



Propriedades antioxidantes, antidiabéticas e perfil fenólico da polpa de seriguela: otimizando processos enzimáticos para agregação de valor a frutos nativos

Palavras-Chave: *Spondias purpurea* L., maceração enzimática, compostos fenólicos

Autores:

Bruna Egilio Macedo; Mariana de Oliveira Silva [FEA – UNICAMP]
Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (orientador) [FEA – UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O consumo de frutas nativas e exóticas tem aumentado nos últimos anos devido ao seu valor nutricional, mas também porque as frutas são reconhecidas como importantes fontes de compostos bioativos (Assis et al., 2021). No entanto, algumas espécies ainda são pouco exploradas comercialmente, como por exemplo, a seriguela (*Spondias purpurea* L.).

A serigueleira é uma árvore nativa das Américas do Sul e Central e os seus frutos possuem formato ovoide, com coloração variando do verde ao vermelho e apresentam uma polpa aromática, com sabor agrídoce. Os frutos de seriguela são ricos em compostos fenólicos como ácido protocatecuico, ácido vanílico, rutina e catequina (Omena et al., 2012; Silva et al., 2016; Cancino-Labra et al., 2023).

Para melhorar a liberação de compostos bioativos em matrizes alimentares, diversos tipos de técnicas vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas, dentre as quais o tratamento enzimático possui merecido destaque (Granato et al., 2022; Santos et al., 2022). Essa tecnologia consiste em adicionar enzimas específicas ao substrato sob condições brandas de processamento, que atuam na matriz alimentar liberando compostos que geralmente estão complexados com macronutrientes como proteínas e carboidratos, tornando-os mais solúveis e fáceis de recuperar, resultando em maior extração de compostos bioativos (Benchikh et al., 2023).

Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento enzimático sobre as propriedades antioxidantes e antidiabéticas e sobre o perfil fenólico de polpa de seriguela (*Spondias purpurea* L.).

METODOLOGIA:

As polpas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) foram adquiridas da empresa Frutaboa localizada na cidade de Limoeiro do Norte (Ceará, Brasil). As polpas de frutas foram transportadas sob refrigeração, ao abrigo de luz até o Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA - Unicamp e foram utilizadas para o tratamento enzimático.

Para o tratamento enzimático foram utilizadas as enzimas Pectinex® Ultra SP-L (pectinase), Celluclast® 1.5L (celulase) e Viscozyme® L (complexo multienzimático de carboidrases), adquiridas da empresa Novozymes. A polpa foi diluída em uma proporção de 1:1 (m:v) em tampão de acetato (100 mmol/L, pH 5,0) para ajuste do pH. A mistura de reação foi incubada a 40 °C sob agitação de 100 rpm por 40 minutos utilizando as diferentes preparações enzimáticas e suas combinações (na concentração final de 0,25% v:v), de acordo com o planejamento experimental de misturas (Tabela 1). A polpa sem aplicação de tratamento foi utilizada como controle.

As amostras foram analisadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais (expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de amostra - AGE g⁻¹) (Magro; de Castro, 2020), flavonoides totais e taninos condensados (expressos em mg de catequina equivalente por g de amostra CE g⁻¹) (Rasera; Hilkner; de Castro, 2020); capacidade antioxidante pelos métodos: ABTS e DPPH (Rasera et al., 2019) e FRAP (Santos et al. 2022) (expressa em μmol de Trolox equivalentes por g de amostra - μmol TE g⁻¹); as propriedades antidiabéticas foram estimadas pela inibição das atividades de α-amilase e de α-glicosidase (valores expressos em %) (Ohara et al., 2020); a identificação dos compostos fenólicos foi realizada por HPLC (resultados expressos em μg de composto por g de amostra - μg g⁻¹) (Dutra et al. 2017).

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental de misturas contendo as composições enzimáticas utilizadas no tratamento da polpa de seriguela.

Ensaio	Pectinex® Ultra SP-L	Celluclast® 1.5L	Viscozyme® L
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

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos para cada ensaio do Planejamento Experimental de Misturas (Tabela 2), demonstraram que o teor de compostos fenólicos totais variou de 2,14 a 3,59 mg AGE g⁻¹. De forma geral, a aplicação do tratamento enzimático afetou de forma positiva a polpa de seriguela, atingindo um valor máximo de 3,59 mg AGE g⁻¹ (ensaio 4), com aplicação da mistura binária (Pectinex® Ultra SP-L e Celluclast® 1.5L) em iguais proporções. O tratamento enzimático nesse caso resultou em um aumento percentual de 68,10% quando comparado ao ensaio controle.

Para a determinação de flavonoides totais e taninos condensados, a polpa de seriguela tratada com a mistura ternária das enzimas Pectinex® Ultra SP-L (1/6), Celluclast® 1.5L (1/6) e Viscozyme® L (2/3) (ensaio 10) apresentou o maior teor desses compostos, atingindo valores de 1,98 mg CE g⁻¹ para flavonoides e 1,09 mg CE g⁻¹ para taninos condensados, resultando em um aumento percentual de 94% e 110%, respectivamente, em relação ao ensaio de controle.

Já os valores de capacidade antioxidante medidos pelo método ABTS variaram de 31,98 a 60,91 μmol TE g⁻¹, enquanto os obtidos para os métodos DPPH e FRAP variaram de 23,75 a 33,41 e de 17,37 a 34,54 μmol TE g⁻¹, respectivamente. Para os métodos ABTS e FRAP, foram observados aumentos de 90,45% e 79,83%, respectivamente, na capacidade antioxidante quando a polpa foi tratada com a mistura ternária de Pectinex® Ultra SP-L (1/6), Celluclast® 1.5L (1/6) e Viscozyme® L (2/3) (ensaio 10). Já para o método DPPH, a aplicação da enzima Celluclast® 1.5L de forma isolada (ensaio 2), resultou em uma amostra com maior aumento percentual (40,66%) quando comparado ao controle (Tabela 2).

Em relação ao potencial antidiabético das amostras após o tratamento enzimático, o melhor percentual de inibição foi observado no ensaio 5, onde a amostra foi tratada com a combinação de Pectinex® Ultra SP-L e Viscozyme® L, em iguais proporções, com capacidade de inibição de 0,91 e 48,34% para α-amilase e α-glicosidase, respectivamente (Tabela 3).

O tratamento enzimático tem sido considerado uma boa estratégia para melhorar a extração de compostos fenólicos nos alimentos. Para tal, essa tecnologia faz uso de pectinases, celulases, proteases, dentre outras enzimas, as quais atuam aumentando a solubilização do tecido vegetal pela hidrólise de macromoléculas. Como consequência, as amostras hidrolisadas podem apresentar maior conteúdo de compostos bioativos, o que resulta em um produto com melhores propriedades bioativas e nutricionais (GRANATO et al., 2022; SANTOS et al., 2022).

Tabela 2. Teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante da polpa de seriguela (*Spondias purpurea* L.) antes e após o tratamento enzimático em função dos ensaios definidos no planejamento experimental de misturas.

Teor de compostos bioativos						
Ensaio	Fenólicos totais (mg AGE g ⁻¹)	Δ (%) ¹	Flavonoides totais (mg CE g ⁻¹)	Δ (%) ¹	Taninos condensados (mg CE g ⁻¹)	Δ (%) ¹
Controle	2,14 ± 0,13 ^d	-	1,02 ± 0,25 ^{bc}	-	0,52 ± 0,29 ^a	-
1	3,31 ± 0,23 ^{ab}	55%	1,42 ± 0,45 ^{ab}	32%	1,03 ± 0,35 ^a	96%
2	2,60 ± 0,32 ^{cd}	21%	1,20 ± 0,08 ^{ab}	17%	0,95 ± 0,23 ^a	81%
3	2,63 ± 0,12 ^{cd}	23%	1,49 ± 0,15 ^{ab}	90%	1,02 ± 0,13 ^a	94%
4	3,59 ± 0,27 ^a	68%	1,10 ± 0,55 ^{abc}	7%	0,66 ± 0,26 ^a	27%
5	3,07 ± 0,24 ^{abc}	44%	1,62 ± 0,12 ^{ab}	58%	0,58 ± 0,28 ^a	10%
6	3,23 ± 0,26 ^{ab}	51%	0,21 ± 0,19 ^c	-79%	0,79 ± 0,23 ^a	51%
7	3,47 ± 0,17 ^a	62%	1,53 ± 0,11 ^{ab}	49%	0,87 ± 0,25 ^a	66%
8	2,87 ± 0,18 ^{bc}	34%	1,64 ± 0,27 ^{ab}	60%	0,64 ± 0,30 ^a	22%
9	3,39 ± 0,04 ^a	59%	1,17 ± 0,07 ^{ab}	14%	1,00 ± 0,30 ^a	91%
10	3,54 ± 0,16 ^a	65%	1,98 ± 0,56 ^a	94%	1,09 ± 0,23 ^a	110%

Capacidade antioxidante						
Ensaio	ABTS (μmol TE g ⁻¹)	Δ (%)	DPPH (μmol TE g ⁻¹)	Δ (%)	FRAP (μmol TE g ⁻¹)	Δ (%)
Controle	31,98 ± 0,70 ^d	-	23,75 ± 3,06 ^d	-	17,37 ± 0,49 ^e	-
1	57,79 ± 0,31 ^a	80%	29,22 ± 1,83 ^{abcd}	23%	24,42 ± 2,42 ^d	40%
2	38,47 ± 0,72 ^c	20%	33,41 ± 1,17 ^a	41%	30,59 ± 0,74 ^{abc}	76%
3	45,94 ± 1,75 ^b	43%	27,17 ± 2,70 ^{bcd}	14%	32,52 ± 2,89 ^{ab}	87%
4	39,33 ± 1,39 ^c	23%	29,51 ± 1,54 ^{abc}	24%	25,40 ± 1,28 ^d	46%
5	33,14 ± 0,34 ^d	4%	30,69 ± 1,09 ^{ab}	30%	29,42 ± 0,24 ^{bcd}	70%
6	40,64 ± 3,07 ^c	27%	25,16 ± 4,50 ^{cd}	6%	28,00 ± 1,02 ^{cd}	61%
7	39,75 ± 1,67 ^c	24%	29,25 ± 2,32 ^{abc}	23%	32,33 ± 2,62 ^{abc}	86%
8	42,10 ± 2,97 ^{bc}	32%	32,29 ± 1,16 ^{ab}	36%	31,23 ± 0,63 ^{abc}	80%
9	60,52 ± 3,42 ^a	89%	30,15 ± 1,33 ^{abc}	27%	31,14 ± 3,54 ^{abc}	79%
10	60,91 ± 1,31 ^a	90%	30,60 ± 1,40 ^{abc}	29%	34,54 ± 0,78 ^a	98%

Os valores foram expressos como a média (triplicata) ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os resultados pelo teste de Tukey. Δ (%)¹: A variação percentual dos resultados foi calculada considerando a diferença entre os valores obtidos para as amostras hidrolisadas (testes 1 a 10) em relação ao teste de controle (não hidrolisado).

Tabela 3. Determinação da capacidade de inibição de α-amilase e α-glicosidase antes e após o tratamento enzimático em função dos ensaios definidos no planejamento experimental de misturas.

Ensaio	Inibição α-amilase (%)	Inibição α-glicosidase (%)
Controle	4,20 ± 0,82 ^{de}	38,95 ± 0,85 ^c
1	3,97 ± 0,93 ^{de}	29,01 ± 1,78 ^f
2	5,17 ± 1,26 ^{cde}	26,51 ± 0,72 ^f
3	6,92 ± 1,06 ^{bcd}	26,79 ± 2,42 ^f
4	2,44 ± 0,69 ^{ef}	43,92 ± 0,66 ^d
5	0,91 ± 0,43 ^f	48,34 ± 0,41 ^c
6	3,07 ± 0,62 ^{ef}	47,51 ± 1,10 ^c
7	0,41 ± 0,02 ^f	53,03 ± 0,62 ^b
8	12,91 ± 2,38 ^a	58,07 ± 1,84 ^a
9	8,22 ± 0,46 ^b	48,06 ± 0,41 ^c
10	7,57 ± 0,24 ^{bc}	42,26 ± 1,01 ^d

Os valores foram expressos como a média (triplicata) ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os resultados pelo teste de Tukey. Δ (%)¹: A variação percentual dos resultados foi calculada considerando a diferença entre os valores obtidos para as amostras hidrolisadas (testes 1 a 10) em relação ao teste de controle (não hidrolisado).

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada na polpa de seriguela após a aplicação do tratamento enzimático que foi selecionado como o mais adequado tanto com relação à recuperação de compostos fenólicos e propriedades antioxidantes quanto em relação às propriedades antidiabéticas, da seguinte forma: polpa tratada com a mistura ternária de Pectinex® Ultra SP-L (1/6), Celluclast® 1.5L (1/6) e Viscozyme® L (2/3) (ensaio 10) e polpa tratada com a mistura binária de Pectinex® Ultra SP-L (1/2) e Viscozyme® L (1/2) (ensaio 5), respectivamente.

Na etapa de identificação dos compostos fenólicos por HPLC, foi possível confirmar que a aplicação do tratamento enzimático culminou no aumento da recuperação de compostos fenólicos, quando comparados ao ensaio controle (sem aplicação do tratamento) (Tabela 4). Na polpa da seriguela tratada sob as condições do ensaio 10 foram identificados nove compostos, sendo seis ácidos fenólicos (ácido gálico, protocatecuico, vanílico, cafeico, p-cumárico e ferúlico) e três flavonoides (catequina, rutina e miricetina). Já na polpa tratada sob as condições do ensaio 5 foram identificados seis compostos, sendo quatro ácidos fenólicos (ácido gálico, protocatecuico, vanílico e cafeico) e dois flavonoides (catequina e rutina).

O ácido fenólico majoritariamente detectado foi o ácido gálico, tanto no ensaio 10 ($377,15 \mu\text{g g}^{-1}$) quanto no ensaio 5 ($282,34 \mu\text{g g}^{-1}$), representando um aumento de 137% e 78%, respectivamente, em relação ao controle ($158,86 \mu\text{g g}^{-1}$). Já o principal flavonoide identificado foi a rutina, tanto no ensaio 10 ($36,98 \mu\text{g g}^{-1}$) como no ensaio 5 ($28,34 \mu\text{g g}^{-1}$), com aumentos de 77% e 36%, respectivamente, quando comparados ao controle ($20,83 \mu\text{g g}^{-1}$). Diversas bioatividades têm sido relacionadas ao ácido gálico, dentre as quais estão atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras (Salas et al., 2013). Estudos relatam que compostos como rutina e miricetina apresentam vários efeitos benéficos à saúde do organismo e podem agir como antioxidantes, antidiabéticos, anti-inflamatórios e gastroprotetores (Semwal et al., 2021).

O ácido p-cumárico foi identificado somente após a aplicação do tratamento enzimático, sugerindo que o uso das enzimas em combinação não só melhorou como permitiu a recuperação desse composto fenólico. De acordo com Kilic & Yesiloglu (2013), o ácido p-cumárico apresenta várias bioatividades incluindo funções como antioxidante, antimicrobiano e antimutagênico. Em matrizes vegetais, os ácidos fenólicos ocorrem principalmente na forma insolúvel, enquanto os flavonoides são encontrados na forma solúvel (Inada et al., 2015), o que nos mostra a importância de aplicar o tratamento enzimático como estratégia para aumentar a extração desses compostos presentes na polpa da seriguela, que anteriormente estariam complexados com macronutrientes, como as proteínas e os carboidratos.

Tabela 4. Identificação de compostos fenólicos por HPLC em polpa de seriguela antes e depois do tratamento enzimático com mistura ternária de Pectinex®, Celluclast® 1.5L e Viscozyme® L (ensaio 10 – ensaio mais adequado para recuperação de compostos fenólicos e propriedades antioxidantes) e mistura binária de Pectinex® e Viscozyme® L (ensaio 05 – ensaio mais adequado para propriedades antidiabéticas).

Compostos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)					Parâmetros de validação		
	Ensaio controle	Ensaio 10	Δ (%)	Ensaio 05	Δ (%)	LOD (μg) ¹	LOQ (μg) ²	Linearidade (R^2)
Ácido gálico	158,86 ± 38,29	377,15 ± 6,26	137%	282,34 ± 6,28	78%	0,55	1,69	0,9956
Ácido protocatecuico	4,31 ± 0,14	6,00 ± 0,80	40%	22,22 ± 1,15	270%	0,02	0,07	0,9980
Ácido vanílico	71,67 ± 21,36	296,55 ± 36,36	313%	175,39 ± 6,72	145%	0,07	0,21	0,9561
Ácido cafeico	15,12 ± 1,01	40,73 ± 21,96	170%	34,35 ± 5,28	127%	0,07	0,23	0,9978
Ácido p-cumárico	-	3,27 ± 0,02	-	-	-	0,16	0,48	0,9970
Ácido ferúlico	55,58 ± 0,05	68,50 ± 0,41	14%	-	-	0,03	0,09	0,9895
Catequina	10,28 ± 0,02	13,49 ± 2,97	31%	13,13 ± 0,86	28%	0,26	0,79	0,9914
Rutina	20,83 ± 0,01	36,98 ± 0,11	77%	28,34 ± 0,03	36%	0,06	0,20	0,9999
Miricetina	12,92 ± 0,61	27,98 ± 0,18	116%	-	-	0,06	0,18	0,9994

CONCLUSÕES:

A partir das análises realizadas, foi possível demonstrar que a maceração enzimática foi eficaz no tratamento da polpa de seriguela, o que resultou em uma maior extração de compostos fenólicos e um aumento de suas propriedades bioativas. A análise por HPLC permitiu a identificação de nove compostos fenólicos, com predominância do ácido gálico e da rutina em ambos os ensaios, confirmando a eficiência do tratamento enzimático na liberação dos compostos de interesse, possibilitando também estabelecer uma correlação entre a presença desses compostos com o aumento do potencial antioxidante e antidiabético da polpa. Os resultados obtidos oferecem uma oportunidade para um processo que pode ser aplicado industrialmente para melhorar as propriedades funcionais de frutas nativas ainda pouco exploradas comercialmente.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente a Deus e à minha família por me dar as condições necessárias para me manter na Unicamp, ao CNPq/PIBIC e à Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP) da Unicamp pela bolsa de iniciação científica e principalmente ao Professor Doutor Ruann Janser Soares de Castro e à Mariana de Oliveira Silva pela oportunidade de desenvolvimento do projeto, por toda ajuda e ensinamentos. Agradeço também a todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela parceria neste ano.

BIBLIOGRAFIA

ASSIS, B.B.T. et al. Biotransformation of the Brazilian Caatinga fruit-derived phenolics by *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Lactocaseibacillus casei* 01 impacts bioaccessibility and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 146, p.110435, 2021.

BENCHIKH, Y. et al. Extraction of phenolic compounds. **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**, p. 329-354, 2023.

CANCINO-LABRA, S. et al. Phenophase description in dry-season *Spondias purpurea* L. using a modified version of the BBCH scale. **Scientia Horticulturae**, v. 318, p. 112086, 2023.

DUTRA, R. L. T. et al. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650–657, 2017.

INADA, K. O. P. et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422–433, 2015.

KILIÇ, I., & YEŞİLOĞLU, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 719–724, 2013.

MAGRO, A.E.A. et al. Solid-state fermentation as an efficient strategy for the biotransformation of lentils: enhancing their antioxidant and antidiabetic potentials. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, p.36, 2020.

OMENA, C. M. B. et al. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 334–344, 2012.

OHARA, A. et al. Improving the antioxidant and antidiabetic properties of common bean proteins by enzymatic hydrolysis using a blend of proteases. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 39, p. 100-108, 2020.

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.

SALAS, M. G. et al. (2013). Actividad anticancerígena del ácido gálico en modelos biológicos in vitro. **Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 5, n. 9, 55–11, 2013.

SANTOS, K.L. de. O.; DACCACHE, I.S.C.; de CASTRO, R.J.S. Synergistic action of multiple enzymes resulting in efficient Hydrolysis of banana bracts and products with improved antioxidant properties. **Processes**, v. 10, p. 1807, 2022.

SEM WAL, R. et al. Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value. **Phytochemistry Letters**, v. 46, p. 119–128, 2021.

SILVA, R. V. et al. 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.

GRANATO, D. et al. 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.