



EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ENZIMAS DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE CASCAS DE ABÓBORA: UMA ALTERNATIVA PARA O APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS COM POTENCIAL BIOATIVO

Palavras-Chave: *Curcubita*, Hidrólise Enzimática, Resíduos Agroindustriais

Autores:

PEDRO HENRIQUE SERAIN DE OLIVEIRA, FEA – UNICAMP

JAYME CÉSAR DA SILVA JÚNIOR, FEA – UNICAMP

Prof. Dr. RUANN JANSER SOARES DE CASTRO (orientador), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A abóbora é uma hortaliça extensivamente cultivada em todo o mundo (JAHAN et al., 2023), com destaque para o continente asiático que detém a maior parte da produção mundial (~60%) (FAOSTAT, 2020). Em sua composição, a abóbora apresenta-se como fonte de nutrientes e moléculas biologicamente ativas exercendo efeitos benéficos à saúde, como atividade antioxidante (AMIN et al., 2020; JAHAN et al., 2023). Usualmente, a polpa da abóbora é parte mais consumida e se apresenta como um ingrediente versátil no preparo gastronômico em pratos doces e em salgados. Entretanto, o processamento da abóbora produz resíduos como cascas e sementes. As sementes, em determinadas regiões do mundo, são consumidas na forma in natura ou processadas (KOTECKA-MAJCHRZAK et al., 2020). Com relação às cascas, na maioria das vezes são descartadas e podem ser consideradas resíduos, mas do ponto de vista químico, sua composição apresenta componentes bioativos que podem desempenhar um importante papel em sistemas vivos (YANG et al., 2022a). As cascas de abóbora são fontes extraordinárias de ácidos fenólicos e flavonoides, podendo ser utilizadas no enriquecimento de alimentos, agregando valor a este resíduo (HUSSAIN et al., 2022; NOH et al., 2022).

A hidrólise enzimática apresenta-se como uma alternativa promissora no tratamento de resíduos e possibilita maior recuperação de compostos bioativos, a técnica é considerada um método eficiente e ambientalmente amigável, pois o controle de parâmetros é de fácil condução, utilizada condições brandas de processo e não gera resíduos tóxicos. Enzimas podem atuar diretamente na matriz vegetal, desestruturando os componentes, o que resulta no aumento da extração de compostos menos solúveis e/ou conjugados com outros componentes da parede celular (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021; RADENKOVS et al., 2018).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por finalidade avaliar os efeitos da extração assistida por enzimas sobre o conteúdo de compostos fenólicos e sobre as propriedades antioxidantes de extratos obtidos a partir das cascas de abóbora moranga (*Curcubita maxima*) e abóbora manteiga (*Curcubita moschata* D.).

METODOLOGIA:

AQUISIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO

As amostras de Abóbora Batã (**AB**) foram gentilmente doadas pela empresa Mallamann (Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil). Já as amostras de Abóbora Moranga (**AM**) foram adquiridas no comércio local de Campinas (São Paulo, Brasil). As abóboras foram então selecionadas por avaliação visual e manual, de forma que fossem isentas de quaisquer injúrias mecânicas e/ou causadas por micro-organismos. As abóboras foram descascadas manualmente; as cascas foram separadas, trituradas, congeladas e posteriormente liofilizadas. Após o processo de liofilização, as cascas foram submetidas à trituração para redução da granulometria e a farinha obtida foi armazenada sob congelamento (-18°C).

TRATAMENTO ENZIMÁTICO DAS CASCAS DE ABÓBORA

Para execução do estudo foram utilizados as preparações enzimáticas comerciais (Sigma-Aldrich) Flavourzyme® 500L (protease), Celluclast® 1.5L (celulase) e Viscozyme® L (mistura de carboidrases). Os tratamentos enzimáticos das cascas de AB e AM foram realizados de acordo com as condições estabelecidas no planejamento experimental de misturas (**Tabela 1**). Os ensaios contemplaram a aplicação das enzimas de maneira isolada, ou em combinações (binárias/ternárias) em 6 níveis: 1) 0 (0%), 2) 1/6 (16,67%), 1/3 (33%), 1/2 (50%), 2/3 (66,67%) e 1 (100%) (**Tabela 1**). Dispersões de 50 mL das cascas de abóbora (AB e AM) (5% m:v) em tampão acetato (100 mmol/L, pH 5,0) foram adicionadas das enzimas e incubadas em banho termostático na temperatura de 45°C por 2h de sob agitação de 100 rpm. A concentração final de enzimas na mistura reacional foi de 0,5% (v:v). Um ensaio controle, onde as cascas foram incubadas sob as mesmas condições de hidrólise, mas sem a adição de enzimas, foi preparado para avaliação comparativa. Após a realização da hidrólise enzimática, as soluções foram resfriadas em banho de gelo para paralisação das reações enzimáticas; na sequência os hidrolisados foram congelados e liofilizados para posteriores análises.

Tabela 1 – Matriz de planejamento experimental de misturas utilizado para determinação do tratamento enzimático mais adequado para recuperação de compostos com atividade antioxidante a partir de cascas de abóbora.

Ensaio	Protease (Flavourzyme® 500L)	Celulase (Celluclast® 1.5L)	Mistura de Carboidrases (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

TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

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) e à 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).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, realizado com auxílio do software Minitab[®]19 de Minitab Inc. (Pensilvânia, EUA). Os valores foram expressos como média aritmética e considerados estaticamente diferentes quando os valores de *p* inferior a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados referentes ao Teor de Fenólicos Totais (TFT) e a atividade antioxidante total por diferentes métodos estão apresentados na **Tabela 2**. Os compostos fenólicos são substâncias bioativas presente em vegetais, sendo considerados metabólitos secundários e estão amplamente presentes em espécies de abóbora, e podem desempenhar funções benéficas ao organismo ou aos sistemas que compõem, como atividade antioxidante (YANG et al. 2022b). Os valores obtidos para o TFT mostraram que os tratamentos enzimáticos foram eficientes em aumentar a extração dessa classe de compostos. Independente da variedade de abóbora utilizada, na maior parte dos casos, o TFT foi superior à amostra controle. Para AB, os maiores destaques são para ensaios utilizando misturas de enzimas, a saber: ensaio 5 (iguais proporções de Flavourzyme e Viscozyme) e ensaio 9 (1/6 de Flavourzyme, 2/3 de Celluclast e 1/6 de Viscozyme), que resultaram em aumentos de 74,54 e 75,20% no TFT, respectivamente, em relação ao controle. Para AM, a maior variação percentual foi detectada no ensaio 4 (iguais proporções de Flavourzyme e Celluclast), com aumento de 219,07% no TFT em relação ao controle.

Para atividade antioxidante mensurada pelo método ABTS, o maior destaque foi para o ensaio 1, no qual a enzima Flavourzyme (protease) foi aplicada isoladamente; os extratos obtidos nessa condição apresentaram aumentos de 30,06 e 20,79% em relação ao controle, para as variedades AB e AM, respectivamente. Já para o método DPPH, não houve grande variação entre os extratos produzidos nos diferentes ensaios, sendo a maior parte dos valores considerados estatisticamente iguais (*p* > 0,05). Já para o método FRAP, as amostras hidrolisadas apresentaram, na maioria dos casos, redução da atividade antioxidante e onde a variação foi positiva, o resultado não diferiu estatisticamente (*p* > 0,05) do controle.

Embora os compostos fenólicos estejam fortemente associados com propriedades antioxidantes, os extratos obtidos após o tratamento enzimático não apresentaram aumento tão expressivo desta atividade. É importante ressaltar que não só a quantidade, mas o tipo de composto recuperado vai exercer maior ou menor certo tipo de atividade, o que pode justificar os resultados observados. Ademais, os métodos antioxidantes in vitro são baseados em diferentes mecanismos de ação e a capacidade de certo composto antioxidante em reagir ou não com um determinado radical livre doando elétrons ou átomos de H vai mudar sensivelmente de acordo com o método de avaliação assim como com os compostos envolvidos na reação.

Tabela 2 – Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) mensurados para as amostras de cascas de diferentes espécies de abóbora hidrolisadas enzimaticamente.

ABÓBORA BATÃ (AB)								
ENSAIO	TFT (mg AGE ⁻¹)	Δ% ^{**}	ABTS (μmol TE ⁻¹)	Δ% ^{**}	DPPH (μmol TE ⁻¹)	Δ% ^{**}	FRAP (μmol TE ⁻¹)	Δ% ^{**}
Controle*	2,95 ^{cd} ± 0,11		23,28 ^{de} ± 2,14		17,27 ^{ab} ± 0,40		8,73 ^{ab} ± 0,40	
1	4,81 ^a ± 0,09	63,10	30,28 ^b ± 0,56	30,06	18,81 ^a ± 0,74	8,92	9,43 ^a ± 0,23	7,96
2	2,56 ^d ± 0,12	-13,30	20,93 ^c ± 2,14	-10,09	15,07 ^c ± 0,42	-12,73	7,19 ^c ± 0,15	-17,61
3	3,22 ^{cd} ± 0,20	9,17	23,07 ^{de} ± 2,44	-0,90	15,31 ^c ± 0,15	-11,38	7,26 ^c ± 0,11	-16,85
4	3,74 ^{bc} ± 0,08	26,92	27,96 ^{bcd} ± 0,91	20,08	17,49 ^{ab} ± 0,54	1,26	8,83 ^{ab} ± 0,10	1,20
5	5,15 ^a ± 0,15	74,54	28,34 ^{bc} ± 1,88	21,73	17,01 ^b ± 0,16	-1,50	9,07 ^{ab} ± 0,13	3,88
6	3,18 ^{cd} ± 0,08	7,74	21,27 ^e ± 2,11	-8,66	16,02 ^{bc} ± 0,29	-7,24	6,91 ^c ± 0,21	-20,90
7	4,79 ^a ± 0,10	62,22	24,57 ^{cde} ± 0,81	5,55	17,33 ^{ab} ± 1,16	0,34	8,60 ^b ± 0,17	-1,54
8	4,82 ^a ± 0,03	63,37	23,56 ^{cde} ± 2,22	1,19	17,17 ^{ab} ± 0,45	-0,60	8,69 ^{ab} ± 0,16	-0,40
9	5,17 ^a ± 0,62	75,20	23,01 ^{de} ± 2,17	-1,16	17,18 ^{ab} ± 0,32	-0,51	8,35 ^b ± 0,11	-4,30
10	4,40 ^{ab} ± 0,28	48,99	72,69 ^a ± 0,53	-5,79	17,54 ^{ab} ± 0,97	1,56	9,05 ^{ab} ± 0,61	3,63
ABÓBORA MORANGA (AM)								
ENSAIO	TFT (mg AGE ⁻¹)	Δ% ^{**}	ABTS (μmol TE ⁻¹)	Δ% ^{**}	DPPH (μmol TE ⁻¹)	Δ% ^{**}	FRAP (μmol TE ⁻¹)	Δ% ^{**}
Controle*	1,98 ^f ± 0,06		29,25 ^{bcd} ± 1,78		18,83 ^{abc} ± 0,55		14,00 ^{ab} ± 0,85	
1	5,60 ^b ± 0,13	182,59	35,33 ^a ± 1,11	20,79	20,33 ^a ± 1,30	7,99	13,55 ^b ± 0,27	-3,18
2	4,87 ^c ± 0,11	146,05	33,95 ^a ± 0,75	16,07	18,80 ^{abc} ± 0,73	-0,15	13,27 ^b ± 0,33	-5,20
3	4,21 ^d ± 0,17	112,73	26,80 ^d ± 0,96	-8,39	17,01 ^c ± 0,39	-9,67	9,91 ^{cd} ± 0,27	-29,22
4	6,32 ^a ± 0,06	219,07	35,11 ^a ± 0,73	20,02	19,58 ^{ab} ± 0,98	3,96	14,91 ^a ± 0,40	6,52
5	5,53 ^b ± 0,08	179,45	30,39 ^{bc} ± 0,68	3,91	18,38 ^{abc} ± 0,68	-2,39	9,64 ^{cd} ± 0,30	-31,18
6	4,12 ^d ± 0,10	108,28	26,96 ^{cd} ± 2,14	-7,83	17,41 ^{bc} ± 0,26	-7,52	9,22 ^d ± 0,21	-34,18
7	5,58 ^b ± 0,04	182,01	29,49 ^{bcd} ± 0,87	0,82	20,10 ^a ± 1,06	6,75	10,35 ^c ± 0,27	-26,08
8	5,82 ^b ± 0,07	194,08	31,94 ^{ab} ± 1,29	9,19	18,56 ^{abc} ± 0,50	-0,97	9,87 ^{cd} ± 0,36	-29,48
9	3,62 ^e ± 0,13	82,87	28,32 ^{cd} ± 1,45	-3,18	18,30 ^{abc} ± 0,28	-2,81	10,29 ^c ± 0,32	-26,47
10	5,11 ^c ± 0,02	157,95	28,54 ^{bcd} ± 0,88	-2,42	18,48 ^{abc} ± 1,37	-1,87	9,70 ^{cd} ± 0,17	-30,72

Todos os resultados foram obtidos por meio de média (n = 3) ± desvio padrão. *Ensaio controle realizado sem adição de enzimas. **Variação percentual em relação ao controle.

O maior rendimento de extração de compostos fenólicos durante o tratamento enzimático pode estar ligado à compatibilidade funcional das preparações enzimáticas e suas combinações com a composição estrutural de cascas de abóbora que possui celulose, hemicelulose e proteínas, dentre outros componentes minoritários. As formulações enzimáticas, em especial as combinações de enzimas, possuíam atividades de pectinase, protease, juntamente com enzimas celulolíticas que podem ter hidrolisado eficientemente os carboidratos e proteínas estruturais das cascas de abóbora liberando fenólicos superficialmente aprisionados (livres), bem como glicosidicamente ligados.

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos permitiram concluir que o tratamento enzimático é uma estratégia eficiente na recuperação de fenólicos de cascas de abóbora, aumentando em até 75% e 219% o teor destes compostos nas amostras de abóbora batã e moranga, respectivamente. A atividade antioxidante dos hidrolisados mensurada pelo ABTS foi positivamente afetada pelo processo enzimático, resultando em aumentos de 30% e 20% essa atividade nas amostras de abóbora batã e moranga, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, n. December 2020, p. 200–214, 2021.
- AMIN, M. Z. et al. A comparative assessment of anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-bacterial activities of hybrid and indigenous varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.) seed oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, n. June, p. 101767, 2020.
- FAOSTAT (The Statistics Division of the Organization for Food and Agriculture of the United Nations) (2020). Value of Agricultural Production <http://www.fao.org/faostat>. Acessado em 21 de abril de 2021.
- JAHAN, F. et al. Nutritional characterization and antioxidant properties of various edible portions of *Cucurbita maxima*: A potential source of nutraceuticals. **Heliyon**, 2023.
- KOTECKA-MAJCHRZAK, K. et al. Oilseed proteins – Properties and application as a food ingredient. **Trends in Food Science and Technology**, v. 106, n. October, p. 160–170, 2020.
- MAGRO, A.E.A, DE CASTRO, R. J. S. 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.
- OH, N. A. N. M.; KARIM, L.; OMAR, S. R. Value-added products from pumpkin wastes: A review. **Malaysian Journal of Science Health & Technology**, v. 8, n. 1, p. 77-84, 2022.
- RADENKOVS, V. et al. Non-waste technology through the enzymatic hydrolysis of agro-industrial by-products. **Trends in food science & technology**, v. 77, p. 64-76, 2018.
- 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.
- SANTOS, K. L. 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, n. 9, p. 1807, 2022.
- YANG, Z. et al. Effect of processing on polyphenols in butternut pumpkin (*Cucurbita moschata*). **Food Bioscience**, v. 49, p. 101925, 2022a.
- YANG, Z. et al. Bioaccessibility and bioavailability changes of phenolic compounds in pumpkins (*Cucurbita moschata*): A review. **Food Bioscience**, v. 47, p. 101753, 2022b.