

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 30/03/2024.

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Estudo da hidrólise das proteínas de duas fontes vegetais não convencionais: *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller com proteases obtidas de bioprodutos do figo e o abacaxi: análise do efeito citotóxico e antiproliferativo *in vitro* em células de adenocarcinoma do colon (SW420)

Lady Johana Arismendi Bustamante

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências dos alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dr^a. Juliana Cristina Bassan

Araraquara
2022

Estudo da hidrólise das proteínas de duas fontes vegetais não convencionais: *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller com proteases obtidas de bioprodutos do figo e o abacaxi: análise do efeito citotóxico e antiproliferativo *in vitro* em células de adenocarcinoma do colon (SW420)

Lady Johana Arismendi Bustamante

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências dos alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Juliana Cristina Bassan

Araraquara
2022

-
- A714e** Arismendi-Bustamante, Lady Johana.
Estudo da hidrólise das proteínas de duas fontes vegetais não convencionais: *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller com proteases obtidas de bioprodutos do figo e o abacaxi, análise do efeito citotóxico e antiproliferativo *in vitro* em células de adenocarcinoma do colon (SW420) / Lady Johana Arismendi Bustamante. – Araraquara: [S.n.], 2022.
117 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia dos Alimentos. Área de Concentração Ciências dos Alimentos.
- Orientadora: Juliana Cristina Bassan.
1. *Moringa oleífera* Lam. 2. *Pereskia aculeata* Miller. 3. Bioprodutos. 4. Proteases. 5. Proteínas. 6. Citotoxicidade. 7. Câncer. I. Bassan, Juliana Cristina, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da hidrólise das proteínas de duas fontes vegetais não convencionais: Moringa oleífera Lam e Pereskia aculeata Miller com proteases obtidas de bioprodutos do figo e o abacaxi, análise do efeito citotóxico e antiproliferativo in vitro em células de adenocarcinoma do colon (SW420).

AUTORA: LADY JOHANA ARISMENDI BUSTAMANTE

ORIENTADORA: JULIANA CRISTINA BASSAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA CRISTINA BASSAN (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. MARIA ELENA MALDONADO CELIS (Participação Virtual)
Universidade de Antioquia- Escola de Nutrição e Dietética

Araraquara, 30 de março de 2022

Dedicatória

À meu pai, minha mãe e meu namorado Ricardo,

pelo seu amor e apoio incondicional, por serem a razão da minha vida.

A meu sobrinho Ismael,

por seu amor puro. A tia te ama.

Obrigada, mãe, pai, Ricardo e sobrinho, eu amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro no projeto 88882.461721/2019-01

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e principalmente ao Departamento de Alimentos, Nutrição e Engenharia dos Alimentos pela oportunidade oferecida.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a. Juliana Cristina Bassan, por ter me dado a oportunidade de desenvolver o tão desejado Mestrado. Pelo respeito e paciência. Muito obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli e Mariana Barros de Cerqueira e Silva (Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara) pelo suporte, ajuda, disposição com a obtenção dos cromatogramas.

À Prof^a Dr^a. Maria Elena Maldonado Celis (Escuela de Nutrición y Dietética de la Universidad de Antioquia-Colombia) pela parceria nas análises biológicas.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Alimentos, Nutrição e Engenharia dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo conhecimento oferecido e ajuda nos momentos em que foram solicitados.

Aos que aqui não foram citados, mas que direta ou indiretamente fizeram e fazem parte de minha trajetória e cooperaram para conclusão desse projeto.

A todos, o meu MUITO OBRIGADA.

***Leave nothing to chance. Overlook nothing. Combine
contradictory observations. Allow yourself enough
time.***

Hippocrates

Resumo

Objetivo: estudar a hidrólise das proteínas da farinha das folhas de *Moringa oleífera* Lam (MOF) e *Pereskia aculeata* Miller (PAF) com enzimas obtidas dos bioprodutos de figo e/ou acabaxi e o efeito antiproliferativo e citotóxico dos produtos de hidrólise nas células do adenocarcinoma de colon. **Métodos:** tanto a farinha íntegra das folhas quanto as frações solúveis e insolúveis na água foram hidrolisadas com extratos enzimáticos obtidos de bioprodutos do figo e/ou abacaxi. Os produtos de hidrólise foram avaliados por métodos colorimétricos, eletroforéticos e cromatográficos. A capacidade citotóxica e antiproliferativa dos produtos de hidrólise da MOF com o extrato do figo foi avaliada *in vitro* nas células de adenocarcinoma SW480 pôr o método colorimétrico com sulforodamina B e por citometria de fluxo e detecção de fosfatidilserina, respetivamente. **Resultados:** a hidrólise da fração insolúvel e solúvel da MOF com os bioprodutos de figo e abacaxi gerou mudanças na solubilidade e nos perfis eletroforéticos e cromatográficos das proteínas. Se resalta que a fração insolúvel hidrolisada com o extrato de figo apresentou um incremento significativo de proteína solúvel, resultado que foi detectável pelos diferentes métodos aplicados. Por outra parte, a hidrólise da farinha íntegra (sem separação), permitiu verificar que existe um efeito hidrolítico da enzima ficina sob as proteínas de maior massa molecular (> 97 kDa) da MOF e sob diferentes proteínas da PAF. Dos produtos de hidrólise, a fração solúvel da MOF hidrolisada com ficina por 8h permitiu a obtenção de compostos proteicos com atividade citotóxica, antiproliferativa e pró-apoptótica tempo-dependente no modelo *in vitro* na linhagem de células SW480. **Conclusão:** o estudo evidencia que os extratos enzimáticos obtidos de bioprodutos do figo e abacaxi hidrolisam as proteínas da MOF e/ou PAF, e que os produtos de hidrólise mudam segundo a fração da farinha hidrolisada (solúvel, insolúvel ou farinha íntegra). O efeito citotóxico e antiproliferativo da fração solúvel de MOF hidrolisada com figo foi comprovado *in vitro* nas células de adenocarcinoma de cólon SW480, outros estudos devem ser realizados para as outras frações da MOF e PAF.

Palavras-Chave: *Moringa oleífera* Lam, *Pereskia aculeata* Miller, bioprodutos, proteases, proteínas, citotoxicidade, câncer.

Abstract

Objective: to study the hydrolysis of proteins from the flour of *Moringa oleífera* Lam (MOF) and *Pereskia aculeata* Miller (PAF) leaves with enzymes obtained from fig and/or pineapple by-products, and the antiproliferative and cytotoxic effect of the hydrolysis products on adenocarcinoma cells of colon. **Methods:** the whole flour of the leaves and the soluble and insoluble fractions in water were hydrolyzed with enzymatic extracts obtained from fig and/or pineapple byproducts. The hydrolysis products were evaluated by colorimetric, electrophoretic, and chromatographic methods. The cytotoxic and antiproliferative capacity of the hydrolysis products of MOF with fig extract was evaluated in vitro in SW480 adenocarcinoma cells by the colorimetric method with sulphorodamine B and by flow cytometry and detection of phosphatidylserine, respectively. **Results:** the hydrolysis of the insoluble and soluble fraction of MOF with the fig and pineapple by-products generated changes in the solubility and in the electrophoretic and chromatographic profiles of the proteins. It is noteworthy that the insoluble fraction hydrolyzed with the fig extract showed a significant increase in soluble protein, a result that was detectable by the different methods applied. On the other hand, the hydrolysis of whole flour (without separation) allowed to verify that there is a hydrolytic effect of the ficin enzyme on the higher molecular mass proteins (> 97 KDa) of MOF and on different proteins of the PAF. From the hydrolysis products, the soluble fraction of MOF hydrolyzed with ficin for 8h allowed the obtaining of protein compounds with time-dependent cytotoxic, antiproliferative and pro-apoptotic activity in the *in vitro* model in the SW480 cell line. **Conclusion:** the study shows that the enzymatic extracts obtained from fig and pineapple by-products hydrolyze the MOF and/or PAF proteins, and that the hydrolysis products change according to the fraction hydrolyzed (soluble, insoluble, or whole flour). The cytotoxic and antiproliferative effect of the soluble fraction of MOF hydrolyzed with fig was proven *in vitro* in SW480 colon adenocarcinoma cells, further studies should be performed for the other fractions of MOF and PAF.

Keywords: *Moringa oleífera* Lam, *Pereskia aculeata* Miller, by-products, proteases, proteins, cytotoxicity, câncer.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA: *Analysis of variance.*

BAPNA: *N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride.*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium.*

EBC: *Enzymatic bromelain crown.*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid.*

EFL: *Enzymatic ficin látex ou extrato enzimático do látex do figo.*

HPLC: *High-performance liquid chromatography.*

IC50: *The half maximal inhibitory concentration.*

IMOL: *Insoluble Moringa oleífera Lam fraction*

IP: *Iodeto de propídio.*

MO: *Moringa oleífera Lam.*

MOF: *Moringa oleífera Lam flour ou farinha de Moringa oleífera Lam.*

ODc: *Densidad ótica de controles.*

ODt: *Densidad ótica de tratamentos.*

PA: *Pereskia aculeata Miller*

PAF: *Pereskia aculeata Miller Flour ou farinha de Pereskia aculeata Miller*

PANC: *Non-Conventional Food Plants.*

PBS: *Phosphate buffered saline*

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SE: *Error estándar.*

SRB: *Sulforodamina B*

SW480: *Human colon adenocarcinoma cell line*

SW620: *metastatic human colon adenocarcinoma cell line*

SMOL: *Soluble Moringa oleífera Lam fraction*

TCA: *Trichloroacetic acid solution*

Lista de Tabelas

	Página
Introdução	
Tabela 1. Composição química da farinha de folhas de MOF	16
Tabela 2. Composição das frações proteicas da farinha da folha de MOF	16
Capítulo 1	
Tabela 1. Inactivation constant k_i values for EBC and EFL in pH 7	51
Tabela 2. Comparison of the mean $\pm$ standard-deviation soluble protein scores for type of treatment (treatment or not) with EBC or EFL and time to exposition to temperatura (0-24h) in MOF fractions (soluble or insoluble).	53
Capítulo 2	
Tabela 1. Comparação das médias $\pm$ desvios padrão dos valores de proteína solúvel por tipo de tratamento (tratado ou não tratado) com extrato enzimático de ficina a diferentes tempos de exposição à temperatura (0-5h).	78
Capítulo 3	
Tabela 3. Valores de concentração inibitória do 50% (IC50) nas células SW480 e SW60 tratadas com extrato proteico de MO.	102

Lista de Figuras

	Página
Introdução	
Figura 1. Planta da <i>Moringa oleifera</i> Lam. (A) Arbusto. (B) Partes da <i>Moringa oleifera</i> Lam (13)	17
Figura 2. A) <i>Pereskia aculeata</i> Miller. B) <i>Pereskia grandiflora</i>	18
Figura 3. Ilustração da matriz celular	20
Figura 4. Esquema geral de digestão de proteínas	23
Figura 5. Digestão e absorção dos aminoácidos e oligopeptídeos na mucosa intestinal.	24
Figura 6. Classificação de aminoácidos segundo as características químicas da cadeia lateral	25
Figura 7. A) Mecanismo geral de hidrólise de ligações peptídicas por proteases. B) Representação gráfica simplificada do conceito de endopeptidases e exopeptidases	28
Capítulo 1.	
Figura 1. Effect of the pH (a) and temperature (b) on the activity of ficin (circles) and bromelain (squares).	49
Figura 2. Effect of temperature on enzyme activity over time.	50
Figura 3. Molecular weight distribution of temperature controls and hydrolysis assay of insoluble <i>Moringa oleifera</i> Lam flour (IMOF).	55
Figura 4. Molecular weight distribution of temperature controls and hydrolysis assay of soluble <i>Moringa oleifera</i> Lam flour (SMOF).	57
Figura 5. Chromatographic profile of IMOF hydrolyzed with EBC by different times at temperature of 55 °C.	62
Figura 6. Chromatographic profile of IMOF hydrolyzed with EFL by different times at temperature of 55 °C.	63
Figura 7. Chromatographic profile of SMOF hydrolyzed with EBC by different times at temperature of 55 °C.	64
Figura 8. Chromatographic profile of SMOF hydrolyzed with EFL by different times at temperature of 55 °C.	65
Capítulo 2.	
Figura 1. Folhas de <i>Moringa oleifera</i> Lam.	73
Figura 2. Farinha de <i>Pereskia aculeata</i> Miller.	73

Figura 3. Perfil de massa molecular das proteínas do extrato de MOF não tratado (controle de temperatura e do hidrolisado com o extrato com atividade de ficina)	79
Figura 4. Perfil de massa molecular das proteínas do extrato de PAF não tratado (controle de temperatura) e do hidrolisado com o extrato com atividade de ficina.	80

Capítulo 3

Figura 1. Atividade relativa da ficina usando os substratos caseína e BAPNA em função do pH.	97
Figura 2. Atividade relativa da ficina em função da variação de temperatura, utilizando BAPNA e caseína como substratos	98
Figura 3. SDS-PAGE 10% del extrato aquoso de figo com atividade de ficina..	99
Figura 4. SDS-PAGE 10% representativo do controle de temperatura: extrato aquoso da farinha de folhas de <i>Moringa</i> oleífera Lam exposto a 35°C por diferentes tempos (0-8h).	100
Figura 5. SDS-PAGE 10% representativo dos hidrolizados da farinha de folhas de <i>Moringa</i> oleífera Lam com o extrato de figo com atividade de ficina a 35°C por diferentes tempos (0-8h).	101
Figura 6. Efeito do hidrolisado proteico de MOF digerido por 8h no ciclo celular de SW480. As células (SW480) foram tratadas com o hidrolisado (85µg/mL) por 48h.	103
Figura 7. Efeito do hidrolisado proteico de MOF digerido por 8h na indução de apoptose em células SW480. As células (SW480) foram tratadas com o hidrolisado (85µg/mL) por 48h.	104

Lista de Apêndice

	Página
Apêndice 1. Método INFOGEST adaptado para a digestibilidade gastrointestinal <i>in vitro</i> das farinhas de plantas	112

Sumário

	Página
Introdução	15
Capítulos	
Capítulo 1. Enzymatic hydrolysis of <i>Moringa oleífera</i> Lam Fluor using pineapple and fig by-products as a source of protease.	39
Abstract	41
Introduction	41
Materials and methods	43
Results	48
Discussion	58
Conclusion	60
Supplementary material	62
References	66
Capítulo 2. Avaliação da hidrólise de <i>Moringa oleífera</i> Lam e <i>Pereskia aculeata</i> Miller com o extrato enzimático obtido do figo	70
Resumo	71
Introdução	72
Materiais e métodos	72
Resultados	77
Discussão	81
Conclusão	83
Refêrendias	84
Capítulo 3. Atividade antiproliferativa de hidrolisados de proteína da <i>Moringa oleífera</i> Lam em células de câncer de cólon.	85
Resumo	86
Introdução	88
Materiais e métodos	89
Resultados	96
Discussão	104
Conclusão	106
Refêrendias	107
Considerações finais	110
Referências	111
Apêndice	112

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Moringa oleífera* Lam (MO)

A *Moringa oleífera* é uma planta nativa da Índia que pertence ao família Moringácea do gênero *Moringa* e que possui 14 espécies (1). Atualmente, está distribuída nas Américas, África, Europa e Oceania (2). De todas as espécies, a mais conhecida e cultivada é a *Moringa oleífera* Lam que é popularmente chamada de Zogeli na Nigéria (3) e como moringa, moringueiro (4), lírio branco ou quiabo, quina no Brasil (5). A moringa é uma árvore de rápido crescimento e disseminação que pode crescer tanto em trópicos úmidos quanto em terras quentes e secas (1).

Em relação ao teor de nutrientes presentes nas folhas da planta, valores de proteína entre 20 e 31g/100g foram relatados (6,7). Nas tabelas 1 e 2 são apresentados a concentração aproximada de macro e micro nutrientes encontrados na farinha de folhas de (MOF) cultivada no Estado de Minas Gerais, assim como a caracterização do tipo de proteínas que apresentam principalmente proteínas insolúveis, o que tem sido relacionado com resistência à digestibilidade (8). Outros compostos que têm sido identificados nas folhas são os carotenóides como a luteína (9), neoxantina, violaxantina, β -caroteno-epoxido, β -caroteno (8), e diferentes compostos fenólicos, como os flavonoides (6). No que diz respeito aos fatores anti-nutricionais estão presentes os taninos, nitratos, ácido oxálico e inibidor de tripsina (8).

Tabela 1. Composição química da farinha de folhas de MOF (8)

Frações ^a	Proteínas ^b	
	mg.g ⁻¹ de folhas ^c	Peso (%)
Farinha desengordurada	322,40±1,51	100
Globulina	1,44±0,32	0,45±0,10
Albumina	10,8±1,19	3,13±0,37
Glutelina	11,11±0,27	3,45±0,08
Prolamina	6,95±0,16	2,16±0,05
Proteína insolúvel	226,01±3,17	70,1±0,98

Tabela 2. Composição das frações proteicas da farinha da folha de MOF (8)

Constituintes	Quantidade (g.100g ⁻¹)
Umidade	9,0±0,17
Proteínas	28,65±0,04
Lípidios	7,09±0,43
Cinzas	10,9±0,8
Carboidratos*	44,36* calculado pela diferença
Minerais	(mg.100 g ⁻¹)
Cálcio	2,97
Magnésio	1,9
Zinco	1,58
Potássio	4,16
Ferro	103,12
Cobre	3,38

^aSubdivisão de “Osborne”.

^b Peso%.N × 6.25: determinado por método de Kjeldahl.

^c O resultado representa a média ±SD para 3 determinações.

Com relação ao consumo humano, quase todas as partes da moringa são utilizadas (10). As vagens são consumidas em diferentes graus de maturação, as sementes podem ser fritas, o que confere gosto parecido com o de amendoim, ou serem usadas para produção de óleo (10); flores, frutas e raízes também são usados para consumo humano (5). Em relação às folhas, estas podem ser

consumidas frescas ou cozidas (11). Nas Filipinas elas são chamadas de “*mother’s best friend*” (“melhor amiga da mãe”) porque tem sido demonstrado que seu consumo poderia aumentar a produção de leite materno (12). Na Figura 1 é apresentado o arbusto de MO com suas respectivas partes.

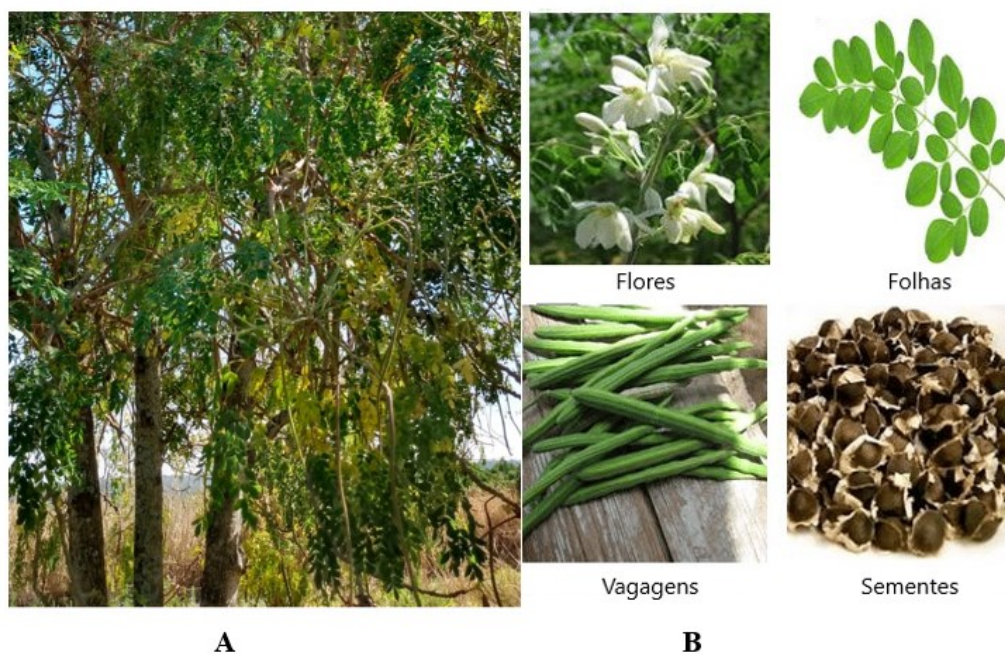


Figura 1. Planta da *Moringa oleifera* Lam. (A) Arbusto. (B) Partes da *Moringa oleifera* Lam (13)

Entre os compostos fenólicos que têm sido identificados nas folhas da MO encontram os ácidos gálico, elágico, cafeico, p-cumarico e clorogênico (6), que conferem às plantas propriedades antioxidantes (14). Em relação a outras atividades biológicas existem estudos que relatam que extratos das folhas de MO diminuem a proliferação de células de melanoma B16F10 e causam apoptose de células cancerígenas (15). Atividade anticâncer também tem sido relatada contra o câncer de mama, cólon (16) de fígado e pulmão (17).

1.2. *Pereskia aculeata* Miller (PA)

Pereskia aculeata Miller e *Pereskia grandifolia* também são plantas alimentícias não convencionais (PANC) que pertencem à família Cactaceae e à subfamília Pereskioideae (Figura 2). Elas são popularmente conhecidas como Ora-pro-nóbis, trepadeiras-limão e groselhas-de-barbados (18). Essas plantas são nativas da América e predominam em áreas áridas e são menos prevalentes em áreas mésicas (19). Sua presença tem sido relatada em regiões do Caribe, América Central e América do Sul (20), incluindo o norte da Argentina, leste da costa andina do Peru, oeste do Paraguai, Uruguai e Brasil nos Estados da Bahia, Rio Grande do Sul (18), Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (21).



Figura 2. A) *Pereskia aculeata* Miller. B) *Pereskia grandiflora*. (22)

Entre as principais diferenças da *Pereskia aculeata* Miller e *Pereskia grandifolia* destaca-se que a primeira possui flores amarelas e a segunda flores roxas, sendo as folhas de ambas plantas consumidas no Brasil, porém, a *Pereskia grandifolia* é

cultivada principalmente como planta ornamental. Em relação à *Pereskia aculeata* Miller, diferentes estudos tem relatado alto teor de proteína em folhas secas, entre 17g/100g e $28,99 \pm 0,59$ g/100g (23–26) e uma digestibilidade proteica de aproximadamente 75,9%(25).

Entre os aminoácidos encontrados em maior proporção nas folhas secas de *Pereskia aculeata* Miller estão a lisina e o triptofano e em menor proporção a metionina e a cisteína (25). A presença de compostos antinutricionais como inibidores de protease e lecitina também tem sido relatada (27). Outros nutrientes que foram relatados nas análises químicas das folhas secas da *Pereskia aculeata* Miller são fibras (39,2g/100g) e minerais de grande importância nutricional, como o ferro, cálcio, magnésio, manganês e zinco (26).

Com relação às formas de consumo da planta, um estudo realizado em um município de Minas Gerais em 2012 mostrou que os participantes afirmaram consumir a planta em diferentes tipos de preparações, como em refogados, saladas cruas, sopas, omelete, arroz e feijão (28). Devido ao alto potencial nutricional desta planta no Brasil, pesquisas têm sido realizadas sobre o desenvolvimento e formulação de produtos como pães (23) e macarrão (29) que buscam promover o uso da planta como um ingrediente de alimentos de consumo popular.

Além do estudo da *Pereskia aculeata* Miller como fonte de proteínas e como ingrediente alimentar para o desenvolvimento de novos produtos, alguns trabalhos têm focado a análise das atividades biológicas da planta, por exemplo, um estudo

demostrou que o extrato metanólico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller contém compostos fenólicos que poderiam ter um efeito citotóxico seletivo *in vitro* contra células de leucemia promielocítica humana e células de adenocarcinoma de mama humano (HL60 e MCF-7), respectivamente (30). Outro estudo relatou o efeito citotóxico de extratos a base de clorofórmio contra linhagens celulares de neuroblastoma SH-SY5Y (31)

1.3. Disponibilidade das proteínas na matriz celular das plantas.

Os componentes dos tecidos vegetais formam uma matriz com diversas interações (Figura 3) que ainda não são entendidas em sua totalidade (32,33). A esse respeito, existem diversas teorias, uma das mais aceitas é a teoria da **“tethered network”** a qual tem sido formulada com base em resultados indiretos que incluem extrações e microscopia, segundo a qual cadeias de xiloglucano atuam como ponto de união entre miofibrilas de celulose, dispostas ao redor das moléculas proteicas e pécticas ((32,33).

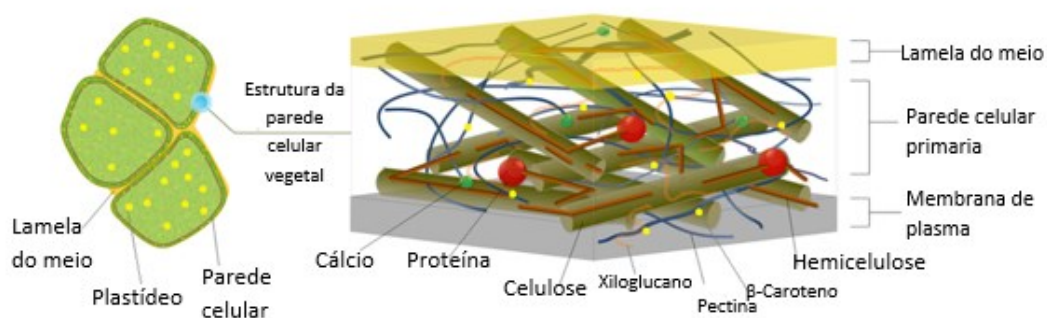


Figura 3. Ilustração da matriz celular vegetal (32,33)

A composição das proteínas e suas interações com os diferentes componentes da matriz celular ainda não foram totalmente esclarecidos (34). Alguns estudos têm conseguido identificar diferentes tipos de proteínas na célula vegetal como as **1)** proteínas instáveis: as quais não interagem ou o fazem fracamente com a parede celular, o que lhes confere movimentação, as **2)** proteínas que se ligam fracamente à matriz celular através de forças de *van der Waals*, ligação de hidrogênio, interações de caráter iônico ou hidrofóbico de modo geral estabelecidas com entre os resíduos galacturônicos das pectinas e proteína e **3)** proteínas que se ligam covalentemente com a pectina (McCann et al., 1990). Além das proteínas estruturais, também podem ser encontrados na célula vegetal proteínas citoplasmáticas nos proteoplastídios que geralmente são encontradas em maior proporção depois do estresse ou infecção presente da planta (35).

1.4. Importância do estudo da biodisponibilidade das proteínas de MO.

A MO representa uma potencial fonte de proteínas para o consumo humano, mas ainda são necessários muitos estudos que de fato comprovem a qualidade (biodisponibilidade) dessas proteínas, bem como o desenvolvimento de processos que poderiam melhorá-las para uso com fins alimentícios e nutricionais. Segundo a FAO, esses estudos podem ser realizados por meio da avaliação da qualidade proteica e das propriedades que a definem como boas fontes proteicas, dentre as quais se encontram a digestibilidade ou absorção da proteína, a

integridade química que permite que os aminoácidos sejam absorvidos de forma químicamente utilizável pelo organismo, além do estudo das substâncias que impedem seu aproveitamento, ou seja, os fatores antinutricionais (36)

1.4.1. Digestibilidade de proteínas

A digestibilidade das proteínas não está apenas relacionada com as variações e interações presentes nas matrizes alimentícias, mas também com a interação entre o alimento e processos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem na pessoa que o ingere. A FAO utiliza o termo digestibilidade de um aminoácido como a proporção do aminoácido consumido que se absorve, ou seja, totalmente metabolizado no trato gastrointestinal (36)

A digestibilidade das proteínas no corpo humano ocorre em diferentes fases (Figura 4), sendo iniciada com a hidrólise parcial da proteína no estômago pela enzima pepsina, a qual contribui com um 10-20% da conversão das proteínas em proteoses e alguns polipeptídios ((37)

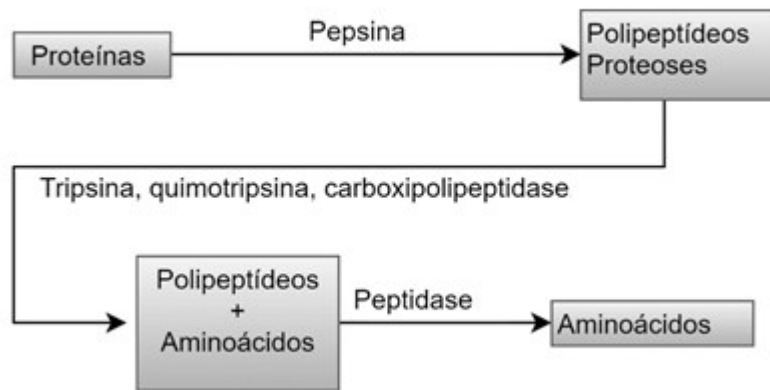


Figura 4. Esquema geral de digestão de proteínas (37)

A digestão final das proteínas ocorre na porção proximal do intestino (duodeno, jejuno) através da ação de enzimas pancreáticas (tripsina, quimiotripsina, carboximetilpeptidase e elastase). Tanto a tripsina quanto a quimiotripsina clivam as moléculas proteicas em pequenos polipeptídios e a carboximetilpeptidase atua liberando aminoácidos livres a partir da extremidade carboxil terminal de uma cadeia peptídica e a elastase responsável por digerir as fibras de elastina. Finalmente os enterócitos contêm diferentes peptidases na membrana apical como as aminopeptidases e dipeptidases, as quais finalizam a degradação dos polipeptídeos remanescentes a tripeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos (37).

1.4.2. Absorção das proteínas

Os di e tripeptídeos são transportados através da membrana apical do enterócito por meio do transportador de membrana PEPT-1 (Figura 5), já os aminoácidos livres utilizam diversos transportadores específicos de acordo com suas características químicas, ou seja, aminoácidos básicos, ácidos, neutros tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos. Finalmente os aminoácidos e dipeptídeos são transportados à circulação através da membrana basolateral por meio do transporte ativo utilizando Na^+ mas em alguns casos podem ser transportados por difusão passiva. Alguns dos aminoácidos seguem a circulação portal para suprir as demandas do enterócito (38).

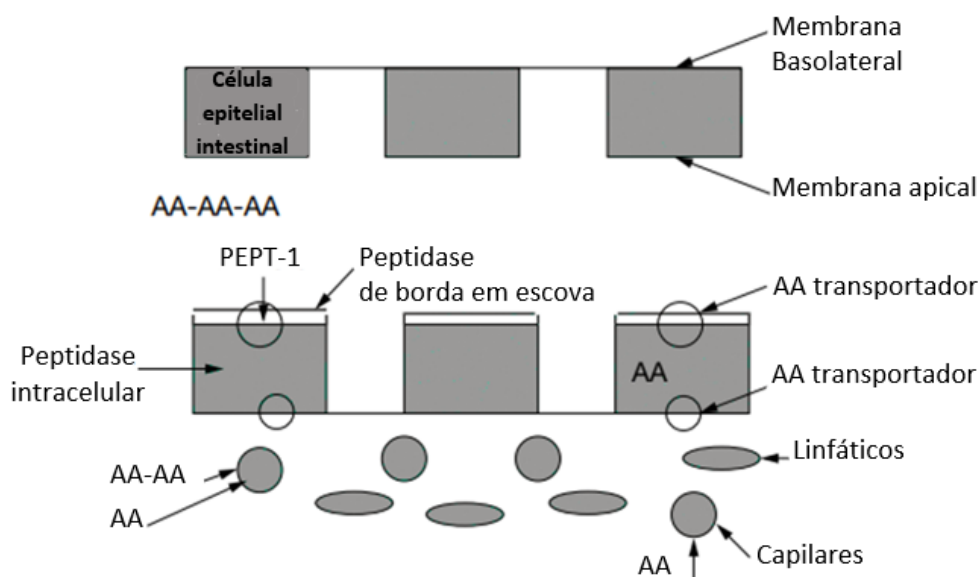


Figura 5. Digestão e absorção dos aminoácidos e oligopeptídeos na mucosa intestinal(38)

1.5. Funcionalidade das proteínas.

A solubilidade das proteínas é considerada uma das propriedades químicas mais importantes (34), pois a sua interação com diferentes solventes está diretamente relacionado ao melhor índice de funcionalidade, especialmente porque tem efeito em outras propriedades tecnológicas e/ou fisiológicas como a capacidade de formação de espuma, emulsificação, gelatinização e digestibilidade, razão pela qual é uma propriedade que deve ser determinada durante o desenvolvimento e avaliação de novos ingredientes proteicos (39).

Entre os fatores que influenciam a solubilidade de uma proteína se encontram a composição e sequência de aminoácidos, a sua massa molecular e a conformação e conteúdo de grupos polares e apolares, assim como fatores extrínsecos como pH do meio, força iônica, tipo de solvente, temperatura, condições de processamento (39) entre outros. Na Figura 6 está representada a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade das cadeias laterais (40).

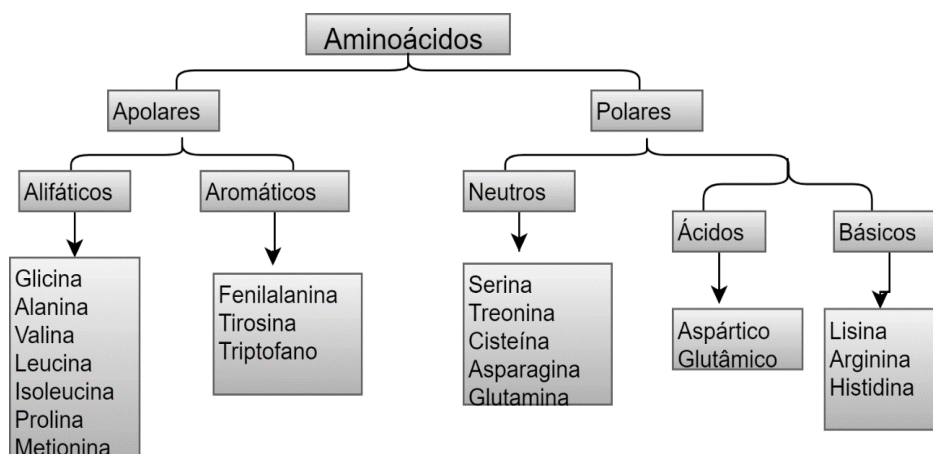


Figura 6. Classificação de aminoácidos segundo as características químicas da cadeia lateral (40)

1.6. Processos tecnológicos que melhoram a funcionalidade das proteínas vegetais.

No que se refere a digestibilidade de proteínas vegetais, alguns processos têm contribuído para sua melhoria, entre eles se encontram o cozimento, a germinação, a fermentação e a hidrólise enzimática (41–43). Com respeito a germinação, esse processo tem efeito positivo por diminuir alguns compostos antinutricionais como o inibidor de tripsina e taninos (41,44), assim como aumenta a atividade de proteases durante a catálise (45). A fermentação, por sua vez, possibilita através de enzimas microbianas, a “quebra” das proteínas (42,46). No que se refere ao efeito da temperatura sobre a solubilidade das proteínas, de modo geral se vê aumentada no intervalo de 0-50°C, e a temperaturas acima de 50°C ocorre diminuição, quando comparado a solubilidade da proteína nativa devido a processos de desnaturação térmica (34). Como exemplo temos o estudo realizado por Singh e colaboradores, que mostraram o aumento da solubilidade das proteínas do sorgo com aumento da temperatura de 25°C para 35°C (44).

Como citado anteriormente alguns processos como germinação e fermentação promovem indiretamente a hidrólise das proteínas sendo uma estratégia para a liberação de aminoácidos, aumento de solubilidade e biodisponibilidade. Já a hidrólise enzimática de proteínas por proteases exógenas é considerada um método direto de digestão e tem sido utilizado no tratamento de

proteínas vegetais como o feijão (47), ervilhas (48), soja (49), algas (50), com objetivo de melhorar as suas propriedades funcionais e sua digestibilidade.

1.6.1. Aplicação da tecnologia enzimática

A aplicação de proteases exógenas em alimentos proteicos busca através de processos de hidrólise, melhorar as propriedades funcionais, a digestibilidade, reduzir possíveis efeitos alergênicos, assim como obter peptídeos bioativos que podem estar relacionados a efeitos positivos para a saúde (51).

Com respeito a melhorias na digestibilidade, alguns estudos em humanos tem evidenciado que proteases como papaína quando fornecida como suplemento digestivo, poderia ajudar a reduzir a constipação e a flatulência associadas à síndrome do intestino irritável (52). Também se tem demonstrado que assim como a papaína, a bromelina pode atuar melhorando os sintomas associados ao intestino irritável e ser eficaz para o tratamento de distúrbios digestivos quando combinada com outras enzimas proteolíticas como papaína, tripsina e quimotripsina (53).

Entre outros efeitos positivos e promissores da implementação da tecnologia enzimática em processos de hidrólise prévia de proteínas na saúde humana, está a geração de peptídeos de diferentes massas moleculares, os quais tem mostrado atividade antiproliferativa em diferentes modelos de câncer como as células de adenocarcinoma HT29 e Caco2, câncer de colo uterino SiHa e câncer

de mama MCF-7 quando provêm de fontes como pele de rã (54), cogumelos (55), larvas de insetos (56) e feijão (57).

1.6.1.1. Proteases

Proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise das ligações peptídicas das proteínas (Figura 7A). Estas enzimas podem ser encontradas em plantas, animais e em diferentes microrganismos. Dependendo do tipo de reações que elas catalisam podem ser chamadas de endopeptidases ou exopeptidases (Figura 7B). As exopeptidases atuam como aminopeptidases (hidrolisam a partir do N-terminal da proteína) ou como carboxipeptidases (hidrolisam a partir da extremidade C-terminal da proteína) e as endopeptidases atuam hidrolisando os aminoácidos não-terminais, estas últimas podem ser classificados em cisteíno-proteases, serino-protease, treonino-proteases, glutâmico-proteases, aspártico-proteases e metaloproteases (58,59).

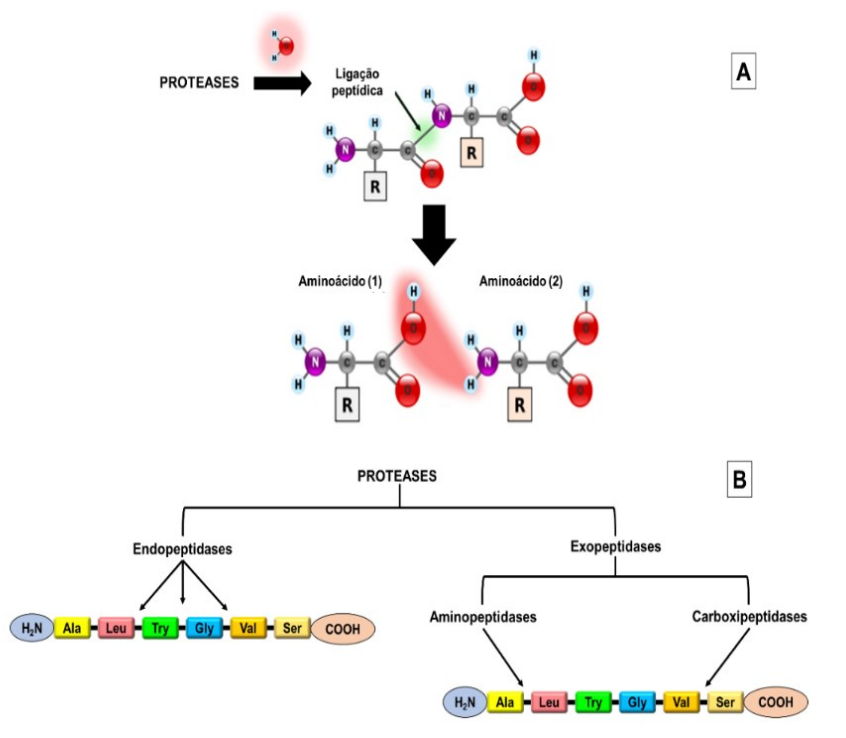


Figura 7. A) Mecanismo geral de hidrólise de ligações peptídicas por proteases. B) representação gráfica simplificada do conceito de endopeptidases e exopeptidases.

Bromelina e Ficina

A bromelina é um grupo de isoenzimas da família das cisteíno-proteases (60) encontradas no abacaxi (*Ananas comosus*) que possuem diferentes sequências de aminoácidos, bem como diferentes especificidades proteolíticas e sensibilidade de inativação. Entre estas isoenzimas está a cisteína-bromelina (EC 3.4.22.4), que se encontra presente no caule da planta e a bromelina (EC 3.4.22.5) presente principalmente no fruto (61). No que se refere a coroa, um estudo de Ketnawa e colaboradores evidenciou que o desperdício do abacaxi apresentava maior quantidade de unidades (atividade enzimática) do que a pele, o caule e o coração (42). O tipo de bromelina presente na coroa segundo Dutta e

colaboradores é principalmente a que se encontra no fruto (EC 3.4.22.5) (62), porém fatores como a variedade e condições de cultivo podem interferir na quantidade e tipo de bromelina presente. No que respeita às condições de atividade ótima da bromelina, em geral tem sido relatada meios com pH entre 5,0 e 9,0 e temperaturas menores que 70°C (58).

A enzima ficina (EC 3.4.22.3) é uma cisteíno-protease do tipo endopeptidase (60), que pertence à família C1 e ao clã CA das proteases (contém todas as famílias de peptidases que têm uma estrutura semelhante com a papaína). Essa enzima é obtida a partir do látex de *Ficus carica* também conhecido como figo. Apresenta termo estabilidade entre as faixas de 45°C a 80°C, e um pH ótimo entre 5 e 8,5 (63). Quanto à identificação dos diferentes tipos de ficina, Zare e colaboradores identificaram 4 que denominaram de enzima A, B, C, D (64). A aplicação comercial de ficina tem sido menos relatada, no entanto existem evidências de que ela contribui para melhorar a textura da carne pela degradação de proteínas micro fibrilares e colagenosas (65), como também tem sido relatada eficácia da ficina no aumento da solubilidade das proteínas da soja (66).

Apesar dos muito benefícios já relatados cientificamente, o uso da tecnologia enzimática pela indústria alimentícia pode gerar altos custos principalmente quando se utiliza enzimas puras. Dessa forma são necessários estudos que viabilizem o uso de enzimas de forma que sua aplicação não onere o processo produtivo e como consequência o custo do produto final. Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo utilizar enzimas não purificadas facilmente

acessíveis, como a bromelina e a ficina, presentes em plantas como abacaxi (*Ananas comosus*) e o figo (*Ficus Carica*), como uma estratégia para melhorar a digestibilidade *in vitro* das folhas da moringa (*Moringa olerifera* Lam) e *Pereskia aculeata* Miller.

Produção de peptídeos por hidrólise enzimática.

Os peptídeos podem ser formados por hidrólise enzimática das proteínas com proteases. O processo de produção de forma geral inclui (67): *i*) a moagem de matéria prima e homogeneização na água ou tampão, *ii*) o equilíbrio de temperatura e ajuste do pH para os valores ótimos da enzima empregada seguida pela adição da enzima (48). O uso ultrassom é opcional (68), *iii*) a separação da enzima do substrato usando membrana caso seja utilizado um reator, ou a inativação enzimática pela mudança da temperatura ou pH, *iv*) a separação dos peptídeos do precipitado e lipídeos por centrifugação ou decantação *v*) a purificação (ultrafiltração, electrodialises/ultrafiltração, ultrafiltração/nanofiltração etc.) e finalmente *vi*) a estabilização através do spray-drying, liofilização etc. Entre os efeitos bioativos que tem sido relatado dos peptídeos se encontram o efeito antifúngico, antimicrobiano, antiviral, imunomodulador, cito-modulador, antitrombótico, antidiabético, antiproliferativo, anticancerígeno etc. (67).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boon M, To A, Morton JF. The horseradish Tree, *Moringa Pterygosperma* (Moringaceae)-a boon to arid lands?. 1991;45(1929):318–33.
2. Brilhante RSN, Sales JA, Pereira VS, Castelo-Branco D de SCM, Cordeiro R de A, de Souza Sampaio CM, et al. Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017;10(7):621–30.
3. Anjorin TS, Ikokoh P, Okolo S. Mineral composition of *Moringa oleifera* leaves, pods and seeds from two regions in Abuja, Nigeria. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2010;12(3):431–4.
4. Silva GF, Oliveira DS, Oliveira LC, Gois M, Belmino JA, Gama Gennaro. *Moringa Oleifera* Lam identification of opportunities for the Brazilian market. *GEINTEC*. 2014;4:925–39.
5. Banerji R, Verma SC, Pushpangadan P. Oil potential of *Moringa*. *Natural Product Research*. 2003;2(2):2–3.
6. Leone A, Fiorillo G, Criscuoli F, Ravasenghi S, Santagostini L, Fico G, et al. Nutritional characterization and phenolic profiling of *moringa oleifera* leaves grown in Chad, Sahrawi refugee camps, and Haiti. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(8):18923–37.
7. Teixeira EMB, Carvalho MRB, Neves VA, Silva MA, Arantes-Pereira L. Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chemistry*. 2014;147:51–4.
8. Borges Teixeira M, Regina M, Carvalho B, Neves VA, Silva MA, Arantes-Pereira L. Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. 2013 [cited 2021 Mar 28]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.135>
9. Saini RK, Shetty NP, Giridhar P. Carotenoid content in vegetative and reproductive parts of commercially grown *Moringa oleifera* Lam. cultivars from India by LC-APCI-MS. *European Food Research and Technology*. 2014;238(6):971–8.
10. Özcan MM. *Moringa* spp: Composition and bioactive properties. *South African Journal of Botany* [Internet]. 2018;(xxxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.017>
11. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research* [Internet]. 2007 Jan [cited 2019 Jul 30];21(1):17–25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2023>

12. Estrella, MCP; Mantaring, JBV; David G. A double-blind, randomized controlled trial on the use of malunggay (*Moringa oleifera*) for augmentation of the volume of breastmilk among non-nursing mothers of preterm infants. *Phillipp Journal Pediatrics*. 2000;49(1):3–6.
13. Paikra BK, Kumar H, Dhongade J, Gidwani B. *Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Lam.* [cited 2021 Mar 28]; Available from: <https://doi.org/10.3831/KPI.2017.20.022>
14. Ndhala AR, Mulaudzi R, Ncube B, Abdelgadir HA, du Plooy CP, van Staden J. *molecules Antioxidant, Antimicrobial and Phytochemical Variations in Thirteen Moringa oleifera Lam. Cultivars.* *Molecules* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 31];19:10480–94. Available from: www.mdpi.com/journal/moleculesArticle
15. Gismondi A, Canuti L, Impei S, di Marco G, Kenzo M, Colizzi V, et al. Antioxidant extracts of African medicinal plants induce cell cycle arrest and differentiation in B16F10 melanoma cells. *International Journal of Oncology*. 2013;43(3):956–64.
16. Al-Asmari AK, Albalawi SM, Athar MT, Khan AQ, Al-Shahrani H, Islam M. *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. *PLoS ONE*. 2015;10(8):1–14.
17. Jung IL, Lee JH, Kang SC. A potential oral anticancer drug candidate, *Moringa oleifera* leaf extract, induces the apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Letters*. 2015;10(3):1597–604.
18. Pinto Nde C N, Scio E. *The Biological Activities and Chemical Composition of Pereskia Species (Cactaceae)-A Review.* *Plant Foods for Human Nutrition*. 2014;69(3):189–95.
19. Duarte MR, Hayashi SS. *Estudo anatômico de folha e caule de Pereskia aculeata Mill. (Cactaceae).* *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;15(2):103–9.
20. Edwards E, Nyffeler R, Donoghue M. *Basal cactus phylogeny: Pereskia paraphyly and implications for early cactus evolution.* *American Journal of Botany* [Internet]. 2005;92(7):1177–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.7.1177>
21. MAPA. *Manual de Hortaliças Não-Convencionais* [Internet]. 1st ed. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, editor. Belo horizonte-Brasil ; 2010. 92 p. Available from: http://www.abcsem.com.br/docs/manual_hortalicas_web.pdf
22. Agropolis Fondation. *PI@ntNet* [Internet]. [cited 2021 Nov 10]. Available from: <https://identify.plantnet.org/es>

23. Oliveira D. Valor nutritivo e análise sensorial de pão de sal adicionado de *Pereskia aculeata* Nutritional composition and sensory analysis of bread rolls added *Pereskia aculeata*. 2014;9(4):1027–40.
24. Rodrigues S, Marinelli PS, Otoboni AMMB, Tanaka AY, Oliveira AS. Caracterização química e nutricional da farinha de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.). 2015;1–14.
25. Takeiti CY, Antonio GC, Motta EMP, Collares-Queiroz FP, Park KJ. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009;60(SUPPL. 1):148–60.
26. Almeida MEF de, Junqueira AMB, Simão AA, Corrêa AD. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. *Bioscience Journal* [Internet]. 2014 May 8 [cited 2021 Nov 9];30:431–9. Available from: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/17555>
27. Pompeu DG, Carvalho ADS, da Costa OF, Galdino AS, Bonoto DG, da Silva JA, et al. Fatores antinutricionais e digestibilidade “in vitro” de folhas de *Pereskia aculeata* Miller. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports* [Internet]. 2014;3(1):1. Available from: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/view/18106>
28. Almeida MEF de, Corrêa AD. Utilization of cactaceae of the genus *Pereskia* in human consumption in a municipality of Minas Gerais [Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais]. *Ciência Rural*. 2012;42(4):751–6.
29. Rocha DR da C, Pereira Júnior GA, Vieira G, Pantoja L, Santos AS dos, Pinto NAVD. Macarrão Adicionado De Ora-Pro-Nóbis. *Alimentos e Nutrição*. 2008;19(4):459–65.
30. Pinto N de CC, Santos RC dos, Machado DC, Florêncio JR, Fagundes EMa de S, Antinarelli LMR, et al. Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia*. *Pharmacologyonline*. 2012;3(June 2015):63–9.
31. Souza LF, Caputo L, de Barros IBI, Fratianni F, Nazzaro F, de Feo V. *Pereskia aculeata* muller (Cactaceae) leaves: Chemical composition and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(9).
32. Dranca F, Oroian M. Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. 2018 [cited 2020 Oct 11]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.065>

33. Mccann MC, Wells B, Roberts K. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. 1990.
34. Sánchez Báscones M, Correa-Guimaraes A, Pérez-Espinosa A, Blanco Covián D, Cabaleiro Núñez F, García-Morales JL, et al. Del Residuo a Recurso: El camino hacia la sostenibilidad. [Internet]. Mundi-Prensa; 2016 [cited 2021 Nov 8]. Available from: <http://hdl.handle.net/10261/196132>
35. Wellburn. Plastid. In: G.H. Bourne, J.F. Danielli, K.W. Jeon, editors. International Review of Cytology. England; 1983. p. 1–340.
36. FAO/ expert consultation. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO food and nutrition paper 92. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011. 1–79 p.
37. Guyton A HJ. Tratado de fisiología médica. 10th ed. McGraw-Hill International., editor. 2001.
38. Hannelore Danie. Protein Digestion and Absorption of Amino Acids and Peptides. In: Leonard R.Johnson, editor. Encyclopedia of Gastroenterology. New York: Elsevier; 2004. p. 247–50.
39. Zayas JF, Zayas JF. Introduction. In: Functionality of Proteins in Food. Springer Berlin Heidelberg; 1997. p. 1–5.
40. Moreno G SJ. Estructura de proteínas. Ariel S.A., editor. España; 2003.
41. Afify AEMMR, El-Beltagi HS, El-Salam SM, Omran AA. Protein solubility, digestibility and fractionation after germination of sorghum varieties. PLoS ONE. 2012;7(2):1–6.
42. Ketnawa S, Ogawa Y. Evaluation of protein digestibility of fermented soybeans and changes in biochemical characteristics of digested fractions. Journal of Functional Foods [Internet]. 2019;52(December 2018):640–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.046>
43. Singh A, Sharma S, Singh B. Effect of germination time and temperature on the functionality and protein solubility of sorghum flour. Journal of Cereal Science [Internet]. 2017;76:131–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.003>
44. Singh A, Sharma S, Singh B. Effect of germination time and temperature on the functionality and protein solubility of sorghum flour. 2017 [cited 2021 Mar 29]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.003>
45. Elkhailifa AEO, Bernhardt R. Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour. Food Chemistry. 2010 Jul 15;121(2):387–92.

46. Osman MA. Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and in vitro protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation. *Food Chemistry*. 2004 Nov 1;88(1):129–34.
47. Los FGB, Demiate IM, Prestes Dornelles RC, Lamsal B. Enzymatic hydrolysis of Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein as an alternative to commercially rejected grains. *LWT*. 2020 May 1;125.
48. García Arteaga V, Apéstegui Guardia M, Muranyi I, Eisner P, Schweiggert-Weisz U. Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2020;65.
49. Coscueta ER, Campos DA, Osório H, Nerli BB, Pintado M. Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. *Food Chemistry: X*. 2019;1.
50. Alavijeh RS, Karimi K, Wijffels RH, van den Berg C, Eppink M. Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource Technology*. 2020;309.
51. Tapal A, Tiku PK. Nutritional and Nutraceutical Improvement by Enzymatic Modification of Food Proteins [Internet]. *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier Inc.; 2018. 471–481 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00027-X>
52. Muss C, Mosgoeller W, Endler T. Papaya preparation (Caricol®) in digestive disorders. *Neuro Endocrinol Lett*. 2013;34(1):38–46.
53. Bose U, Howitt CA, Colgrave ML. Proteases as Digestive Aids [Internet]. Vol. 2, *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier; 2018. 314–321 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22466-9>
54. Attoub S, Arafat H, Mechkarska M, Conlon JM. Anti-tumor activities of the host-defense peptide hymenochirin-1B. *Regulatory Peptides* [Internet]. 2013 Nov [cited 2019 Aug 16];187:51–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167011513001419>
55. Lin JW, Jia J, Shen YH, Zhong M, Chen LJ, Li HG, et al. Functional expression of FIP-fve, a fungal immunomodulatory protein from the edible mushroom *Flammulina velutipes* in *Pichia pastoris* GS115. *Journal of Biotechnology* [Internet]. 2013;168(4):527–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.09.013>

56. Sun HX, Chen LQ, Zhang J, Chen FY. Anti-tumor and immunomodulatory activity of peptide fraction from the larvae of *Musca domestica*. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet]. 2014;153(3):831–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.052>
57. Chan YS, Ng TB. Northeast Red Beans Produce a Thermostable and pH-Stable Defensin-Like Peptide with Potent Antifungal Activity. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013;66(3).
58. Gurumallesh P, Alagu K, Ramakrishnan B, Muthusamy S. A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules* [Internet]. 2019;128:254–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>
59. McDonald JK. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *The Histochemical Journal* [Internet]. 1985 Jul [cited 2019 Jul 31];17(7):773–85. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01003313>
60. Grzonka Z, Kasprzykowski F, Wiczak W. Cysteine Proteases. In: *Industrial Enzymes* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; [cited 2019 Sep 24]. p. 181–95. Available from: http://link.springer.com/10.1007/1-4020-5377-0_11
61. Murachi T. [39] Bromelain Enzymes. *Methods in Enzymology*. 1976;45(C):475–85.
62. Dutta S, Bhattacharyya D. Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of *Ananas comosus* (pineapple) crown leaf. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2013 Nov 25 [cited 2022 Feb 9];150(2):451–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076462/>
63. Baeyens-Volant D, Matagne A, el Mahyaoui R, Wattiez R, Azarkan M. A novel form of ficin from *Ficus carica* latex: Purification and characterization. *Phytochemistry* [Internet]. 2015 Sep [cited 2019 Jul 31];117:154–67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942215300078>
64. Zare H, Moosavi-Movahedi AA, Salami M, Mirzaei M, Saboury AA, Sheibani N. Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. 2012 [cited 2019 Jul 31]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755362/pdf/nihms429958.pdf>
65. Sullivan GA, Calkins CR. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science* [Internet]. 2010;85(4):730–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.033>

66. Kosmala I, Antoniewicz A, de Boever J, Hvelplund T, Kowalczyk J. Use of enzymatic solubility with ficin (EC 3.4.22.3) to predict in situ feed protein degradability. *Animal Feed Science and Technology* [Internet]. 1996 Jun 15 [cited 2019 Jul 31];59(4):245–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840195009108>
67. Hajfathalian M, Ghelichi S, García-Moreno PJ, Moltke Sørensen AD, Jacobsen C. Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. Vol. 58, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018.
68. Kadam SU, Tiwari BK, Álvarez C, O'Donnell CP. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. Vol. 46, *Trends in Food Science and Technology*. 2015.

Considerações finais.

Neste estudo se constatou que a catálise com extratos brutos é um desafio pela variabilidade da matéria prima que condiciona a quantidade de proteína assim como o tipo de isoenzimas dos extratos enzimáticos e suas condições de maior atividade (pH e temperatura) entre outros. Apesar do anterior, a metodologia proposta para as análises que inclui diferentes controles, permitiu detectar mudanças nas proteínas das plantas como o aumento na sua solubilidade e/ou nas propriedades antiproliferativas e carcinogênicas pelo efeito catalítico com proteases exógenas obtidas de bio-produtos o que faz destes resultados eficientes na abordagem inicial de processos catalíticos em matérias não purificadas. Os resultados orientam a continuidade de estudos de produção de extratos puros ou não, assim como a produção de compostos proteicos e sua avaliação de digestão gastrointestinal e biológica *in vitro* e *in vivo*.

No que se refere as análises de digestão gastrointestinal *in vitro*, seu estudo é muito importante e útil quando se pretende avaliar o efeito das enzimas e mudanças do pH gástrico e intestinal nos compostos proteicos obtidos por processos catalíticos exógenos. Na atualidade existem diversas metodologias propostas para a avaliação gastrointestinal *in vitro*, porém o método INFOGEST gerado no ano 2014 (1) e atualizado no ano 2019 (2) propôs um método estático e prático estandardizado da digestão humana que vem sendo muito aplicado. Este método já tem sido validado para diferentes matérias primas, porém existe poca informação no relacionado a sua aplicabilidade e mudanças que devem ser levadas em conta em matérias primas como plantas fonte de proteína vegetal.

Se bem, o método INFOGEST apresenta uma estandardização da execução, requer de sua validação, especialmente quando o objeto de estudo inclui matéria prima para a qual existem poucos ou nulos estudos evidenciados. Além do anterior, o método também requer da validação de equipamentos, pessoal e reagentes que podem variar entre os laboratórios e gerar interferência do

processo de estudo. Conforme o anterior, no Apêndice. 1 do presente projeto se apresenta a adaptação do método INFOGEST para a digestibilidade *in vitro* nas farinhas de *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller com o objetivo de propor as ferramentas para a continuidade dos estudos deste tipo no Laboratório de Enzimologia.

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. Food & Function [Internet]. 2014 May 28 [cited 2021 Nov 26];5(6):1113–24. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/fo/c3fo60702j>
2. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. Nature Protocols [Internet]. 2019;14(4):991–1014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

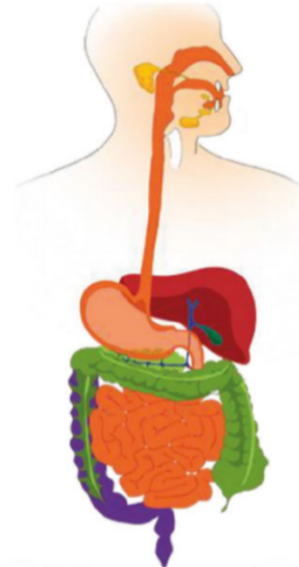
Apêndice. 1

Resumo do protocolo INFOGEST aplicado em farinha de plantas.



Fase de preparação

1. Realizar a atividade enzimática ✓
2. Realizar o ensaio de sais biliares ✗ → Não disponibilidade do Kit
3. Definir a diluição da farinha das plantas ✓ 1:4 (p:v)
4. Realizar experimento de ajuste de teste de pH ✓ → Fase gástrica: ~0,125mL HCL 5M
Fase intestinal: ~0,05 mL NaOH 5M



Fase oral

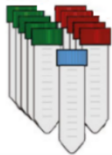
1. Misturar a amostra diluída com solução de fluidos salivares (1:1, (p/p))
2. Adicionar a amilase salivar 75U/mL = 750U → 16,2 mg de pó de amilase
3. Incubar e misturar (2 min, 37°C, pH 3)
4. Incluir $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (0.3M)=0,025 mL

Fase gástrica

1. Misturar o bólus com a solução de fluidos gástricos (1:1, (v/v))
2. Adicionar lipase gástrica ✗ → Não disponibilidade do substrato para a dosagem*
3. Adicionar pepsina gástrica 2000 U/mL = 40000U → 452 mg de pó de pepsina
4. Incubar e misturar (2h, 37°C, pH 3)
5. Incluir $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (0.3M)=0,005 mL

Fase intestinal

1. Misturar o bólus com solução de fluidos intestinais (1:1, (vol/vol))
2. Incluir sais biliares ✗ Não disponibilidade do Kit
4. Incubar e misturar (2h, 37°C, pH 7)
3. Adicionar pancreatina (atividade de tripsina)= 100 U/mL = 4000 U → 468 mg de pó de pancreatina
5. Incluir $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (0.3M)=0,04 mL



Preparação das amostras

1. Inativação da fase intestinal: 5 minutos à 100°C
2. Congelação à -18°C

Fase de preparação

A fase de preparação inclui os ensaios de atividade enzimática, o objetivo deste processo é validar o estado das enzimas já que sua atividade pode variar segundo tempo de armazenamento, condições, marca etc. A continuação se apresenta as principais considerações dos ensaios enzimáticos e as equações implementadas nos cálculos:

α -amilase. EC 3.2.1.1

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com o método proposto Brodkorb et al (2019). Para efeitos do cálculo uma unidade se entendeu como a quantidade de enzima que se requer para produzir 1 mg de equivalentes de maltose do amido in 3 min a pH 6,9 e 20 °C. Para o cálculo foi construída uma curva de calibração utilizando como padrão a maltose. A regressão linear da curva de maltose foi $y = 3,1242x + 0,0027$. A cálculo da atividade enzimática foi realizado com as seguintes equações:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL de enzima}} = \frac{\text{mg de maltose liberada} \times (fd)}{\text{mL de enzima}}$$

Onde:

fd = Factor de diluição

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg de solido}} = \frac{\frac{\text{Unidades}}{\text{mL de enzima}}}{\frac{\text{mg de sólido}}{\text{ml de enzima}}}$$

Pepsina. EC 3.4.23.1

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com o método proposto Brodkorb et al (2019). Para efeitos do cálculo uma unidade se entendeu como o incremento de absorbância ΔA_{280} de 0,001 por min a pH2 y 37°C medido como produtos solúveis de TCA. O cálculo da atividade enzimática foi realizado com as seguintes equações:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL de enzima}} = \frac{(A_{280} \text{ de ensaio} - A_{280} \text{ Branco}) \times (fd)}{(10) \times (0,1) \times (0,001)}$$

Onde:

fd = *Factor de diluição*

10 = Tempo de incubação em minutos.

0,1= Volumen (ml) de solución de enzima adicionada.

0.001= ΔA_{280} por unidad de pepsina (definición de unidad).

Pancreatina. P-7545

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com o método proposto Brodkorb et al (2019) com algumas modificações. Na fase intestinal é usado a atividade enzimática da tripsina como base para a definição de unidades de pancreatina. A dose recomendada nesta fase é 100 U de tripsina/mL de volume final da fase intestinal (40 mL). Existem diversos substratos da tripsina, entre eles o BAPNA (N- N-benzoil- arginina-p-nitroanilida), o BAEE (N α -Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride) e o TAME (p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester). O protocolo recomenda o TAME, porém faz uma equivalência entre os substratos TAME e BAEE como segue a continuação:

100 Unidade de TAME=5560 BAEE.

1 TAME μ M unidades= 55 BAEE A_{253} unidades.

Nosso caso foi utilizado o substrato BAPNA com o ensaio de atividade estabelecido no protocolo INFOGEST para o substrato TAME (Brodkorb et al., 2019). Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como ΔA_{450} de 0,001 por min a por minuto a pH 8.1 a 25°C.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL de enzima}} = \frac{(A_{450} \text{ de ensaio} - A_{450} \text{ Branco}) \times (fd)}{(10) \times (0,1) \times (0,001)}$$

Onde:

fd = Factor de diluição

10 = Tempo de incubação em minutos.

0,1 = Volumen (ml) de solución de enzima adicionada.

0.001 = ΔA_{450} por unidad de pepsina (definición de unidad).

A atividade enzimática da pancreatina também foi calculada com a equação anterior, posteriormente foi determinada a equivalência tripsina-pancreatina com o intuito de oferecer as unidades adequadas na fase intestinal.

Análise do protocolo

No protocolo INFOGEST a definição da forma de consumo do alimento é um passo crucial nas análises *in vitro* já que pode dificultar a execução de processos como a medição de pH, mistura e interação do bolo alimentício com as enzimas digestivas. No caso das amostras avaliadas que ainda não fazem parte de um alimento pronto para comercialização ou consumo humano um passo simples é estabelecer uma diluição cómoda que permita obter uma consistência similar à recomendada. Segundo o protocolo da INFOGEST, se recomenda uma diluição na fase oral de 1:1 (p/p) de alimento (sólido o líquido) com solução salivar até conseguir uma consistência similar à pasta de tomate. Porém, no caso das farinhas de plantas, como a *Moringa oleífera* Lam e a *Pereskia aculeata* Miller a presença da fibra absorve a solução salivar o que suscita uma diluição prévia à fase oral, nesse caso a diluição definida foi 1:5 (p/p) farinha seca, água destilada.

Como aspecto relevante na comparação futura com outros estudos tem que ser tido em conta que a diluição modifica a quantidade de substrato (proteína, carboidratos, lipídios) que se oferece às enzimas digestivas para as quais seus valores de atividade já foram previamente estabelecidos no protocolo.

No que se refere a não inclusão da enzima lipase é necessário ressaltar que segundo o protocolo (Minekus et al., 2014) o uso desta enzima pode ser omitido quando a digestão das proteínas e/ou polissacáridos são o principal foco de estudo. Entre as razões que explicam o porquê pode ser omitida se encontram: i) a lipase se encontra em poucas quantidades na fase de digestão gástrica ($10\text{-}120\text{ U mL}^{-1}$) em comparação com a fase intestinal ($80\text{-}7000\text{ U mL}^{-1}$) ii) a lipólise gástrica é só parcial (5-40%), iii) a enzima lipase gástrica ou alternativas similares são comercialmente indisponíveis e as lipases fúngicas exibem diferentes atividades e especificidade (Minekus et al., 2014). Pelas afirmações anteriores e pôr a falta do substrato (tributyrin) específico para a dosagem da atividade enzimática se decidiu não incluir a enzima lipase na fase gástrica.

Outro passo que foi omitido no protocolo foi a adição de sais biliares. Segundo o protocolo INFOGEST tanto as sais biliares bovinas como porcinas podem ser usadas, porém a sua concentração tem que ser determinada por meio de kits comerciais. Se bem, as sais biliares na digestão humana são importantes no transporte dos produtos de lipólises como os ácidos grassos, os monoglicérideos, o colesterol e outros lipídeos no aparato digestivo (Guyton A, 2001), decidiu se omitir sua adição por: i) falta do kit comercial para a determinação da concentração de sais biliares disponíveis ii) porque se previu uma interferência não direta ou mínima nos resultados de hidrólise de proteína.

Finalmente na última fase de execução do método, o protocolo INFOGEST estabelece diferentes opções de inativação da fase intestinal, entre eles o uso de temperatura como um método fácil e económico mas que pode interferir na

estrutura química das proteínas como já foi previamente discutido em capítulos anteriores.