

**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.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004153070P3

Esta ficha não pode ser modificada



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.

Á 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 ressalta 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
Refêrências	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
Refêrências	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-epóxido, 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
Lípideos	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 méxicas (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).

**A****B**

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 $28,99 \pm 0,59\text{g}/100\text{g}$ (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 demonstrou 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 pécicas ((32,33).

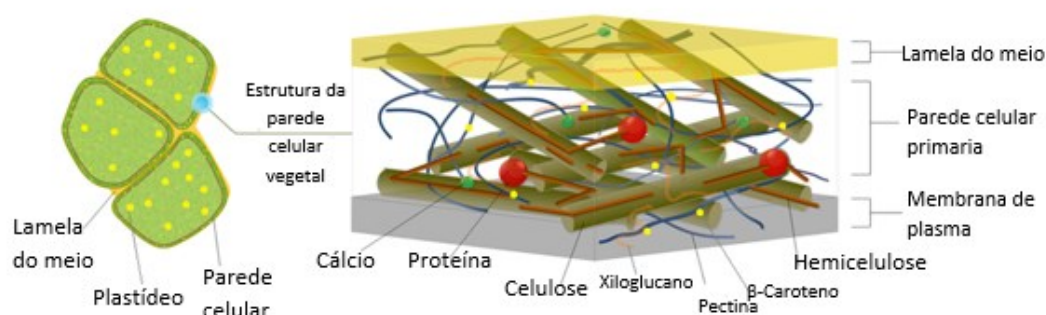


Figura 3. Ilustração da matriz celular vegetal (32,33)

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 quimicamente 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)

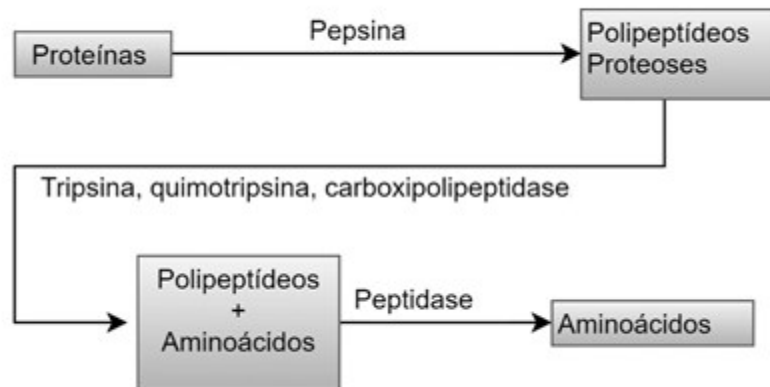


Figura 4. Esquema geral de digestão de proteínas (37)

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).

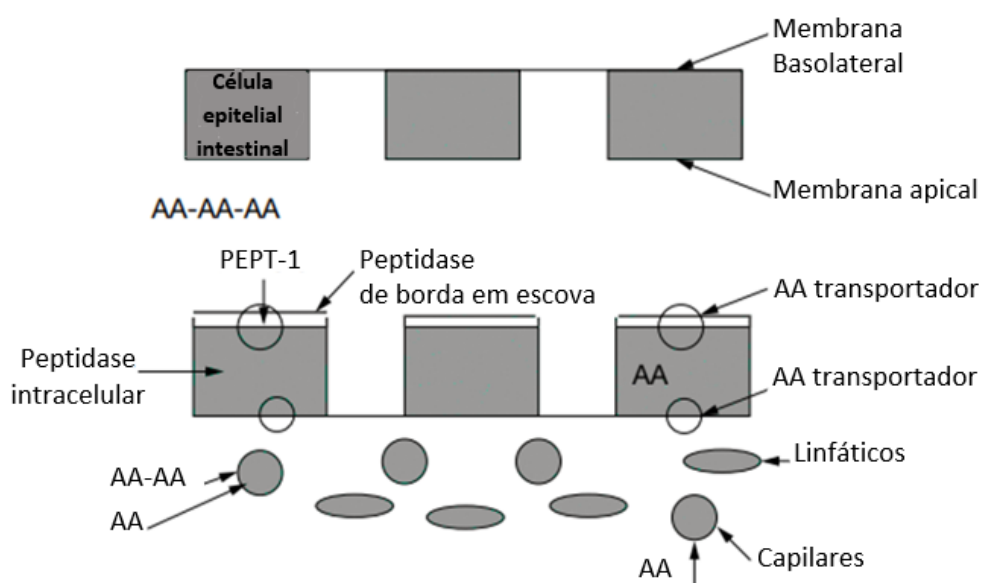


Figura 5. Digestão e absorção dos aminoácidos e oligopeptídeos na mucosa intestinal(38)

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).

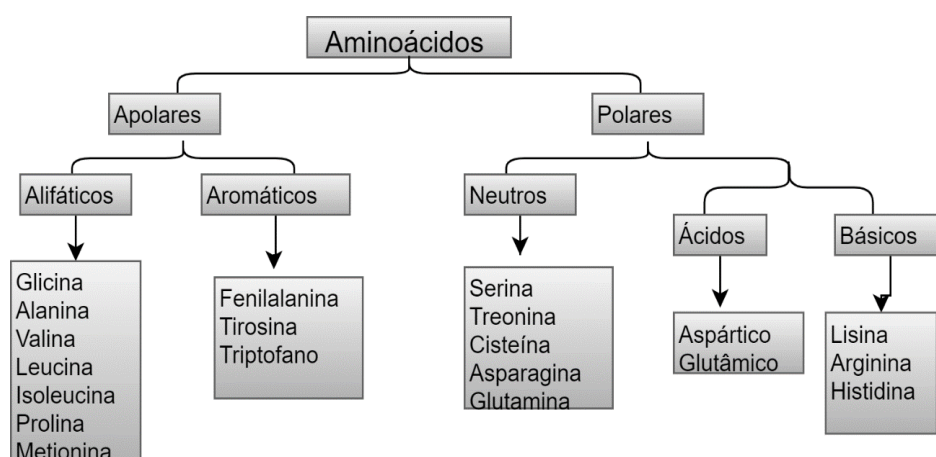


Figura 6. Classificação de aminoácidos segundo as características químicas da cadeia lateral (40)

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).

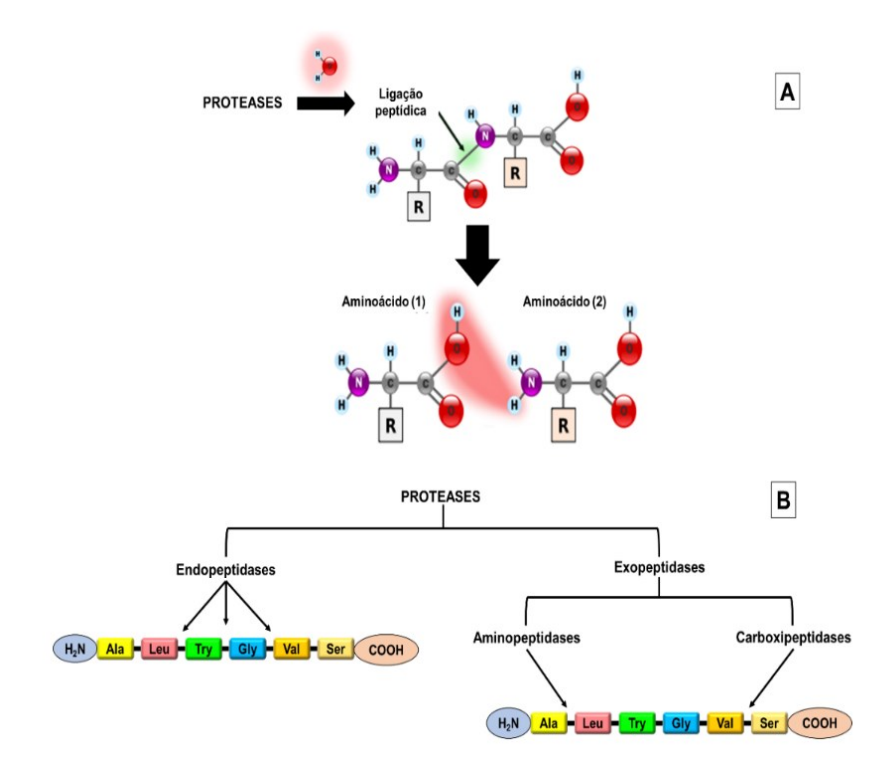


Figura 7. A) Mecanismo geral de hidrólise de ligações peptídicas por proteases. B) representação gráfica simplificada do conceito de endopeptidases e exopeptidases.

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).

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a hidrólise da farinha das folhas de duas fontes vegetais não convencionais: *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller com as proteasas ficina e bromelina obtidas de bioprodutos do figo e abacaxi.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar a hidrólise enzimática das frações solúveis e insolúvel na água da farinha das folhas de *Moringa oleífera* Lam com os extratos do látex do figo e coroa do abacaxi com atividade de protease.

Avaliar a hidrólise enzimática da farinha íntegra (frações solúveis e insolúveis sem separação) de folhas de *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller com o extrato do látex do figo.

Avaliar o efeito antiproliferativo do produto de hidrólise do extrato aquoso da farinha das folhas de *Moringa oleífera* Lam com o extrato enzimático do figo nas células do adenocarcinoma do cólon SW480.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boon M, To A, Morton JF. The horseradish Tree, *Moringa Pterygosperma* (Moringaceae)-a bood 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*. *Natur al Product R adiance*. 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. *Philipp 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. Ndhlala 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. *Pl@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, Tikku 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. Gurumalles 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, Wicz 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.

CAPÍTULO 1.

Enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* Lam flour using pineapple and fig by-products as a source of protease.

Artigo enviado para publicação em junho do 2022 para a revista *Food Chemistry (Food Chem)*.

Lady Johana Arismendi Bustamante^{a*}; Mariana Barros de Cerqueira e Silva^b; Ariela Veloso de Paula^c; Davanso Maisa^c; Estelamar Maria Borges Teixeira^d Juliana Cristina Bassan^{a,c}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department Food, Nutrition and Food Engineering. UNESP – Univ. Estadual Paulista, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

^b Institute of Chemistry, Department of Biochemistry and Chemical Technology, UNESP Univ. Estadual Paulista, 14800-060, Araraquara, SP, Brazil.

^c Faculty of Pharmaceutical Science, Department of Bioprocesses and Biotechnology – EBB. UNESP Univ. Estadual Paulista, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

^d Instituto Federal do triângulo Mineiro. IFTM. Instituto Federal de educação Ciência e Tecnologia do triângulo, 38064-190, Uberaba, MG, Brazil.

***Corresponding author.** Lady Johana Arismendi Bustamante.
lady.johana@unesp.br

Permanent address: School of Nutrition and Dietetic: University of Antioquia. Medellín, Colombia. E-mail:
lady.arismendi@udea.edu.co.

Abbreviations:

MOF: *Moringa oleifera* Lam flour; **EFL:** Enzymatic ficin latex; **EBC:** Enzymatic bromelain crown; **SMOL:** water-soluble *Moringa oleifera* Lam fraction; **IMOL:** water insoluble *Moringa oleifera* Lam fraction.

Highlights

1. The thermodynamic characterization of crude enzymatic bromelain extract obtained from pineapple crown could be explained by the Arrhenius model. On the contrary, the model is not applicable to the crude enzymatic extract of ficin.
2. The protein solubility of *Moringa oleifera* Lam flour presented changes by hydrolysis effect with bromelain and ficin obtain from pineapple crown and fig latex.
3. The hydrolysis of *Moringa oleifera* Lam with ficin from fig latex showed a significant increase of soluble protein by the different methods studied.

Abstract

Moringa oleifera Lamarck flour (**MOF**) has been recognized as a source of vegetable proteins; however, around $70.1 \pm 0.98\%$ of protein can be called “insoluble protein”, for it shows resistance to gastrointestinal digestion. In order for protein to be absorbed in the human intestinal tract, it must be consumed in the form of a soluble protein. Proteases have shown to increase soluble proteins. The objective of this study was, hence, to investigate the increase in soluble proteins of the *Moringa oleifera* Lamarck flour soluble and insoluble water fractions through the hydrolysis with proteases from fig and pineapple by-products. In conclusion, the protein of *Moringa oleifera* Lam had changes in their solubility by enzymatic effect. In particular, the hydrolysis of the insoluble *Moringa oleifera* Lam fraction with ficin contributed to a significant increase in soluble proteins, a result detectable through the different methods used (colorimetric Bradford method, electrophoresis and High- performance liquid chromatography).

Keywords: *Moringa oleifera* leaves; Protein; Enzymatic hydrolysis; By-product; Fig latex; Pineapple crown.

1. INTRODUCTION

Moringa oleifera Lamarck tree (syn. *M. pterygosperma* Gaertn.), is one of species of family Moringaceae (Gupta et al., 2018). This plant is native to Northern India, due to its high adaptability to climatic conditions and dry soils (Morton, 1991) is now cultivated and distributed in Africa, Asia and América (Hedhili et al., 2021). In Brazil, the *Moringa oleifera* (Lam) is popularly Known as “moringa”, “lírio branco” or “quiabo-da-quina”(Brilhante et al., 2017).

Different types of nutrients like protein and important phytoconstituents with antioxidant activity (Benhammouche et al., 2021; Leone et al., 2015; Paikra et al., n.d.) have been identify in the leaves of *Moringa oleifera* Lam tree. Around 18% and 28% of weight of leaves are protein (Alain Mune Mune et al., 2016; Borges Teixeira et al., 2013; Ijarotimi et al., 2013; Sánchez-Machado et al., n.d.) and at least 19 amino acids are present in the plant (Sâmia Nogueira et al., 2017). Around $70.1 \pm 0.98\%$ of protein powder *Moringa oleifera* Lam tree does not solubilize in different types of solvent and may be called “insoluble protein” (Borges Teixeira et al., 2013).

About protein, this macromolecule has important technological and nutritional function in the food matrix (Zayas & Zayas, 1997) and the human body, respectably. It has been estimated that in 2054, 1/3 of all global protein consumed will be of plant origin (Stone et al., 2018; Anonymous, 2017). The current tendency of increasing plant protein consumption includes i) the environmental impact of livestock products (Aiking, 2011); ii) population growth (Boland et al., 2013) and iii) changing lifestyle (Ekmekcioglu et al., 2018).

Among the challenges faced by plant-based protein as a nutrient in the human diet include its ability to meet adequate in quantity and quality, this could be better understood in terms of bioavailability. The bioavailability covers three properties of food: i) digestibility; ii) chemical integrity and iii) exemption of interference in metabolism. Digestibility is an important attribute that refers to the proportion of consuming protein which could be absorbed in the intestinal tract (FAO/ expert consultation, 2011).

One important fact to contribute with the protein digestibility is the presence of different types of human fluids and enzyme that denatures and cleave the macromolecular proteins (Lee et al., 2021) becoming soluble di-tripeptides and free amino-acids to be absorbed in the intestinal tract (Hannelore Danie, 2004). In recent years, it has been studying different strategies to improve the food matrix soluble protein, because among other reasons are gastrointestinal (GI) human tract aging, and some chronic health problems that alter the protein digestion and absorption.

Some improved soluble protein strategies include catabolic processes like fermentation or hydrolysis with exogenous protease (Zhu et al., 2018), thermal processing and non-thermal technologies like ultrasound (Lee et al., 2021) and germination (Singh et al., 2017). As regards to proteases, it could be obtained from plants and animals, however, because of rate yield, deforestation, and ethical issues about sacrificing animals, there is a recall of other sources to be applied (Gurumallesha et al., 2019).

One strategy to mitigate the impact of human intervention in the natural plant and animal habit is reducing the losses and wastes generated by human

consumption. Regarding plants for human consumption, it has been estimated that fruit processing industries contribute more than 0.5 billion tons of waste worldwide (Banerjee et al., 2016). Bio-compounds of loss and waste fruit and vegetables could be used as a source of enzymes (Esparza et al., 2020) which have important application in different types of industries (Dahiya et al., 2017; Sharma et al., 2016).

The pineapple crown and fig latex has shown enzymatic activity like a protease (Ketnawa et al., 2012; Zare et al., 2012). Both could be considered as a food loss because they imply a decrease in mass (dry matter) of food that was originally intended for human consumption (Fao, 2013). In an industrial scale could be considered as a by-product (Torres-León et al., 2018). The application of catabolic process through enzyme like proteases from food loss or by-products to *Moringa oleifera* Lam powder may improve the soluble protein that is important factor in human digestibility.

2. MATERIALS AND METHODS.

Material

***Moringa oleifera* Lam water separation (soluble and insoluble)**

The leaves of *Moringa oleifera* Lam harvested from a tree located in Minas Gerais, Uberaba city, Brazil, were separated from the stem manually and sanitized during 30 minutes with a 200-ppm sodium hypochlorite solution. Then the material was washed with distilled water and dried at 40 °C in an air circulating oven for 24h. The dried leaves were crushed (Philips Walita® RI2035 blender, China) for 2 min. Finally, the *Moringa oleifera* Lam flour (MOF) was stored in a plastic bag in the dark at room temperature until fractionation. To obtain the soluble and insoluble fraction of MOF, each 100g was homogenized (at a ratio of 1:10, w: v) in 100 mM phosphate buffer pH 7.0 and pH8 to hydrolysis with enzymatic ficin latex (EFL) and bromelain crown (EBC),

respectively. Then, the dispersion was blended (Philips Wanita® RI2035 blender, China) for 2 min. The separation of soluble *Moringa oleifera* Lam (SMOL) and insoluble *Moringa oleifera* Lam (IMOL) fractions was made by decantation at 4°C and vacuum filtration through a paper filter, All the fractions was store at -18°C until hydrolysis.

Enzymatic extract preparation.

The pineapple (*Annona comosus* (L.) Merrill) crown, perola variety from Brazil cultivars, were separated from fruit manually, then sanitized and washed as described for *Moringa oleifera* Lam leaves. The clean crown was blended (Philips Walita® RI2035 blender, China) with distilled water at a ratio 1:1 (w: v) or 2 min. The resulting blend was filtered through a cotton mesh filter. The soluble fraction, enzymatic bromelain crown (EBC), was stored at -18°C until use. On other hand, fig (*Ficus carica* Linn) latex from Brazil cultivars, were collected drop by drop from immature fruit peduncle and centrifuged at 3200 g at 4°C for 15 min to remove gums (Siar et al., 2017). The obtained supernatant, enzymatic ficin latex (EFL) was store at -18°C until use.

Methods.

Determination of proteolytic activity

The proteolytic activity of the crude enzyme extract was determined according to Siar et al (2017) with some modifications. Casein and L-tyrosine were used as a substrate and standard, respectively. The enzymatic extract preparation (10 µl) was mixed with 990 µl of a reaction cocktail (contained 1% (w/v) of casein, 5mM cysteine hydrochloride and 5mM EDTA in 0.01M buffer phosphate). The reaction was stopped by the addition of 1mL of 10% (w/v) TCA. Then, the reaction mixture was then centrifuged at 3200 g for 30 min. The obtained supernatant was measured and showed an absorbance of 280

nm. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to promote the liberation of $1\mu\text{mol}$ of tyrosine $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ under the standard assay conditions.

Determination of maximum pH and temperature

A solution of 1% (w/v) of casein was prepared in different pH values (5-9). McIlvaine buffer (pH 5-8) and carbonate bicarbonate buffer (pH 9-10), 100 mM were used. To casein solution was added 5mM cysteine hydrochloride and 5mM EDTA. To 990 μl of substrate solution, 10 μl of crude enzymatic extract was added and the reaction mixture was incubated at the desired temperature (40-75°C) and agitation of 110 rpm for 20 min. The reaction was stopped by the addition of 1mL of 10% trichloroacetic acid (TCA), incubated for 20 min at room temperature and centrifuged at 3200 g for 30 min. The absorbance of soluble peptides and amino acids in the supernatant was measured at 280 nm.

Thermostability characterization of enzymatic extract crude ficin and bromelain

Irreversible thermal denaturation of extract crude ficin and bromelain were checked incubating the EBC and EFL in 100mM phosphate buffer at pH 7 at various temperatures in the range 40-60 °C. Samples were periodically withdraw and proteolytic activity was determined as described above in McIlvaine buffer pH 7 with some modification (900 μl of substrate solution and 10 μl of crude enzymatic extract). The data was fitted to first- order plot and inactivation rate constants (K_i) were determined from the slopes of semi logarithmic plots according to Eq. (1).

$$-\ln \frac{A}{A_0} = K_i * t \quad (1)$$

A is the enzymatic activity in a specific time, A_0 is the initial enzymatic activity and K_i inactivation rate constant. Follows Arrhenius' law (equation 2).

$$k_i = k_0 * e^{-\frac{E}{RT}} \quad (2)$$

k_0 is the frequency factor, E is the energy of activation, R is a constant ($R = 8.314 \text{ J} \times (\text{mol K})^{-1}$), and T is the temperature in degrees Kelvin.

Hydrolysis of *Moringa oleifera* Lam fractions

Insoluble *Moringa oleifera* Lam fraction (IMOL)

To perform the enzymatic hydrolysis, IMOL (solid remaining from the decantation) was dispersed in a 100 mM phosphate buffer in a ratio 1:2.5 (w: v), pH 7 to hydrolyze with EFL and pH 8 to hydrolyze with EBC. The final pH essay was 7.0. The hydrolysis essay was offered on average $3.64 \pm 0.30 \text{ U/mL}$ (EFL/IMOL) and $4.01 \pm 0.27 \text{ U/mL}$ (EBC/IMOL). The temperature was 55°C with agitation of 110 rpm. Aliquots of hydrolyze essay were withdrawn at 1, 3, 5, 7 and 24 h and carried off ethylene glycol bath to -32°C for 10 min to stop the reaction, finally they were stored at -18°C until analyzed. Temperature controls were included in the hydrolysis essay to a) enzymatic extracts (EFL and EBC) and to IMOL.

Soluble *Moringa oleifera* Lam fraction (SMOL)

The enzymatic hydrolysis of SMOL was carried on at pH7 and was offered on average $3.49 \pm 0.11 \text{ U/mL}$ (EFL/SMOL) and $3.87 \pm 0.05 \text{ U/mL}$ (EBC/SMOL). The temperature was 55°C with agitation of 110 rpm for 24h. Aliquots of hydrolyzed essay were withdrawn at 1, 3, 5, 7 and 24 h and carried off ethylene glycol bath to -32°C for 10 min to stop the reaction, finally they were stored at

-18°C until analyzed. Temperature controls were included in the hydrolysis essay to a) enzymatic extracts (EFL and EBC) and to SMOL.

Quantification of soluble proteins after hydrolysis

For determination of soluble protein, aliquots of enzymatic hydrolysis essay and controls were taken to centrifugation at 3200 g for 30 min. The supernatant protein content was measured in 595 nm using UV-Visible spectrophotometer (marca), according to Bradford method (1976). Bovine serum albumin was used as standard.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The identification of protein profiles, assess protein hydrolysis and temperature controls were performed using denaturing SDS-PAGE according to the Laemmli method (1970) with some modifications. Initially, aliquots (1 mL) of hydrolyze essay were centrifuged at 3200 g for 30 min. The supernatant were concentrated at 30°C for 90 min in rotary evaporator and one part (75µl) were mix with buffer (Tris-glycine, glycerol, SDS, β-mercaptoethanol and bromophenol blue) (25 µl) and heated at 100°C for 5 min. Aliquots of 30 µl were in gel (12%) samples well, one of which carried 4µl of a standard molecular weight ladder (GE Healthcare) consisting of phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α-lactalbumin (14.4 kDa). After fixing and staining with coomassie brilliant blue, the gel was discolour and scanned. Apparent molecular weights were determined by using GelAnalyser software version 19.1.

HPLC analysis

Aliquots of hydrolyze essay were centrifuged at 3200g for 20 min and 20 μ l of supernatant was filter (0,22 μ m) and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Da Silva et al (2021) using a Shimadzu Prominence, Kyoto, Japan with a reverse phase column (C18 $\times$ 15 cm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m; Kromasil, Phenomenex®, CA, USA) and UV/VIS detector. The gradient used was 95% of A for 10 min and 5-95% of B for 30 min. The solvent system used was A (0.045% trifluoroacetic acid in ultrapure water) and B (0.036% trifluoroacetic acid in acetonitrile), with a flow rate of 1.0 ml/min, temperature of 30 °C, and readings recorded at 220 nm.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and comparison between means with the Tukey's test was conducted using the software Minitab (Minitab Statistical Software version). Interaction and differences with a P value of <0.05 were considered significant.

3. RESULTS

Biochemical characterization of EBC an EFL

pH and temperature of maximum activity

The effect of pH and temperature on proteolytic activity of EBC and EFL was measured and reported as a relative protease activity against the control (Fig.1). EBC produced the maximum proteolytic activity in pH8 and the EFL at pH7. For the thermal profile, the highest activity was found in 60°C in both.

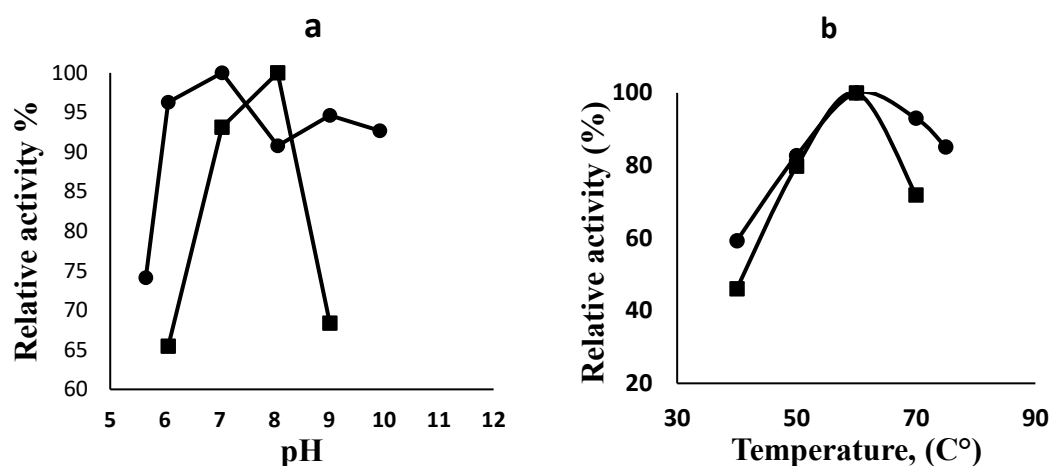
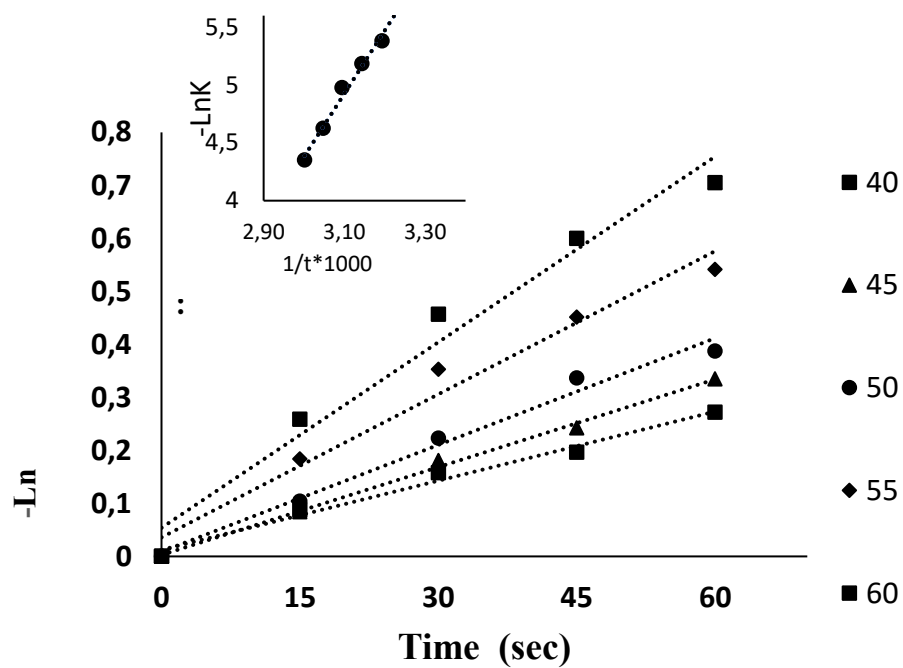


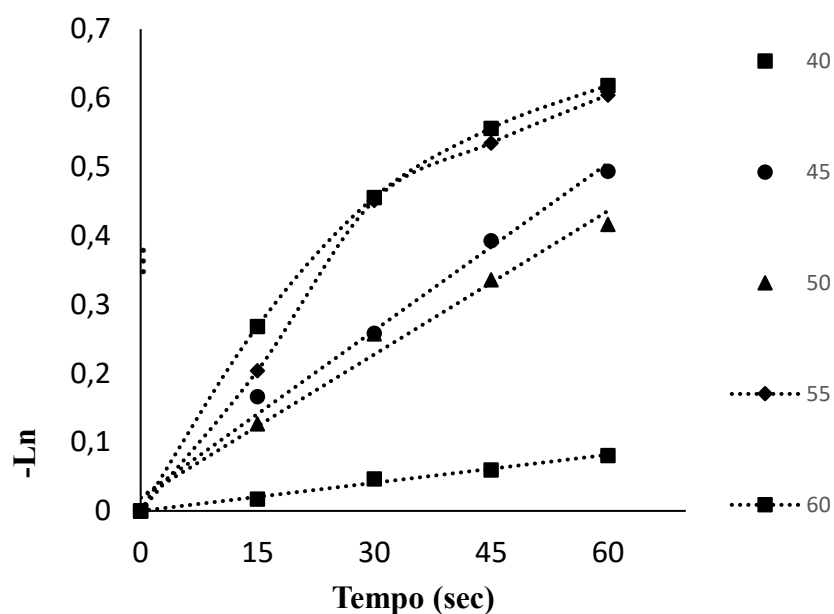
Figure 1. Effect of the pH (a) and temperature (b) on the activity of ficin (circles) and bromelain (squares). Effect of the pH (a) and temperature (b) on the activity of ficin (circles) and bromelain (squares). The pH effect on activity was studied at 50°C, the effect of temperature at pH 7 (ficin) and pH 8 (bromelain). Experiment was performed in duplicate and as described in methods.

Irreversible thermal denaturation of ficin.

The Fig.2 (A and B) shows the thermostability of ficin and bromelain extract crude in a range of 40-60 °C. The rate of denaturation of enzymatic extract could be represented as a first order reaction at all temperatures studied for EBC. On the contrary, EFL just kept the first order reaction till 30 seconds at the temperature of 55 °C and 60 °C degrees under test conditions. At the temperature of 55 °C from 24 exposition time, EBC and EFL have a residual activity of 8,52 % and 41 % (data not shown), respectively.



A



B

Figure 2. Effect of temperature on enzyme activity over time, in the range 40-60 °C, on the EBC (A) and EFL (B) in 100 mM phosphate buffer, pH 7, containing 5 mM cysteine, 5 mM EDTA, using casein as substrate (Homaei et al., 2017). In the inset (fig. 2A), the relative Arrhenius plot ($\log V_{max}$ versus $1/T$) is reported.

The activation energy value (E) and the factor of frequency (k_0) were obtained by equation (2). Constant k_i values results are shown in Table 1. The coefficient of correlation results indicate that Arrhenius model (equation 2) is adequate to explain how constant inactivation k_i varies with temperature in the case of EBC being energy activation (E) = 45,39 (kJ mol⁻¹) and frequency factor (K_0) = 1,63 × 10⁵ (sec⁻¹). In the case of EFL, it was not possible to determine the thermodynamic characteristics in the conditions essay. Also, not many differences are observed between 45°C and 50°C and between 55°C and 60°C thermal stability study.

Table 1. Inactivation constant k_i values for EBC and EFL in pH 7.

Temperature (°C)	Bromelain		Ficin	
	$k_i \times 10^4$ (min.)	r^2	$k_i \times 10^4$ (min.)	r^2
40	36	0,99	14	0,99
45	48	0,99	85	0,99
50	51	0,99	74	0,99
55	77	0,98	(*)	0,98
60	93	0,98	(*)	0,98

*The inactivation kinetics do not obey order one; r^2 : linear correlation coefficient.

SMOF and IMOF hydrolysis assays and their statistical association with the increase in soluble protein

Two-ways variance analyses were performed with the intended to examine two variables, influence of time to exposition to temperature (0-24h) and treatment (hydrolyzed or not) in soluble protein Bradford quantification of IMOF and SMOF (Table 1). The analyses of variance did not detect interaction between variables in soluble protein of IMOF treatment with EBC. Nevertheless, the linear model reports that IMOF treatment has a significant

change over time at 24h to exposure to temperature. No statistical differences were found in the SMOF by treatment with EBC and temperature exposition.

On the other hand, a significant statistical interaction and difference between variables was found in IMOF hydrolyzed with EFL. At a time of 1h temperature exposition of IMOF was detected a significant increase of soluble protein by effect of treatment, no significant changes were detected after 1h of exposition. Also, not statistical interaction and differences were detected in the SMOF treatment with EFL.

Table 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 temperature (0-24h) in MOF fractions (soluble or insoluble).

		Mean $\pm$ standard-deviation					
MOF fraction	Time	EBC		MOF fraction	Time	EFL	
		Not treated	Treated			Not treated	Treated
Insoluble fraction (IMOF)	0	1,25 $\pm$ 0,07 ^{AB}	1,32 $\pm$ 0,08 ^{AB}	Insoluble fraction (IMOF)	0	0,53 $\pm$ 0,06 ^{AB}	0,46 $\pm$ 0,05 ^A
	1	1,44 $\pm$ 0,05 ^{AB}	1,56 $\pm$ 0,10 ^A		1	0,82 $\pm$ 0,06 ^{BC}	1,35 $\pm$ 0,05 ^D
	3	1,45 $\pm$ 0,09 ^{AB}	1,54 $\pm$ 0,13 ^A		3	0,86 $\pm$ 0,06 ^C	1,55 $\pm$ 0,05 ^{DE}
	5	1,44 $\pm$ 0,09 ^{AB}	1,61 $\pm$ 0,12 ^A		5	0,82 $\pm$ 0,05 ^{BC}	1,57 $\pm$ 0,04 ^{DE}
	7	1,23 $\pm$ 0,13 ^{AB}	1,62 $\pm$ 0,11 ^A		7	0,78 $\pm$ 0,09 ^{BC}	1,67 $\pm$ 0,05 ^E
	24	1,16 $\pm$ 0,12 ^{AB}	0,98 $\pm$ 0,13 ^B		24	0,78 $\pm$ 0,03 ^{BC}	1,52 $\pm$ 0,01 ^{DE}
Soluble fraction (SMOF)	0	2,34 $\pm$ 0,13 ^A	2,17 $\pm$ 0,12 ^A	Soluble fraction (SMOF)	0	1,54 $\pm$ 0,33 ^A	1,59 $\pm$ 0,21 ^A
	1	2,08 $\pm$ 0,08 ^A	1,74 $\pm$ 0,08 ^A		1	1,25 $\pm$ 0,21 ^A	1,36 $\pm$ 0,12 ^A
	3	2,02 $\pm$ 0,09 ^A	1,87 $\pm$ 0,19 ^A		3	1,2 $\pm$ 0,20 ^A	1,26 $\pm$ 0,15 ^A
	5	2,01 $\pm$ 0,10 ^A	1,93 $\pm$ 0,14 ^A		5	1,31 $\pm$ 0,31 ^A	1,33 $\pm$ 0,24 ^A

MOF (*Moringa oleifera* Lam flour). EBC (Enzymatic bromelain crown). EFL (Enzymatic ficin Latex).

Insoluble *Moringa oleifera* Lam flour (IMOF) hydrolyzed with EBC

Fig.3A shows the molecular weight distribution of temperature controls (IMOF obtained in pH8 and EBC) and IMOF hydrolyzed. Most significant changes in IMOLF hydrolyzation could be observed in the big molecular weight protein. For example, proteins with more than 97KDa are present in S0-S3 and poorly detected in S5-S7. On the other hand, could be observed an increase in less than 14KDa molecular weight protein in S3 that may be related with 20,1-14,1 KDa hydrolyze proteins. About the protein in this molecular weight range, there is an increase from S5 to S24, probably as a result of ~30 KDa protein hydrolysis. Additionally, in the IMOF hydrolyzed by 24h (S24) new band proteins with a molecular weight between 97-66 kDa (S24) are present, but this will be more related with hydrolysis of protein solubilized by temperature effect after seven hours of exposition. Noticed that C24 presented an increasing intensity of protein between 97-66 kDa when compared with C7. Finally, the chromatographic profiles (annex) evidence changes over time, that could be summarized in a decrease in peak intensity of protein molecule that elutes ~10min and increase in the range of 5-10 min elution time in S5 and S7, manly.

Insoluble *Moringa oleifera* Lam flour (IMOF) hydrolyzed with EFL

Fig. 3B shows the protein profile of temperature controls (IMOF obtained in pH7 and EFL) and IMOF hydrolyzed. In the case of IMOF hydrolyzed, there were changes on different proteins of electrophoretic profile. For example, it could be observed an increased intensity of protein with a molecular weight between 20,1 and 14,1 KDa from S0 to S3 and the disappearance at S5 that may be related with its hydrolysis. Also, the presence of a new protein ~30 KDa could be detected at S5 that may be linked with 97-66 KDa molecular weight protein hydrolysis, notice the decreasing intensity when is comparing S3 with S5 in this range. At S7, a new protein appears with a molecular weight of 97-66 KDa and between 20,1- 4.1 KDa. Also, in S24 could be detected a hydrolysis of them with an increase in proteins with less than 14.1 KDa. On the other hand, the chromatographic hydrolysis profile (annex) shows a rise in the peak of protein

molecules that elute in ~10min from S0 to S5. In 7h of hydrolysis (S7) there was an apparent increase of molecules that eluted after 10 min.

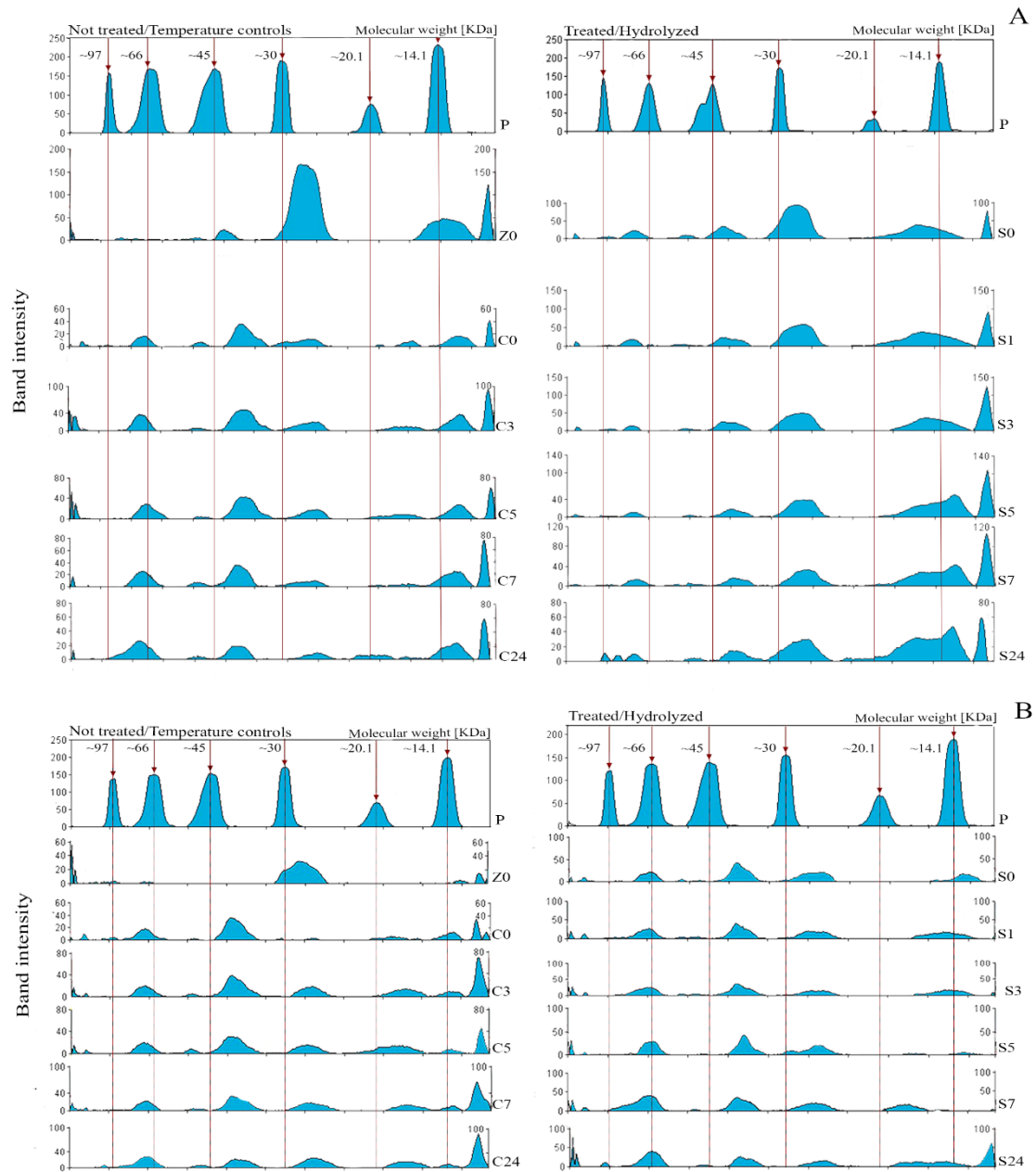


Figure 3. Molecular weight distribution of temperature controls and hydrolysis assay of insoluble *Moringa oleifera* Lam flour (IMOF). (A) Hydrolysis with EBC: P (pattern); Z0 (EBC not exposed to temperature); C0-C24 (IMOF exposed to different times at temperature); S0-S24 (IMOF treated with EBC exposed to different times at temperature). (B) Hydrolysis with EFL: P (pattern); Z0 (EFL not exposed to temperature); C0-C24 (IMOF exposed to different times at temperature); S0-S24 (IMOF treated with EFL exposed to different times at temperature).

Soluble *Moringa oleifera* Lam flour (SMOF) hydrolyzed with EBC

Fig.4A shows the protein profile of SMOF obtained in pH8 (temperature control) and SMOF hydrolyzed with EBC. In SMOF hydrolyzed could be highlight a decreasing intensity in i) big molecular weight when is compare with the temperature controls (C3-C5), ii) in protein with ~45 KDa when is compare S0 with S1 and iii) in the less than <14kDa molecular weight protein over hydrolysis time (S0-S3). The chromatographic hydrolysis profile (annex) evidence an increase in the peak of protein that eluted between 5 and 10 min over 3 h hydrolysis time (S0-S3). At 5h hydrolyzed time there was notice of decreasing of molecule protein that eluted ~5 min.

Soluble *Moringa oleifera* Lam flour (SMOF) obtain in pH7 hydrolyzed with EFL

Fig.4B shows the protein profile of SMOF treated with EFL. Changes in IMOF treated include it does not have big protein (>97 kDa) and protein with a molecular weight ~66 kDa decreases evidently at S5. In addition, currently there was a decrease in protein with a molecular weight between 45 and 30 kDa. The chromatographic hydrolysis profile (data not shown) evidence an increase in the peak of protein that eluted ~10 min at 1h hydrolysis time. From 3 to 5 h hydrolysis time there was an increase in molecular protein that eluted between 5 and 10 min.

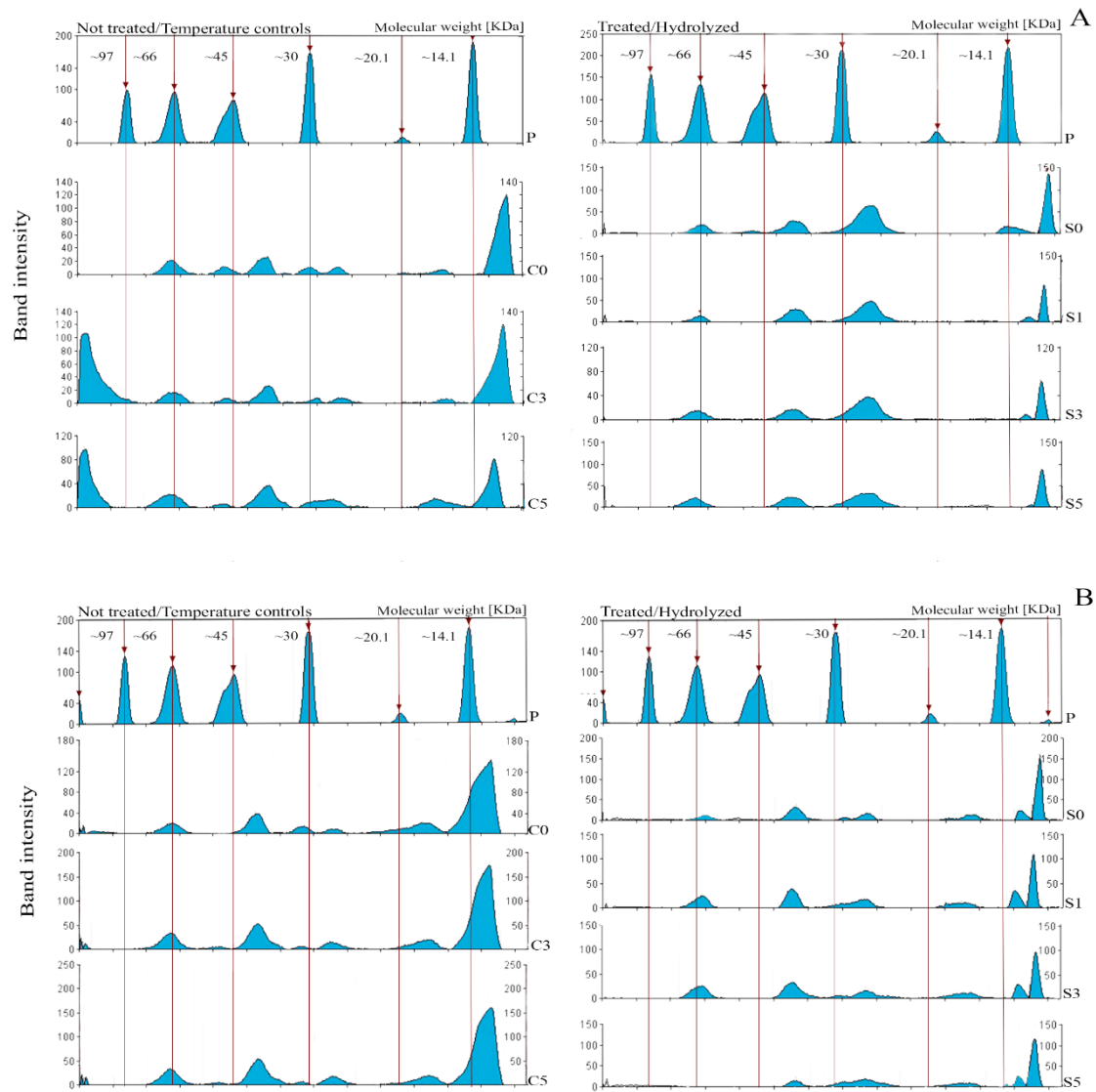


figure 4. Molecular weight distribution of temperature controls and hydrolysis assay of soluble *Moringa oleifera* Lam flour (SMOF). (A) Hydrolysis with EBC: P C0-C5 (SMOF exposed to different times at temperature). S0-S5 (SMOF treated with EFL exposed to different times at temperature). B) Hydrolysis with EFL: P (pattern). C0-C5 (SMOF exposed to different times at temperature). S0-S5 (SMOF treated with EFL exposed to different times at temperature).

Effect of temperature exposition in MOF fractions and EBC, EFL.

Some changes like increasing and decreasing intensity peak in proteins of electrophoretic profile of temperature controls were detected. In IMOF and SMOF could be observed an increasing intensity of less band molecular weight protein and some big molecular protein (>97 Kda) at 3h. Despite that, the SMOF obtained

in pH7 (see fig. 4b) does not present significant changes due to the effect of temperature up to temperature studied. In the case of EBC was observed a decrease in the molecular weight ~30KDa at 7h to temperature exposition (data not shown), and EFL was poorly detected in the electrophoresis analysis at time (data not shown).

3. DISCUSSION

According to the species, cultivar and state of ripening will be found different enzymatic optimum conditions to EFL (Lazreg-Aref et al., 2018) and EBC (LC et al., 2016). Nevertheless, in this study, the optimum pH (7) to ficin and pH (8) to bromelain and temperature (60 °C) are according to other works reported previously to EFL (Homaei, 2015) and EBC (Ketnawa et al., 2012). Specifically, for the EFL, the increased activity of ficin at pH 9 (Fig.1) may be explained by different isoforms as have been previously described by different extract ficin latex (Zare et al., 2012).

In addition, the likely presence of isoforms in EFL may explain the difficulty of thermodynamic characterization by Arrhenius model for the EFL because i) k_i values were greater in 45°C than in 50°C (table 1), ii) the behavior in 55°C and 60 °C does not have substantial differences and iii) there was a maintenance of the enzymatic activity (~40%) up to 24h (data not shown) at the temperature of the 55°C studied. On the other hand, in the case of EBC, the Arrhenius model was adequate to explain how the constant of initiation k_i varies in function of temperature. The activation energy value (E) of EBC was less than for other pineapple residues already studied such as pineapple peel (Elias et al., 2011). It means that less energy is required to initiate the reaction.

The thermal stability (°55C) of different MOF fractions and enzymatic extracts showed changes like increasing and decreasing soluble protein quantification and intensity of peaks in molecular weight distribution. These results could be explained by denaturation processes that include alterations in the surface topology of protein, mainly in grouping of non-polar, polar and charge amino acids

(Foegeding & Davis, 2011). Depending on protein surface topology, will be more susceptible to be soluble or insoluble or as aggregated high molecular weight form (Vihinen, 2020) and to be or not detected in analytical methods. In addition, changes in charge amino acid could differ in the quantification method Bradford essay because dye binding Coomassie Brilliant Blue depends on basic amino acid content in the sample (Noble & Bailey, 2009).

In congruence with the above, temperature and type of amino acid charge could interfere in the analysis of enzymatic effect. Therefore, the implementation of different evaluation methods and controls are relevant. For example, as regards IMOF essay with EBC, the soluble protein quantification Bradford model, does not show significant differences by hydrolysis effect, but electrophoretic profile allowed to determine that big molecular weight protein presented changes over time. Also, in proteins with ~30KDa and between 20,1-14,1 KDa. However, this last result could not be related only by hydrolysis of MOF because EBC has protein with the same molecular weight, and autolysis process of the enzyme may interfere with the results.

Respect to changes at 24h on IMOF hydrolyzed with EBC is not clear the enzymatic effect because at that time, temperature control showed changes in electrophoretic profile and EBC had low residual activity at that time (date not showed). One important fact that must be considered in future studies is that MOF may have enzymes with protease activity, thus the non-pure extract should be analyzed as a control of protease activity.

On the other hand, the effect of EFL on IMOF had statistically significant changes with respect to temperature controls in the soluble protein quantification Bradford model, that could mean the enzymatic effect overcomes the generated temperature exposition, being easy to be detected by this method. Also, the molecular weight distribution of hydrolyzed IMOF had changes in different proteins of the electrophoretic profile and chromatographic profiles were different in all temperatures studied (0-7h). Also, there was less interference of EFL in the

hydrolysis results when is compare with EBC, this can be explained less amount of protein and high activity of EFL.

Finally, about the SMOF fraction, the statistical soluble protein quantification model was less sensible, because it did not find differences by treatment effect (hydrolysis). Despite the above, electrophoretic molecular weight distribution showed a decrease of big molecular weight protein (fig.4) in SMOF hydrolyzed with both enzymatic extract (EBC and EFL). An important aspect to be analyzed in SMOF is there was a noticeable change between C0 and S0 and, it will be explained by increase in the hydrolysis rate by a greater amount protein (see table 1) and/or better availability of these when is compared with IMOF fraction.

4. CONCLUSION

The results allowed evidence that was possible to hydrolyze the proteins of MOF with proteases from fig and bromelain by-product. Specifically, IMOF hydrolyzed with EFL showed a significant increase of soluble protein by the different method applied, being the most promising result. The soluble protein increase of MOF may help to obtain higher protein yields in the plant-based manufacturing industry using environmentally friendly technologies such as enzymatic technology. Moreover, other methods of protein quantification and quality analysis must be included in future studies to understand the type of protein, peptides or amino acid that may be formed by hydrolyzed process and their bioavailability.

CRedit authorship contribution statement

Lady Johana Arismendi Bustamante: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, Writing-Original Draft. **Mariana Barros de Cerqueira e Silva:** Investigation, Writing-Review. **Ariela Veloso de Paula:** Writing-Review. **Maisa Davanso:** Investigation. **Estelamar Maria Borges Teixeira:** Resource. **Juliana Cristina Bassan:** Conceptualization, Supervision.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Finance Code 88882.461721/2019-01

SUPPLEMENTARY MATERIAL

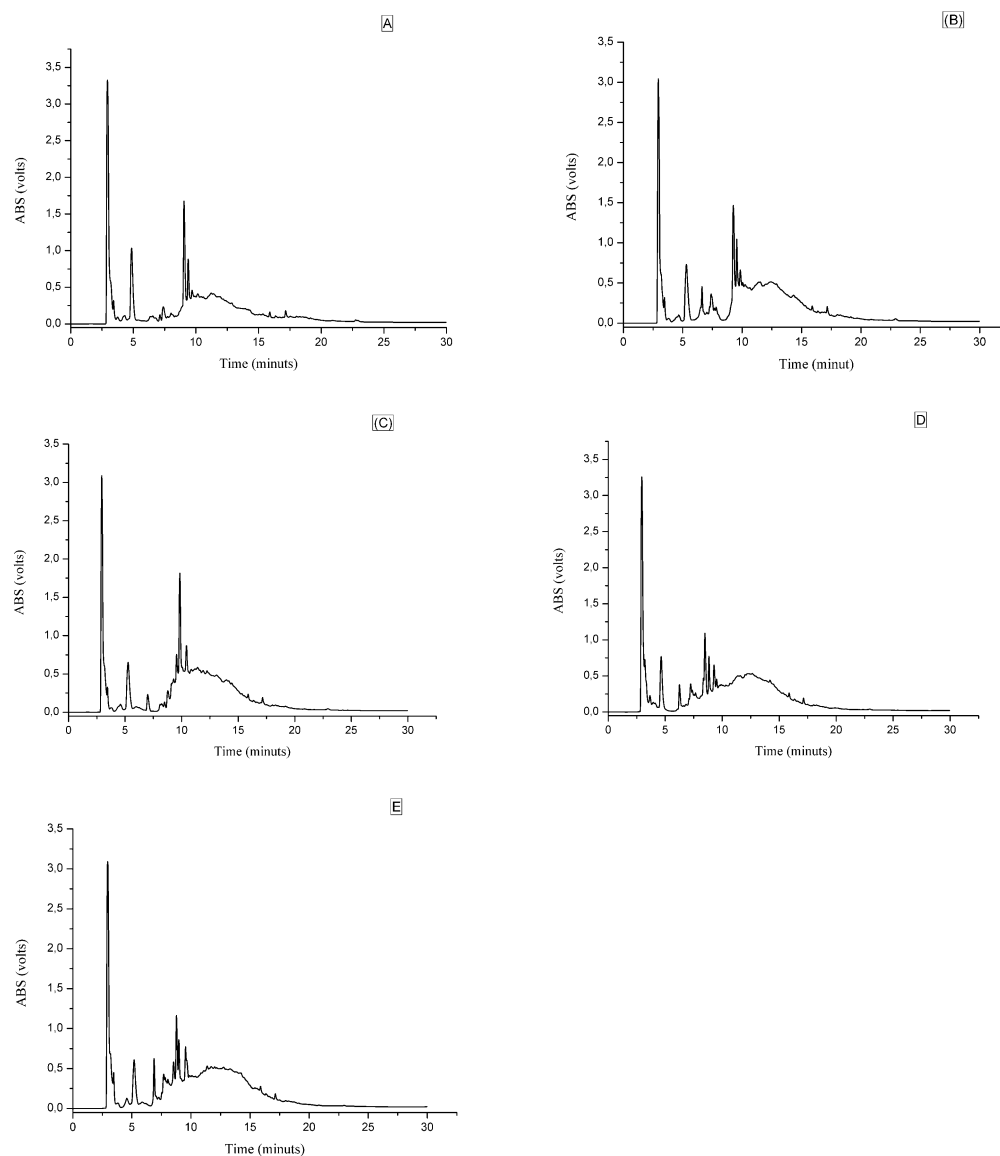


Figure 5. Chromatographic profile of IMOF hydrolyzed with EBC by different times at temperature of 55 °C. A) 0h. B) 1h. C) 3h. D) 5h. E) 7h.

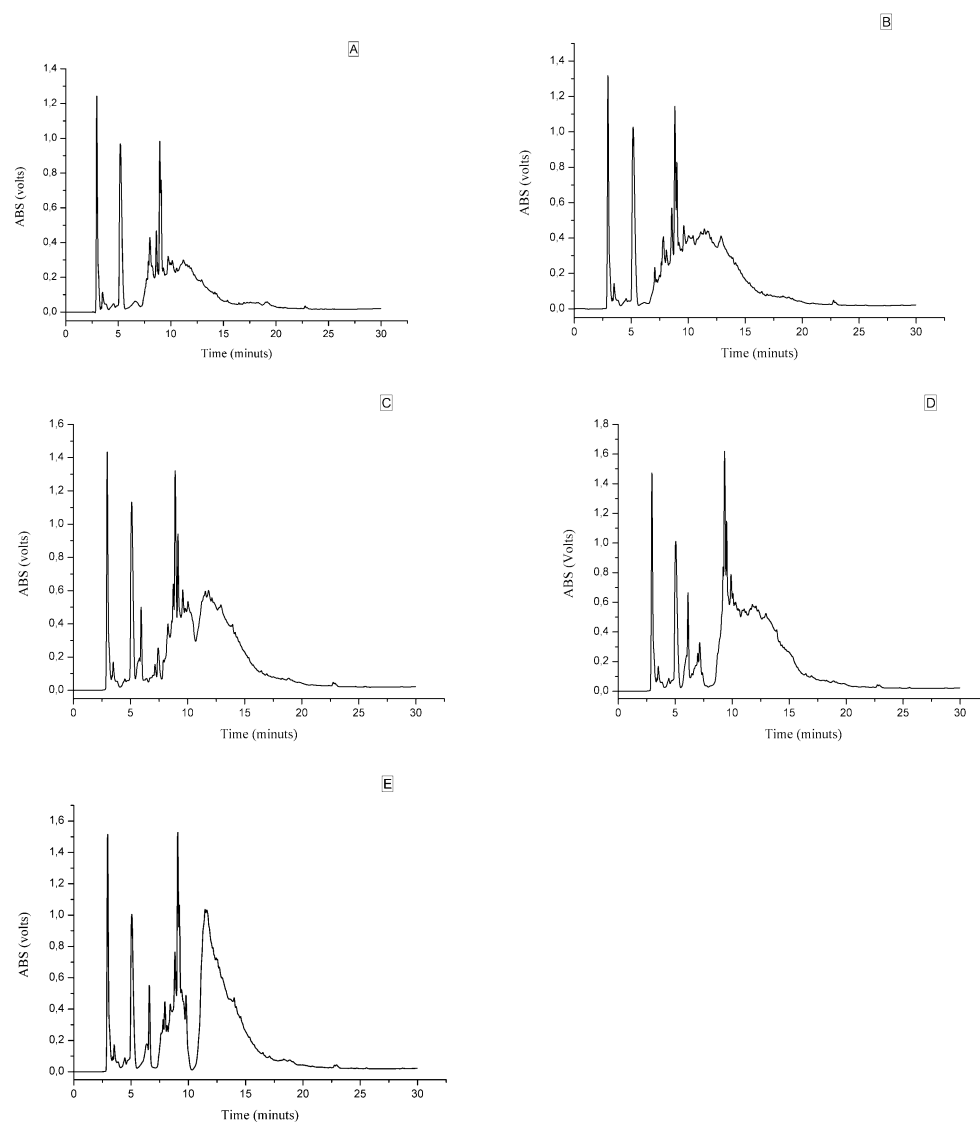


Figure 6. Chromatographic profile of IMOF hydrolyzed with EFL by different times at temperature of 55 °C. A) 0h. B) 1h. C) 3h. D) 5h. E) 7h.

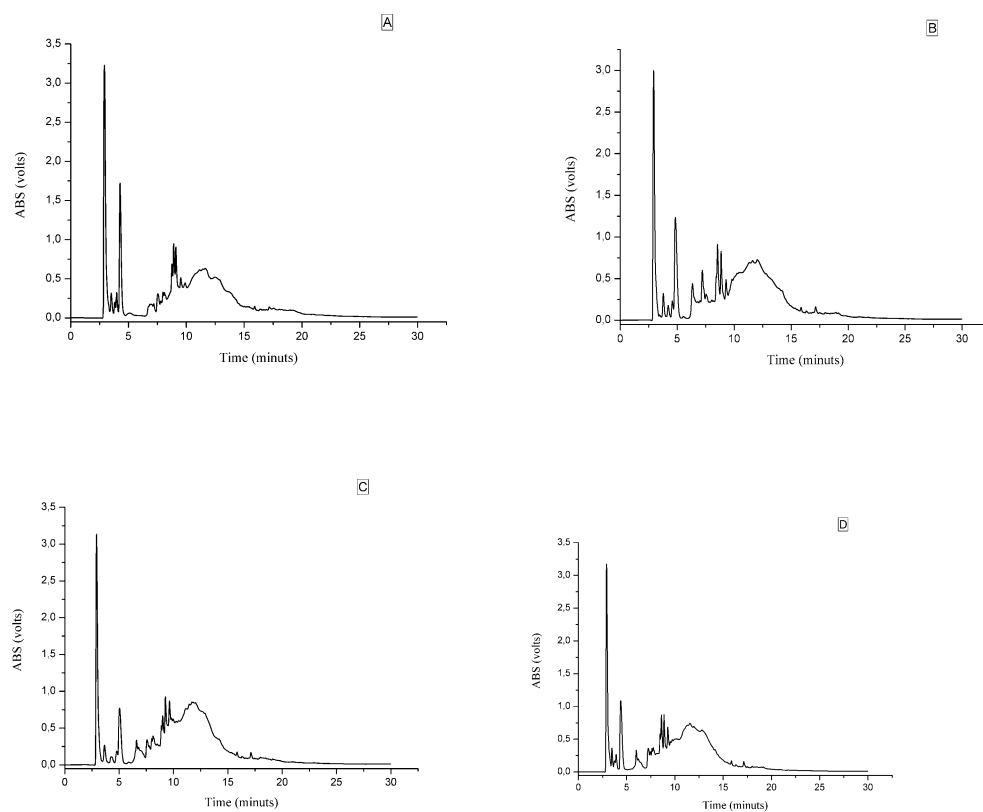


Figure 7. Chromatographic profile of SMOF hydrolyzed with EBC by different times at temperature of 55 °C. A) 0h. B) 1h. C) 3h. D) 5h.

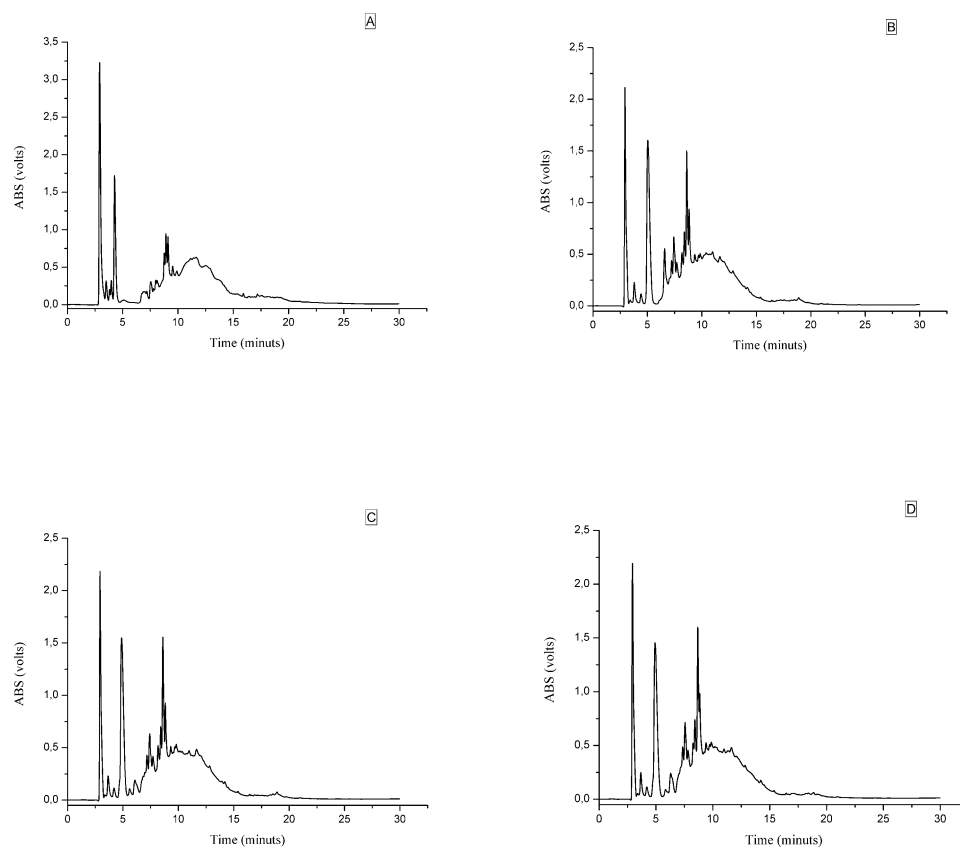


Figure 8. Chromatographic profile of SMOF hydrolyzed with EFL by different times at temperature of 55 °C. A) 0h. B) 1h. C) 3h. D) 5h.

REFERENCES

- Aiking, H. (2011). Future protein supply. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 22, Issues 2–3, pp. 112–120). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.005>
- Alain Mune Mune, M., Carine Nyobe, E., Bakwo Bassogog, C., René Minka, S., & René, S. (2016). A comparison on the nutritional quality of proteins from Moringa oleifera leaves and seeds, *Cogent Food & Agriculture*, 2:1, 1213618. *Cogent Food & Agriculture*, 2, 1213618. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213618>
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., Macfarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2016). *Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
- Benhammouche, T., Melo, A., Martins, Z., Faria, M. A., Pinho, S. C. M., Ferreira, I. M. L. P. V. O., & Zaidi, F. (2021). Nutritional quality of protein concentrates from Moringa Oleifera leaves and in vitro digestibility. *Food Chemistry*, 348, 128858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128858>
- Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P. M., Fischer, A. R. H., van Boekel, M. A. J. S., Rutherford, S. M., Gruppen, H., Moughan, P. J., & Hendriks, W. H. (2013). The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in Food Science and Technology*, 29(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.07.002>
- Borges Teixeira, M., Regina, M., Carvalho, B., Neves, V. A., Silva, M. A., & Arantes-Pereira, L. (2013). *Chemical characteristics and fractionation of proteins from Moringa oleifera Lam. leaves*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.135>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brilhante, R. S. N., Sales, J. A., Pereira, V. S., Castelo-Branco, D. de S. C. M., Cordeiro, R. de A., de Souza Sampaio, C. M., de Araújo Neto Paiva, M., Santos, J. B. F. dos, Sidrim, J. J. C., & Rocha, M. F. G. (2017). Research advances on the multiple uses of Moringa oleifera: A sustainable alternative for socially neglected population. In *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (Vol. 10, Issue 7, pp. 621–630). Elsevier (Singapore) Pte Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.002>
- Da, V., Bolzani, S., Silva, D., Ribeiro, J., de Cerqueira E Silva, J., Barros, M., Philadelpho, J., Oliveira, B., de Souza, J., Cruz, V., Machado, J., Santos, D., Elton, J., Castilho, J., Santos, M., Ferreira, J., de Souza, E., Cilli, J., & Maffud, E. (2021). PyrGF and GSTLN peptides enhance pravastatin's inhibition of 3-

- hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme. *FOOD BIOSCIENCE*, 44(B).
<https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101451>
- Dahiya, S., Naresh Kumar, A., Sravan, J. S., Chatterjee, S., Sarkar, O., & Mohan, S. V. (2017). *Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy*.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.176>
- Ekmekcioglu, C., Wallner, P., Kundi, M., Weisz, U., Haas, W., & Hutter, H. P. (2018). Red meat, diseases, and healthy alternatives: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), 247–261.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1158148>
- Elias, M. J., Arcuri, I. F., & Tambourgi, E. B. (2011). Bromelain: better thermal stability conditions for its recovery from pineapple residues/Avaliacao das condicoes de melhor estabilidade termica para a recuperacao da bromelina a partir de residuos do abacaxi. *Acta Scientiarum. Technology*, 33(3), 281–287.
<https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=18062563&v=2.1&it=r&id=G ALE%7CA442454644&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
- Esparza, I., Jimenez Enez-Moreno, N., Bimbela, F., Ancín-Azpilicueta, C., & Gandía, L. M. (2020). Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. *Journal of Environmental Management*, 265, 110510.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110510>
- Fao. (2013). *Food wastage footprint: Impacts on natural resources - Summary report*.
www.fao.org/publications
- FAO/ expert consultation. (2011). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO food and nutrition paper 92. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Foegeding, E. A., & Davis, J. P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1853–1864.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2011.05.008>
- Gupta, S., Jain, R., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2018). Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam.—Review of current status and future possibilities. In *Journal of Herbal Medicine* (Vol. 11, pp. 1–11). Elsevier GmbH.
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.07.003>
- Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>
- Hannelore Danie. (2004). Protein Digestion and Absorption of Amino Acids and Peptides. In Leonard R.Johnson (Ed.), *Encyclopedia of Gastroenterology* (pp. 247–250). Elsevier.
- Hedhili, A., Lubbers, S., Bou-Maroun, E., Griffon, F., Akinyemi, E., Husson, F., & Valentin, D. (2021). *Moringa Oleifera supplemented biscuits: Nutritional values and consumer segmentation*. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.017>

- Homaei, A. (2015). Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 373–377. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.055>
- Ijarotimi, O. S., Adeoti, O. A., & Ariyo, O. (2013). Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food Science & Nutrition*, 1(6), 452–463. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70>
- Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioprocess Processing*, 90(3), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.006>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lazreg-Aref, H., Gaaliche, B., Ladhari, A., Hammami, M., & Hammami, S. O. (2018). Co-evolution of enzyme activities and latex in fig (*Ficus carica* L.) during fruit maturity process. *South African Journal of Botany*, 115, 143–152. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2018.01.022>
- LC, de L. N., AF, J., AM, L., V, de C. S.-E., PG, M., & A, P. J. (2016). Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnology Progress*, 32(1), 5–13. <https://doi.org/10.1002/BTPR.2190>
- Lee, S., Choi, Y.-S., Jo, K., In Yong, H., Gyung Jeong, H., & Jung, S. (2021). Improvement of meat protein digestibility in infants and the elderly. *Food Chemistry*, 129707. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129707>
- Leone, A., Fiorillo, G., Criscuoli, F., Ravasenghi, S., Santagostini, L., Fico, G., Spadafranca, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Pozzi, F., di Lello, S., Filippini, S., & Bertoli, S. (2015). Nutritional Characterization and Phenolic Profiling of *Moringa oleifera* Leaves Grown in Chad, Sahrawi Refugee Camps, and Haiti. *Int. J. Mol. Sci*, 16, 18923–18937. <https://doi.org/10.3390/ijms160818923>
- Morton, J. F. (1991). The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae)-A boon to Arid Lands? *Economic Botany*, 45(3), 318–333. <https://doi.org/10.1007/BF02887070>
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Chapter 8 Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 463(C), 73–95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
- Paikra, B. K., Kumar, H., Dhongade, J., & Gidwani, B. (n.d.). *Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera* Lam. <https://doi.org/10.3831/KPI.2017.20.022>
- S^ Amia Nogueira, R., 1✉, B., Sales, J. A., Santos Pereira, V., De, D., Collares, S., Castelo-Branco, M., de Aguiar Cordeiro, R., Maria De Souza Sampaio, C., de Araújo, M., Paiva, N., Bosco, J., Santos, F. dos, Júlio, J., Sidrim, C., Abio, M. F. ', & Rocha, G. (2017). *Research advances on the multiple uses of Moringa*

- oleifera: A sustainable alternative for socially neglected population.*
<https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.002>
- Sánchez-Machado, D. I., Núñez-Gastélum, J. A., Reyes-Moreno, C., Ramírez-Wong, B., & López-Cervantes, J. (n.d.). *Nutritional Quality of Edible Parts of Moringa oleifera*. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9106-z>
- Sharma, R., Oberoi, H. S., & Dhillon, G. S. (2016). Fruit and Vegetable Processing Waste: Renewable Feed Stocks for Enzyme Production. In *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass* (pp. 23–59). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00002-2>
- Siar, E. H., Zaak, H., Kornecki, J. F., Zidoune, M. N., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 58(February), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.009>
- Singh, A., Sharma, S., & Singh, B. (2017). *Effect of germination time and temperature on the functionality and protein solubility of sorghum flour*. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.003>
- Stone, A. K., Wang, Y., Tulbek, M., & Nickerson, M. T. (2018). Plant protein ingredients. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 229–234). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21601-6>
- Torres-León, C., Ramírez-Guzman, N., Londoño-Hernandez, L., Martinez-Medina, G. A., Díaz-Herrera, R., Navarro-Macias, V., Alvarez-Pérez, O. B., Picazo, B., Villarreal-Vázquez, M., Ascacio-Valdes, J., & Aguilar, C. N. (2018). Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 0, 52. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2018.00052>
- Vihinen, M. (2020). Solubility of proteins. *ADMET and DMPK*, 8(4), 391–399. <https://doi.org/10.5599/ADMET.831>
- Zare, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Salami, M., Mirzaei, M., Saboury, A. A., & Sheibani, N. (2012). *Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (Ficus carica cv. Sabz) latex*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.12.006>
- Zayas, J. F., & Zayas, J. F. (1997). Introduction. In *Functionality of Proteins in Food* (pp. 1–5). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59116-7_1
- Zhu, X., Kaur, L., Staincliffe, M., & Boland, M. (2018). *Actinidin pretreatment and sous vide cooking of beef brisket: Effects on meat microstructure, texture and in vitro protein digestibility*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.029>

CAPÍTULO 2

Avaliação da hidrólise das proteínas da farinha de *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller usando bio-produtos do figo e o abacaxi.

Lady Johana Arismendi Bustamante^a

Juliana Cristina Bassan^a

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department Food, Nutrition and Food Engineering. UNESP – Univ. Estadual Paulista, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

RESUMO

Objetivo: promover a hidrólise das proteínas de farinha integral de folhas de *Moringa oleífera* Lam (MOF) e *Pereskia aculeata* Miller (PAF). **Métodos:** foram utilizadas folhas frescas de *Moringa oleífera* Lam (MO). As folhas foram secas por convecção com ar quente em estufa à 40°C por 24 horas e processada até uma farinha. Já a farinha de *Pereskia aculeata* Miller orgânica foi adquirida via compra *on line* da Empresa Empório Santo Antônio. As farinhas foram peneiradas e solubilizadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH7. Para a hidrólise enzimática do extrato de *Moringa oleífera* Lam foram oferecidas $5,18 \pm 0,4$ U/mg (Unidades por miligramas de proteína solúvel) e para hidrólise da *Pereskia aculeata* Miller, $11,73 \pm 2,1$ U/mg (Unidades por miligrama de proteína solúvel). A temperatura de hidrólise foi 55°C e agitação a 110 rpm. Amostras foram retiradas em diferentes períodos (0-5h). A inativação da reação enzimática foi feita por congelamento rápido em banho de etilenoglicol a -32°C. As análises dos produtos de hidrólise foram feitas por o método colorimétrico de Bradford e o método SDS-PAGE. **Resultados:** a PAF apresentou um aumento significativo de proteína e peptídeos entre os extratos não hidrolisados (controles de temperatura) e os hidrolisados. Os perfis eletroforéticos evidenciaram que a ficina gera mudanças nas proteínas das duas farinhas das plantas. **Conclusão:** existe um efeito catalítico da enzima ficina sob as proteínas de maior massa molecular (> 97 KDa) da MOF e proteínas de diferentes massas moleculares presentes na PAF. O incremento de proteína e peptídeos por métodos colorimétricos sob foi evidenciado na PAF.

Palavras-chave: *Pereskia aculeata* Miller, *Moringa oleífera* Lam, proteína, peptídeos, hidrólise.

ABSTRACT

Objective: to promote the hydrolysis of proteins from *Moringa oleífera* Lam flour (MOF) and *Pereskia leaves aculeata* Miller flour (PAF). **Methods:** fresh leaves of *Moringa oleífera* Lam (MO) were used. The leaves were dried by convection with hot air in an oven at 40°C for 24 hours and processed. PAF was acquired via online purchase from Emporium Santo Antônio Company. The flours were sieved and solubilized in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH7. For the enzymatic hydrolysis of MOF extract, offered 5.18 ± 0.4 U/mg (Units per milligram of soluble protein) and for hydrolysis of PAF, 11.73 ± 2.1 U/mg (Units per milligram of soluble protein). The hydrolysis temperature was 55°C and stirring at 110 rpm. Samples were taken at different times (0-5h). The inactivation of the enzymatic reaction was made by quick freezing in an ethylene glycol bath at -32°C. Analysis of hydrolysis products were made by the Bradford colorimetric method and the SDS-PAGE method. **Results:** PAF presented a significant increase in soluble protein and peptides among the extracts no hydrolysates (temperature controls). The electrophoretic profiles showed that ficin generates changes of proteins in the two plant flours. **Conclusion:** there is a catalytic effect of the enzyme ficin under the higher proteins molecular weight (> 97 KDa) of MOF and proteins of different molecular weights present in PAF. The increase of protein and peptides by colorimetric methods under were evidenced in the PAF hydrolyzed.

Keywords: *Pereskia Miller aculeata*, *Moringa oleífera* Lam, protein, peptides, hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

Nos processos de pesquisa nas áreas de saúde e engenharia dos alimentos, os pré-tratamentos da matéria orgânica que incluem por exemplo, a secagem, moagem e separação, são comumente necessários para análises de bioatividade, rendimento de extração de biocompostos, impacto ambiental e aplicação em escala industrial. Entre as vantagens que abrangem estes processos se ressaltam a conservação da matéria prima, a diminuição do tamanho de partícula, a quantificação, identificação e purificação de compostos (1).

Os processos de pré-tratamento da MOF implementados em capítulos anteriores incluíram a secagem com fins de conservação e a separação da fração solúvel e insolúvel em água. A partir do processo de separação por solubilidade, foi possível identificar algumas diferenças nos produtos de hidrólise enzimática possivelmente relacionada com a interação enzima-substrato.

Partindo de que os processos de separação representam também um maior consumo de energia e com o objetivo de avaliar se existe efeito catalítico na farinha integral das plantas em estudo, neste capítulo foi apresentado o estudo da hidrólise da farinha integral (sem separação por solubilidade) da *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller (PA).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Para a produção da MOF foram utilizadas folhas frescas (Figura 1) as quais foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Bromatologia do Instituto Federal do Triângulo Mineiro localizado em Uberaba, MG, coordenado pela Profa. Dra. Estelamar Maria Borges Teixeira. A farinha de PA (PAF) orgânica (Figura 2) foi adquirida via compra *on line* da Empresa Empório Santo Antônio, localizada na cidade de Curitiba-PR. O extrato enzimático com atividade de ficina foi obtida a

partir da extração do látex de *Ficus carica* coletado de uma propriedade rural do Município de São Carlos, SP, no mês de julho de 2020. Todos os demais reagentes usados foram de grau analítico.



Figura 1. Folhas de *Moringa oleífera* Lam. (Fonte: Próprio autor)



Figura 2. Farinha comercial de *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nóbis). (Fonte: Próprio autor)

Obtenção da farinha das folhas de *Moringa oleífera* Lam e *Pereskia aculeata* Miller

As folhas frescas de MO foram higienizadas com hipoclorito de sódio à 200 ppm por 30 minutos. Após o tempo de higienização, a solução de hipoclorito de sódio foi drenada e as folhas foram lavadas abundantemente com água destilada. Em seguida as folhas foram secas por convecção com ar quente em estufa à 40°C por 24 horas. Para obtenção de farinha, as folhas secas da MO e PA foram liquidificadas por 2 minutos com auxílio de um liquidificador doméstico de 500 W da marca Philips Walita® modelo RI2035. Após a liquidificação as farinhas foram peneiradas em peneiras de Marca Bertel de abertura 500 e 300 µm.

Obtenção e preparo do EFL.

O material foi coletado a partir da recuperação das gotas de látex liberadas do pedúnculo após a colheita do fruto imaturo de *Ficus carica*. O extrato foi centrifugado a 3200 g por 15 min a 4°C. A fração insolúvel foi descartada e o sobrenadante resultante foi usado como extrato enzimático. Todo o extrato obtido foi devidamente acondicionado em frascos âmbar e armazenado sob congelamento à -18°C

Reconstituição aquosa das farinhas MOF e PAF.

A reconstituição das farinhas da MOF e PAF peneiradas foi realizada na proporção de 1:10 (p/v, farinha: tampão) em tampão fosfato 0.1M pH7. A suspensão resultante foi homogeneizada em processador PMX600 com potência de 600W da marca Philco® por 4 minutos a temperatura ambiente. Os extratos de MOF e PAF foram devidamente armazenados e mantidos em congelamento a -18°C até o momento de uso nos ensaios experimentais.

2.2. MÉTODOS

Hidrólise enzimática

Para a hidrólise enzimática, extratos da MOF e PAF foram dispersos em tampão fosfato de 100mM pH 7 na proporção de 1:1 (p/v),. Para a hidrólise do extrato de MOF foi oferecido 10,93 U/g (Unidades por grama de extrato) ou $5,18 \pm 0,4$ U/mg (Unidades por miligramas de proteína solúvel). Já para o extrato de PAF foi oferecido 10,93 U/g (unidades por gramo de extrato) ou $11,73 \pm 2,1$ U/mg (Unidades por gramo de extrato). Para a hidrólise, alíquotas do extrato de MOF e PAF e o extrato com atividade de ficina foram colocados em frascos, homogeneizados manualmente e levados a banho-maria metabólico com agitação orbital tipo Dubnoff a uma temperatura de 55°C e agitação a 110 rpm. Amostras foram retiradas em diferentes períodos (0-5h). A inativação da reação enzimática foi feita por congelamento rápido em banho de etilenoglicol a -32°C. Concomitante aos ensaios de hidrólise, foi realizado um experimento em paralelo nas mesmas condições de pH e temperatura, mas na ausência de extrato enzimático com atividade de ficina com o objetivo de se avaliar o efeito da temperatura na estabilidade proteica, sendo denominado de “ensaio controle de temperatura”.

Quantificação de proteína total solúvel.

Para a quantificação das proteínas solúveis dos extratos de MOF e PAF, dos controles de temperatura e dos hidrolisados, as amostras foram centrifugadas a 3200 g por 30 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram usados na análise colorimétrica de proteína total pelo método de Bradford (2). Para o cálculo, foi construída uma curva analítica utilizando como padrão a soro albumina bovina (SBA). A absorção foi determinada em $\lambda=595$ nm, a equação obtida em ($\mu\text{g/mL}$) na regressão linear foi $y = 0,0171x + 0,0992$ e o $R^2 = 0.991$.

Análise do perfil proteico das frações solúvel e insolúvel da farinha das folhas de MOF e PAF por SDS-PAGE 10% antes e após hidrólise enzimática

A identificação dos perfis proteicos, avaliação da hidrólise proteica e possíveis mudanças nos controles de temperatura foram realizados utilizando SDS-PAGE 10% de acordo com o método de Laemmli et al (3) com algumas modificações. Inicialmente, alíquotas de 1 mL do ensaio de hidrólise e controle de temperatura foram centrifugadas a 3.200 g por 30 min. O sobrenadante foi concentrado a 30 ° C por 90min em rotaevaporador. Após a rotaevaporação, 75 µl de cada amostra foram homogeneizadas em 25 µl tampão de ruptura seguido de aquecimento a 100 ° C durante 5 min. Alíquotas de 30 µl de cada amostra foram aplicadas no gel (10%), juntamente com 4 µl da solução de padrão de massa molecular (GE Healthcare) composto por fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovo albumina (45 kDa) anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Após a fixação e coloração com azul brilhante de Coomassie, o gel foi descorado e varrido usando (equipamento). Pesos moleculares aparentes foram determinados usando o software GelAnalyser versão 19.1

Análise dos produtos de hidrólise solúveis em ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%)

Os produtos de hidrólise solúveis em TCA 5% e os aminoácidos livres foram determinados de acordo com o método de Wang et al (4) com algumas modificações. Cada amostra de hidrolisado e controle de temperatura (100 µl) foi adicionada a 900 µl de solução de TCA a 5%. A mistura foi mantida em repouso durante 60 min. a 4°C para logo em seguida ser centrifugada a 3200 g durante 30 min. Os produtos de hidrólise solúveis em TCA 5% e os aminoácidos livres presentes no sobrenadante, foram determinados espectrofotometria a 280 nm usando espectrofotômetro UV-Visível. A quantificação de peptídeos foi feita com a equação

Análise estatística

Análises de variância (ANOVA) e comparação de médias com o teste de Tukey foram realizadas usando o software Minitab (Minitab Estatísticas Software versão). As variáveis de estudo foram tratamento (hidrolise ou não hidrólise) e

tempo de exposição à temperatura de 55°C no rango de 0-5h. Interações e diferenças com o valor do $P < 0,05$ foram consideradas significativas.

3. RESULTADOS

Quantificação de proteína solúvel total

O extrato de MOF não apresentou interação ($p > 0,05$) das variáveis tempo de hidrólise e tratamento (hidrolisado e não hidrolisado com ficina) para a proteína solúvel, porém no extrato de MOF não tratado (controle de temperatura) se detectou uma diminuição de proteína solúvel que foi estatisticamente significativa entre o tempo 0h e o tempo de 5h de exposição a 55°C (Tabela 1). Por outro lado, o extrato de PAF apresentou um aumento significativo de proteína entre os extratos não hidrolisados (controles de temperatura) e os hidrolisados com ficina por 1h. Não foram encontradas diferenças após 1h por este método analítico.

Quantificação de peptídeos solúveis totais

O modelo linear não evidenciou interação ($P > 0,05$) entre as variáveis tempo de hidrólise e tratamento (hidrólise/não hidrólise) com a quantificação de peptídeos solúveis totais para as duas farinhas, porém os hidrolisados dos extratos de PAF tratadas (hidrolisada) apresentaram um aumento significativo nos peptídeos totais no intervalo de tempo entre 0h e 1h de hidrólise. Não foram encontradas diferenças significativas após 1 hora de hidrólise.

Tabela 1. Comparação das médias $\pm$ desvios padrão dos valores de proteína solúvel por tipo de tratamento (não hidrolisado/hidrolisado) com extrato enzimático de ficina a diferentes tempos de exposição à temperatura (0-5h).

				Media $\pm$ desvio padrão			
Tipo de Farinha	Tempo	Proteína solúvel		Tipo de farinha	Tempo	TCA-Peptídeos	
		Não hidrolisado*	Hidrolisado**			Não hidrolisado*	Hidrolisado**
<i>Moringa oleífera</i> Lam (MOF)	0	1,96 $\pm$ 0,07 ^A	1,76 $\pm$ 0,03 ^{AB}	<i>Moringa oleífera</i> Lam (MOF)	0	19,71 $\pm$ 0,43 ^{AB}	18,51 $\pm$ 1,20 ^B
	1	1,66 $\pm$ 0,08 ^{AB}	1,70 $\pm$ 0,09 ^{AB}		1	21,21 $\pm$ 0,25 ^{AB}	24,23 $\pm$ 1,44 ^{AB}
	3	1,55 $\pm$ 0,13 ^{AB}	1,77 $\pm$ 0,08 ^{AB}		3	22,21 $\pm$ 1,07 ^{AB}	25,38 $\pm$ 1,45 ^{AB}
	5	1,40 $\pm$ 0,15 ^B	1,70 $\pm$ 0,12 ^{AB}		5	22,77 $\pm$ 1,78 ^{AB}	25,67 $\pm$ 1,61 ^A
<i>Pereskia aculeata</i> Miller (PAF)	0	1,01 $\pm$ 0,09 ^A	1,04 $\pm$ 0,12 ^A	<i>Pereskia aculeata</i> Miller (PAF)	0	15,33 $\pm$ 0,36 ^{AB}	16,39 $\pm$ 0,26 ^A
	1	1,05 $\pm$ 0,06 ^A	1,55 $\pm$ 0,10 ^B		1	16,46 $\pm$ 0,38 ^{AB}	19,89 $\pm$ 0,36 ^{BC}
	3	1,05 $\pm$ 0,07 ^A	1,60 $\pm$ 0,05 ^B		3	17,97 $\pm$ 1,84 ^{ABC}	20,41 $\pm$ 0,15 ^C
	5	1,08 $\pm$ 0,04 ^A	1,61 $\pm$ 0,11 ^B		5	17,03 $\pm$ 0,10 ^{ABC}	20,78 $\pm$ 0,21 ^C

MOF (farinha de *Moringa oleífera* Lam). PAF (farinha de *Pereskia aculeata* Miller). *ausência de ficina e efeito da temperatura (controle de temperatura); **presença de ficina e temperatura (ensaio de hidrólise).

Perfil eletroforético do extrato de MOF hidrolisado e não hidrolisado com ficina.

Na figura 1 é apresentado o perfil eletroforético do extrato de MOF sem tratamento (controle de temperatura) e com tratamento (hidrolisado) com o extrato de ficina. No hidrolisado não são detectadas grandes diferenças por tempo de hidrólise (S0-S5), porém entre C0 e S0 se observa desaparecimento das proteínas de maior peso molecular ($>97\text{kDa}$) assim como as de $\sim 45\text{kDa}$ e incremento na intensidade das proteínas de menor massa molecular ($< 14\text{kDa}$). O incremento das proteínas de menor massa molecular ($< 14\text{kDa}$) também foi observado, mas em menor proporção, nos controles de temperatura (C0-C5).

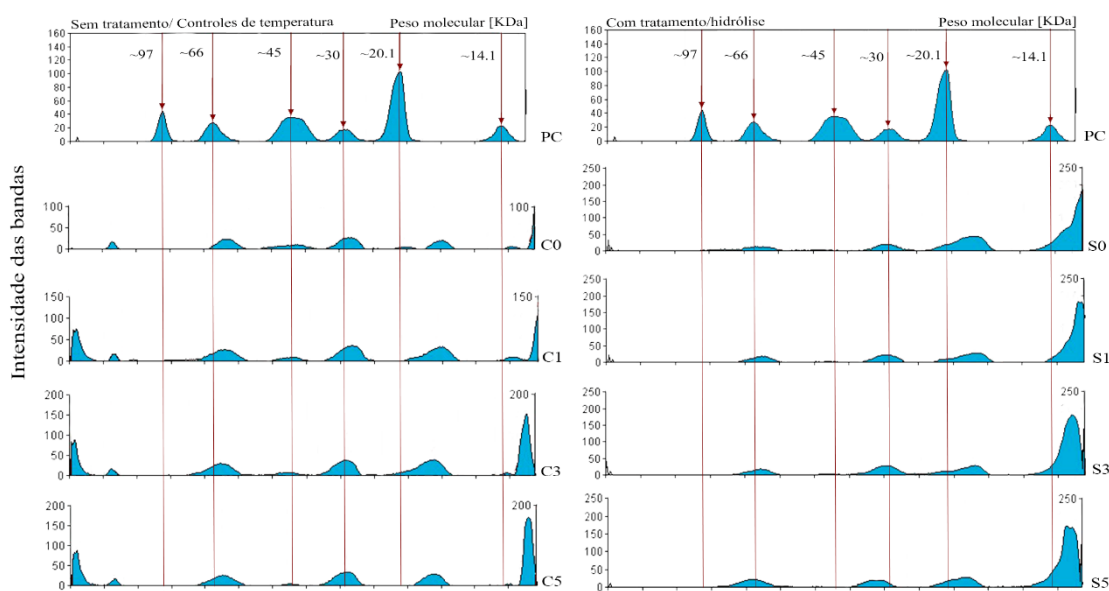


Figura 3. Perfil de massa molecular das proteínas do extrato de MOF não tratado (controle de temperatura) e do hidrolisado com o extrato com atividade de ficina. PC: Padrão de massa molecular. C0: extrato de MOF não exposto a temperatura; C1: extrato de MOF exposto a 55°C por 1h. C3: exposto a 55°C por 3h; C5: exposto a 55°C por 5h. S0: extrato de MOF hidrolisado com ficina e não exposto a temperatura; S1: hidrolisado com ficina e exposto a 55°C por 1h; S3: hidrolisado com ficina e exposto a 55°C por 3h; S5: hidrolisado com ficina e exposto a 55°C por 5h;

Perfil eletroforético do extrato de PAF hidrolisado e não hidrolisado com ficina.

Na figura 2 se apresenta o perfil eletroforético da PAF, hidrolisado e não hidrolisado (controle de temperatura). Entre C0-S0 se observa um aumento na intensidade de proteínas de ~20kDa e uma diminuição das proteínas de menor massa molecular (< 14 kDa). Já para o tempo de hidrólise de 3h (S3) se evidencia a presença de proteínas com massa molecular maior ou igual a 97 kDa, as quais não se observam no tempo de hidrólise de 5h (S5), este último resultado poderia se relacionar com sua hidrólise, assim como o aumento da intensidade de proteínas com massa molecular ~de 20kDa e a diminuição de intensidade das proteínas menores do que <14 KDa em S5.

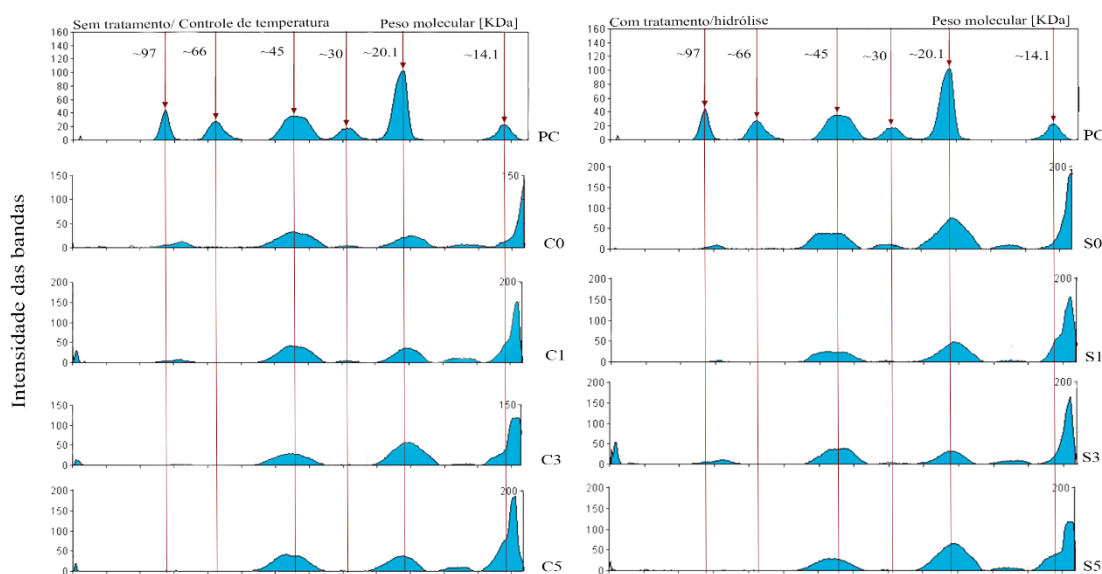


Figura 4. Perfil de massa molecular das proteínas do extrato de PAF não tratado (controle de temperatura) e d hidrolisado com o extrato com atividade de ficina. PC: Padrão de massa molecular. C0: extrato de PAF não exposto a temperatura; C1: extrato de PAF exposto a 55°C por 1h. C3: exposto a 55°C por 3h; C5: exposto a 55°C por 5h. S0: extrato de PAF tratado com ficina exposto a 55°C por 0h; S1: tratado com ficina e exposto a 55°C por 1h; S3: tratado com ficina e exposto a 55°C por 3h; S5: tratado com ficina e exposto a 55°C por 5h.

4. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores com a farinha de folhas de *Moringa oleifera* Lam (Capítulo 2), não foram detectadas na fração solúvel em água diferenças significativas no conteúdo de proteína total avaliada pelo método de Bradford). Um comportamento similar foi encontrado neste estudo de hidrólise da farinha integral de MOF, porém, como já mencionado anteriormente, este resultado não significa que não houve ação catalítica do extrato de ficina sobre o substrato proteico (MOF). As mudanças geradas por efeito da exposição à temperatura interferem nas análises do efeito enzimático, de modo que não se permite distinguir no modelo estatístico se as mudanças são verdadeiramente geradas por a hidrólise. Para a diminuição de proteína solúvel nos controles de temperatura trabalhamos com a hipótese de que existe a presença de proteases endógenas no extrato de MOF ou que a temperatura de reação está ocasionando um processo de desnaturação térmica levando a precipitação de proteínas que não são capazes de serem detectadas por espectrofotometria. Nesse sentido serão necessárias outras análises e experimentos com o intuito de avaliar estas possíveis hipóteses.

No que se refere as análises dos produtos de hidrólise solúveis em TCA 5% (peptídeos e aminoácidos livres), o extrato de MOF tratado com ficina apresentou diferenças significativas no conteúdo de peptídeos totais e aminoácidos por efeito do tempo de exposição à temperatura entre zero (0h) e 1h de hidrólise, mas o modelo não consegue distinguir se existe um efeito significativo do tratamento enzimático ($p=0,054$). O efeito do tratamento enzimático na MOF conseguiu ser evidenciado através do estudo dos perfis eletroforéticos determinados por SDS-PAGE 10%. Previamente para a obtenção dos perfis eletroforéticos da fração solúvel da MOF foram empregados géis de acrilamida ao 12% (capítulo 2). Com essas análises foi evidenciado que as proteínas de maior massa molecular ($>97\text{KDa}$) não estavam presentes nos extratos tratados e sim nos extratos não tratados. Dessa forma foi realizada uma diminuição na porcentagem de acrilamida para 10% com o propósito de se avaliar a possibilidade da presença de proteínas

de maior massa molecular e sua capacidade de permearem o gel, portanto, e ter uma evidência mais clara do efeito do tratamento (hidrólise).

Como resultado da mudança na concentração do gel (SDS-PAGE 10%), para o extrato de MOF foi possível observar que as proteínas de maior massa molecular ($> 97\text{KDa}$) dos extratos não tratados conseguiram permear o gel nos tratamentos controle de temperatura, evidenciado que seu desaparecimento nos extratos tratados com ficina pode estar relacionado com o efeito proteolítico. Além disso, também houve um incremento na detecção de bandas proteicas de menor massa molecular ($<14\text{KDa}$) em S0 quando comparado com C0. Diferenças entre C0 e S0 também foram detectadas na quantificação de proteína solúvel pelo método Bradford, apresentando uma menor quantidade de proteína no extrato tratado enzimaticamente. Uma das razões pelas quais, esta diferença não foi estatisticamente significativa pode estar relacionado com o tipo de aminoácidos ou peptídeos liberados pela hidrólise enzimática, já que segundo sua carga, poderão ou não reagir com o Azul de Coomassie (método Bradford). Com isso análises por métodos mais sensíveis como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) serão realizadas para obtenção de conclusões mais assertivas.

Por outro lado, a hidrólise do extrato de PAF apresentou um aumento de proteína total que segundo o modelo, se explica tanto por efeito do tratamento enzimático quanto pela exposição à temperatura. Por outra parte o aumento significativo de peptídeos entre zero horas e 1 hora se explicou no modelo por efeito do tratamento proteolítico. Esses resultados podem estar relacionados com o aumento de proteínas, peptídeos ou aminoácidos de menor massa molecular ($< 14\text{KDa}$) como foi observado nos perfis eletroforéticos. O incremento das proteínas de menor massa molecular pode ser o resultado da hidrólise de proteínas de maior massa molecular que estão presentes no extrato e evidenciaram mudanças (diminuição da sua intensidade) nos perfis eletroforéticos nas diferentes horas de estudo segundo as gráficas obtidas pelo Gel Analyzer.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados, ficou evidente a importância de ajustes metodológicos, por exemplo, como o aumento da quantidade de enzima permitiu demonstrar que o extrato enzimático com atividade de ficina obtido do látex de *Ficus carica* apresentou maior atividade/especificidade sobre uma das proteínas de maior massa molecular do extrato de MOF, e que o ajuste metodológico sobre a porcentagem do gel de acrilamida permitiu validar ao analisar os controles de temperatura que as mudanças geradas nas proteínas não são devido a influência da temperatura, mas sim um efeito proteolítico. A identificação da atividade enzimática sobre proteínas específicas é um passo muito importante é necessário para posteriores estudos de purificação e obtenção de substâncias bioativas.

Com relação a hidrólise experimental do extrato de PAF com o extrato do látex do figo com atividade de ficina, pode-se concluir que é uma matéria prima com muito potencial de exploração para a obtenção de proteínas solúveis, aminoácidos ou peptídeos.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil -(CAPES) - Código de Financiamento 88882.461721/2019-01

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Azwanida NN (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*. 2015;4(3):196.
2. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976 May 7;72(1-2):248-54.
3. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 [cited 2021 Mar 30];227(5259):680-5. Available from: <https://www.nature.com/articles/227680a0>
4. Wang J, Chi Y, Cheng Y, Zhao Y. Physicochemical properties, in vitro digestibility and antioxidant activity of dry-heated egg white protein. *Food Chem* [Internet]. 2018 Apr 25 [cited 2021 Nov 11];246:18-25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29291838/>

CAPÍTULO 3

Atividade antiproliferativa de hidrolisados de proteína da *Moringa Oleífera* Lam
em células de câncer de cólon

David Torres Camargo^{a*}
Lady Johana Arismendi Bustamante^{ab},
Juliana Cristina Bassan^b,
Maisa Davanso^b,
Maria Elena Maldonado Celis^a.

^aGrupo Impacto dos Componentes Alimentares na Saúde, Escola de Nutrição e Dietética, Universidade de Antioquia, Colômbia.

^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Departamento de Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos.

*Autor correspondente: David Torres Camargo. Robledo Bloque 44, Universidade de Antioquia. Carrera 75 #67-87. Medellín, Colombia Fax: (+57-4) 230 50 07 Teléfono (+57-4) 219 92 23. E-mail: david.torresc@udea.edu.co

Resumo

Objetivo: avaliar o efeito dos hidrolisados de proteína da farinha das folhas da farinha da *Moringa oleífera* Lam (MOF) com o extrato de ficina obtido do látex do figo contra a proliferação das células do adenocarcinoma do cólon SW480. **Métodos:** 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:** O extrato hidrolisado por 8h inibiu o crescimento de Células SW480 de uma maneira dependente do tempo e da dose. A população de células SW480 mortas foi aumentada significativamente ($P < 0,0001$) em cerca de 3,8 vezes após 48h de exposição ao extrato (85µg / mL) em comparação com seus controles. Foi evidenciado um bloqueio na fase SubG0/G1 o que implica a indução de apoptose pelo aumento da Anexina-V. **Conclusão:** estes resultados mostram que a produção de hidrolisados de proteínas da farinha das folhas de *Moringa oleífera* Lam permite a obtenção de peptídeos bioativos capazes de induzir citotoxicidade, anti-proliferação e apoptose de células de adenocarcinoma de cólon, ou seja, que possuem alto potencial de serem explorados como biomoléculas na quimio-prevenção do câncer.

Palavras-chave: *Moringa oleífera*, peptídeos bioativos, câncer de cólon, citotoxicidade, apoptose.

Abstract

Objective: to evaluate the effect of *Moringa oleífera* Lam (MOF) plant protein hydrolysates with ficin obtain from fig latex against colon adenocarcinoma cell proliferation (SW480). **Method:** the cytotoxic and antiproliferative capacity of the hydrolysis products of MOF with fig extract was evaluated in vitro on SW480 adenocarcinoma cells by the colorimetric method with sulforodamine B and by flow cytometry and detection of phosphatidylserine, respectively. **Results:** the protein extract hydrolyzed for 8h inhibited the growth of SW480 cells in a dose-time-dependent manner. The population of dead cells was significantly increased ($P < 0.0001$) 3.8 times more after 48 (85 μ g/mL) hours of exposure in treated SW480 cells than to their untreated counterparts. Also, A block was evidenced in SubG0/G1 phase, involving the induction of apoptosis evidenced by the increase of Annexin-V. **Conclusion:** These results show that the production of MO protein hydrolysates allows obtaining bioactive peptides capable of inducing cytotoxicity, antiproliferation and apoptosis of colon adenocarcinoma cells, and may be a functional ingredient against chemoprevention of this disease.

Key words: *Moringa oleífera*, bioactive peptides, colon cancer, cytotoxicity, apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que resulta do crescimento contínuo e descontrolado de células com a capacidade de invadir tecidos próximos e adquirir o caráter de metástase. O câncer de cólon é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo e na Colômbia (1), e embora haja importantes medicamentos para tratá-la, eles podem apresentar efeitos tóxicos e promover resistência, de forma que há necessidade de desenvolvimento contínuo de estratégias quimio-preventivas baseadas em compostos bioativos de origem alimentar, como frutas, grãos, especiarias e vegetais de baixa toxicidade e de fácil obtenção (2)

Na atualidade há um interesse crescente e uma grande quantidade de evidências relacionadas a atividade anticancerígena e estabilidade de peptídeos de origem vegetal e animal. Por exemplo, a atividade antiproliferativa tem sido relatada em diferentes modelos de câncer, como células de adenocarcinoma HT29 e Caco2, câncer cervical SiHa e câncer de mama MCF-7, para peptídeos obtidos da pele de rã (3), cogumelos (4) larvas de insetos (5) e feijão (6). Nos estudos relatados, o efeito antiproliferativo tem sido relacionado com uma perturbação inespecífica a nível de membrana celular, seguida por uma inserção da bicamada lipídica que leva a um bloqueio do ciclo celular, perturbação da membrana mitocondrial devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio intracelular e indução da apoptose.

A atividade anticancerígena, citotóxica e antiproliferativa de extratos de folhas de MO obtidos com diferentes solventes tem sido estudada (7), sendo que os efeitos bioativos observados foram atribuídos em grande parte aos compostos fenólicos (8). Além da presença significativa de compostos fenólicos, as folhas da MO possuem uma relevante quantidade de proteínas (20 e 31g/100g em base

seca) (9,10) o que possibilita que seja explorada como potencial fonte para a obtenção de peptídeos com diferentes propriedades biológicas.

A obtenção de peptídeos com atividade antioxidante e antiinflamatória a partir das folhas da MO foi primeiramente descrita por Avilés- GAXiola e colaboradores (2021). O estudo incluiu a purificação de proteínas e a análise de peptídeos resultantes de digestão gastrointestinal simulada *in vitro* (11) Ademais das enzimas endógenas humanas como as usadas na digestão gastrointestinal simulada, há a aplicação de enzimas exógenas no tratamento de matrizes alimentares que também são uma estratégia para a obtenção de peptídeos com potencial biológico (12)

Na atualidade existem uma maior quantidade de estudos que exploram o uso de proteases na obtenção de peptídeos com propriedades biológicas a partir da proteína da semente da MO (13,14) quando comparado a estudos com as proteínas encontradas em suas folhas. Diante dessa escassez de trabalhos, este estudo teve como objetivo a produção de hidrolisados das proteínas das farinhas das folhas *Moringa oleifera* Lam (MOF) com proteases exógenas obtidas do látex do figo e a avaliação do efeito do produto de hidrólise na proliferação de células do adenocarcinoma do cólon SW480.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Material Vegetal

Para a produção da MOF foram utilizadas folhas frescas, as quais foram gentilmente coletadas e doadas pelo Laboratório de Bromatologia do Instituto Federal do Triângulo Mineiro localizado em Uberaba-Brasil, MG, coordenado pela Profa. Dra. Estelamar Maria Borges Teixeira. A enzima ficina foi obtida do látex

do figo coletado numa propriedade rural do Município de São Carlos, SP no mês de janeiro do 2019. Todos os demais reagentes usados foram de grau analítico.

Preparo da MOF

As folhas frescas de MO foram higienizadas com hipoclorito de sódio à 200 ppm por 30 minutos. Após o tempo de higienização, a solução de hipoclorito de sódio foi drenada e as folhas foram lavadas abundantemente com água destilada. Em seguida as folhas foram secas por convecção com ar quente em estufa a 40°C por 24 horas. Para a obtenção da MOF, as folhas secas foram liquidificadas por 2 minutos em liquidificador doméstico de 500 W da marca Philips Walita® modelo RI2035.

Preparo do extrato aquoso da MOF

Para obtenção do extrato solúvel da MOF, foi preparada uma suspensão a 10% (m/v), ou seja, para cada 30 gramas de MOF foram adicionados 300mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 9,0 (condição de pH de máxima atividade enzimática para o ensaio de hidrólise com o extrato enzimático com atividade de ficina obtido a partir do látex de *Ficus carica*). A suspensão (MOF + tampão) foi liquidificada por 2 minutos utilizando processador PMX600 com potência de 600W da marca Philco®. O extrato solúvel foi obtido através da separação da fração insolúvel por decantação seguido de filtração a vácuo com auxílio de um Funil de Büchner. O extrato solúvel obtido foi devidamente armazenado a -18°C até o momento de uso nos ensaios experimentais.

Obtenção e preparo do extrato enzimático de látex de figo com atividade de ficina (EFL).

O extrato vegetal bruto com atividade de ficina foi coletado a partir da recuperação das gotas de látex liberadas no pedúnculo após a colheita do fruto imaturo de *Ficus carica*. O extrato foi centrifugado a 3200 g por 15 min a 4°C. A fração insolúvel foi descartada e o sobrenadante foi recuperado e denominado como extrato enzimático do látex do figo (EFL).

2.2. MÉTODOS

Determinação da atividade enzimática do EFL

A atividade enzimática de ficina foi avaliada usando dois substratos, caseína e BAPNA (*N* α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride). Para o ensaio enzimático utilizando a caseína foi realizada a adição de uma alíquota (10-50 μ L) do extrato enzimático a 1 mL de solução de caseína (caseína 1% m/v; tampão bicarbonato 100 mmol L⁻¹; cisteína 5 mmol L⁻¹ e EDTA 5 mmol L⁻¹, pH 9,0). A mistura foi incubada por 20 min a 55°C e agitada a 110 rpm. Em seguida a reação foi interrompida com adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e deixada em repouso por 10 min à temperatura ambiente seguido de centrifugação a 8161 g por 30 min. O sobrenadante obtido foi analisado em espectrofotômetro (Ultrospec 3100-pro, Amersham Biosciences) a 280 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para promover o aumento de 0,001 na absorbância por minuto nas condições do ensaio (15). Para o substrato sintético foi utilizada uma solução 0,1 mmol L⁻¹ de BAPNA solubilizado em 1mL de dimetilsulfóxido e diluído para 100 mL em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7, contendo 5 mmol L⁻¹ de EDTA. A formação de produto foi medida pela leitura contínua da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm durante 5 minutos. Para esse substrato a unidade enzimática foi definida como a quantidade

de p-nitroanilina formada por 1 mg de enzima por minuto nas condições de reação (15).

Determinação no pH de máxima atividade enzimática

A determinação do pH de máxima atividade foi avaliada nos dois substratos (caseína e Bapna). As atividades foram dosadas em sistemas tamponantes com diferentes valores de pH utilizando o tampão McIlvaine para pH de 5,0 a 8,0 e tampão carbonato-bicarbonato para pH 9,0 e 10,0. A dosagem de atividade foi feita como se descreve no item 2.2.1.

Determinação da temperatura de máxima atividade enzimática

A determinação do pH de máxima atividade foi avaliada nos dois substratos (caseína e Bapna). As atividades foram dosadas em condições de pH de máxima atividade, com temperaturas variando entre 25 e 75°C. A dosagem de atividade foi feita como se descreve no item 2.2.1.

Determinação de concentração proteica do EFL

A concentração de proteínas totais do EFL foi determinada pelo método de Bradford utilizando soroalbumina bovina (SBA) como padrão (16). Para efeito de cálculo foi construída uma curva analítica com a concentração de SBA variando de 0-17,5 mg/mL.

Hidrólise enzimática do extrato solúvel de MOF com o EFL

Para a hidrólise, alíquotas do extrato solúvel da MOF (90 mL) e de EFL foram transferidas para Erlenmeyer de 250mL, homogeneizados manualmente e levados a banho-maria metabólico com agitação orbital tipo Dubnoff de 110 rpm a uma temperatura de 35°C. Para cada ensaio de hidrólise foi oferecido 26,65 U/mL

de extrato com atividade de ficina (Unidades por mL de extrato) ou 14,8 U/mg (Unidades por miligramas de proteína solúvel). Amostras foram retiradas em diferentes tempos (2, 4, 6 e 8h). A inativação da reação enzimática foi realizada com HCl 0,5M até atingir pH 4, inclusive para o ensaio controle de temperatura. Para o controle de temperatura, ou seja, o estudo do efeito da temperatura do ensaio sobre as proteínas, alíquotas do extrato aquoso MOF na ausência de ficina, foram expostas a mesmas condições do ensaio enzimático (35°C / 110 rpm). Os experimentos foram realizados em triplicata a fim de avaliar sua replicabilidade.

Análise do perfil proteico do extrato solúvel da MOF por SDS-PAGE antes e após hidrólise enzimática

SDS-PAGE 10% foram realizadas para obter os perfis proteicos do extrato aquoso da MOF não hidrolisado e para monitorar e analisar os produtos de hidrólise. Os géis de SDS-PAGE foram corados com azul de Coomassie 250-R (17). Para as análises por SDS-PAGE, foi utilizado o kit de massa molar GE Lifesciences® composto de fosforilase B (97kDa), soro albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). Para SDS-PAGE 10%, o extrato proteico MOF foi diluído em tampão de ruptura (3:1; v:v).

Cultivo de células 2D e tratamentos.

Foi usada a linhagem de células de adenocarcinoma do cólon SW480. Para seu crescimento e manutenção foi utilizado o meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com glicose 25 mM e L-glutamina 2mM, suplementado com 10% de soro de cavalo inativado (56°C), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 1% de aminoácidos não essenciais. As incubações foram realizadas a 37°C em estufa com atmosfera úmida à 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído a cada 48h. Para todos os experimentos, o soro foi reduzido

para 3%, e o meio foi suplementado com 10 µg / mL de insulina, 5 µg / mL de transferrina, 5 ng / mL, selênio (meio ITS). As células foram expostas a diferentes concentrações dos hidrolisados entre 0,0 e 100 µg / mL em um período de incubação de 48 horas. O tratamento controle foi realizado com células expostas somente ao meio de cultura. Subsequentemente, as células foram analisadas por coloração com sulforhodamina B para tamisar os hidrolisados e identificar o hidrolisado de MOF com a melhor atividade citotóxica (menor valor de IC50).

Coloração com Sulforodamina B (SRB)

Este método é baseado na coloração de proteínas com SRB (Vichai et al 2006) e foi implementado para a determinação da concentração mínima necessária de hidrolisado para inibir 50% a viabilidade de células SW480 (IC50) como segue a continuação.

Ensaio de citotoxicidade

Células de adenocarcinoma de cólon humano SW480 e SW620 numa densidade de 3×10^3 células foram expostas por 24 e 48 horas ao extrato hidrolisado de MOF nas concentrações de 12,5 µg / mL, 25 µg / mL, 50 µg / mL e 100 µg / mL em meio de cultura. Para a amostra controle, nenhuma concentração de hidrolisado foi adicionada. Após os tempos determinados, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (50% v/v) por 1h a 4°C e, subsequentemente, as proteínas celulares foram coradas com sulforhodamina B (SRB) 0,4% (p / v) por 30 min. Em seguida, o corante que não fixou foi removido com ácido acético 1%. Finalmente, o corante ligado às células viáveis foi extraído com um meio alcalino (solução Tris pH 10,5) e a absorbância foi determinada a 490 nm. A absorbância de SRB é proporcional ao número de células aderentes e vivas a serem determinadas por densidade óptica a 490 nm. A absorbância do

grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade. A porcentagem de inibição de viabilidade em comparação com o controle foi calculada com a seguinte equação: % de inibição = $[1 - (OD_t / OD_c)] \times 100$. Onde OD_t é a densidade óptica das células tratadas e OD_c é a densidade óptica das células não tratadas. Esses valores foram então analisados por regressão linear para determinar o IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular). O hidrolisado de proteína com o melhor IC₅₀ (valor mais baixo) foi usado para análise do ciclo celular e determinação de apoptose por citometria de fluxo.

Análise do ciclo celular por citometria de fluxo da linha celular SW480

As células SW480 foram tratadas com o hidrolisado que apresentou melhor atividade citotóxica a uma concentração (IC₅₀) por 48h. Três ensaios independentes foram conduzidos com replicação interna para cada um. Posteriormente, a distribuição do ciclo celular foi analisada por marcação com iodeto de propídio (IP) de acordo com Nicoletti et al., (1991). Resumidamente, 1×10^6 células mantidas em pratos de cultura de 100 mm de diâmetro, foram coletadas por tripsinização (0,5% tripsina/2.6 mM EDTA) nas condições do IC₅₀, as células foram fixadas, lavadas e ressuspensas em PBS (Phosphate Buffered Saline) com IP e RNase por 30 min, a 37°C no escuro. A fluorescência de 10.000 eventos foi analisada no citômetro de fluxo.

Determinação da apoptose por citometria de fluxo

As células SW480 foram tratadas com o hidrolisado com melhor atividade citotóxica (IC₅₀) por 48h. Três ensaios independentes foram conduzidos com replicação interna para cada um. Posteriormente, foi detectado o

fosfatidilserina na superfície celular usando um kit comercial, seguindo as instruções do fabricante. A fluorescência de 10.000 eventos foi analisada no citômetro de fluxo.

3. Análise estatística.

Os resultados obtidos foram analisados com o GraphPad Prism versão 8.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Os dados foram apresentados como a média $\pm$ erro padrão (SE) de três experimentos independentes. Para determinar a diferença estatística entre o grupo de células malignas tratadas e não tratadas (controle) foi realizado o teste t de Student. As diferenças estatísticas entre grupos para todas as variáveis (anti-proliferação, ciclo celular, apoptose) foram avaliados com ANOVA e as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por meio do teste de Tukey.

4. RESULTADOS

Caracterização cinética de EFL

A determinação dos parâmetros de operação de uma enzima é fundamental para o início de seu estudo e aplicação, pois quando se trata de um extrato vegetal, este é suscetível à variação de atividade catalítica devido a diversos fatores como estação do ano, período do dia em que foi coletado, idade da árvore e estágio de maturação dos frutos (19). No EFL foram dosadas a concentração de proteína total ($45,97 \pm 2,80$ mg/mL) e a atividade enzimática específica utilizando dois substratos diferentes, a caseína e o N α -Benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA), sendo estimadas em $84,69 \pm 1,21$ e $0,202 \pm 0,01$ U/mg, respectivamente.

A Figura 1 mostra a variação da atividade do extrato enzimático quando exposto a diferentes valores de pH utilizando os substratos, caseína e BAPNA, ambos de forma isolada.

Através dos resultados encontrados, foi possível observar que o pH de máxima atividade foi o pH 9,0 para a caseína e o pH 6,0 para o BAPNA.

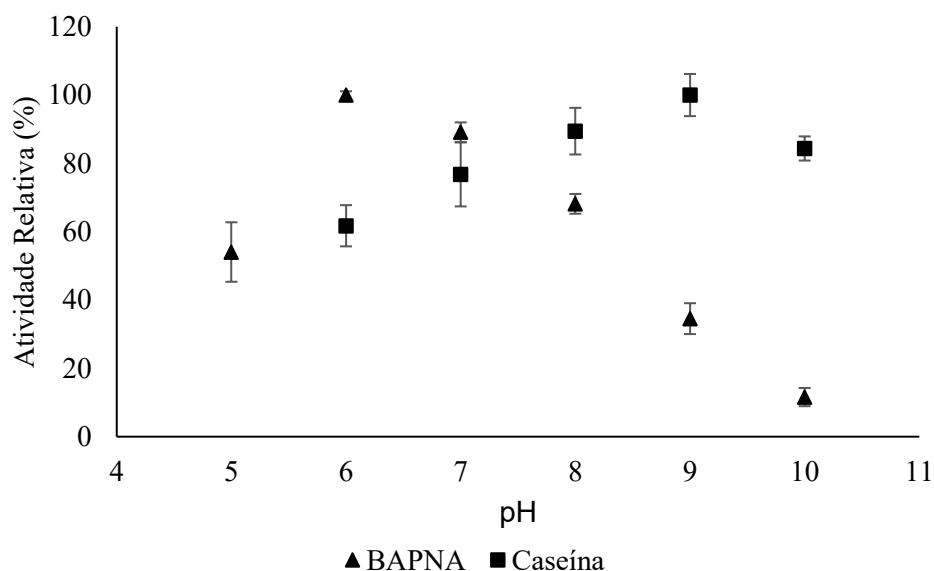


Figura 1. Atividade relativa da ficina usando os substratos caseína e BAPNA em função do pH. Fonte: Autor (2019)

Diferentemente do pH, o comportamento da atividade enzimática em relação a temperatura (Figura 2) foi similar para os dois substratos avaliados, com boa atividade na faixa de 55 e 65°C ($3170,66 \pm 65,54$ e $3230,93 \pm 165,94$ U/mL) para a caseína e 55°C ($17,55 \pm 1,47$ U/mL) com o BAPNA. Outros trabalhos desenvolvidos com ficina relatam uma maior atividade entre 25 e 60°C com substratos distintos e observaram melhor atividade enzimática em 60°C usando caseína como substrato (20).

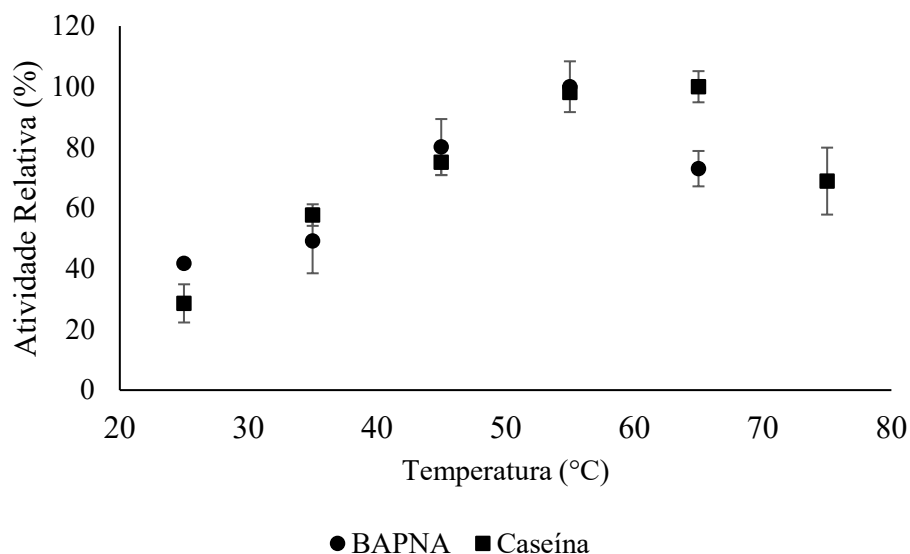


Figura 2. Atividade relativa da ficina em função da variação de temperatura, utilizando BAPNA e caseína como substratos

Análise do perfil de proteínas do extrato aquoso de MOF por SDS-PAGE 10% antes e após ensaio de hidrólise

A Figura 3 apresenta o perfil proteico do extrato aquoso do látex figo com atividade de ficina (EFL) por SDS-PAGE 10%. Essa análise foi realizada com o objetivo de excluir bandas proteicas que não fazem parte do extrato aquoso de MOF mas sim do EFL. Como pode ser observado, o EFL apresenta proteínas (destacadas na caixa amarela) com massas moleculares de ~ 45kDa e entre 14,4-20,1kDa.

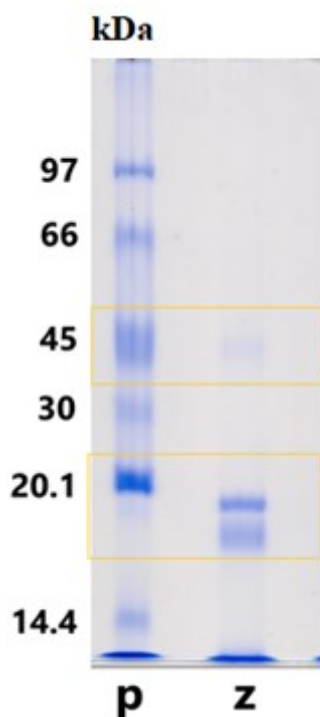


Figura 3. SDS-PAGE 10% do extrato aquoso de figo com atividade de ficina. P: Patrón de massa molecular (4μl). Z extrato aquoso do extrato enzimático do látex do figo.

Na figura 4 se apresenta o perfil proteico do extrato aquoso de MOF submetido a temperatura de 35°C (controles de temperatura) com o objetivo de avaliar as mudanças nas proteínas do extrato geradas pela temperatura. Observa-se a presença de proteínas com massas molecular >97 kDa, no rango de 65-45 kDa e ~30 kDa. No perfil eletroforético não se detectam diferenças significativas pelos tempos de exposição à temperatura.

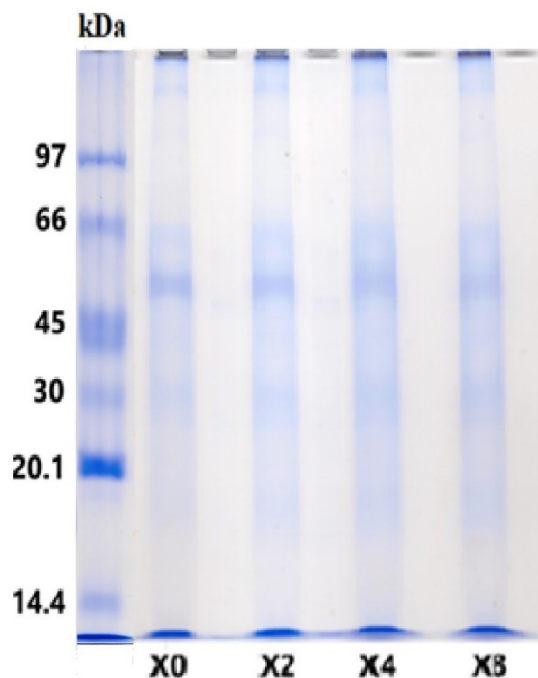


Figura 4. SDS-PAGE 10% representativa do controle de temperatura do extrato solúvel de MOF exposto a 35°C por diferentes períodos (0h,2h,4h,6h e 8h). X0: extrato de MOF não exposto a temperatura. X2:exposto duas horas a temperatura. X4: exposto 4 horas a temperatura. X8: exposto 8 horas a temperatura.

Na figura 5 se apresenta o perfil eletroforético dos produtos de hidrólise (extrato aquoso de MOF com a ficina. Observa-se que a interação enzima-substrato está ocorrendo de forma efetiva e promovendo a hidrólise das proteínas presentes no extrato solúvel de MOF e que seus produtos hidrólise não são detectados por este método analítico já que eles possivelmente têm massas moleculares inferiores a 14,4 kDa. Como se descreve anteriormente (figura 3) o extrato enzimático contém proteínas ~20,1 kDa (Figura 3) os quais estão presentes na figura 5.

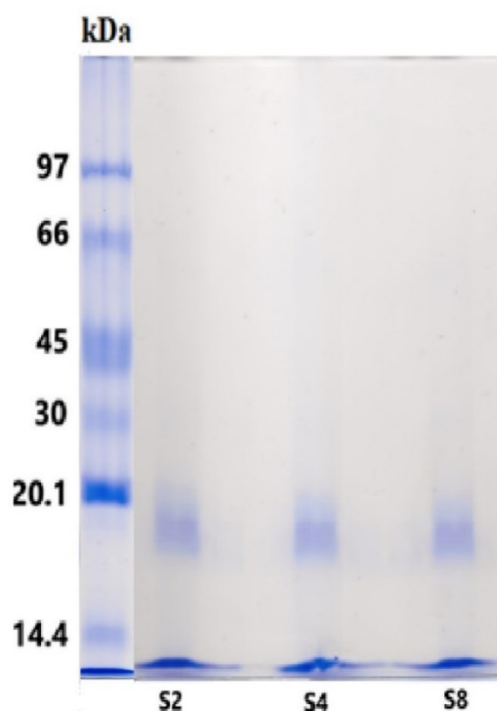


Figura 5. SDS-PAGE 10% representativo do extrato de MOF hidrolisado com o extrato de figo com atividade de ficina (EFL) a 35°C por diferentes períodos de tempo (0-8h). S2: produto de hidrólise durante 2h; S4: produto de hidrólise durante 4h; S8: produto de hidrólise durante 8h.

Capacidade inibitória do extrato de MOF hidrolisado com a enzima ficina durante 2,4, 6 e 8 horas a 35°C sob as células SW480.

O tratamento de células de adenocarcinoma humano SW480 por 24h com o extrato solúvel de MOF não hidrolisado (0h) e com os extratos solúveis hidrolisados por 2, 4 e 8h mostrou que os hidrolisados obtidos com os maiores tempo de hidrólise foram capazes de gerar produto de hidrólise com maior capacidade citotóxica para inibir a proliferação nas linhagens celulares, este efeito também foi proporcional ao aumento da concentração de hidrolisados (Tabela 1). Esses resultados mostram que o extrato solúvel MOF contém proteínas de baixo massa molecular (<14 kDa), e que é provável a peptídeos a maiores tempos de

hidrólise, os quais poderiam estar afetando a viabilidade e o crescimento das células do adenocarcinoma de cólon SW480 e SW620 (21,22).

Tabela 1. Valores de concentração inibitória do 50% (IC50) nas células **SW480** e **SW620** tratadas com extrato proteico de MO.

Tempo de tratamento (horas)	Amostra	IC50 SW480 (µg/mL)	R ²	IC50 SW620 (µg/mL)	R ²
24 horas	Proteínas não hidrolisada	119,57	0,748	286,658	0,659
	Proteínas hidrolisada 2h	101	0,412	592,636	0,514
	Proteínas hidrolisada 4h	98,086	0,389	180,455	0,438
	Proteína hidrolisada 8h	94,016	0,355	116,629	0,434
48 horas	Proteína não hidrolisada	110,151	0,539	91,257	0,899
	Proteína hidrolisada 2h	99,634	0,51	90,499	0,894
	Proteína hidrolisada 4h	98,764	0,551	89,893	0,877
	Proteína hidrolisada 8h	84,75	0,806	71,147	0,863

Efeito no ciclo celular das células de adenocarcinoma de colón SW480 do extrato solúvel de MOF com ficina por 8h no ciclo celular.

Para validar a eficácia citotóxica e antiproliferativa do extrato solúvel de MOF hidrolisado por 8 h, foi analisado seu efeito no ciclo celular como parte de um dos mecanismos de ação envolvidos. Iodeto de propídio é um corante que permite caracterizar a distribuição celular em cada fase como G0 / G1, S ou G2 / M, quando o conteúdo de DNA é medido. Induzir causas de morte celular gera degradação do DNA e as células mortas têm um conteúdo de DNA menos de 2n. Essas células são detectadas por citometria de fluxo na região SubG0 / G1 (Figura 7A). Esta aproximação permite determinar a quantidade de células mortas ou moribundas (apoptose ou necrose) (18,23). Na Figura 7B se apresentam os histogramas representativos mostrando a distribuição de células SW480 tratadas ou não com hidrolisado de 8h. Observa-se que a população de células SubG0 / G1 aumentou após 48 h de tratamento no seu respectivo IC50 para 48h, 85 µg / mL para células SW480. A população de células mortas aumentou significativamente em cerca de 3,8 vezes para as

células SW480 tratadas ($P < 0,0001$), em comparação com os controles (não tratadas).

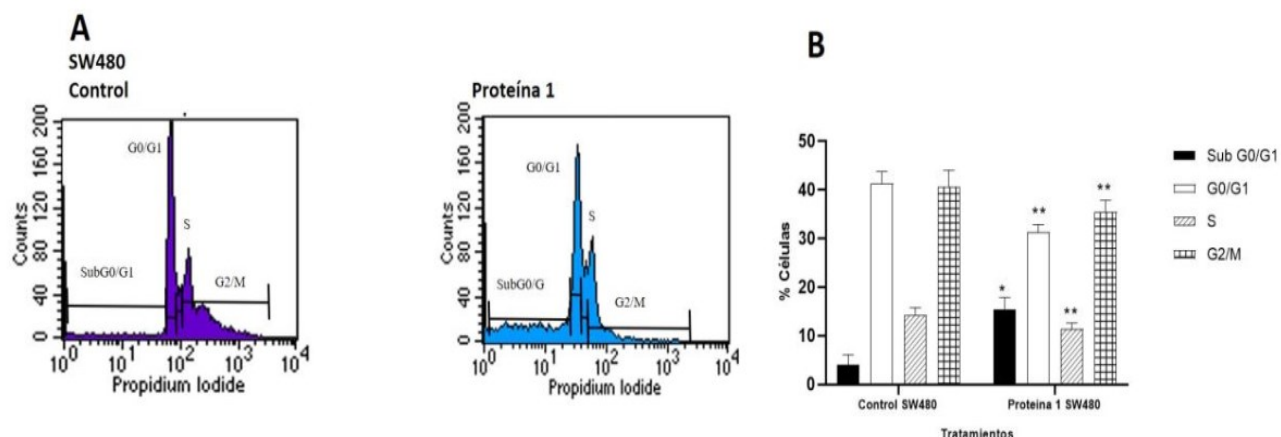


Figura 6. Efeito do hidrolisado proteico de MOF digerido por 8h o ciclo celular de SW480. As células (SW480) foram tratadas com o hidrolisado (85µg/mL) por 48h, as células foram coradas com iodeto de propício e analisadas por citometria de fluxo conforme descrito na seção de materiais e métodos. **A)** histogramas representativos das distribuições no ciclo das células tratadas ou não. **B)** Dados médios $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimento independentes. Tratamento com hidrolisado de proteína versus controle (células não tratadas): * $P < 0,05$, ** $P < 0,0001$.

Para determinar se o hidrolisado de 8h do extrato solúvel de MOF induz apoptose como o mecanismo de morte em células SW480, foi analisado a exposição à fosfatidilserina por anexina-V. Na Figura 8, são apresentados os histogramas representativos de que a fosfatidilserina aumentou sua localização na monocamada externa da membrana plasmática da linhagem celulares após 48 h de tratamento a 85 µg / mL em células SW480. O aumento de células positivas para anexina-V foi significativo ($P < 0,05$) com respeito às células não tratadas.

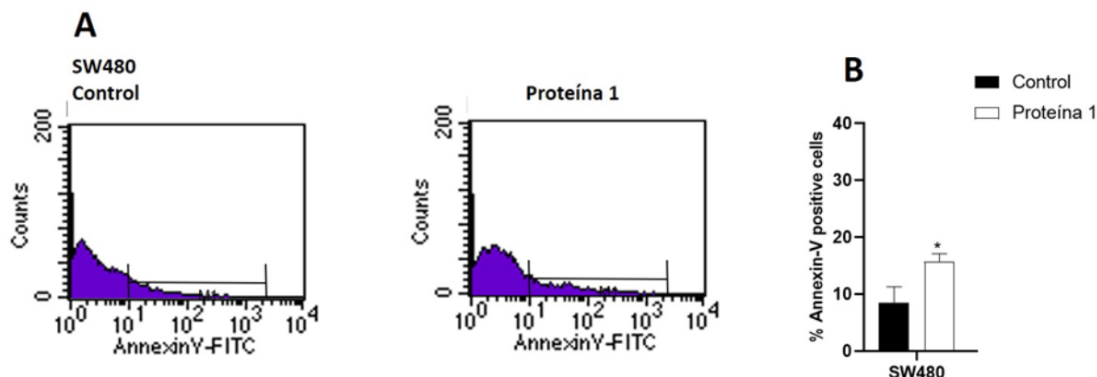


Figura 7. Efeito do hidrolisado de 8h do extrato solúvel de MOF na indução de apoptose nas células SW480. As células (SW480) foram tratadas com o hidrolisado (85µg/mL) por 48h, as células foram coradas com anexina-V-FITC e analisadas por citometria de fluxo conforme descrito na seção de materiais e métodos. A) histogramas representativos das células positivas para anexina-V tratadas ou não. B) Dados médios $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimento independentes. Tratamento com hidrolisado *versus* controle (células não tratadas): * $P < 0,05$, ** $P < 0,0001$.

3. DISCUSSÃO

O objetivo foi avaliar o efeito do extrato proteico hidrolisado de farinha de folhas de *Moringa oleífera* Lam no crescimento de células de adenocarcinoma de cólon (tumor primário) SW480, no ciclo celular e apoptose. Entre os resultados mais representativos deste estudo se ressalta que o fator tempo (t), desempenha um papel importante nas diferentes etapas metodológicas já que tanto o maior tempo de hidrólise do extrato solúvel da MOF (8 h vs 4 h, 2 h) quando o da exposição das células malignas (48 h vs 24 h) apresentaram os melhores resultados. O anterior pode ser relacionado com uma maior presença de peptídeos com atividade citotóxica como resultado da hidrólise de MOF com ficina por 8h já que que como foi observado nos perfis eletroforéticos às duas horas de hidrólise as proteínas já apresentam um tamanho molecular menor do que 14 kDa, o que acrescenta a possibilidade de que nas 4 e 8 horas de hidrólise se tenham moléculas muito menores. Respeito ao tamanho molecular, tem sido evidenciado

que peptídeos $\leq 6\text{kDa}$ apresentam boa bioatividade em diferentes processos biológicos (24).

No que se refere aos peptídeos, têm sido relacionadas particularidades da sua estrutura química com o efeito antioxidante nos alimentos processados e na prevenção e melhoria das condições de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis. Entre elas a presença de i) aminoácidos (His, Trp, Phe, Pro Gly, Lys, Ile e Val), ii) de anéis como indol / imidazol / pirrolidina, iii) a estrutura estérica no C- e N terminais iv) e o peso molecular. De todas as características citadas, a composição e a sequência de aminoácidos dos peptídeos têm sido dos parâmetros mais relevantes apontados (25). Levando em conta a relação da composição e sequência de aminoácidos dos peptídeos. A purificação e caracterização química dos hidrolisados do extrato solúvel da MOF necessita ser realizada em futuros estudos, pois contribuiria substancialmente ao entendimento dos mecanismos biológicos e citotóxicos dos produtos de hidrólise nas células do adenocarcinoma de colón.

O aprimoramento dos mecanismos apoptóticos dos peptídeos obtidos dos hidrolisados do extrato solúvel de MOF é uma área de pesquisa que precisa aperfeiçoamento, especialmente por sua escassa literatura. Este estudo apresenta dados parciais já que o bloqueio do ciclo celular avaliado por citometria de fluxo evidenciou um aumento de células mortas em cerca de 3,8 vezes em relação ao controle na sua respectiva fase apoptótica SubG0 / G1. A falta de trabalhos similares torna complexa a discussão, porém permite considerar este trabalho como pioneiro na área e incentiva a sua continuidade.

Finalmente as culturas de células têm sido uma ferramenta útil para estudar os efeitos e mecanismos de ação de peptídeos bioativos em relação a células cancerígenas. Segundo os critérios do Instituto Nacional do Câncer, um extrato é considerado ativo se apresentar a capacidade de inibir 50% do crescimento das

células cancerígenas com uma concentração menor ou igual a 30 µg / mL (Suffness & Pezzuto., 1990), porém concentrações maiores do que 100 µg / mL são consideradas baixas. Portanto o resultado encontrado nesse trabalho com o hidrolisado de 8h do extrato solúvel de MOF para atividade antiproliferativa contra células SW480, poderia ser considerado alto, e pode ser eficaz na inibição da fase de progressão do Câncer de cólon.

5. CONCLUSÃO

A hidrólise do extrato solúvel de MOF com o extrato enzimático com atividade de ficina (EFL) obtido do látex de *Ficus carica* permitiu a obtenção de hidrolisados proteicos com atividade citotóxica, antiproliferativa e pró-apoptótica no modelo *in vitro* para linhagem de células SW480 de uma maneira tempo-dependente. Os resultados deste estudo são promissores, porém se faz necessário um estudo mais amplo e detalhado da composição química dos produtos de hidrólise, assim como dos mecanismos de atividade biológica. A continuidade deste tipo de estudos contribuiria com a criação de metodologias de produção dos compostos e sua inclusão como alimentos ou tratamentos nas doenças crônico-degenerativas humanas.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil -(CAPES)- Código de Financiamento 88882.461721/2019-01

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Dec 4];71(3):209–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>
2. Afrin S, Giampieri F, ... MGB, 2020 undefined. Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. Elsevier [Internet]. [cited 2022 Jan 29]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301952?casa_token=fq4-wmgPz3wAAAAA:bVHIGXxUIK8qboC2c0mEauj-wkO6zIVSSWXm4aVvVrAg_GLfUpmbyalpfMmAV186xhK0Ly3uWk
3. Attoub S, Arafat H, Mechkarska M, Conlon JM. Anti-tumor activities of the host-defense peptide hymenochirin-1B. Regul Pept [Internet]. 2013 Nov 10 [cited 2022 Jan 29];187:51–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24185042/>
4. 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. J Biotechnol [Internet]. 2013 Dec [cited 2022 Jan 29];168(4):527–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24070903/>
5. Sun HX, Chen LQ, Zhang J, Chen FY. Anti-tumor and immunomodulatory activity of peptide fraction from the larvae of *Musca domestica*. J Ethnopharmacol [Internet]. 2014 May 14 [cited 2022 Jan 29];153(3):831–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24690776/>
6. Luna-Vital DA, Mojica L, González de Mejía E, Mendoza S, Loarca-Piña G. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. Food Research International. 2015 Oct 1;76(P1):39–50.
7. Gupta S, Jain R, Kachhwaha S, Kothari SL. Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam.—Review of current status and future possibilities. Vol. 11, Journal of Herbal Medicine. Elsevier GmbH; 2018. p. 1–11.
8. 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.

9. 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. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 [cited 2021 Mar 28];16:18923–37. Available from: www.mdpi.com/journal/ijmsArticle
10. 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>
11. Avilés-Gaxiola S, León-Félix J, Jiménez-Nevárez YB, Angulo-Escalante MA, Ramos-Payán R, Colado-Velázquez J, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of novel peptides from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *South African Journal of Botany*. 2021 Sep 1;141:466–73.
12. Tapal A, Tikku 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>
13. Aderinola TA, Fagbemi TN, Enujiugha VN, Alashi AM, Aluko RE. Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*. 2018 Oct 1;4(10):e00877.
14. González Garza NG, Chuc Koyoc JA, Torres Castillo JA, García Zambrano EA, Betancur Ancona D, Chel Guerrero L, et al. Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of moringa seed (*Moringa oleifera*). *Journal of Food Science and Technology* 2017 54:13 [Internet]. 2017 Oct 29 [cited 2021 Nov 22];54(13):4268–76. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-017-2898-8>
15. Siar EH, Zaak H, Kornecki JF, Zidoune MN, Barbosa O, Fernandez-Lafuente R. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*. 2017;58(February):98–104.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976 May;72(1–2):248–54.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 [cited 2021 Mar 30];227(5259):680–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/227680a0>

18. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1991 Jun 3;139(2):271–9.
19. Morellon-Sterling R, El-Siar H, Tavano OL, Berenguer-Murcia Á, Fernández-Lafuente R. Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020 Nov;162(June):394–404.
20. Gagaoua M, Boucherba N, Bouanane-Darenfed A, Ziane F, Nait-Rabah S, Hafid K, et al. Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Separation and Purification Technology*. 2014 Aug;132:461–7.
21. Kannan A, Hettiarachchy N, Narayan S. Colon and breast anti-cancer effects of peptide hydrolysates derived from rice bran. *Open Bioactive Compounds Journal*. 2009;2:17–20.
22. Beaubier S, Framboisier X, Ioannou I, Galet O, Kapel R. Simultaneous quantification of the degree of hydrolysis, protein conversion rate and mean molar weight of peptides released in the course of enzymatic proteolysis. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [Internet]. 2019 Jan 15 [cited 2021 Dec 4];1105:1–9. Available from: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02164117>
23. Sasaki K, Yamagata T, Mitani K. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera. *Cancer Sci* [Internet]. 2008 Feb [cited 2021 Dec 5];99(2):414–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18271940/>
24. 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.
25. Zou T bin, He TP, Li H bin, Tang HW, Xia EQ. The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Dec 4];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771594/>
26. SUFFNESS, M. Assays related to cancer drug discovery. *Methods in Plant Biochemistry : Assays for Bioactivity* [Internet]. 1990 [cited 2021 Dec 4];6:71–133. Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10027518623>

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 Anexo. 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 BIBLIOGRAFICAS

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>

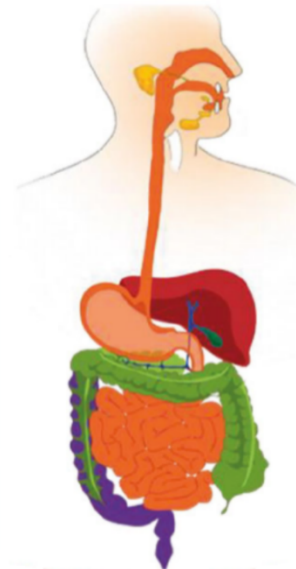
Apêndice. 1

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

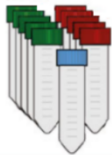
1. Misturar a amostra diluída com solução de fluidos salivares (1:1, (p/p))
2. Adicionar a amilase salivar 75U/mL = 750U → 16,2 mg de pó de amilase
3. Incubar e misturar (2 min, 37°C, pH 3)
4. Incluir $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (0.3M)=0,025 mL

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.

Considerações finais

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 ($10-120 \text{ U mL}^{-1}$) em comparação com a fase intestinal ($80-7000 \text{ U mL}^{-1}$) 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.