



FAG Journal of Health

journal homepage: <https://fjh.fag.edu.br>



Antioxidant and antimicrobial activities in bullfrog skin hydrolysate

Atividades antioxidante e antimicrobiana em hidrolisados de pele de rã-touro



Juliana Aparecida Mirante da Silva¹, Marina Brito Cunha¹, Diego de Assunção Justo¹, Ortência L. G. S. Nunes², Solange Maria Cottica³, Tatiana Shioji Tiuman⁴

¹Acadêmicos do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UTFPR, Campus Toledo. ²Engenheira Agrônoma, Mestre e Doutora em Energia na Agricultura, pós-doutoranda do curso de Processos Químicos e Biotecnológicos da UTFPR, Campus Toledo. ³Licenciada em Química, Mestre e Doutora em Química Analítica, docente do curso de Tecnologia em Processos Químicos e do mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos da UTFPR, Campus Toledo. ⁴Docente da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Toledo.

Original Article

ARTICLE INFO

Article history:

Received 01 February 2021
Revised 10 March 2021
Accepted 28 May 2021
Available online 27 June 2021
Blind reviews

Keywords:

Bioactive Compounds
Enzymatic Hydrolysis
Ultrasound
Peptides

Palavras-chave:

Compostos Bioativos
Hidrólise Enzimática
Ultrassom
Peptídeos

* Corresponding author at:
smcottica@utfpr.edu.br
<https://orcid.org/0000-0003-3183-2531>

ABSTRACT

Industry and science study and develop products from a natural source to supply the demand for molecules with antioxidant and antimicrobial activities. Frog skin is a by-product of slaughterhouses for this animal and has been the subject of study in the prospecting of bioactive peptides from enzymatic hydrolysis. In Brazil, the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is the only species allowed for commercial exploitation in ranches to use the meat. This study aimed to evaluate the use of ultrasound in conjunction with enzymatic hydrolysis of bullfrog skin for the production of peptides with antioxidant and antimicrobial activities. The results showed that the peptides released by the conventional hydrolysis of bullfrog skin have significant antioxidant activity. The use of a sonicator decreased the hydrolysis time to 5 min, with the best power of 250 W evaluated by the DPPH and FRAP analyzes, while the power of 100 W was better for the ABTS analysis. Regarding the antimicrobial activity, the hydrolysates did not show any results in the concentration of 20 mg mL⁻¹, being necessary to do other studies with higher values of sample concentration.

RESUMO

A indústria e a ciência estudam e desenvolvem produtos a partir de fonte natural para suprir a demanda por moléculas com atividades antioxidante e antimicrobiana. A pele de rã é um subproduto de frigoríficos de abate desse animal e tem sido objeto de estudo na prospecção de peptídeos bioativos oriundos de hidrólise enzimática. No Brasil, a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é a única espécie permitida para exploração comercial em ranários para aproveitamento da carne. Este estudo teve por objetivo avaliar o uso do ultrassom em conjunto com a hidrólise enzimática de pele de rã-touro para a produção de peptídeos com atividades antioxidante e antimicrobiana. Os resultados mostraram que os peptídeos liberados pela hidrólise convencional da pele de rã-touro possuem expressiva atividade antioxidante. O uso de um sonificador diminuiu o tempo de hidrólise para 5 min, com a melhor potência de 250 W avaliada pelas análises do DPPH e do FRAP, enquanto que a potência de 100 W foi melhor para a análise do ABTS. Em relação à atividade antimicrobiana, os hidrolisados não apresentaram qualquer resultado na concentração de 20 mg mL⁻¹, sendo necessário fazer outros estudos com valores maiores de concentração de amostra.

<https://doi.org/10.35984/fjh.v3i2.335>

© 2021 The Authors. Published by FAG Journal of Health. This is an open access article under the CC BY-NC-ND licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

1. Introdução

Os antioxidantes são capazes de impedir a formação de radicais livres inibindo a oxidação das células e, assim, evitam ou retardam a degradação de estruturas tanto no meio fisiológico quanto em alimentos (RAMALHO e JORGE, 2006; SINDHI et al, 2013).

Em condições normais, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os radicais livres são eliminados pelo sistema de defesa constituído por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, presente nos organismos e nos alimentos. Contudo, sob condições patológicas, o equilíbrio entre a geração e eliminação de ROS é quebrada. Como resultado, moléculas de DNA, lipídios e proteínas são danificadas pelo estresse oxidativo e, dessa forma, ocorre a geração descontrolada de radicais livres que estão envolvidos em distúrbios como diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas e inflamatórias (PRYOR e ANN, 1982; BUTTERFIELD et al, 2002; GOUVEIA e LIMA, 2017).

A maneira mais eficaz de reduzir os radicais livres são os hábitos saudáveis de vida e alimentação. A indústria e a ciência procuram, cada vez mais, desenvolver produtos a partir de fonte natural para suprir a demanda farmacêutica, nutricional e cosmética. Nesse sentido, os anfíbios têm sido uma opção de estudo, pois a pele desses animais apresenta a função de defesa contra fungos, bactérias, vírus e protozoários que podem ser danosos para a saúde humana e animal, bem como, do meio ambiente (CLARKE, 1997; ROLLINS-SMITH, 2005; GOMES et al, 2007) e pesquisas citadas por BARBOSA et al, (2018) mostram potente atividade antioxidante em secreção de sapos asiáticos.

No Brasil, a opção é a rã-touro americana, *Lithobates catesbeianus*, que é a única espécie cuja criação em sistema intensivo é permitida nos ranários nacionais (BRASIL, 1998). Ela foi introduzida no país em 1935 (CUNHA e DELARIVA, 2009) e, segundo a FAO (2019), a produção aquícola global desse animal foi de 2727 toneladas, em 2016. Embora seja uma pequena cadeia produtiva, tudo que se obtém da rã-touro atinge alto valor de venda no mercado. A carne é o principal produto e a sua composição química está associada a benefícios diretos para a saúde humana (AFONSO, 2012). A pele representa 8 a 10% (AYRES et al, 2015) e é usada na indústria da moda. Já a indústria farmacêutica aproveita as suas características medicinais, podendo ser utilizada em queimaduras e na reconstrução de machucados, devido à presença de agentes antimicrobianos que inibem o crescimento de microrganismos indesejados e reduzem o tempo de cicatrização (CLARKE, 1997).

A pele de rã também tem sido utilizada para a extração de colágeno (QIAN et al, 2007) e, com aproximadamente 25% de conteúdo proteico (HUANG et al, 2011), a hidrólise enzimática de proteínas da pele é considerada o método mais usado para produzir peptídeos bioativos que são eficientes, seguros, relativamente baratos e com muitas aplicações (NWACHUKWU e ALUKO, 2019). As proteínas podem ser quebradas em moléculas menores por meio de hidrólise na presença de água (PETRI e OGEDA, 2010). Esse processo consiste no rompimento de ligações das proteínas, com liberação de peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. Ainda que a hidrólise enzimática seja vantajosa do ponto de vista técnico, em escala industrial existem barreiras como, custo de produção e baixa estabilidade que dificultam o uso exclusivo de enzimas (CHAPMAN et al, 2018). Entretanto, outras possibilidades estão sendo desenvolvidas, como o processamento utilizando alta pressão,

micro-ondas, aquecimento ôhmico, plasma de atmosfera fria, campo elétrico pulsado, ozônio e ultrassom (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al, 2019). O uso do ultrassom tem seu destaque por ser rápido e eficiente na extração de compostos a partir de estruturas vegetais ou animais, além do baixo custo e simplicidade da técnica. O fenômeno da cavitação provocado pelo ultrassom favorece a ruptura do tecido (animal ou vegetal) e diminui o tamanho da partícula (KARNJANAPRATUM e BENJAKUL, 2020). O ultrassom pode modificar as propriedades funcionais e estruturais da proteína alimentar (TELLEZ-MORALES et al, 2020). No entanto, essa modificação estrutural depende da natureza da proteína, do grau de desnaturação e de agregação, tempo de tratamento e potência do equipamento utilizado (WANG et al, 2020). A associação das tecnologias de hidrólise enzimática e ultrassom é interessante porque pode aumentar o rendimento da reação, uma vez que o ultrassom pode atuar na enzima, no substrato e no sistema de reação mista (WANG et al, 2018).

As bioatividades mais estudadas são a antioxidante e a antimicrobiana. A atividade antioxidante pode ser avaliada por diversos métodos. O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é uma metodologia muito usada em amostras de origem animal, vegetal, alimentos processados e bebidas. O seu princípio é dado pela capacidade dos antioxidantes transferirem elétrons para estabilizarem o radical livre do DPPH (BOROSKI et al, 2015). O método do ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) tem sua atividade antioxidante medida pela capacidade de estabilizar o cátion radicalar ABTS que na presença da amostra volta a ser um composto neutro (BOROSKI et al, 2015). A metodologia do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) foi desenvolvida para determinar a redução do ferro Fe³⁺ a Fe²⁺ em soluções biológicas (BENZIE e STRAIN, 1996). Já a atividade antimicrobiana pode ser determinada pelo teste da concentração inibitória mínima (CIM) cujo resultado é dado pela turbidez do meio líquido onde as bactérias estão em várias concentrações de um extrato ou de um antibiótico (OLIVEIRA et al, 2009). A análise CIM é a concentração mais baixa de um antibiótico que impede o crescimento visível de uma bactéria após 24 h de incubação em microplacas, usando diluições em série do antibiótico. Os resultados dessa análise dependem do microrganismo alvo da infecção e do antibiótico (TRIPATHI, 2013).

Este estudo teve por objetivo avaliar o uso do ultrassom em conjunto com a hidrólise enzimática de pele de rã-touro para a produção de peptídeos com atividades antioxidante e antimicrobiana.

2. Metodologia

2.1. Matéria-prima

As peles de rã-touro foram cedidas, gentilmente, por um ranicultor da cidade de Palotina-PR. Elas foram levadas ao laboratório da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Câmpus Toledo, higienizadas, moídas em picadora elétrica (modelo PB 221, Beccaro) à temperatura ambiente e armazenadas em sacos de polietileno mantidos a -20 °C até o momento de sua utilização.

2.2. Enzima

A enzima utilizada foi a Corolase H-pH® da AB Enzymes, proveniente de processo de fermentação de uma cepa geneticamente modificada de *Trichoderma Reesei*.

2.3. Amostra/substrato

Todas as amostras foram preparadas usando a relação substrato:água 1:5 (m/m) e o pH foi medido, em triplicata, para verificar a necessidade de correção em função da enzima Corolase H-pH cuja faixa de atividade está entre 7,0 e 10,0. O valor médio do pH da pele de rã-touro foi de 6,93, portanto, sem necessidade de fazer ajuste.

2.4. Enzima/Substrato

Em todos os ensaios, a relação enzima:substrato utilizada foi 1:100 (m/m).

2.5. Preparo dos Hidrolisados

As hidrólises da pele de rã-touro foram feitas seguindo dois procedimentos. O processo convencional de hidrólise foi desenvolvido em erlenmeyers de 500 mL colocados em shaker (Thoth Equipamentos) para manter a temperatura e a agitação constantes. As amostras de pele de rã-touro em água na razão de 1:5 foram incubadas a 50 °C e a enzima Corolase H-pH foi adicionada para atuar nos intervalos de tempo de 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 min. Uma amostra sem adição de enzima foi considerada como controle. Todas as amostras deste ensaio foram denominadas Grupo 1.

Para a hidrólise enzimática assistida por sonicador (Desruptor de célula Eco-Sonics, Ultronique) acoplado em banho termostatizado (Solab SL152), os intervalos de tempo foram 5, 15, 30 e 60 min para a potência de 100 W do equipamento (Grupo 2). Quando a potência foi alterada para 250 W e 500 W, o tempo de ação do ultrassom foi de apenas 5 min (Grupo 3).

Todas as amostras hidrolisadas, inclusive o controle, tiveram a enzima Corolase H-pH inativada a 85 °C por 10 min. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 2264 x g por 10 min e o sobrenadante de cada uma foi liofilizado em liofilizador Liobras, Liotop L101 e armazenado em freezer.

2.6. Propriedades antioxidantes

Para as análises de atividade antioxidante, a concentração utilizada de cada amostra foi de 4 mg mL⁻¹ de água ultrapura obtida em sistema Milli-Q.

2.6.1. Captura do radical DPPH

A captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi determinada de acordo com o método descrito por Pires et al, (2012). Inicialmente foram utilizados 4 mg mL⁻¹ de hidrolisados para fazer a análise e, pelos resultados de absorbância, foi necessário fazer uma diluição 1:10 para cada amostra. Em seguida, 1 mL de cada hidrolisado foi misturado com 1 mL de 0,1 mmol L⁻¹ de DPPH. A mistura foi agitada no escuro por 1 h a 25 °C, centrifugada a 2264 x g por 10 min e a absorbância foi lida em 517 nm em espectrofotômetro (PG Instruments modelo T80+). Os resultados foram expressos em μmol Trolox g⁻¹ de hidrolisado, utilizando uma curva de calibração preparada com o padrão Trolox na faixa de 0 a 500 μmol L⁻¹ com equação da reta $y = -0,0014x + 0,8825$ e $R^2 = 0,9892$.

2.6.2. Captura do radical ABTS

A captura do radical ABTS ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi determinada de acordo com Boroski et al, (2015). Três mililitros foram adicionados em 30 μL de amostra e após 6 min a absorbância foi lida em espectrofotômetro (PG Instruments modelo T80+) a 734 nm.

Os resultados foram expressos em μmol Trolox g⁻¹ de hidrolisado, utilizando uma curva de calibração preparada com o padrão Trolox na faixa de 0 a 1500 μmol L⁻¹ com equação da reta $y = -0,0003x + 0,7517$ e $R^2 = 0,997$.

2.6.3. Poder de redução pelo FRAP

A metodologia de FRAP (Ferric Reducing Ability Power) foi desenvolvida de acordo com BOROSKI et al, (2015). Após adicionar 3,0 mL de reagente FRAP em 100 μL de amostra e 300 μL de água ultrapura, o material foi incubado a 37 °C em banho-maria por 40 min, centrifugado por 5 min a 2264 x g por 10 min e a absorbância foi lida em 593 nm em espectrofotômetro (PG Instruments modelo T80+). Os resultados foram expressos em μmol Trolox g⁻¹ de hidrolisado, utilizando uma curva de calibração preparada com o padrão Trolox na faixa de 0 a 700 μmol L⁻¹ com equação da reta $y = 0,001x - 0,03$ e $R^2 = 0,9908$.

2.7. Atividade antimicrobiana

2.7.1. Concentração inibitória MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima determina a maior diluição que inibe o crescimento do microrganismo estudado. Foram utilizadas duas bactérias, Escherichia coli ATCC 25922 e a Staphylococcus aureus ATCC 29213.

As bactérias foram padronizadas em solução salina com escala 0,5 Mc Farland, repicada 24 h antes do experimento em caldo Mueller-Hinton (MH). Em seguida, 50 μL da suspensão bacteriana padronizada foram diluídos em 950 μL de caldo MH. As amostras foram preparadas na concentração de 20 mg mL⁻¹ de caldo MH. Cem microlitros de caldo MH foram colocados na microplaca de 96 poços. Na linha A foram adicionados 100 μL das amostras em duplicata, seguido das diluições seriadas até a linha G. Na linha H foi adicionado o controle do crescimento bacteriano e, por último, foram adicionados 10 μL da suspensão bacteriana em cada poço. O material foi incubado em estufa a 35 °C por 24 h. Os poços sem crescimento a olho nu, foram plaqueados em ágar MH e incubados em estufa 35 °C por 24 h. Foram adicionados 10 μL de uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5 % em água, por poço da microplaca que foi incubada por 3 h em estufa a 35 °C. Os poços com coloração rosa indicam crescimento microbiano (NCCLS, 2003).

2.7.2. Concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima é a menor concentração do extrato capaz de impedir o crescimento do microrganismo estudado após subcultivo (NCCLS, 2003).

2.8. Análise estatística

Os resultados das análises de antioxidantes foram expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 3). Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o programa Statística 10.0. Foram utilizados análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias (p<0,05).

3. Resultados e discussão

3.1. Atividade antioxidante

Os resultados das análises de atividade antioxidante in vitro das amostras do Grupo 1 que correspondem aos hidrolisados preparados em shaker de forma convencional são apresentados na Figura 1 e na Tabela 1. Ao comparar os métodos analíticos, foi verificado que os resultados para a captura do radical DPPH foram mais efetivos que os demais.

A amostra controle, sem adição de enzima, apresentou atividade antioxidante de $112,00 \pm 0,35 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ de hidrolisado que foi aumentada em mais de oito vezes com 5 min de hidrólise, ou em dez vezes com 10 min, e teve o seu máximo de atividade, $1211,01 \pm 7,43 \mu\text{mol ET g}^{-1}$, com 60 min. Esse valor não diferiu estatisticamente do resultado com 6 h de hidrólise. É importante ressaltar que na análise de captura do radical DPPH foi necessário diluir a amostra em 10 vezes. Portanto, a concentração da amostra foi de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Para as demais metodologias, a concentração foi de $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Para a metodologia do poder de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} o máximo de atividade foi $173,58 \pm 1,41 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ obtido em 4 h de hidrólise e na captura do radical ABTS, $154,51 \pm 3,99 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ em 5 h de hidrólise.

Existem vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante em alimentos, e dessa forma, sugere-se que cada avaliação deva ser feita por várias técnicas em diferentes meios e condições de oxidação. O DPPH é um radical livre relativamente estável que aceita um elétron ou um átomo de hidrogênio a partir de compostos antioxidantes para se tornar uma molécula menos reativa (GIRGIH et al, 2015). O método de eliminação do radical ABTS é baseado na redução de cor e redução do radical ABTS quando exposto a um composto com atividade antioxidante, utilizado tanto para compostos hidrofílicos quanto compostos lipofílicos (CENTENARO et al, 2014). O poder redutor é uma medida que fornece uma estimativa da capacidade de um composto em reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de um composto antioxidante, sendo determinada através de uma relação colorimétrica. As amostras com maior poder redutor, são aquelas que apresentaram maior capacidade de doação de elétrons.

Figura 1. Atividade antioxidante pelos métodos de ABTS, DPPH e FRAP nas amostras de hidrolisados preparados em shaker (Grupo 1).

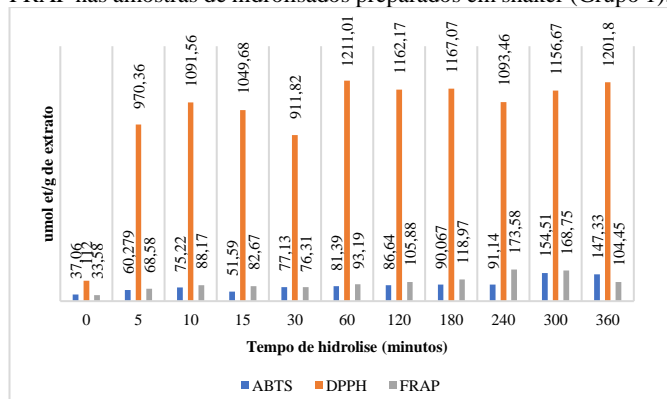


Tabela 1. Atividade antioxidante dos hidrolisados preparados

| Tempo de hidrólise (min) | DPPH ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) | ABTS ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) | FRAP ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) |
|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| controle | $112,0 \pm 0,4^a$ | $37,1 \pm 4,0^a$ | $33,6 \pm 1,7^a$ |
| 5 | $970,4 \pm 5,4^c$ | $60,3 \pm 6,2^{bc}$ | $68,6 \pm 0,4^b$ |
| 10 | $1091,6 \pm 19,9^e$ | $75,22 \pm 9,4^{bd}$ | $88,2 \pm 2,5^{cd}$ |
| 15 | $1049,7 \pm 13,2^d$ | $51,6 \pm 5,9^{ac}$ | $82,7 \pm 1,1^{ce}$ |
| 30 | $911,8 \pm 8,3^b$ | $77,1 \pm 2,3^{de}$ | $76,3 \pm 2,8^{be}$ |
| 60 | $1211,0 \pm 7,4^g$ | $81,4 \pm 6,1^{de}$ | $93,2 \pm 0,5^d$ |
| 120 | $1162,2 \pm 11,7^f$ | $86,6 \pm 6,8^{de}$ | $105,9 \pm 2,4^f$ |
| 180 | $1167,1 \pm 2,6^f$ | $90,1 \pm 3,6^{de}$ | $119,0 \pm 3,0^g$ |
| 240 | $1093,5 \pm 21,2^e$ | $91,1 \pm 3,2^e$ | $173,6 \pm 1,41^h$ |
| 300 | $1156,7 \pm 9,6^f$ | $154,5 \pm 4,0^f$ | $168,8 \pm 3,40^h$ |
| 360 | $1201,8 \pm 9,6^g$ | $147,3 \pm 5,8^f$ | $104,4 \pm 2,1^f$ |

Os valores mostrados são a média e o desvio padrão de medições em triplicata. As médias dentro da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Para as amostras do Grupo 2 (Tabela 2) que correspondem aos hidrolisados preparados em sonicador com a potência de 100 W e variação do tempo, a análise de ABTS aponta que 5 min de hidrólise são suficientes para atingir a maior atividade antioxidante, cerca de 4 vezes maior que a amostra controle e estatisticamente igual às hidrólises ocorridas após 15 e 30 min.

O poder de redução pelo FRAP teve seu resultado aumentado em três vezes após 60 min de hidrólise assistida por ultrassom, mostrando novamente que o aumento da quebra da proteína da pele de rã-touro em peptídeos menores tem uma melhor redução do composto Fe^{3+} . O mesmo foi observado para o DPPH, onde houve um aumento de nove vezes a atividade antioxidante comparada com o controle.

Tabela 2. Atividade antioxidante dos hidrolisados preparados em sonicador com potência de 100 W (Grupo 2).

| Tempo de hidrólise (min) | DPPH ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) | ABTS ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) | FRAP ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) |
|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | SQ \pm DP | SQ \pm DP | SQ \pm DP |
| controle* | $112,0 \pm 0,4^a$ | $37,2 \pm 4,0^a$ | $33,5 \pm 1,7^a$ |
| 5 | $779,6 \pm 37,0^b$ | $134,4 \pm 5,0^c$ | $67,2 \pm 0,5^c$ |
| 15 | $909,1 \pm 27,9^c$ | $127,5 \pm 2,8^c$ | $73,9 \pm 0,7^d$ |
| 30 | $876,0 \pm 27,3^c$ | $136,7 \pm 11,8^c$ | $54,7 \pm 1,4^b$ |
| 60 | $1054,9 \pm 24,4^d$ | $110,9 \pm 7,9^b$ | $99,3 \pm 2,6^e$ |

*controle obtido em shaker

Os valores mostrados são a média e o desvio padrão de medições em triplicata. As médias dentro da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

No grupo 3 (Tabela 3), que corresponde aos hidrolisados preparados em sonicador com a variação de potência e o tempo fixado em 5 min, o método de captura do radical DPPH apresentou novamente os melhores resultados quando comparado aos demais procedimentos analíticos, e não houve diferença estatística na atividade antioxidante das amostras submetidas a 250 e 500 W que foram superiores àquela na potência de 100 W, porém, em relação ao controle, houve um aumento de cerca de dez vezes na atividade. Um comportamento semelhante foi observado na análise de FRAP, com um aumento de quase três vezes para as potências de 250 e 500 W em relação à amostra controle.

Para o método de captura do radical ABTS, a potência de 100 W resultou em maior atividade antioxidante e superior em três vezes à amostra sem adição de enzima.

Tabela 3. Atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados preparados em sonicador por 5 min (Grupo 3).

| Potência (W) | DPPH ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) | ABTS ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) | FRAP ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$) |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | SQ \pm DP | SQ \pm DP | SQ \pm DP |
| controle* | $112,0 \pm 0,4^a$ | $37,1 \pm 4,0^a$ | $33,8 \pm 1,7^a$ |
| 100 | $779,6 \pm 37,0^b$ | $134,4 \pm 5,0^c$ | $67,2 \pm 0,5^b$ |
| 250 | $1097,0 \pm 3,7^c$ | $85,0 \pm 8,2^b$ | $95,9 \pm 3,2^c$ |
| 500 | $1121,4 \pm 1,0^c$ | $84,5 \pm 2,8^b$ | $98,1 \pm 0,3^c$ |

*controle obtido em shaker

Os valores mostrados são a média e o desvio padrão de medições em triplicata. As médias dentro da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ao correlacionar os três grupos de hidrolisados em relação à metodologia de captura do radical DPPH, é possível perceber que a amostra que teve melhor resultado foi aquela obtida em processo de hidrólise convencional ocorrida em shaker durante 60 min. Por outro lado, ao fixar o tempo de

hidrólise em 5 min, ao comparar os processos convencional e assistido por ultrassom, a maior atividade antioxidante é alcançada nas amostras submetidas às potências de 250 W e 500 W no sonicador. De acordo com ROMDHANE et al, (2016), o processamento ultrassônico desempenha um papel fundamental nas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer de biopolímeros.

Comparando os três grupos novamente, mas dessa vez para a análise de ABTS, o melhor resultado foi para o hidrolisado desenvolvido no shaker por 5 h (300 min). Porém, fixando o tempo de hidrólise em 5 min, ao comparar shaker e sonicador, a maior atividade antioxidante é alcançada nos hidrolisados em sonicador com potência de 100 W.

Tanto a metodologia do DPPH quanto a do ABTS são técnicas conhecidas pelo sequestro de radicais livres e medem a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica (RABELO et al, 2014). Normalmente, as análises de uma forma geral seguem a mesma tendência de resultados, um método confirmando o outro. No entanto, o método de ABTS apresentou uma um comportamento diferente em relação às demais metodologias (DPPH e FRAP). Isto pode ter ocorrido, pela maior reação do ABTS com peptídeos de baixa massa molecular, indicando que a hidrólise por um tempo mais prolongado foi mais efetiva, diminuindo o tamanho das cadeias de peptídeos na amostra.

Correlacionando os três grupos, para o FRAP a amostra que mais se destacou foi o hidrolisado desenvolvido em shaker durante 4 h (240 min) de hidrólise. Porém, fixando o tempo em 5 min, ao comparar os processos, shaker e sonicador, maior atividade antioxidante foi alcançada nos hidrolisados em sonicador com potência de 250 e 500 W, assim como para o DPPH.

Com base nos resultados apresentados, entende-se que os peptídeos de baixo peso molecular liberado pela pele de rã-touro por meio da hidrólise enzimática possuem atividade antioxidante, apresentando um grande poder de inibição dos radicais livres, o que seria esperado para que houvesse a proteção contra os danos oxidativos, ajudando a prevenir o envelhecimento das células e a propensão da ação do câncer. Consequentemente pode-se sugerir que a pele de rã-touro apresenta potencial nutracêutico e bioativo (Fleming, 1980).

3.2. Atividade antimicrobiana

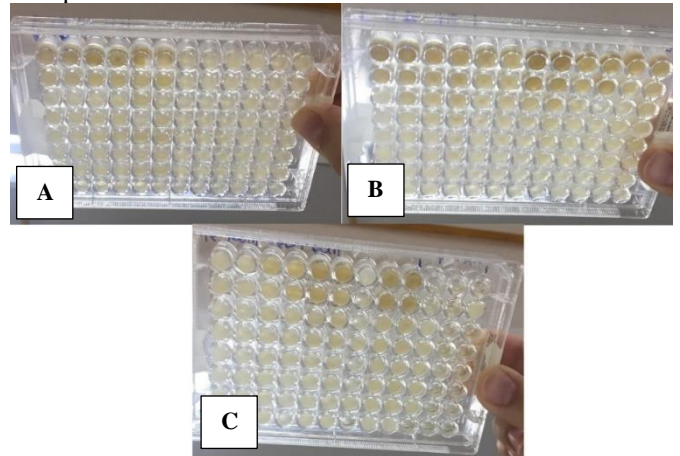
A concentração inibitória mínima determina a maior diluição que inibe o crescimento do microrganismo estudado. Neste trabalho foram utilizadas duas bactérias, a *Escherichia coli* ATCC 25922 e a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, sendo a *E. coli* uma bactéria Gram-negativa e a *S. aureus* uma bactéria Gram-positiva. Elas se diferenciam por suas paredes celulares, pela coloração de Gram-negativa (coloração vermelha/rosa) e positiva (coloração azul/roxa). A Gram-negativa é responsável pelas infecções de pneumonia, peritonite, infecções no aparelho urinário, infecções em feridas e a meningite. Já a Gram-positiva causa carbúnculo, difteria, listeriose, erisipelotricose (LIMA et al, 2015; SOUZA et al, 2016).

Aplicou-se a *E. coli* nos extratos diluídos com o meio MH e os resultados são apresentados na Figura 2. Na primeira visualização sem a adição do corante, foi observado que havia a turvação em todos os poços.

Como não houve confirmação visual da inibição do crescimento da bactéria *E. coli*, não foi feito o plaqueamento como consta na metodologia, tendo em vista que essa etapa só ocorreria se houvesse a confirmação positiva. Foi adicionada

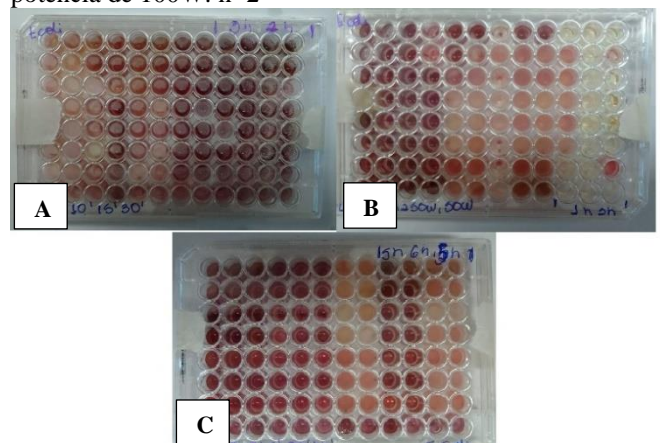
a solução de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) para ter uma comparação, visto que a olho nu poderia haver o erro de analista (Figura 3).

Figura 2. Teste antimicrobiano pelo método de CIM nos hidrolisados de pele de rã com a *E. coli*, sem a adição do corante. A) amostras de 5 a 120 min em shaker. B) amostras de 180 a 360 min e as amostras de 15 e 30 na potência de 100W. C) amostras de 100, 250 e 500 W e a amostra de 60 min com potência de 100W. n=2



Fonte: do autor

Figura 3. Teste antimicrobiano pelo método de CIM nos hidrolisados de pele de rã com a *E. coli*, com a adição de CTT. A) amostras de 5 a 120 min em shaker. B) amostras de 180 a 360 min e as amostras de 15 e 30 na potência de 100W. C) amostras de 100, 250 e 500 W e a amostra de 60 min com potência de 100W. n=2



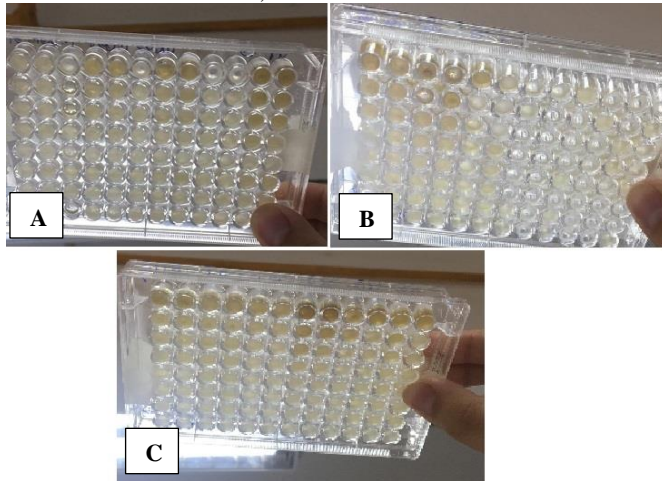
Fonte: do autor

Com a adição de CTT foi possível perceber que a turbidez nas amostras eram as bactérias presentes no meio. As amostras, na concentração utilizada, não foram capazes de inibir o crescimento da bactéria Gram-negativa, *E. coli* que se mostrou mais resistente à ação dos hidrolisados, por possuir uma parede celular constituída de lipopolissacarídeos, mais resistente em comparação com outros microrganismos (GOULD, 2009).

Para a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, o resultado foi parecido. Na visualização sem a adição da solução de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) não havia inibição do crescimento das bactérias, como apresenta a Figura 4. Novamente, não foi realizado o plaqueamento para a análise de CBM, pois não foi possível detectar a inibição a olho nu.

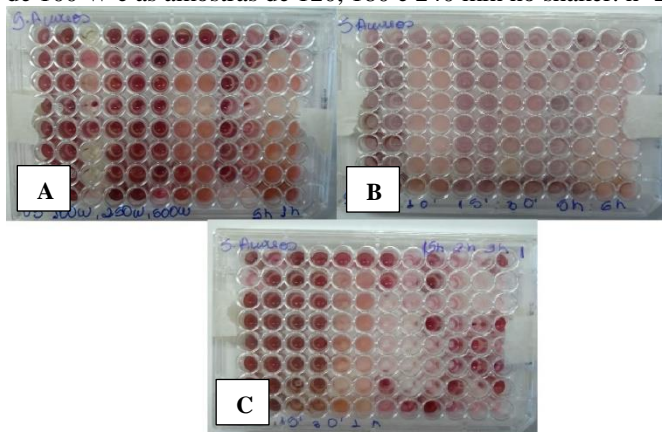
Após a adição do CTT (Figura 5B), ficou possível detectar que as amostras não apresentaram resultado positivo, mostrando que os hidrolisados não foram capazes de inibir o crescimento das bactérias.

Figura 4. Teste antimicrobiano pelo método de CIM nos hidrolisados de pele de rã com a *S. aureus*, sem a adição de CTT. A) amostras de 100, 250, 500W e 60 min no shaker. B) amostras de 5 a 30 min e as amostras de 300 e 360 no shaker. C) amostras de 5 a 60 min no sonicador com a potência de 100 W e as amostras de 120, 180 e 240 min no shaker. n=2



Fonte: do autor

Figura 5. Teste antimicrobiano pelo método de CIM nos hidrolisados de pele de rã com a *S. aureus*, com a adição de CTT. A) amostras de 100, 250, 500W e 60 min no shaker. B) amostras de 5 a 30 min e as amostras de 300 e 360 min no shaker. C) amostras de 5 a 60 min no sonicador com a potência de 100 W e as amostras de 120, 180 e 240 min no shaker. n=2



Fonte: do autor

O microrganismo Gram-positivo apresentou uma resposta semelhante ao Gram-negativo por ele ter uma parede celular constituída por peptidoglicano, explicando novamente que a parede celular dos microrganismos estudados tem o poder de proteger a bactéria dos agentes externos. A *S. aureus* é uma bactéria patogênica, associada à infecção hospitalar, um dos principais microrganismos presentes nas infecções de pele. Essa cepa é muito estudada pela sua alta resistência a antimicrobianos betalactâmicos (GELATTI et al, 2009).

ISLAS-RODRÍGUEZ et al, (2009) relatou a atividade antibacteriana in vitro e em um modelo animal, do peptídeo antimicrobiano de pele de rã, esculentina 1-21 □Esc (1-21)□. Os resultados revelaram que esse peptídeo é altamente potente

contra os microrganismos causadores de mastite, *Streptococcus agalactiae*, e causaram uma regressão do estágio clínico dessa doença em vacas leiteiras, após uma semana de tratamento, demonstrando ter um potencial terapêutico para o desenvolvimento de medicamentos para a cura da mastite.

Geralmente, os peptídeos antimicrobianos contêm em sua composição 10 a 50 aminoácidos (ZOHRAB et al, 2018) em diferentes, sequência, estrutura e atividade. Todos têm carga positiva em pH neutro e possuem mais de 30 % de resíduos hidrofóbicos. Os peptídeos se dobram em uma estrutura anfífilica para se ligarem às membranas dos microrganismos que são carregados negativamente e, assim, terem o efeito antimicrobiano (ISLA-RODRÍGUEZ, 2009). Acredita-se que a concentração utilizada no presente estudo não foi satisfatória para os resultados desejados.

4. Conclusão

Os peptídeos liberados pela hidrólise da pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) nas condições apresentadas no trabalho possuem expressiva atividade antioxidante. O uso de um sonicador diminuiu drasticamente o tempo de hidrólise para apenas 5 min, com a melhor potência de 250 W avaliada pelas metodologias analíticas do radical DPPH e da redução do Fe³⁺ pelo FRAP, e a potência de 100 W foi melhor para a análise de captura do radical ABTS. A redução significativa do tempo justifica a continuidade da pesquisa para o uso dessa tecnologia.

Os hidrolisados não apresentaram atividade antimicrobiana na concentração estudada, sendo necessário continuar o trabalho nessa linha. Para além disso, para que seja possível desenvolver um produto com as atividades antioxidante e antimicrobiana a partir de hidrolisado proteico de pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), utilizando a tecnologia de hidrólise assistida por ultrassom, será necessário ajustar alguns pontos importantes como a escolha de uma enzima presente na lista positiva da Anvisa, tendo em vista que a Corolase H-pH, apesar de seu bom desempenho, ainda não tem seu registro aprovado naquele órgão para uso nas indústrias de alimentos, fármacos ou cosmética. Além disso, faz-se necessário a avaliação do hidrolisado desenvolvido utilizando um sistema de digestão in vitro para avaliar a estabilidade do produto frente às enzimas presentes no sistema digestório.

A continuidade desse trabalho é parte de uma pesquisa de pós-doutorado em desenvolvimento no programa de Pós-graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Toledo.

5. Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Central Analítica-Laboratório Multiusuário da UTFPR de Toledo-PR, pela disponibilização do espaço e equipamentos para as análises.

7. Referências

- AFONSO, A. M. Ricultura se consolida com cadeia produtiva operando em rede interativa. **Revista Visão Agrícola**, 11, 33-35, 2012.
- AYRES et al. Carcass yield and proximate composition of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Acta Sci., Anim. Sci.**

- 37, 329-333, 2015. <http://doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i4.28196>.
- BARBOSA et al. Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. **Free Radical Biology and Medicine**, 115, 68–79, 2018. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.001>.
- BENZIE I.; STRAIN J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry** 239:70-76, 1996. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- BOROSKI et al. Antioxidantes princípios e métodos analíticos. Curitiba: Editora Appris, 2015.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria nº 93, de 7 de julho de 1998. Regulamenta a importação e a exportação de espécimes vivos, produtos e subprodutos da fauna silvestre brasileira e da fauna silvestre exótica. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 8 jul. 1998. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/IBAMA/PT0093-070798.PDF>. Acesso em: 03 jan. 2021.
- BUTTERFIELD et al. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer’s diseases. **J. Nutr. Biochem.** 13, 444-461, 2002. [http://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00205-X](http://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00205-X).
- CENTENARO et al. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 172, 2877–2893, 2014. <http://doi.org/10.1007/s12010-014-0732-6>.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, 8(6), 20–29, 2018. <http://doi.org/10.3390/catal8060238>.
- CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev.** 72, 365–379, 1997. <http://doi.org/10.1017/s0006323197005045>.
- CUNHA, E. R.; DELARIVA, R. L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW 1802): Uma revisão. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.** 4, 2, 34-36, 2009.
- FAO. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Rana catesbeiana*, Fisheries and Aquaculture Department. Retrieved 2019-03-12, 2019.
- FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. **Clinical Infectious Diseases**. 2, 129–139, 1980. <http://doi.org/10.1093/clinids/2.1.129>.
- GELATTI et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 84, 5, 501-506, 2009. <http://doi.org/10.1590/S0365-05962009000500009>.
- GIRGIH et al. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. **Food Chemistry**, 173, 652–659, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.079>.
- GOMES et al. Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**. 45, 579-593, 2007.
- GOULD, D. Effective strategies for prevention and control of Gram-negative infections. **Nursing Standard**, Londres, 23, 48, 42-46, 2009. <http://doi.org/10.7748/ns2009.08.23.48.42.c7204>.
- GOUVEIA, S. da S.; LIMA, A. A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, 20, 3, 174-179, 2017.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, H. M.; MORENO-VILET, L.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S. J. Current status of emerging food processing technologies in Latin America: Novel non-thermal processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 58, 1-16, 2019. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102233>.
- HUANG et al. *In vitro* evaluation of antioxidant activities and inhibition of ACE activity by collagenase-treated hydrolysate derived from bullfrog skin. **Journal of Food and Drug Analysis** 19, 301-308, 2011. <http://doi.org/10.38212/2224-6614.2191>.
- ISLAS-RODRIGUEZ et al. Esculentin 1–21: a linear antimicrobial peptide from frog skin with inhibitory effect on bovine mastitis-causing bacteria. **J. Pept. Sci.** 15: 607–614, 2009. <http://doi.org/10.1002/psc.1148>.
- KARNJANAPRATUM, S.; BENJAKUL, S. Asian bullfrog (*Rana tigerina*) skin gelatin extracted by ultrasound-assisted process: Characteristics and in-vitro cytotoxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, 148, 391-400, 2020. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.150>.
- LIMA et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de literatura. **Uningá Review**, 21, 1, 32-39, 2015.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NWACHUKWU, I. D.; ALUKO, R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **J Food Biochem** e12761, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.12761.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**. Vol 33 no. 7 São Paulo; 2010. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>.
- OLIVEIRA et al. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento, 49). ISSN 1676-6709.
- PIRES, C.; CLEMENTE, T.; BATISTA, I. Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. **J Sci Food Agric** 93(4):771-780, 2012. <http://doi.org/10.1002/jsfa.5796>.
- QIAN et al. Isolation and characterization of collagen from skin of bullfrog, *Rana catesbeiana* Shaw. **J Fish Sci Technol** 10, 2, 53-59, 2007. <http://doi.org/10.5657/fas.2007.10.2.053>.
- RABELO et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 36(spe1), 265–271, 2014. doi: <http://doi.org/10.1590/s0100-29452014000500031>.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 475-760. Pryor, W.A.; Ann, N.Y. (1982). Free

- radical biology: xenobiotics, cancer, and aging. **Acad. Sci.** 393, 1–22, 2006. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023>.
- ROLLINS-SMITH et al. Antimicrobial Peptide Defenses in Amphibian Skin. **Integr. Comp. Biol.**, 45, 137–142, 2005. <http://doi.org/10.1093/icb/45.1.137>.
- ROMDHANE et al. Optimization of polysaccharides extraction from watermelon rinds: structure, functional and biological activities. **Food Chem.** 216, 355–364, 2017. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.056>.
- SINDHI et al. Potential applications of antioxidants - A review. **Journal of Pharmacy Research** 7, 828 – 835, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>.
- SOUZA et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarréiogênica versátil. **Rev Pan Amaz Saúde**, 7, 2, 79-91, 2016. <http://doi.org/10.5123/S2176-62232016000200010>.
- TÉLLEZ-MORALES, J. A.; HERNÁNDEZ-SANTO, B.; RODRÍGUEZ-MIRANDA, J. Effect of ultrasound on the techno-functional properties of food components/ingredients: A review. **Ultrasonics – Sonochemistry**, 61, 104787, 2020. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104787>.
- TRIPATHI, K. D. Antimicrobial Drugs: General Considerations. In: **Essentials of Medical Pharmacology**, 7th ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers., 2013. Section 12, Cap. 49 p.688-703.
- WANG et al. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, 119, 453–461, 2018. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.133>.
- WANG, X.; MAJZOBI, M.; FARAHNAKY, A. Ultrasound-assisted modification of functional properties and biological activity of biopolymers: A review. **Ultrasonics - Sonochemistry** 65, 105057, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105057>.
- ZOHRAB et al. Biological Properties, Current Applications and Potential Therapeutic Applications of Brevinin Peptide Superfamily. **Int J Pept Res Ther** 25, 39–48, 2019. <http://doi.org/10.1007/s10989-018-9723-8>.