UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

EXTRAÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL E APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS BIOATIVAS

CAROLINA FERRER GONÇALVES

Engenheira de Alimentos

PROF.ª DR.ª MICHELE GREQUE DE MORAIS

Orientadora

PROF.ª DR.ª KARINE RIGON ZIMMER

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

EXTRAÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL E APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS BIOATIVAS

CAROLINA FERRER GONÇALVES

Engenheira de Alimentos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos na área de Bioprocessos em Alimentos.

PROF.ª DR.ª MICHELE GREQUE DE MORAIS

Orientadora

PROF.ª DR.ª KARINE RIGON ZIMMER

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2015

G586e Gonçalves, Carolina Ferrer.
Extração de biopeptídeos de origem microalgal e aplicação no desenvolvimento de nano fibras bioativas / Carolina Ferrer Gonçalves. – 2015.
93 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos, Rio Grande/RS, 2015.
Orientadora: Drª. Michele Greque de Morais.
Co-orientadora: Drª. Karine Rigon Zimmer.

1. Conservação de alimentos 2. Biopeptídeos 3. Microalgas 4. Nanofibras I. Morais, Michele Greque II. Zimmer, Karine Rigon III. Título.

CDU 664.9.022

Catalogação na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Carolina Ferrer Gonçalves e aprovada em 5 de março de 2015, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Michele Greque de Morais – FURG

Profa. Dra. Elessandra da R. Zavareze – UFPEL

Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon – FURG

Profa. Dra. Cristiane Reinaldo Lisboa - FURG

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por todo aprendizado que tenho recebido nesta jornada acadêmica.

Aos meus pais, irmão e cunhada pelo apoio, dedicação, conselhos, suporte, compreensão e carinho durante toda minha vida.

Aos meus tios Vera e Edgard pelo amparo e todo carinho que recebi de vocês.

Aos meus primos Raquel e Rodrigo que me receberam em sua casa como filha.

Ao Josiel Dimas, pela paciência, incentivo e apoio em mais esta etapa.

Às minhas orientadoras Pr.ª Dr.ª Michele Greque de Morais e Pr.ª Dr.ª Karine Rigon Zimmer, pelas orientações, ensinamentos, seriedade, amizade, paciência e incentivos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Igor e Carina por toda ajuda na realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande e professores do PPGECA, pelos auxílios e ensinamentos recebidos nestes dois anos. À estrutura física e técnica dos Laboratórios da Escola de Química e Alimentos (FURG) por todo o auxílio na concretização deste trabalho.

Ao Laboratório de Peptídeos e Enzimas do Centro de Biotecnologia da UFRGS pela disponibilidade na realização de análises deste trabalho.

Em especial aos Laboratórios de Engenharia Bioquímica (LEB) e Microbiologia e Bioquímica (MIBI), pelo suporte fornecido epela receptividade. Ao pessoal do LEB e MIBI pelo convívio e amizades que levarei para sempre.

À Maristela pela amizade e palavras de carinho que me ajudaram a seguir em frente. Em especial aos meus amigos Carina e Cleber que tornaram a minha vida em Rio Grande mais feliz e divertida.

Agradeço a todas as pessoas e amigos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

"Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final.
Se insistirmos em permanecer nela mais do que o tempo necessário,
perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver."
Fernando Pessoa

RESUMO GERAL

As microalgas têm sido estudadas em processos biotecnológicos devido ao seu conteúdo nutricional rico em proteínas. A *Spirulina* possui certificação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como alimento seguro podendo ser adicionada em produtos para consumo humano. A hidrólise enzimática de proteínas permite obter peptídeos de baixa massa molecular com propriedades ativas que possuem ação de conservação de alimentos. A incorporação de antioxidantes na matriz das nanofibras formadas por *electrospinning* permite a liberação destes compostos visando à conservação de produtos. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de nanofibras contendo biopeptídeos extraídos de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 para conservação de carne de frango. Inicialmente foi avaliado por delineamento composto central (DCC) 2^2 a obtenção de peptídeos da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por hidrólise enzimática. O perfil de biopeptídeos foi avaliado por método eletroforético e cromatografia em camada delgada (CCD) e a atividade antioxidante por métodos de sequestro de radicais livres DPPH, ABTS e poder redutor. As nanofibras foram produzidas com poli-ε-caprolactona (PCL) com incorporação de biopeptídeos (10 kDa) e avaliadas as propriedades térmicas (DSC e TGA) e mecânicas (resistência a tração e alongamento). A estabilidade da carne de frango recoberta com as nanofibras contendo biopeptídeos foi determinada por TBARS e N-BVT no período de 12 dias de armazenamento. Foi obtido grau de hidrólise (GH) de aproximadamente 60% na condição de 3% (m/v) de substrato e 3 $U.mL^{-1}$ de enzima. Os hidrolisados obtidos apresentaram maior conteúdo proteico solúvel bem como maior atividade antioxidante comparados a biomassa não hidrolisada. A presença de peptídeos/aminoácidos nas amostras foi detectada por CCD através da coloração por ninhidrina. As nanofibras de PCL com adição de 3% (m/v) de biopeptídeos apresentaram diâmetro de nanofibras de 438 nm e menor ponto de fusão e degradação térmica quando comparadas com as nanofibras de PCL devido a presença de fragmentos proteicos. As nanofibras com biopeptídeos apresentaram atividade antioxidante quanto ao poder redutor de 0,182 (U.A.), 22,6% e 12,4% de inibição específica dos radicais DPPH e ABTS, respectivamente. Na avaliação de estabilidade de TBARS e N-BVT os cortes de frango recobertos com nanofibras contendo biopeptídeos apresentou maior controle nos índices de oxidação lipídica e bases voláteis totais comparados com a amostra controle sem recobrimento. Desta forma, as nanofibras de PCL contendo biopeptídeos com atividade antioxidante são potenciais alternativas para aplicação como embalagens primárias para conservação de produtos perecíveis como carne de frango.

Palavras-chave: antioxidantes, biopeptídeos, nanofibras, *electrospinning*.

ABSTRACT

Microalgae have been studied in biotechnological processes due to its high nutritional content in protein. *Spirulina* is certified by FDA (*Food and Drug Administration*) as safe food can be added to products for human consumption. The enzymatic protein hydrolysis allows to obtain low molecular weight peptides with active properties and may be added as preservatives or active packaging for food preservation. The incorporation of antioxidants in the matrix of nanofibers formed by electrospinning allows the release of these compounds for conservation products. This study was general aim the development of nanofibers containing biopeptides of *Spirulina* sp. LEB 18 for conservation of chicken. It was initially by central composite design (DCC) 2^2 to obtain biopeptides from *Spirulina* sp. 18 LEB biomass by enzymatic hydrolysis The biopeptides profile was evaluated by electrophoretic method and thin layer chromatography and the antioxidant activity of radical scavenging DPPH, ABTS and reducing power. The nanofibers were produced with the addition of biopeptides (10 kDa) in poly-ε-caprolactone (PCL) and evaluated the thermal properties (DSC and TGA) and mechanical (tensile strength and elongation). The stability of chicken coated with nanofibers containing biopeptides was measured by TBARS and the N-BVT 12-day storage period. Degree of hydrolysis (GH) obtained was approximately 60% under the condition of 3% (w/v) substrate and 3 $U.mL^{-1}$ enzyme. The hydrolysates showed higher soluble protein content and higher antioxidant activity. The presence of peptides / amino acids in samples was detected by thin-layer chromatography using the ninhydrin staining. The PCL nanofibers with addition of 3% (w/v) biopeptides nanofibers have a diameter of 438 nm and reduced melting points and thermal degradation when compared to PCL nanofibers due to the presence of protein fragments. Nanofibers with biopeptídeos showed antioxidant activity as the reducing power of 0.182 (AU), 22.6% and 12.4% specific inhibition of DPPH and ABTS radical, respectively. In the evaluation of stability of TBARS and N-BVT chicken cuts covered with nanofibers containing biopeptídeos with control in lipid oxidation rates and total volatile bases compared with the control sample. Therefore, the PCL nanofibers containing biopeptides with antioxidant activity are potential alternatives for use as primary packaging for preservation of perishable products like chicken.

Keywords: antioxidants, biopeptides, nanofibers, electrospinning.

LISTA DE TABELAS

CAPTÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

TABELA 1 – Matriz do delineamento composto central (2^2) com valores codificados e reais e a resposta grau de hidrólise do conteúdo proteico de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.....39

TABELA 2 – Conteúdo proteico e atividade antioxidante da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados e filtrados em membranas 0,1µm e Amicon® 10K.....46

ARTIGO 2: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL APLICADO EM NANOFIBRAS PARA DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGENS ATIVAS.

TABELA 1 – Resostas de parâmetros térmicos para análises de DSC e TGA das nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos.....63

TABELA 2 – Atividade antioxidante dos biopeptídeos, das nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos.....65

TABELA 3 – Análise de TBARS e N-BVT para amostras contendo nanofibras com biopeptídeos e controle após 12 dias de armazenamento.....67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 − Esquema do equipamento do processo de *electrospinning*. 26

CAPTÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

FIGURA 1− Superfície de contorno da resposta GH% com relação as variáveis independentes AE (U.mL-1) e CP (%) para a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.....42

FIGURA 2 − Cinética de GH nas condições de CP 3% (m/v) e AE 3 $U.mL^{-1}$.....43

FIGURA 3−Perfil eletroforético da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados e filtrados proteicos em gel SDS-PAGE 20% corado com *Coomassie blue* (a) e gel SDS-PAGE 15% corado com nitrato de prata (b).....44

FIGURA 4– Análise de CCD da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados proteicos, filtrados em membrana 0,1 µm e coluna Amicon® 10K. Fase eluente: butanol:ácido acético:água (4:1:1).....45

ARTIGO 2: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL APLICADO EM NANOFIBRAS PARA DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGENS ATIVAS.

FIGURA 1– Nanofibras com 12% de PCL, 1,4% de NaCl (a) e 12% de PCL, 1,4% de NaCl, metanol e 3% de biopeptídeos de *Spirulina* sp. LEB 18 (b) sob aumento de 3500 x.....62

FIGURA 2– Cortes de carne de frango controle (1) e nanofibras contendo biopeptídeos em 0 e 12 dias de armazenamento.....66

CAPÍTULO VI – APÊNDICES

APÊNDICE 1– Perfil eletroforético da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados e filtrados proteicos em gel SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie blue* (a) e gel SDS-PAGE 20% corado com nitrato de prata (b).....84

APÊNDICE 2– Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) das nanofibrasde PCL e PCL com biopeptídeos.....85

APÊNDICE 3– Análise termogravimétrica das nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos.....85

SUMÁRIO

RESUMO GERAL 6
ABSTRACT 7
CAPÍTULO I 13
1 INTRODUÇÃO GERAL 14
2 OBJETIVOS 16
2.1 Objetivo geral 16
2.2 Objetivos específicos 16
CAPÍTULO II 16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
3.1 Microalgas 18
3.2 Proteínas 20
3.3 Hidrólise enzimática de proteínas 21
3.4 Biopeptídeos 22
3.5 Biopolímeros 23
3.6 Nanotecnologia 24
3.7 Oxidação lipídica de produtos cárneos 28
CAPÍTULO III 29
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO 30
ARTIGO 1: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 31
RESUMO 31
ABSTRACT 31
1 INTRODUÇÃO 32
2 MATERIAL E MÉTODOS 33
2.1 Microalga 33
2.2 Determinação da composição proximal da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 34
2.3 Atividade enzimática da Protemax 580 L 34
2.4 Delineamento Composto Central (DCC^2) 35

2.5. Hidrólise proteica da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 35
2.6 Fracionamento dos hidrolisados proteicos 36
2.7 Análise dos biopeptídeos de origem microalgal 37
2.8 Atividade antioxidante de biopeptídeos extraídos da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 37
2.9 Análise estatística 38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
4 CONCLUSÃO 49
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49
ARTIGO 2: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL APLICADO EM NANOFIBRAS PARA DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGENS ATIVAS 53
RESUMO 53
ABSTRACT 53
1 INTRODUÇÃO 54
2 MATERIAL E MÉTODOS 56
2.1 Obtenção de biopeptídeos por hidrólise enzimática da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 56
2.2 Solução polimérica para desenvolvimento das nanofibras 57
2.3 Processo de *electrospinning* 57
2.4 Caracterização físico-química das nanofibras 57
2.5 Atividade antioxidante das nanofibras 59
2.6 Aplicação das nanofibras com biopeptídeos na conservação de cortes de carne de frango 59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
4 CONCLUSÃO 68
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68
CAPÍTULO IV 29
6 CONCLUSÃO GERAL 74
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 75
CAPÍTULO V 73

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 77
CAPÍTULO VI..... 76
9 APÊNDICES..... 84

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

A conservação de alimentos perecíveis é um dos desafios da área de tecnologia de embalagens na busca de sistemas que não prejudiquem o meio ambiente e permitam maior durabilidade e segurança dos produtos. A oxidação lipídica é um dos processos que causam alterações nos alimentos com a formação de sabores e odores desagradáveis e perda da qualidade nutricional (PEREIRA, 2009).

O desenvolvimento de embalagens ativas tem sido bastante difundido para atender as exigências de mercado. As funções das embalagens além de proteção e contenção dos alimentos tem por finalidade a interação com o produto para prolongar a vida de prateleira. A incorporação de agentes antioxidantes e antibacterianos nas embalagens auxilia no processo de armazenagem e conservação de produtos alimentícios retardando a iniciação dos processos oxidativos (NEO et al., 2013; REALINI; MARCOS, 2014).

A utilização de polímeros biodegradáveis de origem natural tem despertado interesse por ser alternativa na redução de descarte de plásticos de origem petroquímica no ambiente (ALIX et al.,2013; MARTÍNEZ-ABAD et al.,2013). A poli-ε-caprolactona (PCL) é um polímero sintético que possui aplicação na área biomédica, engenharia de tecidos e potencial aplicação para embalagens alimentícias, devido suas propriedades mecânicas, biodegradabilidade, além da certificação como seguro pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e por não ser tóxico para uso por humanos (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010; RANJBAR-MOHAMMADI; BAHRAMI, 2015).

O desenvolvimento de matrizes de nanofibras biodegradáveis para formação de estrutura com compostos ativos para conservação de alimentos é uma das aplicações da nanotecnologia que apresenta vantagens frente aos sistemas convencionais de embalagens. Constituem-se em melhorias nas propriedades de barreira e aumento da área superficial de contato dos compostos ativo com o produto facilitando a inibição dos processos de degradação e ação microbiana (RANJBAR-MOHAMMADI; BAHRAMI, 2015; RHIM; PARK; HA, 2013).

A biotecnologia microalgal tem sido amplamente difundida devido ao grande potencial de extração de compostos biotivos a partir da biomassa desses micro-organismos fotossintéticos (COSTA; MORAIS, 2014). A *Spirulina* é uma cianobactéria que tem

despertado o interesse de pesquisadores devido ao seu alto conteúdo de proteínas entre 50 e 70% (FAO, 2008).

A *Spirulina* possui todos os aminoácidos essenciais e pode ser fonte de biopeptídeos. Os biopeptídeos são obtidos a partir da hidrólise proteica e são classificados como fragmentos de proteínas que atuam sobre as funções biológicas sendo considerados promotores de saúde (KORHONEN, 2009). O uso de hidrolisados proteicos e peptídeos em alimentos e suplemento nutricional apresenta considerável importância, uma vez que também apresentam atividade antioxidante e algumas fontes naturais são deficitárias desses componentes (CARVAJAL, 2009). Além disso, a aplicação desses biopeptídeos com ação antioxidante na área de embalagens de alimentos previne a degradação do produto iniciada por processos enzimáticos ou não enzimáticos como, por exemplo, a peroxidação lipídica (MILLS et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver nanofibras contendo biopeptídeos extraídos de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 com potencial para conservação de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o grau de hidrólise de proteínas de microalgas obtidas por hidrólise enzimática considerando a atividade de enzima e concentração de proteína para obtenção de biopeptídeos.

- Obter biopeptídeos com propriedades antioxidantes para aplicação em nanofibras;

- Desenvolver nanofibras de poli-ε-caprolactona com incorporação de biopeptídeos;

- Avaliar as propriedades morfológicas, térmicas, estruturais e antioxidantes das nanofibras contendo biopeptídeos de microalgas;

- Aplicar as nanofibras contendo biopeptídeos de microalgas em cortes de carne de frango e avaliar as propriedades de antioxidação na conservação do produto.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

As microalgas estão presentes em diversos ecossistemas. São organismos descendentes das primeiras formas de vida fotossintética e apresentam papel regulador da bioesfera do planeta (HENRIKSON, 1994). Estima-se a existência de mais de 50.000 espécies, porém o número de espécies identificadas e estudadas concentra-se em torno de 30.000. As microalgas fazem parte de um grupo heterogêneo de micro-organismos fotossintetizantes, que tem a capacidade de desenvolver-se rapidamente em condições adversas devido a sua estrutura celular simples. As cianobactérias (*Cyanophyceae*) são procarióticas enquanto as algas verdes (*Chlorophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*) são eucarióticas (MATA et al., 2010; MOSTAFA, 2012; RICHMOND, 2004).

As microalgas podem ser classificadas nutricionalmente em autotróficas e heterotróficas. A primeira forma exige para seu desenvolvimento apenas compostos inorgânicos incluindo CO_2 como fonte de energia. A segunda requer uma fonte externa de compostos orgânicos como fonte de energia e não realizam a fotossíntese. Algumas algas fotossintéticas são mixotróficas, tendo a capacidade de realizar fotossíntese e utilizar nutrientes orgânicos de fontes exógenas. As microalgas utilizam a fotossíntese como mecanismo conversor de radiação solar e CO_2 absorvidos pelos cloroplastos em adenosina trifosfato (ATP) e O_2. O O_2 e ATP são utilizados na respiração para produzir energia e suporte para o desenvolvimento (BRENNAN; OWENDE, 2010; PELCZAR, 1997; RICHMOND, 2004).

A utilização de biomassa de origem microalgal tem sido investigada e aplicada nas áreas de alimentos, farmacêutica e química por meio de suplementos para alimentação animal, nutrição humana, fármacos, biocombustíveis, biofertilizantes, também tem sido utilizada no tratamento de águas residuais e a produção de energia (COSTA; MORAIS, 2014; WANG et al., 2012).

Quando submetidas a condições físicas e químicas específicas, as microalgas são capazes de produzir grandes quantidades de biocompostos como proteínas, lipídeos, carboidratos e polímeros. Além destes compostos, estes micro-organismos são capazes de produzir moléculas bioativas de alto valor agregado como antioxidantes, carotenoides,

polissacarídeos, ácidos graxos, vitaminas e hidrocoloides (COSTA; MORAIS, 2014; MATA et al., 2010).

O interesse no potencial de aplicação biotecnológico das microalgas tem aumentado devido a sua ampla biodiversidade e aos numerosos bioprodutos e compostos ativos que estes micro-organismos podem sintetizar.

3.1.1 *Spirulina*

A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria Gram-negativa, filamentosa e microscópica constituída por células de 2 a 8 μm de comprimento que formam um espiral, de onde origina seu nome (CARVAJAL, 2009). Possui cor verde-azulada devido à produção de biopigmento denominado ficocianina, além de possuir outros compostos de cor como a clorofila e os carotenoides (FAO, 2008). As microalgas podem ser encontradas em diversos meios como no solo, pântanos, água doce, água alcalina, salina ou salobra (RICHMOND, 2004).

Desde 1981 a microalga *Spirulina* é legalmente aceita pelo FDA (*Food and Drug Administration*), considerada segura para consumo humano com certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*). A *Spirulina* pode ser fonte de proteínas, vitaminas e minerais. Além disso, pode ser comercializada como alimento ou complemento alimentar livre de contaminantes e de adulteração (FOX, 1996). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também reconhece a *Spirulina* como alimento e não oferece risco à saúde. Esta microalga vem sendo utilizada como nutriente biológico em virtude do alto teor de proteínas (50 a 70%), carboidratos (20%), lipídeos (8%), minerais e vitaminas (CARVAJAL, 2009; FAO, 2008).

Muitos trabalhos desenvolvidos com a microalga *Spirulina* relatam sua importância terapêutica. Dentre estes, podemos citar o efeito estimulante dos mecanismos de reparo do DNA, propriedade esta desempenhada pelos polissacarídeos da microalga (ANDRADE, 2009). Além disso, esta microalga pode ser fonte de biossurfactantes e de compostos antioxidantes (ANDRADE, 2009; GUARIENTI, 2009).

Compostos bioativos podem ser sintetizados pela *Spirulina* dentre eles destacam-se ficocianinas, flavonoides, ácidos graxos poli-insaturados e biopeptídeos. Esses componentes extraídos da biomassa de *Spirulina* apresentam propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e antimicrobiana que auxiliam na manutenção da saúde. Além

disso, esses compostos são mais seguros que os sintéticos e, portanto destacam por ser uma fonte alternativa e abundante para obtenção desses compostos (LISBOA et al., 2014; MORAIS et al., 2015).

Suetsuna e Chen (2001) investigaram a atividade anti-hipertensiva de peptídeos extraídos da biomassa de *Spirulina* e a atividade foi atribuída a determinadas sequências de aminoácidos obtidos por hidrólise. He et al. (2007) também avaliaram a atividade de peptídeos obtidos por hidrólise e estes compostos apresentaram capacidade anti-hipertensiva.

3.2 Proteínas

Proteínas são cadeias polipeptídicas muito longas, tendo de 100 a mais de 2000 resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Elas são encontradas de diferentes formas e tamanhos. Todas as proteínas são construídas com o mesmo ubíquo conjunto de 20 aminoácidos ligados covalentemente em sequências lineares características. Esses aminoácidos possuem um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α). Os polímeros de aminoácidos são conhecidos como peptídeos. Os peptídeos que ocorrem biologicamente variam de tamanho, desde moléculas pequenas contendo apenas dois ou três aminoácidos e pode formar polipeptídeos pela presença de mais aminoácidos (CAMPBELL; FARRELL, 2007; NELSON; COX, 2011; VOET, VOET, 2013).

As proteínas são moléculas complexas formadas por diferentes sequências de aminoácidos. Cada molécula proteica pode apresentar características bem distintas umas das outras, pois são cadeias poliméricas que dependem além da sequência, a composição e proporção dos de aminoácidos formadores das proteínas (DAMODARAN et al., 2010). As proteínas exibem uma grande diversidade de funções biológicas. Essas macromoléculas catalisam reações celulares, executam função de transporte, armazenamento, motilidade, estrutural, de defesa, além de fundamental função à nutrição humana e animal (CARVAJAL, 2009).

Todas as proteínas produzidas biologicamente podem ser utilizadas como proteínas alimentares. As proteínas alimentares são disponíveis em abundância e caracterizam-se pela fácil digestão, adequabilidade nutricional, não toxicidade e podem ser utilizadas de forma funcional em produtos alimentícios (DAMODARAN et al., 2010).

3.3 Hidrólise enzimática de proteínas

Com o crescente aumento da população mundial novas fontes proteicas precisam ser investigadas a fim de suprir a demanda. As proteínas constituem uma fonte nutricional fundamental que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de compostos com alto valor agregado (DAMODARAN et al., 2010).

Diversos estudos são encontrados na literatura sobre hidrólise enzimática de proteínas. A hidrólise proteica baseia-se na clivagem das ligações peptídicas, originando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por três métodos: hidrólise alcalina, hidrólise ácida e hidrólise enzimática (CAMPBELL; FARRELL, 2007; NELSON; COX, 2011).

As enzimas proteolíticas ou proteases são uma classe única de enzimas que realizam a catálise da reação, resultando na quebra das ligações peptídicas das proteínas. As proteases são encontradas em todas as células e tecidos, auxiliam na digestão de alimentos proteicos e cada uma delas tem capacidade de atuação em diferentes sítios ativos de moléculas de proteínas. Esta característica das enzimas permite a realização de uma hidrólise mais seletiva, devido à alta especificidade destas enzimas em quebrar ligações peptídicas adjacentes gerando resíduos de aminoácidos (NELSON; COX, 2011; KHANTAPHANT; BENJAKUL, 2008).

As enzimas proteolíticas pertencem a classe 3 das hidrolases e subclasse 3.4 das peptídeo-hidrolases ou peptidases, as quais envolvem água no processo para formação do produto. O principal papel dessas enzimas é nutricional, visando à hidrólise de cadeias polipeptídicas em moléculas mais simples para que sejam absorvidas pelas células (FEDATTO, 2004). A hidrólise enzimática das proteínas apresenta vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, como a especificidade e controle do grau de hidrólise. Além disso, as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sendo desnecessária sua remoção (ZAVAREZE et al., 2009).

Pesquisas na área de alimentos direcionam-se em conhecer a concentração total, o tipo, a estrutura celular e propriedades funcionais das proteínas. A modificação da estrutura da proteína pela hidrólise enzimática é empregada com o intuito de melhorar as propriedades da molécula proteica, como aumentar a solubilidade das proteínas. As enzimas proteolíticas

possuem alta especificidade e capacidade de modificar uma grande variedade de grupos funcionais (ZAVAREZE et al., 2009).

3.4 Biopeptídeos

As proteínas são fundamentadas como fonte essencial de aminoácidos, mas recentemente tem-se reconhecido outras funcionalidades *in vivo* por meio de peptídeos biologicamente ativos. Os biopeptídeos são definidos como fragmentos de proteínas que apresentam benefícios a saúde. Os biopeptídeos contêm de 3 a 20 resíduos de aminoácidos e normalmente são inativos dentro da sequência da molécula de proteína. Assim, as proteínas precisam ser hidrolisadas para que ocorra a liberação dos fragmentos bioativos contidos nas mesmas (KORHONEN, 2009).

Os biopeptídeos, por meio de administração oral, podem afetar beneficamente os principais sistemas do corpo, como o cardiovascular, digestivo, endócrino, imunológico e nervoso. Alguns dipeptídeos possuem propriedades funcionais, como o aspartame (L-aspartil-fenilalanina) o qual apresenta poder adoçante. Outros compostos peptídicos apresentam ação antioxidante, como o tripeptídeo glutationa (CAMPBELL; FARRELL, 2007; NELSON; COX, 2011).

A ação de radicais livres e o estresse oxidativo estão relacionados ao câncer, doença cardiovascular, diabetes, doenças autoimunes e neurológicas. Desta forma, a utilização de compostos, como os peptídeos com atividade antioxidante, tem apresentado resultados positivos na manutenção da saúde e prevenção destas doenças. Estudos tem demonstrado uma relação benéfica entre o consumo regular de dietas enriquecidas com antioxidantes e a prevenção de tais riscos a saúde (GUEDES et al., 2013; HU et al., 2013).

O emprego de biopeptídeos hidrolisados de proteína alimentar apresentam numerosas vantagens potenciais. Os biopeptídeos derivados de alimentos são considerados componentes de ação brandos e seguros, pois apresentam menores efeitos colaterais quando comparados a drogas sintéticas normalmente utilizadas no tratamento de doenças. Desta forma, a busca de fontes naturais não convencionais, como as microalgas, da qual possa obter peptídeos com atividade antioxidante é de relevante interesse no emprego da manutenção da saúde (GUEDES et al, 2013; HU et al., 2013; SHANAB et al., 2012).

Peptídeos com ação biológica quando ingeridos devem ser resistentes à ação de peptidases do sistema digestório, preservando a integridade da sequência de seus

aminoácidos. Desta forma, estes compostos necessitam do emprego de matrizes visando a proteção destes compostos bioativos (PACHECO; ANTUNES, 2009). Além disso, para exercer seus efeitos fisiológicos *in vivo*, os biopeptídeos ingeridos devem atingir seus sítios-alvo no interior do trato intestinal ou em órgãos periféricos específicos após a absorção (MADUREIRA et al., 2010).

Muitos trabalhos têm sido realizados na obtenção de biopeptídeos derivados de leite e seus subprodutos (KORHONEN, 2009; MADUREIRA et al., 2010). Neste sentido, são investigados sistemas de produção com emprego de enzimas como a pepsina, tripsina e peptidases da mucosa intestinal para a produção de peptídeos bioativos. Estes sistemas visam garantir a produção de peptídeos que sejam resistentes à digestão fisiológica (KORHONEN, 2009). Porém, há poucos estudos que investigam o potencial uso de peptídeos biologicamente ativos provenientes de outras fontes naturais.

O emprego de biopeptídeos derivados de hidrolisados de proteína alimentar apresentam vantagens aos obtidos de outras fontes, pois são alternativas mais seguras em relação aos antioxidantes sintéticos. Além disso, podem atuar sinergicamente com os antioxidantes não peptídicos, melhorando o efeito protetor (POWER et al., 2013).

3.5 Biopolímeros

Novas alternativas vêm sendo estudadas para contornar o problema do descarte de plásticos no meio ambiente. Além de causar grande poluição ambiental, os plásticos de origem petroquímica vêm sendo repensados, uma vez que há previsão de esgotamento de reservas de petróleo. Neste sentido, o uso de materiais biodegradáveis representa alternativa para a redução do problema. Estes novos materiais apresentam as mesmas propriedades que os plásticos convencionais, com a vantagem de serem completamente biodegradáveis quando descartados no meio ambiente (DALCANTON, 2006).

As macromoléculas poliméricas são formadas pela união de unidades fundamentais repetidas que originam longas cadeias. O tamanho das cadeias formadas, principalmente de átomos de carbono, é o principal aspecto que confere a este grupo características que o diferencia de outras macromoléculas (ORÉFICE et al., 2012).

O poli-ε-caprolactona (PCL) é um polímero da família dos poliésteres alifáticos, sintético que é de grande interesse devido suas propriedades mecânicas e de biodegradabilidade. Este polímero tem sido estudado como material para aplicação na área

biomédica, engenharia de tecidos, e, sistemas de liberação de fármacos e como embalagens para alimentos, uma vez que é aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) considerado como seguro para utilização em humanos (KIM; KIM, 2014; SANTOS, 2011; TAKALA et al., 2013). O PCL apresenta propriedades termoplásticas e reológicas favoráveis de processabilidade como temperatura de fusão (55 a 60°C), transição vítrea (-60ºC), degradação a 350ºC, cristalinidade em torno de 50% e solubilidade em diversos solventes orgânicos (PATRÍCIO et al., 2014; WU et al., 2014; SANTOS, 2011).

Estudos recentes mostram a utilização de PCL como material para desenvolvimento de filmes com aplicação em embalagens alimentícias. Diversos métodos como extrusão, *casting* e *electrospinning* são empregados para formação de filmes formados por blendas de PCL com outros biopolímeros com inserção de compostos ativos (TAKALA et al., 2013; ALIX et al., 2013; GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013). Estes estudos demonstram que o PCL apresenta propriedades mecânicas e térmicas favoráveis para aplicação na área de embalagens além de serem biodegradáveis.

3.6 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área emergente de pesquisa devido ao seu potencial de aplicação nas mais diversas áreas industriais. O Brasil desde 2001, por meio da Iniciativa Brasileira em Nanotecnologia, vem desenvolvendo pesquisas por todo país vinculadas a instituições de ensino e pesquisa. A utilização de materiais em escala nanométrica tem revolucionado o conhecimento sobre as propriedades e comportamentos dos materiais, pois são geralmente diferentes dos materiais em escala macroscópica (DURÁN et al., 2006).

A nanotecnologia compreende um domínio entre 0,1 a 1000 nm, região onde as propriedades do material são determinadas e podem ser controladas. O setor comercial tem apresentado flexibilidade tais como considerar nano medidas de 300 a 500 nm, o qual para comunidade acadêmica seria sub-microtecnologia (DURÁN et al., 2006; MORAIS, 2008). A nanotecnologia é uma área extremamente interdisciplinar, uma vez que baseia-se nos mais diversos tipos de materiais nanoestruturados (polímeros, semicondutores, compósitos e biomateriais), com a finalidade de formar nanopartículas, nanotubos e nanofibras, que por sua vez são formadas a partir de átomos e moléculas. Nanofibras poliméricas são sistemas com potencial aplicação em diversas áreas de alimentos, engenharia de tecidos, biomédica e farmacêutica.

Na indústria de alimentos a nanotecnologia tem sido utilizada no desenvolvimento e modificação de embalagens, compostos com propriedades funcionais e antioxidantes que sejam melhor absorvidas pelo organismo humano (NEO et al., 2013;). O número de estudos e métodos para obtenção desses sistemas tem aumentado consideravelmente. Dentre os métodos encontram- se *drawing*, *template synthesis*, separação por fases e *self-assembly* que são eficientes na obtenção de nanofibras, porém o aumento de escala para aplicação industrial é um fator limitante no desenvolvimento de produtos. A técnica de obtenção de nanofibras por *electrospinning* pode produzir estruturas com fibras longas e contínuas com as matrizes dependentes do tamanho do coletor permitindo aumento da escala de produção (STEFFENS et al., 2012).

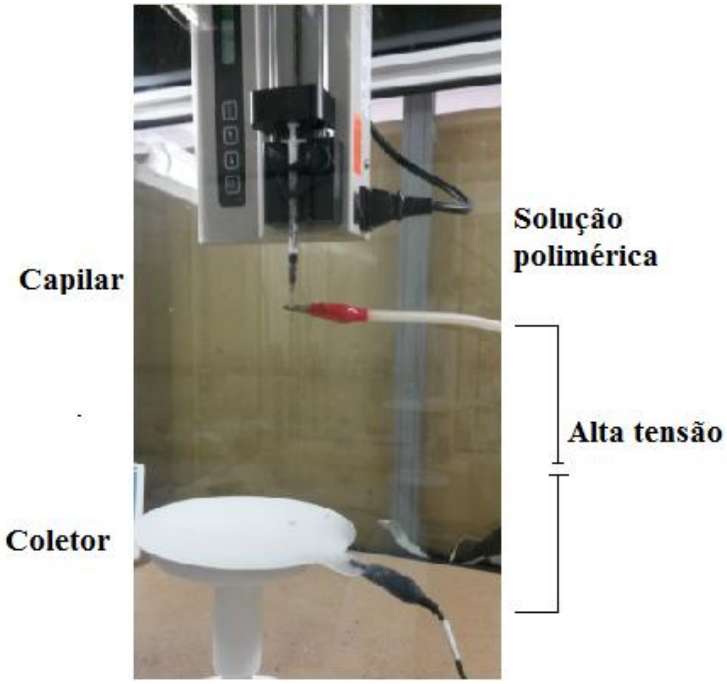
3.6.1 *Electrospinning*

A técnica de produção de nanofibras por *electrospinning* é uma das mais difundidas e os principais poliésteres alifáticos empregados para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados são os homopolímeros poli-hidroxialcanoatos (PHA), poli-ε-caprolactona (PCL), ácido poli-láctico (PLA) e glicólico (PGA) e seus copolímeros (PLGA) (DURÁN et al., 2006).

Electrospinning é um processo simples e direto que envolve a aplicação de um forte campo eletrostático sobre uma solução polimérica contida em uma seringa e alimentada a partir de um capilar que produz um jato em direção ao coletor aterrado. A diferença de potencial elétrico formado permite que o jato da fibra seja alongado permitindo a evaporação do solvente (NEO et al., 2013; FERNANDES et al.,2014).

O equipamento (Figura 1) para obtenção de nanofibras possui fácil controle no dimensionamento das fibras, reprodutibilidade e permite aumento de escala. Alguns pontos como instabilidade do jato, uniformidade de deposição das fibras no coletor ainda são limitantes no processo (RAMAKRISHNA et al., 2005).

FIGURA 1 - Esquema do equipamento do processo de *electrospinning*.



Nesta técnica é importante que seja utilizado o solvente adequado para dissolver o polímero, além disso, o solvente deve ser volátil para que as fibras mantenham sua integridade. A viscosidade e a superfície de tensão do solvente não devem ser muito altas, permitindo que a solução do polímero seja ejetada livremente, e deve-se fornecer energia suficiente para vencer a tensão superficial na ponta do capilar e assim ocorrer o alongamento da fibra (RAMAKRISHNA et al., 2005).

Os parâmetros relacionados com a solução polimérica mais importante são a massa molecular do polímero, concentração, condutividade e viscosidade das soluções. O aumento da viscosidade torna a resistência ao fluxo de fusão maior e pode limitar a capacidade de extrusão do polímero. Além disso, a viscosidade influencia na capacidade de atração eletrostática do jato polimérico, bem como a morfologia e dimensão das nanofibras. Uma vez adequado estes parâmetros, as condições do equipamento como distância do capilar ao coletor e tensão de *electrospinning* permitem o controle sobre o diâmetro na formação das nanofibras (BROWN et al., 2014; WU et al.,2014).

Os fatores ambientais como temperatura e umidade apresentam influência sobre as características das nanofibras formadas. A temperatura da solução atua na taxa de evaporação do solvente e na redução da viscosidade da solução. O aumento da mobilidade das moléculas do polímero, devido ao aumento da temperatura também proporciona elevado

alongamento da solução (RAMAKRISHNA et al., 2005). Sob alta umidade relativa pode ocorrer a condensação de água e a formação de poros na superfície das nanofibras. Como consequência, isto pode influenciar na forma e uniformidade das nanofibras (MORAIS, 2008).

As nanofibras produzidas por *electospinning* apresentam propriedades tais como área de superfície elevada em relação ao volume e são promissoras para adição de compostos antioxidantes e antimicrobianos (WU et al., 2014; NEO et al., 2013b). O processo de *electrospinning* possibilita novas perspectivas para o desenvolvimento de materiais nanoestruturados com propriedades melhoradas. As nanofibras podem ser aplicadas como materiais que ficam em contato direto com alimentos. As aplicações consistem em embalagens de alimentos e auxiliam na manutenção dos produtos durante a transformação, transporte e armazenamento de produtos (NEO et al., 2013).

3.6.2 Aplicação de embalagens ativas formadas por nanofibras poliméricas

Sistemas de embalagens convencionais possuem importante papel na conservação de alimentos até chegar ao consumo final atuando como barreira passiva e na contenção dos alimentos. Embalagens ativas têm sido extensamente investigadas para conservação de alimentos por conter compostos ativos, como antioxidantes e antimicrobianos que conferem melhorias e auxiliam no aumento de vida de prateleira de produtos alimentícios (AZEREDO, 2013; ALIX et al.,2013) .

A área da nanotecnologia que tem apresentado maior crescimento e investimento em pesquisas é a de embalagens para alimentos. Em 2014, cerca de 7,3 bilhões de dólares foram gastos em pesquisa e desenvolvimento de embalagens nanotecnológicas. Este fato está ligado a aceitação do consumidor em utilizar a nanotecnologia fora do alimento do que ingerir diretamente nanopartículas (DUNCAN, 2011). A utilização de nanomateriais, como nanofibras para produção de embalagens alimentícias, tem inferido melhorias no desempenho e nas propriedades de barreiras e bioativas dos sistemas pelo aumento da área superficial garantindo a manutenção da qualidade do produto (RHIM; PARK; HA, 2013).

Diversos sistemas de nanocompósitos têm sido estudados para aplicação como embalagens de alimentos. Neo et al. (2013) estudaram o desenvolvimento de nanofibras de zeína com inserção de ácido gálico de grau alimentício. Os autores constataram que as nanofibras obtidas são desejáveis para aplicação como embalagens para alimentos.

Dheraprasart et al. (2009) avaliaram características morfológicas e antimicrobianas de nisina adicionada a nanofibras de gelatina para controle de crescimento microbiano e potencial aplicação em embalagens.

3.7 Oxidação lipídica de produtos cárneos

Os lipídeos tem papel determinante na aceitação da carne, uma vez que a concentração e a composição influenciam nas propriedades sensoriais. O maior teor de lipídeos está no músculo e varia entre 1,5 e 13%. A fração de lipídeos poli-insaturados é um dos principais alvos da oxidação (PINO, 2005).

A oxidação lipídica é um dos principais processos de degradação em alimentos que resultam na perda da qualidade. Além de alterações na cor do produto a oxidação lipídica altera o sabor de produtos cárneos. Essas alterações geram produtos indesejáveis do ponto de vista sensorial e destrói vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais (OSAWA et al., 2005; PINO, 2005). Além disso, reduzem a suculência e firmeza da carne tendo baixa aceitabilidade.

A rancidez oxidativa ocorre por ação de enzimas lipoxigenases ou não enzimática que incluem foto-oxidação e auto-oxidação. A oxidação lipídica é uma reação que envolve três estágios de iniciação, propagação e terminação. A iniciação ocorre quando um átomo de hidrogênio é retirado de uma molécula de ácido graxo para formar um radical livre. A propagação envolve a reação do radical livre com o oxigênio para formar um radical peróxido que captura um hidrogênio de outro ácido graxo insaturado e ocorre uma reação em cadeia. A terminação ocorre a formação de produtos estáveis da reação entre radicais livres (DOMINGUES, 2008).

Para que seja evitada a formação desses processos oxidativos diversos estudos demonstram que a utilização de compostos antioxidantes retarda a degradação, rancidez e perda de cor decorridos da auto-oxidação. Os antioxidantes protegem os tecidos contra os efeitos das espécies reativas ao oxigênio. Esses compostos promovem a remoção e inativação dos radicais livres formados durante as etapas de iniciação e propagação da reação, doando átomos de hidrogênio e interrompendo a reação em cadeia (PEREIRA, 2009). Os sistemas de acondicionamento e embalagens bioativas resultam em bom aspecto visual ao produto, além de aumento na vida de prateleira pela presença de compostos antioxidantes que auxiliam na manutenção da qualidade (DOMINGUES, 2008).

CAPÍTULO III

4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas, em que a primeira consistiu na obtenção de biopeptídeos por processo de hidrólise enzimática e avaliação da capacidade antioxidante desses compostos. A melhor condição obtida nesta primeira etapa foi empregada para realização da segunda etapa baseada no desenvolvimento de uma embalagem ativa por meio da inserção de biopeptídeos na matriz de nanofibras. Essa embalagem foi avaliada para conservação de cortes de carne de frango devido aos processos oxidativos e de degradação durante o armazenamento. Cada etapa deste trabalho gerou um artigo que será submetido a publicação em periódicos internacionais da área.

ARTIGO 1: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

ARTIGO 2: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL APLICADO EM NANOFIBRAS PARA DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGENS ATIVAS.

ARTIGO 1: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

RESUMO

A biomassa microalgal tem sido aplicada na produção de alimentos para enriquecimento nutricional devido ao alto conteúdo proteico. Além disso, tem sido investigada como fonte de biopeptídeos que podem ser obtidos por hidrólise, uma vez que encontram-se inativos na molécula proteica. O trabalho teve como objetivo a obtenção de biopeptídeos de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por hidrólise enzimática. O grau de hidrólise (GH) foi determinado por meio de delineamento composto central (DCC) 2^2 com ponto central para avaliação das variáveis atividade enzimática e concentração de proteína. A hidrólise foi realizada com enzima Protemax 580L em tempo fixo de 240 min, pH 9,5, temperatura de 60ºC e agitação de 180 rpm. A cinética de hidrólise foi realizada para avaliar o aumento do GH das proteínas. A presença de biopeptídeos foi avaliada por eletroforese e cromatografia em camada delgada (CCD) enquanto a atividade antioxidante foi investigada pelos métodos DPPH, ABTS e poder redutor. O DCC resultou em GH de 58,1% e a cinética de hidrólise com tempo final de 420 min resultou em GH de 60,9±0,3%. A eletroforese indicou a presença de fragmentos proteicos apenas nos hidrolisados proteicos devido, provavelmente, à presença de biopeptídeos de baixa massa molecular. Com a CCD permitiu a detecção de biopeptídeos em todas as amostras revelando os biopeptídeos de baixa massa molecular. A capacidade antioxidante dos biopeptídeos foi maior que a biomassa não hidrolisada de *Spirulina* sp. LEB 18. Assim, a biomassa microalgal pode ser fonte promissora de compostos para aplicação na área alimentícia.

Palavras-chave: antioxidantes, biopeptídeos, hidrólise enzimática, *Spirulina* sp. LEB 18.

MICROALGAL SOURCE OF BIOPEPTIDES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY OBTAINED BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

ABSTRACT

The microalgal biomass has been applied in food production for nutritional enrichment due to the high protein content. Moreover, it has been investigated as a source of biopeptide that can be obtained by enzymatic hydrolysis, these shorts compounds are inactive in the protein. The aim of this study were to obtain biopeptides by enzymatic hydrolysis from biomass of *Spirulina* sp. LEB 18The degree of hydrolysis (DH) was determined using a central composite design (DCC) 2^2 with the central point for evaluation of variables enzyme activity and protein concentration. The hydrolysis was performed using enzyme Protemax 580L at fixed time 240 min, pH 9.5, 60 ° C and agitation of 180 rpm. The hydrolysis kinetics were performed to evaluate the increase in degree of hydrolysis of proteins. The presence of

biopeptides was evaluated by electrophoresis and thin layer chromatography as the antioxidant activity was investigated by methods DPPH, ABTS and reducing power. DCC presented degree of hydrolysis of 58.1% and the hydrolysis kinetics of the end time of 420 min resulted in 60.9±0.3%. The electrophoresis ndicated the presence of protein fragments only in protein hydrolysates, probably due to the presence of low molecular weight biopeptides. With the thin layer chromatography allowed the detection of biopeptides in all samples revealing the low molecular weight biopeptides. The antioxidant capacity of biopeptides was higher than the non-hydrolysed biomass of *Spirulina* sp. 18 LEB. The microalgal biomass can be a promising source of compounds for application in the food industry.

Keywords: antioxidants, biopeptides, enzymatic hydrolysis, *Spirulina* sp. LEB 18.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia microalgal tem sido extensamente difundida devido ao potencial de obtenção de compostos a partir da biomassa produzida nos cultivos desses micro-organismos. A *Spirulina* é uma cianobactéria filamentosa que pode conter elevado conteúdo proteico o que a torna de interesse pelo potencial de extração de compostos como biopeptídeos. Estes fragmentos de proteína contêm de 3 a 20 resíduos de aminoácidos e sua atividade é baseada na composição e sequência que se encontram organizados. Estas cadeias curtas de aminoácidos estão inativas dentro da molécula de proteína e podem ser liberados por meio de hidrólise (CIAN; MARTÍNEZ-AUGUSTIN; DRAGO, 2012; GARCÍA; FERNANDÉZ; SEVILLA, 2012; COSTA; MORAIS, 2014).

O processo de hidrólise proteica por meio de ação enzimática permite a obtenção de hidrolisados de baixa massa molecular. A hidrólise enzimática de proteínas apresenta vantagens frente à hidrólise por via química como especificidade, controle do grau de hidrólise e manutenção da atividade dos produtos gerados (NELSON; COX, 2011; KHANTAPHANT; BENJAKUL, 2008).

Os biopeptídeos obtidos pela hidrólise apresentam funções de proteção e melhoramento da saúde. Os biopeptídeos de fontes naturais podem ser utilizados como suplementos nutricionais e nutricosméticos pelas propriedades fisiológicas como ação antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. A utilização de antioxidantes sintéticos tem sido avaliada devido aos efeitos carcinogênicos ao organismo quando adicionados aos alimentos. O crescente mercado busca compostos antioxidantes obtidos de

fontes menos convencionais e economicamente viáveis como as microalgas (GUEDES et al., 2013; SHANAB et al., 2012).

A busca de compostos com atividade antioxidante tem sido investigada em hidrolisados proteicos e biopeptídeos de diferentes fontes como carnes, pescado, leite, ovos, grãos e mais recentemente de biomassa microalgal obtidos por hidrólise enzimática. Por serem obtidos de fonte alimentar, os antioxidantes naturais são considerados mais seguros para consumo humano (XIA et al., 2012; MEMARPOOR-YAZDI; ASOODEH; CHAMANI, 2012; HOU et al., 2012; GARCÍA; FERNANDÉZ; SEVILLA, 2012).

O conteúdo proteico de biomassa microalgal apresenta boas propriedades de digestibilidade e solubilidade, porém perdem em qualidade comparada as fontes proteicas convencionais. A extração de biopeptídeos de fonte microalgal permite obtenção de compostos de alto valor agregado e não compeptitivos com as fontes proteicas destinadas a alimentação humana. Os biopeptídeos com atividade antioxidante tem potencial aplicação em embalagens pela liberação de compostos ativos ao produto para redução dos processos oxidativos visando à conservação de alimentos. No entanto, existem poucos estudos sobre a obtenção e capacidade antioxidante de biopeptídeos de fonte microalgal a partir de hidrólise enzimática (SHANAB et al., 2012; CIAN; MARTÍNEZ-AUGUSTIN; DRAGO, 2012). O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de hidrólise enzimática da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 para obtenção de biopeptídeos com potencial atividade antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microalga

No desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 obtida da planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul. Esta microalga foi isolada da Lagoa Mangueira (33º 30’ 13’’ S e 53º 08’ 59’’ W) localizada no sul do Brasil entre o Oceano Atlântico e a Lagoa Mirim. A planta piloto de Santa Vitória do Palmar possui 3 biorreatores tipo *raceway* de 10.000 L cada (MORAIS et al., 2009). O meio de cultivo original Zarrouk (ZARROUK, 1966), que contêm ($g.L^{-1}$): $NaHCO_3$, 16,8; $NaNO_3$, 2,5; K_2HPO_4, 0,5; K_2SO_4, 1,0; NaCl, 1,0; $Mg.SO_4.7H_2O$, 0,2; $CaCl_2$, 0,04; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01; EDTA, 0,08 e micronutrientes foi utilizado para o cultivo e obtenção de biomassa de *Spirulina*.

A biomassa foi concentrada em prensa hidráulica e submetida à secagem em estufa na temperatura de 50ºC. A biomassa foi moída em moinho de bolas (Modelo Q298, QUIMIS) e fracionada por peneirador vibratório. A peneira granulométrica utilizada para selecionar a fração de biomassa apresenta malha ABNT/ Tyler 60 com abertura de 250 mm. A biomassa foi armazenada sob congelamento a -18ºC.

2.2 Determinação da composição proximal da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

A composição de proteína total, cinzas e umidade foram determinadas segundo métodos descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). O teor de proteínas da biomassa foi quantificado pela determinação de nitrogênio total por micro-Kjeldahl com fator de conversão 6,25. As análises de cinzas e umidade foram conduzidas por método gravimétrico em temperaturas de 550-600ºC e 105ºC até massa constante, respectivamente.

O teor de carboidratos e lipídeos foi definido pelos métodos de Dubois et al. (1956) e Folch, Lees e Stanley (1957), respectivamente. A determinação dos carboidratos baseia-se na reação dos açúcares incluindo metil ésteres com fenol em meio ácido produzindo compostos de coloração amarelo-alaranjado com absorção em 488 nm. Os lipídeos foram determinados por processo de extração com mistura de clorofórmio:metanol (2:1), purificado com 0,88% de KCl e após metanol:água (2:1). O solvente foi evaporado em rota evaporador (QUIMIS), o conteúdo seco a 50ºC e o percentual determinado por gravimetria direta.

2.3 Atividade enzimática da Protemax 580 L

A determinação da atividade enzimática de protease foi realizada segundo método de Ma et al. (2007) com modificações. As adaptações empregadas na metodologia foram a albumina como substrato da reação, o tampão bicarbonato-carbonato de sódio 0,2 mol.L^{-1} (pH 9,5) adaptado para a enzima deste trabalho e a velocidade da centrifugação (3975 x g). O método consistiu na determinação da quantidade de tirosina removida da proteína, ou mistura de proteínas, utilizadas como substrato.

A reação entre a enzima Protemax 580 L e albumina 0,5% (m/v) solubilizada em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5, foi conduzida a 60ºC por 30 min. A proporção enzima:substrato (1:200) foi empregada na reação. Antes do início da reação, as soluções foram pré-incubadas a 60ºC. A reação foi inativada pela adição de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). Após remoção do precipitado (3975 x g por 10 min, 4°C), o

conteúdo de tirosina do sobrenadante foi determinado por método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (LOWRY et al., 1951). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μg de tirosina por minuto de reação. A atividade enzimática específica foi determinada considerando o conteúdo proteico ($U.mg^{-1}$). O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando albumina bovina como padrão.

2.4 Delineamento Composto Central (DCC^2)

O delineamento composto central (DCC) foi utilizado para avaliar o grau de hidrólise tendo como variáveis: atividade enzimática e concentração de substrato. A concentração de proteína variou entre 3 e 5% enquanto que a atividade enzimática:volume de reator variou entre 3 e 7 $U.mL^{-1}$. A Tabela 2 apresenta a matriz do DCC 2^2 com os valores codificados e reais para as variáveis. A resposta avaliada foi o grau de hidrólise (GH) para as reações.

Após a obtenção dos resultados do DCC, foi realizada a cinética enzimática da melhor condição do delineamento experimental para a resposta grau de hidrólise, a fim de avaliar o tempo necessário para obter maior valor de grau de hidrólise. Em intervalos de tempo de 5 min até 30 min, de 10 min até 60 min, 30 min até 120 min e 40 min até 420 min de reação foram retiradas alíquotas para quantificação do conteúdo proteico. Alíquotas de 1 mL da reação, as quais foram inativadas pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% (m/v) e mantidas em repouso por 10 min. Posteriormente as alíquotas foram centrifugadas por 5 min a 3975 x g para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. As proteínas solúveis presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina como padrão.

2.5. Hidrólise proteica da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

A hidrólise proteica da biomassa da microalga foi realizada utilizando enzima comercial Protemax 580 L gentilmente cedida pela empresa Prozyn (São Paulo). Essa enzima é classificada como uma serino-endopeptidase de origem bacteriana (cepa de *Bacillus licheniformis*), apresentando pH e temperatura ótimos de 9,5 e 60ºC, respectivamente. A escolha por essa enzima baseou-se nos resultados do estudo desenvolvido por Lisboa (2013).

A hidrólise proteica foi realizada em *erlenmeyer* utilizando 100 mL da biomassa dissolvida em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5. A enzima foi adicionada e a

reação ocorreu sob agitação de 180 rpm a 60ºC por tempo de 240 min. A reação final foi inativada termicamente em banho de 85°C por 10 min.

O volume de 1 mL da reação foi retirado do reator e inativado pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% (m/v) e mantido em repouso por 10 min. Após, foi centrifugado por 5 min a 3975 x g para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. O conteúdo do sobrenadante foi quantificado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina como padrão a fim de quantificar proteína solúvel.

A proteólise foi avaliada pelo GH segundo a quantidade de proteína solúvel, conforme método descrito por Hoyle e Merrit (1994). A medida (Equação 1) foi expressa segundo a relação da quantidade de proteínas totais presentes no substrato, determinadas pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005) e a quantidade de proteínas solúveis, determinada pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando albumina como padrão.

$$\%GH = \frac{(PS_{tf} - PS_{t0})}{P_t} \times 100 \quad (1)$$

em que o branco (PS_{t0}), corresponde à quantidade de proteína solúvel antes da adição da enzima*;* PS_{tf} a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P_t a quantidade de proteína total na amostra determinada por micro-Kjeldahl (N x 6,25).

2.6 Fracionamento dos hidrolisados proteicos

As soluções contendo os hidrolisados proteicos foram filtradas utilizando membranas (LISBOA, 2013). Primeiramente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm, e o sobrenadante filtrado em membrana qualitativa e 0,45 μm (Millipore®). Posteriormente, a fração obtida dessa primeira etapa de filtração foi submetida a filtração por membrana de 0,2 μm (Millipore®) e por fim em membrana de 0,1 μm (Millipore®).

A fração obtida desta última etapa foi aplicada em coluna vertical com porosidade 10 kDa (Amicon® 10K, Ultra 0.5 Centrifugal Filters, Millipore®). Após este processo, os filtrados obtidos foram armazenados sob congelamento -18ºC para posterior análise.

2.7 Análise dos biopeptídeos de origem microalgal

2.7.1 Eletroforese

Biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados proteicos e os filtrados foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970). Uma amostra de 20 µg de proteína (Lowry et al., 1951) foi misturada com o tampão de amostra e fervidos (100ºC) por 5 min antes da aplicação nos geis. Os geis de separação utilizados foram de 15 ou 20% e empilhamento de 5%, respectivamente (APÊNDICE 1). A corrida eletroforética foi realizada a 120 V por aproximadamente 150 min em BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra Cell. O gel foi corado com solução de *Coomassie Brilliant Blue* G-250 e também com nitrato de prata. O nitrato de prata apresenta maior sensibilidade na detecção de fragmentos de proteínas.

2.7.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As amostras (biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados proteicos e fracionados em membranas) foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD), (Kieselgel 60 GF_{254}, 0.2 mm, Merck, Germany). As fases eluentes testadas foram butanol: ácido acético: água [7:2,5:0,7] (v:v:v), acetato de etila:metanol:água [6:3:1] (v:v:v) e butanol: ácido acético: água [4:1:1] (v:v:v). As placas foram visualizadas em luz ultravioleta (254 e 365 nm) e solução de ninhidrina foi utilizada para detecção de aminas e aminoácidos (WAGNER; BLADT, 1996). A fase eluente butanol: ácido acético: água [4:1:1] (v:v:v) apresentou melhor análise e está apresentada neste trabalho.

2.8 Atividade antioxidante de biopeptídeos extraídos da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

A atividade antioxidante da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados e filtrados foi realizada pela avaliação da capacidade de sequestro do radical livre DPPH, captura do radical livre ABTS e poder redutor, os quais se baseiam em diferentes princípios.

O método de capacidade de sequestro do radical livre DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazol (DPPH) utilizado foi descrito por Brand-Williams et al. (1995). O DPPH é solubilizado em solvente orgânico e colocado em reação com o extrato. A medida é realizada pela variação da absorbância em λ=515 nm e determinada em percentual de inibição (Equação 2). As amostras de biomassa, hidrolisados e filtrados em membranas foram preparadas em concentração de 5 $mg.mL^{-1}$.

A capacidade de captura do radical livre ABTS foi determinada conforme Rufino et al. (2007). A capacidade antioxidante é avaliada pela redução da coloração verde do radical ABTS. As amostras de biomassa, hidrolisados e filtrados em membranas foram preparadas em concentração de 10 $mg.mL^{-1}$. As medidas foram expressas em percentual de inibição (Equação 2).

$$\%\ Inibição = \left(\frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}}\right) x100 \quad (2)$$

O poder redutor foi determinado segundo método adaptado de Wu, Chen e Shiau (2003). As amostras de biomassa, hidrolisados e filtrados em membranas foram preparadas em concentração de 10 $mg.mL^{-1}$. O aumento da absorbância indica maior potencial redutor da amostra e a leitura é realizada em espectrofotômetro em 700 nm.

2.9 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em três repetições independentes. As análises foram executadas em triplicata e os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA). As médias comparadas pelo teste de Tukey a um nível de 5% de significância. O DCC foi avaliado estatisticamente a um nível de confiança de 90%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição proximal da biomassa apresentou 24,9±0,4% (m/m) de carboidratos, cinzas e lipídeos 17,6±0,0% (m/m) e 7,8±0,4% (m/m), respectivamente. O elevado conteúdo de proteínas da biomassa de algumas microalgas é o principal motivo pela busca dessas fontes proteicas não convencionais para extração dos compostos de interesse como peptídeos bioativos. A biomassa utilizada neste trabalho mesmo não sendo cultivada em condições que estimulem a síntese proteica apresentou conteúdo elevado de 46,2±1,1% (m/m).

Segundo Morais et al. (2009) a produção em larga escala de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 depende de fatores como luz, nutrientes e temperatura, os quais influenciam a quantidade e composição da biomassa produzida. O conteúdo proteico pode ser incrementado alternando as condições de cultivo. O cultivo foi proveniente do mês de janeiro de 2014 e o biorreator não possui controle nos parâmetros de processo. O culivo exposto a

temperaturas elevadas e maior período de luminosidade pode ter ocorrido a limitação na produção de proteínas.

A partir do conteúdo de proteínas determinado por micro-Kjeldahl foi a quantificada a massa de microalga necessária para obtenção das condições de concentração de proteínas empregadas no DCC (Tabela 1). Os valores de grau de hidrólise (GH) obtidos no delineamento experimental apresentaram variação entre 40,3% e 58,1% nos ensaios do DCC. A influência das variáveis do processo: atividade enzimática ($U.mL^{-1}$) e concentração de proteína (m/v) foram avaliadas frente à resposta GH a um nível de confiança de 90%.

TABELA 1 – Matriz do delineamento composto central (2^2) com valores codificados e reais e a resposta grau de hidrólise das proeteínas de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

Ensaio	**Atividade enzimática da protease ($U.mL^{-1}$)**	**Concentração de proteína (%)**	**Grau de hidrólise (%)**
1	-1 (3)	-1 (3)	58,1
2	1 (7)	-1 (3)	47,3
3	-1 (3)	1 (5)	39,7
4	1 (7)	1 (5)	40,3
5	0 (5)	0 (4)	45,2
6	0 (5)	0 (4)	42,2
7	0 (5)	0 (4)	44,2

O maior valor para o grau de hidrólise (58,1%) foi obtido no ensaio com atividade enzimática de 3 $U.mL^{-1}$ e concentração de proteína de 3% (m/v) por 240 min. Os níveis inferiores da matriz do DCC apresentaram melhor resposta ao grau de hidrólise provavelmente devido a menor massa de *Spirulina* sp. LEB 18 presente na solução facilitando a ação catalítica da protease sobre os grupamentos serina da cadeia proteica da biomassa. Além disso, observou-se que a medida que aumentou a concentração de proteína microalgal houve redução no GH independentemente da atividade enzimática.

No processo de hidrólise enzimática há a formação de complexo enzima:substrato (E:S) com maior velocidade nos instantes iniciais da reação. Isto se dá pela disponibilidade das moléculas proteicas para ligarem-se aos sítios ativos das enzimas. Quando há excesso na

concentração de proteína ocorre redução na velocidade da reação e a inibição do GH. O excesso de substrato resulta na competição das moléculas proteicas em se ligar ao sítio ativo da enzima reduzindo a velocidade de formação de produto (WHITAKER, 1994; NELSON; COX, 2011). Desta forma, a relação adequada entre enzima e substrato favorece o processo de hidrólise proteica.

Os valores de GH da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 estão de acordo com estudos realizados com outros organismos marinhos. No estudo de Cian, Martínez-Augustin e Drago (2012), os autores obtiveram valores de GH entre 43,5% e 64,3% para obtenção de biopeptídeos de alga vermelha *Porphyra columbina* empregando alcalase e tripsina. Os biopeptídeos apresentaram baixa massa molecular com valores entre 0,5 e 12,5 kDa. Aminoácidos como alanina, ácido glutâmico e aspártico foram identificados nos hidrolisados e apresentaram atividade anti-hipertensiva.

Sheih, Wu e Fang (2009) utilizando pepsina para hidrólise de resíduos de algas obtiveram GH de 48,3% após 15h de reação. Os autores descreveram que a hidrólise foi necessária para liberar os biopeptídeos antioxidantes que se encontravam inativos na molécula proteica de resíduo de *Chlorella vulgaris*. Além disso, os autores sugeriram que a atividade dos hidrolisados foi devido a diferentes sequências de biopeptídeos.

Estudo realizado por Lisboa (2013) avaliou a ação da enzima Protemax 580 L sobre a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. O GH obtido neste estudo foi 55,3% nas condições 10 $U.mL^{-1}$ (enzima: reator) e 5% (m/v) de proteína no tempo de reação de 240 min. Os biopeptídeos formados apresentaram atividade antioxidante e massa molecular entre 20 e 110 kDa.

No presente trabalho foi possível obter hidrolisados proteicos com GH semelhante a Lisboa (2013) com melhoria nas condições de processo. As condições do meio reacional foram beneficiadas. O conteúdo de enzima a ser adicionado no meio reacional bem como o conteúdo proteico foi reduzido e obtiveram-se valores superiores de GH proteico.

A diferença na hidrólise enzimática das proteínas de variadas fontes pode estar intimamente ligada com a disponibilidade dos aminoácidos que compõem as proteínas e devido à especificidade de atuação da enzima (ZAVAREZE, 2012).

Para avaliação e predição do modelo matemático foi realizado análise de variância (ANOVA), para o GH proteico da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. A partir dos resultados

avaliados a nível de confiança de 90%, foi possível observar que o valor do teste $F_{calculado}$ foi 14,46 e 2,68 vezes maior que $F_{tabelado}$= 5,39 ($p<0,10$). Desta forma, o modelo proposto para o DCC (Equação 3) foi gerado mantendo as variáveis atividade enzimática (AE) e concentração de proteína (CP) e sua interação na resposta GH. O modelo apresentou coeficiente de correlação aos dados experimentais de R^2=0,94.

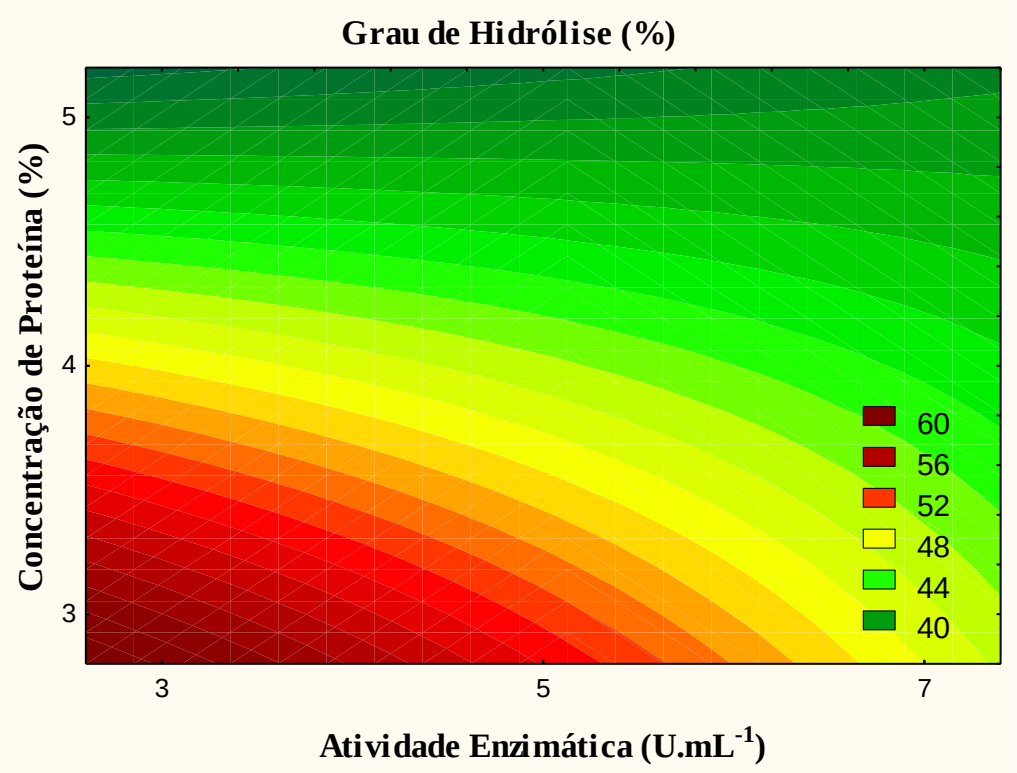
$$GH = 45{,}28 - 2{,}52AE - 6{,}37CP + 2{,}84AExCP \quad (3)$$

em que: GH é o grau de hidrólise das proteínas (%), AE a atividade enzimática:volume reator ($U.mL^{-1}$) e CP a concentração de proteínas da biomassa microalgal (%, m/v).

A concentração de proteína foi a variável que apresentou maior efeito sobre a resposta GH. O incremento no nível de CP teve efeito negativo no processo resultando na redução de 12,7% do GH. A atividade enzimática (AE) avaliada a 90% de confiança não apresentou significância para a resposta GH, porém foi mantida para obtenção do modelo matemático (p=0,11). Esta validação foi realizada devido a AE ser a variável que fornece atividade catalítica para a reação permitindo a clivagem das ligações peptídicas. O incremento na AE reduziu em 5,0% a resposta GH. A interação das variáveis AE e CP foi significativa e apresentou efeito positivo para a resposta GH (5,7%).

A partir do modelo matemático obtido foi gerada a superfície de contorno (Figura 1) e observa-se que o incremento nos níveis das variáveis AE e CP não favorece a obtenção de fragmentos proteicos com maior GH ($p<0,10$). Assim, as menores condições de AE e CP foram favoráveis e reduzem os custos para obtenção de hidrolisados com maior GH. A concentração de substrato foi um dos principais fatores que influenciam a velocidade da reação hidrolítica. Os ensaios com maior concentração de proteína contem maior quantidade de biomassa o que aumentou o soluto no meio reacional afetando diretamente o processo hidrolítico.

FIGURA 1 - Superfície de contorno da resposta grau de hidrólise (%) com relação as variáveis independentes atividade enzimática:volume reator ($U.mL^{-1}$) e concentração de proteínas (%, m/v) para a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

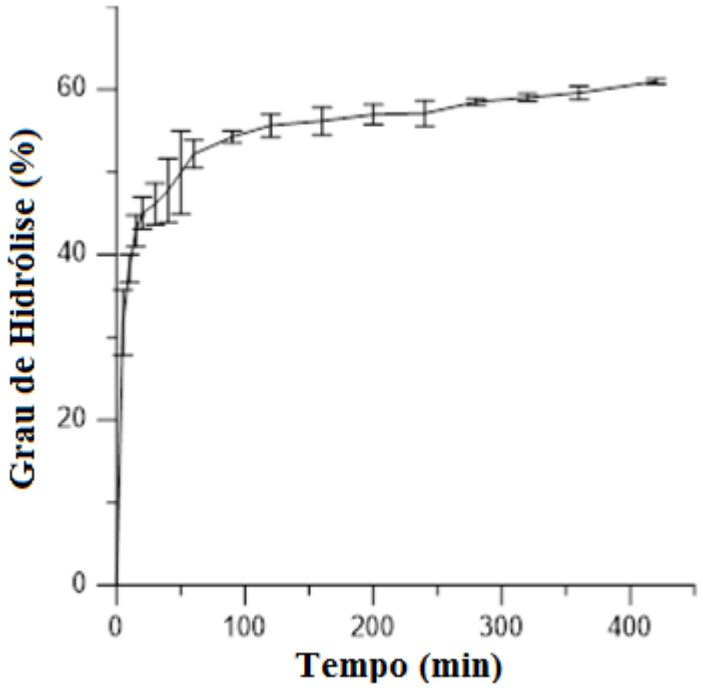


A partir do resultado obtido no delineamento composto central foi realizada a cinética de hidrólise enzimática para o ensaio que continha 3 % (m/v) de proteína e enzima 3 $U.mL^{-1}$ até o tempo final de 420 min a fim de avaliar melhora na resposta GH.

O interesse em obter hidrolisados proteicos com maior GH baseia-se na eficiência da reação gerar fragmentos de proteínas de baixa massa molecular com propriedades bioativas. O valor de GH obtido foi 60,9±0,3% no tempo final de 420 min. Neste processo foi possível observar que não houve diferença significativa ($p<0,05$) no GH comparado com o tempo de 240 min utilizado no delineamento experimental.

A partir do teste de Tukey ($p<0,05$) realizado para avaliar diferença entre as médias de GH obtidos na cinética foi verificado que a partir do tempo de 120 min com valor de GH 55,6 ± 1,4% não houve diferença significativa entre os valores obtidos comparados com o tempo final da cinética de 420 min. Este resultado evidencia que a atividade catalítica da protease empregada é maior nos instantes iniciais da reação. A redução de tempo de processo é favorável por permitir economia nos custos e menor exposição dos hidrolisados proteicos a temperatura de 60ºC auxiliando na manutenção da atividade dos compostos.

FIGURA 2 − Cinética de grau de hidrólise nas condições de concentração de proteínas de 3% (m/v) e atividade enzimática de 3 $U.mL^{-1}$.

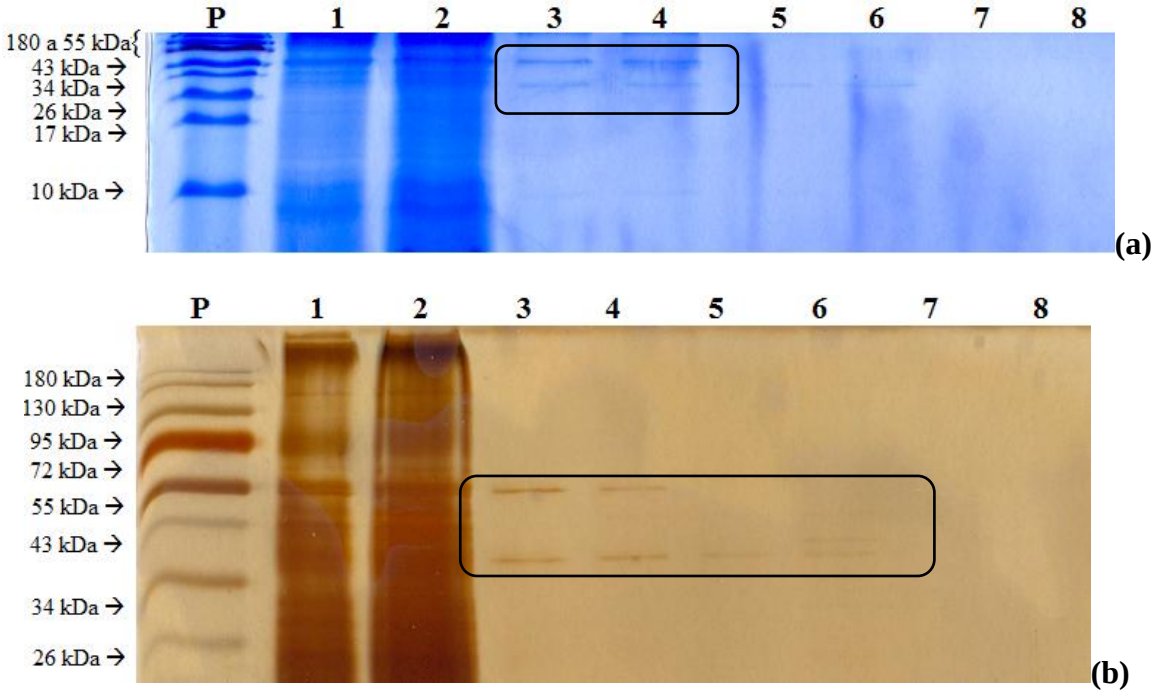


Vioque et al. (2006) descrevem que o GH pode ser classificado quanto ao percentual de hidrólise. Desta forma, os produtos com GH<10% são considerados parcialmente hidrolisados e acima de 10% altamente hidrolisados. Segundo esses autores, os hidrolisados obtidos neste trabalho classificam-se como altamente hidrolisados e podem ser utilizados como suplemento alimentar ou compostos bioativos.

A partir dos hidrolisados obtidos nas reações hidrolíticas foi realizado o fracionamento por meio de filtrações em membranas Milipore® e coluna vertical Amicon com porosidade de 10 kDa. O fracionamento por membranas de diferentes porosidades permite selecionar hidrolisados proteicos excluindo fragmentos de alta massa molecular (SAMARAKOON; JEON, 2012). A técnica de eletroforese foi empregada para avaliação qualitativa do perfil de aminoácidos da biomassa antes e após hidrólise (Figura 3).

A análise por SDS-PAGE demonstrou padrão de massa molecular disperso para a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 3). Nos hidrolisados (3 e 4) e filtrados (5 e 6) foi possível observar a presença de subunidades de massa molecular entre 34 e 55 kDa .

FIGURA 3 − Perfil eletroforético da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados e filtrados proteicos em gel SDS-PAGE 20% corado com *Coomassie blue* (a) e gel SDS-PAGE 15% corado com nitrato de prata (b).

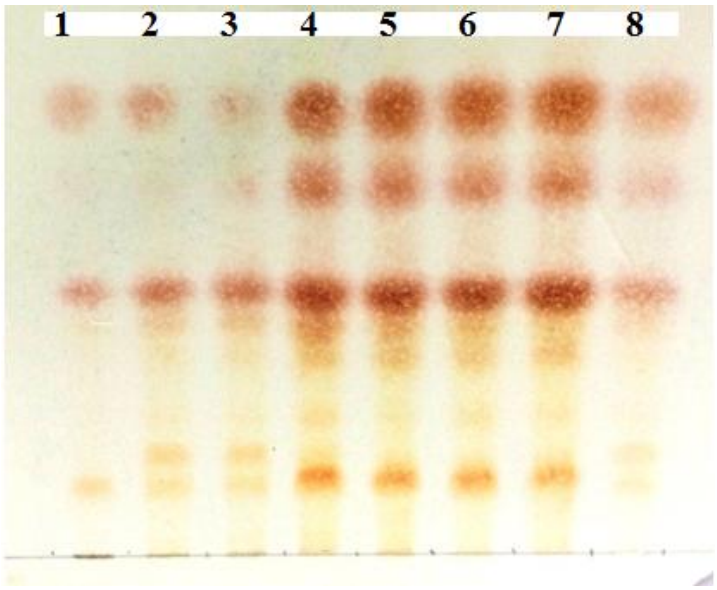


*1: 20 µg de biomassa não hidrolisada; 2: 40 µg de biomassa não hidrolisada; 3: hidrolisado proteico (t= 420min), 4: hidrolisado proteico (t= 240min), 5: filtrado em membrana 0,1µm (t= 420min); 6: filtrado em membrana 0,1µm (t= 240min); 7: filtrado em coluna Amicon® 10K (t= 420min) e 8: filtrado em coluna Amicon® 10K (t= 240min). O padrão (P) de massa molecular está indicado a esquerda e representado em kDa.

A eletroforese permitiu a detecção de poucos fragmentos proteicos gerados após a hidrólise, os quais podem ser melhor visualizados no gel corado com nitrato de prata (Figura 3b). Entretanto, os componentes presentes nos filtrados não foram visualizados por essa técnica, devido, provavelmente, a presença de fragmentos de baixa massa molecular que não ficaram retidos nos geis. Desta forma, foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) na tentativa de revelar os peptídeos de baixa massa molar que não foram observados por eletroforese.

A análise por CCD indicou a presença de aminas/aminoácidos em todas as amostras avaliadas (revelação com ninhidrina), mostrando um perfil similar entre as amostras (Figura 4). Entretanto, alguns fragmentos mostram-se mais fortes comparadas a biomassa não hidrolisada de *Spirulina* sp. LEB 18.

FIGURA 4 – Análise de cromatografia em camada delgada da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados proteicos, filtrados em membrana 0,1 µm e coluna Amicon® 10K.



*1: biomassa não hidrolisada; 2: hidrolisados após 420 min; 3: hidrolisados após 240 min; 4: filtrado em membrana 0,1 µm (t=420 min); 5: filtrado em membrana 0,1 µm (t=240 min); (6) filtrado em coluna Amicon® 10K (t=420 min; (7) filtrado em coluna Amicon® 10K (t=240 min) e (8) filtrado em coluna Amicon® 10K liofilizado, 5 $mg.mL^{-1}$ (m/v). As concentrações de proteínas estão apresentadas na Tabela 2.

O aumento na revelação dos fragmentos dos hidrolisados e filtrados nas membranas 0,1 µm e Amicon 10K está associado ao aumento do conteúdo proteico após o processo de hidrólise (Tabela 2). Apesar de a CCD ser uma ferramenta analítica limitada, ela foi útil na detecção de componentes de origem proteica, os quais não foram todos detectados pela eletroforese.

You et al. (2009) obtiveram biopeptídeos por hidrólise enzimática de pescado e observaram aumento na atividade antioxidante em fragmentos proteicos de massa molecular de 0,5 kDa na presença de aminoácidos histidina e triptofano.

Além disso, Sheih, Wu e Fang (2009) mostraram a capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos de resíduos de *Chlorella vulgaris*. Os biopeptídeos isolados e purificados apresentaram massa molecular 1,3 kDa revelados em gel eletroforético (SDS-PAGE) com concentração de 20%.

A importância na obtenção de biopeptídeos de baixa massa molecular está no fato desses compostos apresentarem determinadas sequências de aminoácidos que possuem bioatividade. Assim, como neste trabalho, vários estudos confirmam que a baixa massa

molecular dos hidrolisados proteicos tem maior potencial de atividade na inibição de espécies reativas ao oxigênio comparado com os hidrolisados de alta massa molecular (CHANG; WU; CHIANG, 2007).

A fim de avaliar a influência da hidrólise das proteínas na atividade antioxidante foram selecionadas: a biomassa não hidrolisada, os hidrolisados proteicos, os filtrados em membrana 0,1µm e Amicon® 10K (Tabela 2). O conteúdo proteico dos hidrolisados apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de reação. Portanto, as análises de atividade antioxidante dos filtrados subsequentes foi realizada a partir dos hidrolisados obtidos no tempo de 240 min.

TABELA 2 – Conteúdo proteico e atividade antioxidante da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados e filtrados em membranas 0,1µm e Amicon® 10K.

Amostra	**Conteúdo proteico ($mg.mL^{-1}$)**	**DPPH (% Inibição)**	**ABTS (% Inibição)**	**Poder Redutor (λ=700 nm)**
Biomassa não hidrolisada	$11,7 \pm 0,1^{e}$	$28,3 \pm 3,8^{a}$	$26,5 \pm 1,7^{d}$	$0,415 \pm 0,015^{b}$
Hidrolisados (t=420 min)	$19,6 \pm 0,0^{c}$	$30,9 \pm 4,1^{a}$	$46,1 \pm 0,5^{c}$	$0,668 \pm 0,010^{a}$
Hidrolisados (t=240 min)	$18,8 \pm 0,1^{d}$	$31,0 \pm 2,7^{a}$	$47,0 \pm 0,5^{c}$	$0,462 \pm 0,014^{b}$
Filtrado 0,1µm	$24,6 \pm 0,1^{a}$	$31,9 \pm 1,6^{a}$	$53,2 \pm 0,7^{b}$	$0,688 \pm 0,031^{a}$
Filtrado Amicon® 10K	$21,5 \pm 0,1^{b}$	$30,6 \pm 1,1^{a}$	$58,3 \pm 0,9^{a}$	$0,677 \pm 0,007^{a}$

*Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

A hidrólise enzimática das proteínas da biomassa resultou no aumento do conteúdo proteico solúvel (Tabela 2). A capacidade antioxidante dos hidrolisados foi maior quando comparada com a biomassa não hidrolisada. O aumento da atividade antioxidante foi diretamente proporcional ao aumento do conteúdo proteico dos hidrolisados e filtrados em membranas 0,1 µm e Amicon ® 10K. A concentração de proteínas foi aumentada nas filtrações, pois houve exclusão de outros constituintes da biomassa microalgal de maior massa

molecular. Além disso, foram obtidos menores volumes a cada filtração concentrando o conteúdo proteico. Desta forma, pode-se assim dizer que a capacidade antioxidante é proveniente dos hidrolisados proteicos. Os valores estão expressos em atividade antioxidante específica relacionada com o conteúdo proteico determinado em cada fração.

A análise de sequestro do radical livre DPPH não apresentou diferença significativa para as amostras analisadas ($p<0,05$). Esta resposta pode ter sido influenciada, pois os extratos possuem solubilidade em água. O radical DPPH é solúvel em solventes orgânicos (especialmente em álcoois) e apresenta estabilidade sob determinadas condições (ARNAO, 2000). A quantificação pode ter sido prejudicada devido a limitação na capacidade de interação dos extratos aquosos com o radical DPPH.

A análise de sequestro do radical ABTS apresentou aumento na capacidade antioxidante quando comparados a biomassa não hidrolisada, hidrolisados proteicos, filtrados em membrana 0,1µm e em coluna Amicon® 10K ($p<0,05$). O percentual de inibição específico do radical entre os hidrolisados proteicos nos diferentes tempos de reação não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$), uma vez que o conteúdo proteico dos hidrolisados foram semelhantes. As análises com radical ABTS foram melhor sucedidas, pois o radical pode ser solubilizado em solventes aquosos e orgânicos. O ABTS é capaz de medir atividade antioxidante tanto de amostras hidrofílicas quanto lipofílicas (ARNAO, 2000). Desta forma, a resposta de inibição dos extratos aquosos foi maior devido a maior interação com o radical ABTS.

Por meio dos ensaios de poder redutor, as amostras de biomassa não hidrolisada e hidrolisada no tempo de 240 min não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$). As amostras de hidrolisados proteicos (t=420 min), filtrados em membrana 0,1µm e coluna Amicon® 10K apresentaram poder redutor significativamente iguais. Estas amostras não se diferem estatisticamente ($p < 0,05$) e comparadas a biomassa não hidrolisada apresentaram maior capacidade de poder redutor. Estes resultados demonstram que após a reação de hidrólise no tempo de 420 min, os compostos relacionados a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} estão presentes nos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18. Além disso, pode-se considerar que os hidrolisados proteicos e filtrados subsequentes apresentam forte poder redutor.

Segundo Wu, Chen e Shiau (2003) o poder redutor mais elevado pode ser atribuído ao maior conteúdo de biopeptídeos doadores de elétrons ou hidrogênio que formam

um complexo com Fe^{2+}. Desta forma, ocorre o aumento de absorbância que é diretamente relacionada com maior poder de atividade antioxidante.

Os resultados de capacidade antioxidante dos fragmentos proteicos demonstram que a hidrólise foi importante para liberação de biopeptídeos que se encontravam inativos na biomassa não hidrolisada de *Spirulina* sp. LEB 18. Além disso, o processo de filtração em membranas foi eficiente para concentração dos biopeptídeos resultando em fragmentos de baixa massa molecular (Amicon com porosidade de 10 kDa) com ação antioxidante.

Os antioxidantes sintéticos possuem atividade carcinogênica e sua aplicação na indústria de alimentos ainda é maior e predominante com relação aos bioativos de fonte natural (BOZKURT, 1995). Desta forma, os biopeptídeos obtidos neste trabalho apresentam potencial de aplicação na área de alimentos por ser de fonte natural e ter apresentado capacidade antioxidante pelos métodos testados.

Cian, Martínez-Augustin e Drago (2012) estudaram a extração de biopeptídeos purificados de resíduo de alga *Porphyra columbina* por hidrólise proteica com diferentes enzimas e obtiveram peptídeos com atividade antioxidante frente aos métodos DPPH e ABTS. A concentração dos hidrolisados para inibição de 50% dos radicais foi de aproximadamente 2,5 $g.L^{-1}$ e foi evidenciada a aplicação desses compostos como imunossupressores. No presente trabalho foram obtidos valores inferiores de inibição, uma vez que a concentração dos extratos são superiores (21,5 $mg.mL^{-1}$). Porém, o diferencial deste estudo está no emprego dos extratos brutos para determinação de antioxidantes.

You et al. (2009) estudaram o efeito do grau de hidrólise na atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de pescado. Os autores constataram que o aumento no GH influencia o aumento da atividade antioxidante dos biopeptídeos purificados. Além disso, os autores relatam a atividade antioxidante oriunda de biopeptídeos purificados de baixa massa molecular de aproximadamente 0,5 kDa. O mesmo foi observado no presente trabalho com hidrolisados e concentrados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18. O aumento do GH permitiu a obtenção de biopeptídeos de baixa massa molecular (10 kDa) com maior atividade antioxidante para os métodos ABTS e poder redutor.

O presente trabalho apresentou resultados superiores de atividade antioxidante de biopeptídeos de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 comparado com estudo de Lisboa (2013). Considerando os extratos concentrados em coluna Amicon® 10K para as análises de DPPH,

ABTS e poder redutor os resultados obtidos pelo autor consistiram em 34%, 0,402 (U.A.) e 0,120 mMol Trolox.g^{-1}, respectivamente. Desta forma, o presente trabalho proporcionou a redução nas condições de processo para obtenção de biopeptídeos brutos e estes compostos apresentaram melhorias na capacidade antioxidante apresentando potencial de aplicação na área alimentícia.

Diversos estudos tem demonstrado a importância na busca de compostos bioativos como peptídeos para utilização como antioxidantes nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Biopeptídeos provenientes de organismos marinhos tem apresentado potencial atividade visando controle de processos oxidativos, além de benefícios como ação antimicrobiana, anti-hipertensiva e anticoagulante (KIM; WIJESEKARA, 2010; SUETSUNA; CHEN, 2001).

4 CONCLUSÃO

A hidrólise proteica apresentou maior GH (58,1%) nas condições de 3% (m/v) de proteínas e atividade 3 U.mL^{-1} da protease. Os biopeptídeos obtidos das filtrações apresentaram baixa massa molecular (10 kDa). A atividade antioxidante é proveniente dos biopeptídeos obtidos após a hidrólise, pois com o aumento do conteúdo proteico houve aumento na ação antioxidante dos hidrolisados. Assim, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 é boa alternativa para obtenção de biopeptídeos devido capacidade antioxidante e por não competir com as principais fontes proteicas de origem alimentar.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS,** 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international. 17. ed. Washington, D.C.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogem radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and Thymbra spicata oil in Turkish dry-fermented sausage. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSER, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. **Activity Lebensm.-Wiss. u.-Technology**., v. 28, p. 25-30, 1995.

CHANG, C. Y., WU, K. C., CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v.100, p. 1537–1543, 2007.

CÍAN, R. E.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DRAGO, S. R. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of Porphyra columbina. **Food Research International**, v.49, p.364-372, 2012.

COSTA, J. V.; MORAIS, M. G. **An Open Pond System for Microalgal cultivation**. In: Pandey A., Lee D., Chisti Y., Soccol C. Biofuels from Algae. 1º edição. São Diego: Elsevier; p. 1- 20, 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBBERS,P. A.; SMITH,F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p. 350-356, 1956.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

GARCÍA, J. M. R.; FERNÁNDEZ, A.; SEVILLA, J. M. F. Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.112, p.164-170, 2012.

GUEDES, A. C.; GIÃO, M. S.; SEABRA, R.; FERREIRA, A. C. S.; TAMAGNINI, P.; FERREIRA-MORADAS, P.; MALCATA, F. X. Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1256-1270, 2013.

HOYLE, N., MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (Clupea harengus**). Journal of Food Science**, v. 59, p. 76−79, 1994.

HOU, H.; FAN, Y.; LI,B.; XUE,C.; YU,G.; ZHANG,Z.; ZHAO,X. Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame. **Food Chemistry**, v.134, p.821-828, 2012.

KHANTAPHANT, S., BENJAKUL, S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.151, p. 410–419, 2008.

KIM, S. K.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v.2, p. 1-9, 2010.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LISBOA, C.R**. Produção de nanopartículas contendo peptídeos bioativos de microalgas.** Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL., R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal Biology Chemistry**, v. 93, p. 265-275, 1951.

MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and Characterization of an Alkaline Protease from the Marine Yeast Aureobasidium pullulans for Bioactive Peptide Production from Different Sources. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 343–351, 2007.

MEMARPOOR-YAZDI, M.; ASOODEH, A.; CHAMANI, J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v.4, p.278-286, 2012.

MORAIS, M. G, RADMANN, E. M., ANDRADE, M. R., TEIXEIRA, G. G., BRUSCH, L. R. F., COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60-64, 2009.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. São Paulo. Artmed, 5ª Ed., 2011.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G., PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. **EMBRAPA: Comunicado técnico 128 – on line**. Fortaleza, Brasil, 2007.

SAMARAKOON, K.; JEON, Y.J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. **Food Research International**, v.48, p.948-960, 2012.

SHANAB, S. M.; MOSTAFA, S. M; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G.I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2 (8), p.608-615, 2012.

SHEIH, I. C.; WU, T. K.; FANG,T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**, v.100, p.3419-3425, 2009.

SUETSUNA, K.; CHEN,J. R. Identification of Antihypertensive Peptides from Peptic Digest of Two Microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. **Marine Biotechnology**, v.3, p.305-309, 2001.

VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 99-102, 2006.

XIA,Y.; BAMDAD,F.; GÄNZLE,M.; CHEN, L. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 134, p.1509-1519, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996, 369p.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. Editora Marcel Dekker. Nova York, 1994.

WU, H. C.; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v.36, p.949-957, 2003.

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. Innovative **Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.235-240, 2009.

ZARROUK, C. **Contribuition a Letude Dune Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de Spirulina maxima geitler**. Ph.D. Thesis University of Paris, 1966.

ZAVAREZE, E.R. **Produção e aplicação de filmes bioativos com inclusão de hidrolisados proteicos nanoencapsulados provenientes de corvina (*Micropogonias furnieri*)**. 2012. 116p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

ARTIGO 2: BIOPEPTÍDEOS DE ORIGEM MICROALGAL APLICADO EM NANOFIBRAS PARA DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGENS ATIVAS

RESUMO

Novos sistemas de embalagens ativas têm sido investigados em substituição aos plásticos convencionais. Nanofibras apresentam potencial aplicação na área de alimentos através da incorporação de compostos bioativos para conservação dos produtos. A grande área superficial de contato permite a liberação de compostos garantindo a manutenção da qualidade. O objetivo deste trabalho foi produzir nanofibras de PCL com incorporação de biopeptídeos de origem microalgal e avaliar a estabilidade de cortes de carne de frango durante o armazenamento. Os biopeptídeos foram obtidos por hidrólise enzimática da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e a atividade determinada pelos métodos DPPH, ABTS e poder redutor. As nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos foram formadas por *electrospinning* com tensão de 25 kV, diâmetro do capilar 0,7 mm, vazão de alimentação 2000 $\mu L.h^{-1}$ e distância do capilar ao coletor 120 mm. As nanofibras foram caracterizadas quanto as propriedades térmicas (DSC e TGA) e mecânicas (resistência a tração e alongamento). A estabilidade de cortes de frango com as nanofibras bioativas foi avaliada pelos métodos de TBARS e N-BVT. Foram formados nanofibras com diâmetro de 403,7 e 438 nm desenvolvidas com PCL e PCL contendo biopeptídeos, respectivamente. Os dados de propriedades mecânicas e térmicas apresentaram variação devido a presença de fragmentos proteicos com ponto de desnaturação abaixo do ponto de degradação do polímero puro. As nanofibras com biopeptídeos apresentaram poder redutor de 0,182 (U.A.), 22,6% e 12,4% de inibição do radical DPPH e ABTS, respectivamente. Os cortes de carne de frango recobertos pelas nanofibras com biopeptídeos apresentaram 0,98 $mgMDA.kg^{-1}$ e 25,8 $mgN.100g^{-1}$ para análises de TBARS e N-BVT, respectivamente. Assim, as nanofibras contendo biopeptídeos antioxidantes proporcionaram ao produto estabilidade e controle dos processos oxidativos durante os 12 dias de armazenamento.

Palavras-chave: antioxidantes, electrospinning, poli-ε-caprolactona.

BIOPEPTIDES SOURCE MICROALGAE APLLIED IN NANOFIBERS FOR DEVELOPMENT ACTIVE PACKAGING

ABSTRACT

New active packaging systems have been investigated to replace conventional plastics. Nanofibers have potential application in the food by incorporating bioactive compounds for preservation of products. The high surface area of contact allows the release of compounds for

maintaining the quality. The aims of this work was to produce nanofiber PCL with inclusion of microalgal source biopeptides and evaluate the stability of chicken during storage. The biopeptides were obtained by enzymatic hydrolysis of the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18 and the activity determined by DPPH methods, ABTS and reducing power. Nanofibers PCL and PCL with biopeptides were obtained by *electrospinning* with 25 kV, capillary diameter 0.7 mm, feed rate in 2000 μL.h-1 and away from the capillary to the collector 120 mm. The nanofibers were characterized by thermal properties (DSC and TGA) and mechanical (tensile strength and elongation). The chicken stability with the bioactive nanofibers was evaluated by the methods of TBARS and N-BVT. Nanofibers were formed with a diameter of 403.7 and 438 nm developed with PCL and PCL containing biopeptides, respectively. The mechanical and thermal properties showed variation due to the presence of protein fragments below the denaturation point of the pure polymer degradation point. The nanofibres with biopeptides presented reducing power of 0,182 (AU), 22.6% and 12.4% inhibition of DPPH and ABTS radical, respectively. Chicken meat coated by the nanofibers with biopeptides showed 0.98 mgMDA.kg-1 and 25.8 mgN.100g-1 for analysis of TBARS and N-BVT, respectively. The nanofibers containing biopeptides gave the product stability and control of oxidative processes during the 12 days of storage.

Keywords: antioxidants, *electrospinning*, poly(ε-caprolactone).

1 INTRODUÇÃO

A conservação de produtos cárneos frescos é fator importante para garantir a segurança alimentar até o consumo final. Devido ao conteúdo lipídico e proteico, estes produtos são alvo de oxidação lipídica que resultam em alterações nutricionais pela degradação de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais (PEREIRA, 2009). Novas tecnologias têm sido empregadas para melhorar a qualidade e prolongar a vida útil de produtos alimentícios.

O uso de embalagens ativas é uma dessas tecnologias e consiste na ação de compostos ativos que interagem com os alimentos (ALIX et al., 2013). Existem vários mecanismos para ação desses agentes que incluem absorção de gás carbônico, oxigênio, etileno e odores. Além disso, têm sido aplicados em embalagens compostos como antimicrobianos e antioxidantes que retardam os processos de degradação em alimentos (MARTÍNEZ-ABAD et al., 2013; NEO et al., 2013; WU et al., 2014).

Na indústria de alimentos diversos antioxidantes sintéticos como BHT e BHA foram aplicados para retardar os processos de peroxidação. No entanto, a utilização desses compostos deve ser controlada devido aos efeitos carcinogênicos à saúde humana (KIM;

WIJESEKARA, 2010). Desta forma, a busca por antioxidantes naturais são alternativa mais segura para aplicação em alimentos.

As microalgas são capazes de sintetizar diversos compostos bioativos. Dentre eles estão lipídeos, carotenoides e ficobiliproteínas. Os biopeptídeos de origem microalgal possuem aplicações como suplementos alimentares, promotores de saúde e mais recentemente tem sido investigada a inserção em embalagens ativas (MORAIS et al., 2015).

A *Spirulina* é uma cianobactéria que possui certificação *GRAS (Generally Recognized As Safe)*, com alto teor proteico e é fonte de biopeptídeos com atividade antioxidante (LISBOA, 2013). Os biopeptídeos são fragmentos de proteínas que contêm de 3 a 20 resíduos de aminoácidos que estão inativos dentro da molécula de proteína e podem ser liberados por hidrólise (KORHONEN, 2009). Os estudos de biopeptídeos de origem microalgal para uso como bioativos na área de embalagens para conservação de alimentos são escassos (MILLS et al., 2011).

As nanofibras podem ser aplicadas para conservação de alimentos. Embalagens formadas por nanofibras apresentam vantagens por permitir o aumento da área de contato dos compostos bioativos com o produto. A incorporação de biopeptídeos à matriz das nanofibras possui a finalidade de inferir melhorias no desempenho e nas propriedades físicas e ativas desses suportes. Embalagens de nanofibras podem ser alternativas para aumentar o período de conservação de alimentos até o consumo final (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

As nanofibras podem ainda ser desenvolvidas a partir de polímeros biodegradáveis. Desta forma, reduz os problemas ambientais causados pelo descarte de embalagens desenvolvidas a partir de polímeros de origem petroquímica (TAKALA et al., 2013; AZEREDO et al., 2013; KIM; KIM, 2014). Neste sentido, o objetivo do trabalho foi desenvolver nanofibras com incorporação de biopeptídeos antioxidantes de origem microalgal para conservação de carne de frango.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de biopeptídeos por hidrólise enzimática da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

2.1.1 Biomassa microalgal

No desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 obtida na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul (MORAIS et al., 2009). A biomassa foi concentrada em prensa hidráulica, seca a 50ºC, moída em moinho de bolas (Modelo Q298, QUIMIS) e peneirada. A peneira granulométrica ABNT/ Tyler 60 foi utilizada para selecionar a fração de biomassa de interesse. A biomassa foi mantida a -18ºC.

2.1.2 Hidrólise proteica da biomassa microalgal

A hidrólise proteica da biomassa da microalga foi realizada utilizando enzima comercial (Protemax 580 L) cedida pela empresa Prozyn (São Paulo). Essa enzima é classificada como serino-endopeptidase de origem bacteriana (cepa de *Bacillus licheniformis*), apresentando pH e temperatura ótimos de 9,5 e 60ºC, respectivamente.

A hidrólise proteica foi realizada em *erlenmeyer* utilizando 100 mL da biomassa dissolvida em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5 nas condições de concentração de proteína da biomassa 3% (m/v) e atividade enzimática 3 $U.mL^{-1}$ sob agitação de 180 rpm a 60ºC por tempo de 240 min. A reação final foi inativada termicamente em banho de 85° C por 10 min.

O grau de hidrólise (GH) foi determinado pelo conteúdo proteico antes e após o processo, conforme método descrito por Hoyle e Merrit (1994) e expresso pela Equação 1.

$$\%GH = \frac{(PS_{tf} - PS_{t0})}{P_t} \times 100 \quad (1)$$

em que: o branco PS_{t0}, corresponde à quantidade de proteína solúvel antes da adição da enzima; PS_{tf} a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima determinados por Lowry et al. (1951) e P_t a quantidade de proteína total na amostra determinada por micro Kjeldahl (N x 6,25) (AOAC, 2005).

Os hidrolisados obtidos no processo foram filtrados em membranas qualitativa, de 0,45µm, 0,22µm, 0,1µm e coluna vertical Amicon® 10K (porosidade 10 kDa) para selecionar

biopeptídeos com baixa massa molecular. Após esta etapa as amostras foram liofilizadas para utilização no preparo da solução polimérica de policaprolactona (PCL).

2.2 Solução polimérica para desenvolvimento das nanofibras

O polímero policaprolactona (PCL) obtido da Sigma Aldrich® (densidade 1,145 $g.mL^{-1}$ e massa molecular 80.000 $g.mol^{-1}$) foi utilizado no preparo das soluções poliméricas para desenvolvimento de nanofibras. A concentração de polímero foi 12% (m/v) utilizando clorofórmio como solvente e adicionados 1,4% (m/v) de NaCl, 3% (m/v) de biopeptídeos e metanol na proporção 1:3 (v:v) de clorofórmio para auxiliar a solubilização dos compostos na solução polimérica. A solução controle foi preparada nas mesmas condições contendo apenas PCL e NaCl. As soluções foram homogeneizadas em agitador magnético por 12h em temperatura ambiente.

2.3 Processo de *electrospinning*

As soluções de PCL e PCL contendo biopeptídeos de fonte microalgal foi injetada por meio de capilar com 0,70 mm de diâmetro. A distância entre capilar e coletor foi 120 mm, tensão de 25 kV e taxa de alimentação da solução 2000 $\mu L.h^{-1}$. A condição ambiente do processo foi 25ºC e umidade relativa 44%. As nanofibras foram formadas utilizando volume de 2 mL de solução. Após o processo as nanofibras foram coletadas e armazenadas em dessecador sob umidade controlada (20% U.R.).

2.4 Caracterização físico-química das nanofibras

As análises foram realizadas nas amostras de PCL contendo biopeptídeos e nanofibras contendo somente PCL denominadas controle.

2.4.1 Forma e diâmetro das nanofibras

As nanofibras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM–6610 LV, Japão). Os diâmetros foram determinados através de 30 medidas das nanofibras. As amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com ouro, utilizando o metalizador *diiode sputtering* (Denton Vacuum CAR001-0038, Estados Unidos) de acordo com ASTM E986-04 (ASTM, 2010).

2.4.2 Viscosidade

A viscosidade das soluções poliméricas foi determinada por reômetro (Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer, Estados Unidos). Esta análise consiste na medida direta de viscosidade das soluções de PCL e PCL com biopeptídeos.

2.4.3 Temperatura de fusão e entalpia das nanofibras

As temperaturas de fusão e entalpias foram determinadas por análise de calorímetria diferencial de varredura (DSC) (Shimadzu DSC-60, Japão). Uma amostra de 3 mg de nanofibras foram colocadas em cápsula de alumínio com tampa, sob atmosfera de nitrogênio e fluxo 50 mL.min^{-1}. As análises foram conduzidas na faixa de 25ºC a 180°C, com razão de aquecimento de 10°C.min^{-1}. A temperatura de fusão foi determinada a partir do pico máximo de fusão apresentado na curva de DSC (ASTM D7426-08, 2013).

2.4.4 Estabilidade térmica das nanofibras

A estabilidade térmica das nanofibras foi realizada em analisador termogravimétrico (Shimadzu DTG-60, Japão) segundo protocolo ASTM D3850-12 (ASTM, 2013). As análises foram conduzidas de 25 a 500^{o}C, em atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo 30 mL.min^{-1} e taxa de aquecimento constante de 10 °C.min^{-1}, utilizando 3 mg de amostra.

2.4.5 Determinação da resistência à tração e alongamento no ponto de ruptura

A resistência à tração e alongamento no ponto de ruptura das nanofibras foram determinadas em texturômetro (Stable Micro Systems modelo TA.XT plus, Inglaterra). As amostras foram preparadas com dimensões de 10 x 70 mm e a espessura medida em micrômetro (Starrett 444MXRL-75, Brasil). Os ensaios foram realizados com velocidade 2 mm.s^{-1} e distância inicial entre as garras de 50 mm.

A resistência à tração e alongamento na ruptura foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3.

$$T_r = \frac{F_m}{A} \quad (2)$$

em que: T_R = resistência à tração (MPa); F_m = força máxima no momento da ruptura do filme (N); A = área da seção transversal (m^2).

$$\varepsilon = 100\frac{d_r}{d_i} \quad (3)$$

em que: ε = alongamento na ruptura (%); d_i = distância inicial de separação (mm); d_r = distância no momento da ruptura (mm); d_r é a diferença entre a distância de separação no momento da ruptura e a distância inicial.

2.5 Atividade antioxidante das nanofibras

A atividade antioxidante foi determinada para biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, biopeptídeos filtrados em coluna Amicon® 10K, bem como nas nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos. Os métodos avaliaram o poder redutor e a capacidade de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS.

O poder redutor foi determinado segundo método adaptado de Wu et al. (2003). O método de capacidade de sequestro do radical livre DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazol (DPPH) utilizado foi descrito por Brand-Williams et al. (1995). A capacidade de captura do radical livre ABTS foi determinada conforme Rufino et al. (2007). As medidas foram expressas em percentual de inibição (Equação 4).

$$\%\ Inibição = \left(\frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}}\right) x100 \quad (4)$$

A solução de biomassa e biopeptídeos foram preparadas na concentração de 10 $mg.mL^{-1}$ para análise dos métodos de poder redutor e sequestro do radical livre ABTS. Na análise do sequestro do radical livre DPPH foram preparadas as soluções na concentração 5 $mg.mL^{-1}$. As soluções de nanofibras foram preparadas utilizando 50 mg de nanofibras com adição de 5 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio para romper a estrutura das nanofibras. A concentração real de biopeptídeos na matriz das nanofibras analisadas para atividade antioxidante correspondeu a 0,21 $mg.mL^{-1}$. As soluções foram homogeneizadas com vortex por 1 min.

2.6 Aplicação das nanofibras com biopeptídeos na conservação de cortes de carne de frango

2.6.1 Matéria-prima

Nas análises de estabilidade foram realizados cortes de uma mesma amostra de peito de frango com aproximadamente 90 g cada. Uma amostra foi recoberta com a matriz de

nanofibras contendo biopeptídeos e outra amostra foi mantida sem cobertura por um período de 12 dias conforme o período de validade utilizado comercialmente. As amostras foram cortadas, homogeneizadas e pesadas 50 g para melhor condução das análises.

2.6.2 Estabilidade de carne de frango pelo método TBARS

A estabilidade dos peitos de frango armazenados com e sem recobrimento de nanofibras sob refrigeração (± 6ºC) com as nanofibras contendo biopeptídeos e sem nanofibras foi avaliada pela quantificação do TBARS pelo método descrito por Crackel et al. (1988) com modificações. Amostras de 50g de peito de frango foram cortadas e homogeneizadas com 100 mL de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% durante 20 min em mixer, filtrada à vácuo e completado o volume para 100 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi misturada com 5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M em tubo de ensaio coberto com papel alumínio e levado a banho-maria por 30 min a 80ºC. O branco da análise contendo 5 mL de TCA 7,5% e 5 mL de TBA foi realizado pararelamente aos ensaios. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 538 nm. A curva padrão de TEP (tetraetoxipropano) foi utilizada para quantificação de TBARS. As avaliações foram realizadas em dois tempos: no tempo zero e após 12 dias de armazenamento. A matriz de nanofibras foi retirada da amostra para fazer a análise.

2.6.3 Estabilidade de carne de frango pelo método N-BVT

A determinação das bases voláteis totais nos cortes de frango mantidos sob refrigeração (± 6ºC) foi realizada conforme a metodologia oficial da AOAC (1990). Uma amostra de aproximadamente 50 g foi homogeneizada com 100 mL de TCA 7,5% durante 20 min em mixer, filtrada à vácuo e completado o volume para 100 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de 10 mL dos extratos foram transferida para tubos de destilação de microkjeldahl, adicionados de 3 gotas de fenolftaleína e submetidos a destilação em microkjeldahl. O destilado foi recolhido em 5 mL de ácido bórico (50 $g.L^{-1}$) com 4 gotas de indicador verde bromocresol e vermelho de metila (30:20). A titulação foi realizada com solução de ácido clorídrico 0,02 N. O cálculo foi realizado conforme a Equação 5 e expresso em mg N/100g amostra.

$$N - BVT = \frac{(V_{HCl\ amostra} - V_{HCl\ branco}) x N_{HCl} x 14{,}01 x 100}{P_{amostra}} \quad (5)$$

em que: V_{HCl}= volume gasto (mL) nas titulações; N_{HCl}= normalidade do HCl; $P_{amostra}$= massa de amostra (g).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

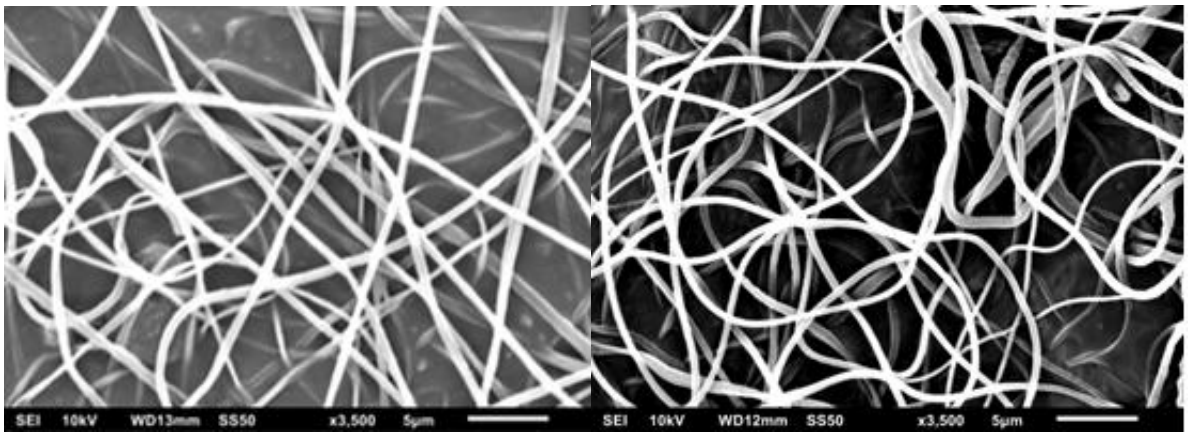
As viscosidades aparente das soluções de PCL e PCL contendo biopeptídeos foram 221,2 ± 5,1 e 243,1 ± 12,0 $mPa.s^{-1}$, respectivamente, e permitiu a formação de nanofibras cilíndricas sem formação de gotas. O aumento da viscosidade é diretamente proporcional ao aumento da concentração das soluções. Estas condições adequadas são importantes para o processo de *electrospinning*, pois evita a formação de gotas e permite de forma contínua que o jato de solução polimérica forme nanofibras com maior uniformidade (ALCOBIA, 2013).

A viscosidade da solução deste trabalho esta de acordo com o estudo de Morais et al. (2010). Os autores obtiveram valores de viscosidades aparente na faixa de 370 e 600 $mPa.s^{-1}$ para soluções de óxido de polietileno (PEO) com inserção de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

Soluções de PCL 10% (m/v) utilizadas por Ranjbar-Mohammadi et al. (2015) apresentaram viscosidade aparente na faixa de 700 $mPa.s^{-1}$. Os autores desenvolveream nanofibras por *electrospinning* sob as condições: distância entre capilar ao coletor de 150 mm, tensão de 15 kV e vazão de alimentação e apresentaram diâmetro médio de 156 nm por (RANJBAR-MOHAMMADI et al., 2015). Os valores no presente trabalho estão de acordo, a diferença de viscosidade pode estar associada à adição de metanol que auxiliou na solubilização dos biopeptídeos na solução de PCL. Além disso, o maior diâmetro das nanofibras está nas diferenças das condições de processo de *electrospinning* que afetam diretamente o diâmetro.

As nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos produzidas por e*lectrospinning* foram observadas por MEV (Figura 1) para determinar a forma e diâmetro médio. Foram obtidas nanofibras cilíndricas e com diâmetro em escala nanométrica. Os diâmetros das nanofibras foram de 404±72 e 438±24 nm para PCL e PCL com biopeptídeos, respectivamente. O diâmetro das nanofibras contendo os biopeptídeos foi aumentado com relação ao controle devido a solução apresentar maior viscosidade, porém não apresentou diferença significativa a 95% de confiança.

FIGURA 1 – Nanofibras com 12% de PCL, 1,4% de NaCl (a) e 12% de PCL, 1,4% de NaCl, metanol e 3% de biopeptídeos de *Spirulina* sp. LEB 18 (b) sob aumento de 3500 x.



(a) **(b)**

O presente trabalho apresentou resultados semelhantes ao desenvolvido por Goes et al. (2012). Os autores obtiveram nanofibras a partir de solução de 15% de PCL com adição de 2,5% de argila e resultaram em diâmetro médio de 340 ± 119 nm (GOES et al., 2012). Além disso, as soluções foram preparadas pela mistura de clorofórmio e metanol como neste estudo. Desta forma, as características de condutividade foram melhoradas devido ao aumento da polaridade da solução pela presença de metanol. Wu et al. (2014), obtiveram fibras sem formação de gotas com diâmetro de 150 nm de PCL com adição de 20% (m/m) de polianilina pelo processo de *electrospinning*. As soluções também foram preparadas com mistura de clorofórmio e metanol.

Conforme os dados da análise de DSC apenas um pico de transição foi apresentado para as amostras de PCL e PCL com biopeptídeos (APÊNDICE 2). A análise de DSC resultou em um evento de primeira ordem endotérmico que pode ser consequência de processos como ruptura de ligações, decomposição e volatilização.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de ponto de fusão ($T_{fusão}$) e entalpia para PCL e PCL com biopeptídeos. A entalpia esta intimamente relacionada com a quantidade de energia absorvida pelas amostras para que ocorra uma mudança de estado. A entalpia é proporcional a $T_{fusão}$ e ambas apresentaram redução nas nanofibras contendo biopeptídeos. Este fato pode estar associado à presença de fragmentos de proteínas que possuem degradação abaixo da $T_{fusão}$ de PCL (≈ 60ºC).

Campos et al. (2010) avaliaram as propriedades térmicas de filmes extrusados de PCL e relatou que a $T_{fusão}$ foi 56,36ºC estando de acordo com os valores deste trabalho. Além disso, relatam que a temperatura de transição vítrea do PCL se encontra na faixa de – 60ºC. A partir dessas informações é possível definir a faixa de aplicabilidade de PCL como embalagens alimentícias para produtos refrigerados ou a temperatura ambiente, uma vez que as temperaturas não excedem os limites de mudança de estado dos filmes.

Em estudo de Senedese (2011) foi verificado que as mudanças na $T_{fusão}$ em nanofibras de PCL alteram a cristalinidade do polímero e consequentemente o processo de biodegradação. Ciardeli et al. (2005) no estudo de blendas de PCL associado a polissacarídeos obtiveram redução nos valores de $T_{fusão}$ das amostras quando comparado ao filme de PCL devido as interações dos compostos incorporados ao polímero.

Nas curvas de derivada a amostra de PCL com biopeptídeos apresentou valores (Tabela 1) de degradação térmica inicial de 262,3ºC e final de 339,6ºC estes valores apresentaram redução na faixa de temperatura de degradação comparado com PCL (APÊNDICE 3). Além disso, não foi observado pico de degradação na faixa de 60ºC, portanto, constata-se que não há resíduo dos solventes clorofórmio e metanol nas nanofibras tendo sido completamente evaporado no processo de *electrospinning*.

TABELA 1 – Propriedades térmicas de DSC e TGA das nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos.

Amostra	**$T_{fusão}$ (ºC)**	**Entalpia ($J.g^{-1}$)**	**T_{id} (ºC)**	**T_m (ºC)**	**T_{fd} (ºC)**
PCL	58,6	34,9	333,0	403,4	434,0
PCL + biopeptídeos	56,8	28,6	262,3	318,0	339,6

$T_{fusão}$: temperatura de fusão das nanofibras; T_{id}: temperatura inicial de degradação das nanofibras; T_m: temperatura média de degradação das nanofibras; T_{fd}: temperatura final de degradação das nanofibras.

As mudanças nas temperaturas de degradação das nanofibras contendo biopeptídeos pode ser consequência da interação do PCL com os compostos naturais adicionados que são degradados em temperaturas inferiores. Ciardeli et al. (2011) verificaram redução de temperatura no processo de pirólise de blendas de PCL/polissacarídeos comparado

com filmes de PCL puro. Patrício, Glória e Bártolo (2013) obtiveram valores de estabilidade até temperaturas de 300ºC para blendas poliméricas de PCL e PLA.

As mudanças nos parâmetros térmicos avaliados nas análises de DSC e TGA não são prejudiciais para obtenção de nanofibras visando aplicação em embalagens. Dessa forma, é possível definir que o processamento das nanofibras e sua aplicabilidade devem ser realizados abaixo de 260ºC. A obtenção de nanofibras com biopeptídeos por *electrospinning* é adequado, pois não utiliza temperaturas elevadas no processo. Desta forma, os biopeptídeos não são desnaturados e ocorre a manutenção da atividade para aplicação como embalagem. As informações a respeito dos parâmetros térmicos são importantes para definição das possíveis aplicações, bem como reciclagem e descarte. Além disso, as características de estabilidade das nanofibras apresentam potencial para embalagens de alimentos e a degradabilidade que os biopolímeros possuem são benéficas para redução de problemas ambientais (DUARTE, 2004).

As propriedades mecânicas foram avaliadas para as nanofibras de PCL e PCL contendo biopeptídeos. A espessura dos filmes foram 0,50 e 0,16 mm para nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos. A diferença na espessura entre as amostras pode ser explicada pela diferença de potencial no momento de formação das nanofibras que por meio de forças eletrostáticas atrai maior concentração de nanofibras para um determinado ponto do coletor.

Os valores de resistência à tração são dependentes da força máxima aplicada no material para que ocorra a ruptura e da área da seção transversal da matriz das nanofibras. As diferenças de resistência à tração e alongamento estão diretamente ligadas a espessura das matrizes de nanofibras. As nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos apresentaram resistência a tração 0,137 e 0,245 MPa e alongamento 85 e 64%. Johnson et al. (2009) avaliou o alongamento de nanofibras formadas a paritr de 12% de PCL e obteve 102%. Este valor foi superior ao obtido neste trabalho, porém os autores utilizaram acetona sob aquecimento (50ºC) para o preparo da solução polimérica. A variação da interação entre solvente e polímero pode formar uma organização distinta nas cadeias poliméricas formadas que influencia diretamente nas propriedades das nanofibras (ALCOBIA, 2013).

Em estudo de Ghasemi-Mobarakeh et al. (2008) por meio da adição de gelatina às nanofibras de PCL foi observado que houve redução na resistência a tração devido as fracas propriedades de ligação PCL/gelatina resultando em valores inferiores a 1 MPa. Esse mesmo evento foi observado neste trabalho para as nanofibras com adição de biopeptídeos.

A fim de verificar a atividade antioxidante de nanofibras produzidas com 12% de PCL e 3% de biopeptídeos obtidos da coluna Amicon® 10 K foram empregados dois métodos de sequestro de radicais livres DPPH e ABTS, além de análise do poder redutor (Tabela 2).

Para o método DPPH não houve diferença significativa ($p<0,05$) do percentual de inibição entre a biomassa não hidrolisada com os biopeptídeos e as nanofibras com biopeptídeos. Os métodos de sequestro de ABTS e poder redutor apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) para as amostras analisadas apresentando aumento da atividade antioxidante dos compostos após a hidrólise e redução após o processo de *electrospinning*.

TABELA 2 – Atividade antioxidante da biomassa, biopeptídeos e nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos.

Amostra	**DPPH (%Inibição)**	**ABTS (%Inibição)**	**Poder Redutor (U.A., λ= 700 nm)**
Biomassa	$28,3 \pm 3,8^{a,b}$	$26,5 \pm 1,7^{b}$	$0,415 \pm 0,015^{b}$
Biopeptídeos	$30,6 \pm 1,1^{a}$	$58,3 \pm 0,9^{a}$	$0,677 \pm 0,007^{a}$
PCL	$-^{**}$	$-^{**}$	$0,006 \pm 0,001^{d}$
PCL + biopeptídeos	$22,6 \pm 2,9^{b}$	$12,4 \pm 0,6^{c}$	$0,182 \pm 0,024^{c}$

*Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$).
−**: os valores de absorbância foram utilizados como branco para o cálculo de % de inibição dos radicais DPPH e ABTS. Portanto, os valores não foram apresentados.

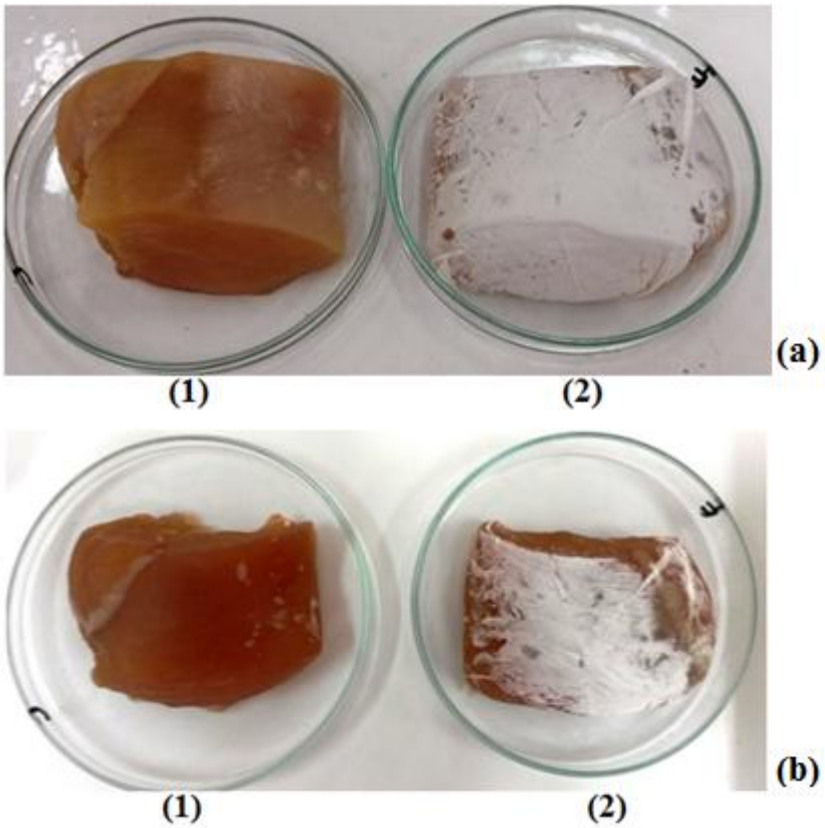
A redução pode estar associada ao processo de obtenção dos extratos para quantificação de atividade antioxidante. Da mesma forma, a matriz das nanofibras é composta por apenas 3% (m/v) correspondendo a 0,21 $mg.mL^{-1}$ de biopeptídeos no extrato enquanto que na análise do composto puro foram utilizados 5 e 10 $mg.mL^{-1}$ de biopeptídeos. Ainda assim, os biopeptídeos contidos nas nanofibras de PCL apresentaram capacidade antioxidante para os três métodos estudados.

Sheih, Wu e Fang (2009) em estudo para obtenção de biopeptídeos de massa molecular de 1,3 kDa, a partir de resíduos de algas testou a atividade frente aos métodos DPPH e ABTS. Os autores obtiveram 50% de sequestro desses radicais em baixas concentrações de aproximadamente 10 $\mu g.mL^{-1}$ quando comparado com antioxidantes sintéticos.

Cian, Martínez-Augustin e Drago (2012) estudaram a bioatividade de peptídeos purificados obtidos por hidrólise de alga *Porphyra columbina* e apresentaram valores de 50% de inibição dos radicais ABTS e DPPH em concentrações de aproximadamente 3 $mg.mL^{-1}$. A atividade antioxidante dos biopeptídeos do presente trabalho são significativas, uma vez que as concentrações testadas foram superiores (10 $mg.mL^{-1}$) e os biopeptídeos são extratos brutos. Assim, foi possível obter biopeptídeos não purificados com ação antioxidante frente aos métodos testados.

Na Figura 2 estão apresentadas as amostras de carne de frango com aplicação da matriz de nanofibras com biopeptídeos e o controle. A amostra controle sem recobrimento de nanofibras apresentou diferença significativa ($p<0,05$) no conteúdo de malonaldeído e bases voláteis totais comparadas a carne de frango mantida com nanofibras. Estes valores mostram que a carne de frango sem recobrimento apresentou maior produção de compostos oriundos da oxidação lipídica (Tabela 4).

FIGURA 2 – Cortes de carne de frango controle (1) e com nanofibras (2) contendo biopeptídeos em 0 (a) e 12 dias (b) de armazenamento.



A aplicação das nanofibras com biopeptídeos antioxidantes na carne de frango foi eficiente durante o armazenamento e reduziu a degradação da amostra. As nanofibras possuem maior área superficial de contato comparado com seus homólogos de escala macroscópica. Assim, os compostos bioativos apresentaram maior reatividade com os produtos de degradação auxiliando na manutenção da qualidade do produto (AZEREDO, 2013).

O uso de nanocompósitos na indústria de embalagens para alimentos é promissora por aumentar consideravelmente a vida de prateleira de produtos como carnes, queijos, frutas e cereais (RHIM et al., 2013). No presente trabalho foi possível observar que a aplicação de nanofibras com biopeptídeos manteve a conservação do produto durante o período de armazenamento avaliado.

TABELA 3 – Análise de TBARS e N-BVT para amostras contendo nanofibras com biopeptídeos e controle após 12 dias de armazenamento.

Amostra	**TBARS (mgMDA.kg^{-1})**	**N-BVT (mgN.100g^{-1})**
Controle (0 dias)	$0,3 \pm 0,0^{c}$	$25,1 \pm 0,7^{b}$
Controle (12 dias)	$2,6 \pm 0,0^{a}$	$33,8 \pm 0,0^{a}$
PCL+ biopeptídeos (12 dias)	$1,0 \pm 0,0^{b}$	$25,8 \pm 0,3^{b}$

*Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Counsell e Horning (1981 apud PEREIRA, 2009) relataram que valores de TBARS acima de 2 mg malonaldeído por kg de amostra são detectados odores de ranço por provadores não treinados.

Pereira (2009) estudou a aplicação de antioxidantes naturais para estabilização de oxidação lipídica em carne de frango mecanicamente separada e constatou aumento gradativo dos índices de TBARS para as amostras sem adição de antioxidantes. A aplicação de antioxidantes naturais controlou os processos oxidativos durante o armazenamento apresentando potencial aplicação para conservação das amostras analisadas. Pino (2005) avaliou o conteúdo de TBARS de cortes de frango armazenados sob congelamento e verificou aumento gradual dos níveis de malonaldeído no período analisado.

O resultado da análise de bases voláteis totais foi satisfatório. A carne de frango quando recoberta com nanofibras contendo os biopeptídeos apresentou controle no processo de degradação e apresentou valor inferior ao apresentado como limite pela legislação. A quantificação de bases voláteis é regulamentada para pescados em geral. Não há legislação vigente para determinação do conteúdo de N-BVT de cortes de carne de frango. Alguns estudos demonstram que níveis superiores a 30 mgN.100g^{-1} conferem ao produto alterações sensoriais e fazem com que ele não seja considerado adequado ao consumo humano (BRASIL, 1980).

4 CONCLUSÃO

As nanofibras contendo biopeptídeos de origem microalgal apresentaram diâmetro de 438 nm e devido a grande área de superfície de contanto podem ser aplicadas na conservação de alimentos. Nos ensaios de estabilidade de cortes de carne de frango com aplicação de nanofibras contendo biopeptídeos houve controle no processo de oxidação lipídica com valores de 1,0 ± 0,0 mgMDA.kg^{-1} e 25,8 ± 0,3 mg N.100g^{-}1 comparado com a amostra controle que apresentou 2,6 ± 0,0 mgMDA.kg^{-1} e 33,8 ± 0,0 mg N.100g^{-1}. Assim, matrizes de nanofibras de PCL contendo biopeptídeos com atividade antioxidante são potenciais alternativas para aplicação como embalagens ativas primárias visando à conservação de produtos alimentícios.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOBIA, D. S. **Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais.** Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ALIX, S.; MSHIEU,A.; TERRIE,C.; SOULESTIN,J.; GERAULT,E.; FEUILLOLEY,M.G.J.; GATTIN, R.; EDON,V; AIT-YOUNES,T.; LEBLANC,N. Active pseudo-multilayered films from polycaprolactone and starch based matrix for food-packaging applications. **European Polymer Journal**, v.49, p.1234-1242, 2013.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed., Washington, 1990.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international**. 17.ed. Washington, 2005.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard practice for scanning electron microscope beam size characterization. **ASTM E986 – 04**, West Conshohocken, PA, USA, 2010.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for assignment of the DSC procedure for determining Tg of a polymer or an elastomeric compound. **ASTM D7426 – 08**, West Conshohocken, 2013.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for rapid thermal degradation of solid electrical insulating materials by thermogravimetric method (TGA). **ASTM D3850 – 12**, West Conshohocken, 2013.

AZEREDO, H. M. C. Antimicrobial nanostructures in food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v.30, p.56-59, 2013.

BHUSAHANI, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food and Technology**, v.38, p.21-33, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSER, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. **Activity Lebensm.-Wiss. u.-Technology**., v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 165p, Brasília, 1980.

CAMPOS, A.; MARCONATO, J. C.; FRANCHETTI, S. M. M. biodegradação de filmes de PP/PCL em solo e solo com chorume. **Polímeros**, v. 20, p.295-300, 2010.

CÍAN, R. E.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DRAGO, S. R. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. **Food Research International**, v.49, p.364-372, 2012.

CIARDELLI, G.; CHIONO, V.; VOZZI, G.; PRACELLA, M.; AHLUWALIA,A.; BARBANI, N.; CRISTALLINI, C.; GIUSTI, P. Blends of Poly-(E-caprolactone) and

Polysaccharides in Tissue Engineering Applications. **Biomacromolecules**, v.6, p.1961-1976, 2005.

COUNSELL, J. N.; HORNING, D. H. **Vitamin C (ascorbis acid).** Applied Science, cap. 7, London, 1981.

CRACKEL, R. L.; GRAY, I.J.; PEARSON, A.M; BOOREN, A.M.; BUCKLEY, O.J. Some further observations on the TBA. Test as an index of lipid oxidation in meats. **Food Chemistry**, v. 28, p. 187-196, 1988.

DUARTE, M. A. T. **Estudo do processamento e da degradação térmica do poli(3-hidroxibutirato) e de suas blendas com poli(ε-caprolactona).** Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2004.

GHASEMI-MOBARAKEH, L.; PRABHAKARAN, M. P.; MORSHED, M.; NESR-ESFAHANI, M. H.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p.4532-4539, 2008.

GOES, A. M.; CARVALHO, S.; ORÉFICE, R. L.; AVÉROUS, L.; CUSTÓDIO, T. A.; PIMENTA, J. G.; SOUZA, M. B.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S. Viabilidade Celular de Nanofibras de Polímeros Biodegradáveis e seus Nanocompósitos com Argila Montmorilonita. **Polímeros**, v.22, p.34-40, 2012.

HOYLE, N., MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p. 76−79, 1994.

JOHNSON, J.; NIEHAUS, A.; NICHOLS, S.; LEE, D.; KOEPSEL, J.; ANDERSON, D.; LANNUTTI, J. Electospun PCL *in vitro*: a microstructural basis for mechanical property changes. **Journal of Biomaterials Science**, v.20, p.467-481, 2009.

KIM, M. S.; KIM, G. Three-dimensional electrospun polycaprolactone (PCL)/alginatehybrid composite scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v.114, p.213-221, 2014.

KIM, S. K.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v.2, p. 1-9, 2010.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL., R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal Biology Chemistry**, v. 93, p. 265-275, 1951.

MARTÍNEZ-ABAD, A.; SÁNCHEZ, G.; FUSTER,V. LAGARON, J. M; OCIO, M. J. Antibacterial performance of solvent cast polycaprolactone (PCL) films containing essential oils. **Food Control**, v.34, p.214-220, 2013.

MILLS, S.; STANTON, C.; HILL,C.; ROSS,R.P. New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, p. 299-329, 2011.

MORAIS, M. G, RADMANN, E. M., ANDRADE, M. R., TEIXEIRA, G. G., BRUSCH, L. R. F., COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (Arthrospira). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2872-2876, 2010.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed Research International**, IN PRESS, 2015.

NEO, Y. P.; RAY, S.; JIN, J.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; NIEUWOUDT, M. K.; LIU, D.; QUEK, S. Y. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system. **Food Chemistry**, v.136, p.1013-1021, 2013.

PATRÍCIO, T.; DOMINGOS, M.; GLORIA, A.; D'AMORA, U.; COELHO, J. F.; BÁRTOLO, P. J. Fabrication and characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering. **Rapid Prototyping Journal**, v.20, p. 145-156, 2014.

PEREIRA, M. G. Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PINO, L. M. **Estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, armazenada sob congelamento.** Dissertação (Mestrado em Ciências: Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

RANJBAR-MOHAMMADI, M.; BAHRAMI,S.H. Development of nanofibrous scaffolds containing gum tragacanth/poly(ε-caprolactone) for application as skin scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v.48, p. 71-79, 2015.

RHIM, J.W.; PARK, H.M.; HA, C.S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v.38, p. 1629-1652, 2013.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G., PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre $ABTS^{+}$. **EMBRAPA: Comunicado técnico 128** – *on line*. . Fortaleza, Brasil, 2007.

SENEDESE, A. L. C. **Estruturação tridimensional de scaffolds de policaprolactona via manufatura aditiva.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SHEIH, I. C.; WU, T. K.; FANG,T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**, v.100, p.3419-3425, 2009.

TAKALA, P.N.; VU, K.D.; SALMIERI,S.; KHAN,R.A.; LACROIX,M. Antibacterial effect of biodegradable active packaging on the growth of *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in fresh broccoli stored at 4ºC. **LWT – Food Science and Technology**, v.53, p.499-506, 2013.

WU, H. C.; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v.36, p.949-957, 2003.

WU, J. C. C.; RAY, S.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; UY, B.; SWIFT, S.; JIN, J.; COONEY, R. P. Nanostructured bioactive material based on polycaprolactone and polyaniline fiber-scaffolds. **Synthetic Metals**, v.198, p.41-50, 2014.

CAPÍTULO IV

6 CONCLUSÃO GERAL

A hidrólise proteica da biomassa de *Spirulina* utilizando a enzima Protemax 580 L apresentou GH de 58,07% produzindo hidrolisados proteicos de baixa massa molecular (10 kDa). Os níveis inferiores das variáveis concentração de substrato e atividade enzimática avaliados no DCC apresentaram efeito positivo na resposta GH. A cinética GH foi avaliada até o tempo de 420 min e resultou em GH de 60,94% não apresentando diferença significativa ($p< 0,05$) com a melhor condição do DCC.

As análises de eletroforese e CCD mostraram que a hidrólise da biomassa proporcionou a formação de fragmentos proteicos de baixa massa molecular e confirmam que podem ser biopeptídeos de massa molecular inferior 10 kDa. A atividade antioxidante dos biopeptídeos foi superior comparada com a biomassa não hidrolisada para os métodos ABTS e poder redutor ($p< 0,05$). A atividade antioxidante apresentou aumento da mesma forma que houve aumento no conteúdo de proteína solúvel, inferindo que a atividade provém dos biopeptídeos.

As nanofibras de PCL contendo biopeptídeos apresentaram diâmetro de 438 nm sem formação de gotas. As propriedades térmicas e de degradação apresentaram redução devido à presença de fragmentos proteicos com ponto de desnaturação inferior as temperaturas para o polímero puro e não interferiram na formação de nanofibras. As nanofibras com biopeptídeos apresentaram atividade antioxidante para os métodos DPPH, ABTS e poder redutor. O armazenamento de cortes de carne de frango recobertos com as nanofibras com biopeptídeos apresentou controle nos índices de bases voláteis totais (25,8 $mgN.100g^{-1}$) e oxidação lipídica (0,98 $mgMDA.kg^{-1}$) quando comparados ao controle armazenado sob as mesmas condições. Desta forma, as nanofibras de PCL contendo biopeptídeos apresentaram potencial aplicação como embalagens de alimentos perecíveis.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar a obtenção de peptídeos bioativos a partir de isolados proteicos de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

Identificar os aminoácidos da biomassa microalgal e a sequência de fragmentos proteicos que apresentam bioatividade.

Estudar misturas de blendas poliméricas para formação de nanofibras visando melhorias nas propriedades mecânicas e de barreira para aplicação como embalagens.

Avaliar processos de encapsulação de biopeptídeos para manutenção da atividade e inserção das nanopartículas nas nanofibras.

CAPÍTULO V

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIX,S.; MSHIEU,A.; TERRIE,C.; SOULESTIN,J.; GERAULT,E.; FEUILLOLEY,M.G.J.; GATTIN, R.; EDON,V; AIT-YOUNES,T.; LEBLANC,N. Active pseudo-multilayered films from polycaprolactone and starch based matrix for food-packaging applications. **European Polymer Journal**, v.49, p.1234-1242, 2013.

ANDRADE, M. R. **Biossistema para produção de biomassa microalgal e biometano**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2009.

AZEREDO, H. M. C. Antimicrobial nanostructures in food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v.30, p.56-59, 2013.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

BROWN, T. D.; EDIN, F.; DETTA, N.; SKELTON, A. D.; HUTMACHER, D. W.; DALTON, P. D. Melt electrospinning of poly(ε-caprolactone) scaffolds: Phenomenological observations associated with collection and direct writing. **Materials Science and Engineering C**, v. 45, p.698-708, 2014.

CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **BIOQUÍMICA: Bioquímica básica**. São Paulo. Thomson, 5ª ed., 2007.

CARVAJAL, J.C.L. **Caracterização e modificações químicas da proteína da microalga *Spirulina (Spitulina maxima)***. 2009. 138p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

COSTA, J.V.; MORAIS, M.G. **An Open Pond System for Microalgal cultivation**. In: Pandey A., Lee D., Chisti Y., Soccol C. Biofuels from Algae. 1º edição. São Diego: Elsevier; p. 1- 20, 2014.

DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. 2006. 150p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. São Paulo. 4. Ed. Editora Artmed, p. 900, 2010.

DHERAPRASART, C.; RENGPIPAT, S.; SUPAPHOL, P.; TATTIYAKUL, J. Morphology, release characteristics, and antimicrobial effect of nisin-loaded electrospun gelatin fiber mat. **Journal of Food Protection**, v.72, p.2293- 2300, 2009.

DOMINGUES, M. A. F. **Qualidade lipídica da carne de frangos alimentados com ração contendo farelo de coco**. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 1-24, 2011.

DURÁN, N., MATTOSO, L. H. C., MORAIS, P. C. **Nanotecnologia introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artilier, p. 17- 19, 2006.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Fisheries and Aquaculture Circular nº 1034. A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish**. Roma, 2008.

FEDATTO, L.M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. 2004. 69p. Dissertação (Mestrado em Ecologia em Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

FERNANDES, J. G.; CORREIA, D. M.; BOTELHO, G.; PADRÃO, J.; DOURADO, F.; RIBEIRO, C.; LANCEROS-MÉNDEZ, S.; SENCADAS, V. PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. **Polymer Testing**, v.34, p.64-71, 2014.

FOX, R. D. ***Spirulina* Production & Potencial**. France, Edisud, 1996.

GAUTAM, S.; DINDA, A. K.; MISHRA, N. C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Materials Science and Engineering C**, v.33, p. 1228-1235.

GUEDES, A.C.; GIÃO, M.S.; SEABRA, R.; FERREIRA, A.C. S.; TAMAGNINI, P.; FERREIRA-MORADAS, P.; MALCATA, F.X. Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. **Marine drugs,** v. 11, p. 1256-1270, 2013.

GUARIENTI, C. **Potencial antioxidante da microalga *Spirulina* frente as condições de estresse oxidativo.** 2009. 123p. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2009.

HE, H. L.; CHEN, X. L. WU, H.; SUN, C. Y.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, B. C. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. **Bioresource Technology**, 98, p.3499-3505, 2007.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

HU, B.; TING,Y; ZENG X.; HUANG Q. Bioactive Peptides/ Chitosan Nanoparticles Enhance Cellular Antioxidant Activity of (-)-Epigallocatechin-3-gallate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 875-881, 2013.

KHANTAPHANT, S., BENJAKUL, S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.151B, n.4, p. 410–419, 2008.

KIM, M. S.; KIM, G. Three-dimensional electrospun polycaprolactone (PCL)/alginatehybrid composite scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v.114, p.213-221, 2014.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P.; COSTA, J. A. V. Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the productionof enzymatic protein hydrolysates. **International Journal of Enginnering Research and Applications**, v.4, p. 29-38, 2014.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F.X. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey protein. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n.2, p. 437-455, 2010.

MARTÍNES-ABAD, A.; SÁNCHEZ, G.; FUSTER,V. LAGARON, J. M; OCIO, M. J. Antibacterial performance of solvent cast polycaprolactone (PCL) films containing essential oils. **Food Control**, v.34, p.214-220, 2013.

MATA, T.; MARTINS, A.; CAETANO, N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable a sustainable energy reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MILLS, S.; STANTON, C.; HILL,C.; ROSS,R.P. New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, p. 299-329, 2011.

MORAIS, M.G. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimentos de nanofibras**. 2008. 154p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed Research International**, IN PRESS, 2015.

MOSTAFA, S. S. M. Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications. **Plant Science**, DOI: 10.5772/53649, p. 275-314, 2012.

NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. São Paulo. Artmed, 5ª Ed., 2011.

NEO, Y. P.; RAY, S.; JIN, J.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; NIEUWOUDT, M. K.; LIU, D.; QUEK, S. Y. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system. **Food Chemistry**, v.136, p.1013-1021, 2013.

NEO, Y. P.; SWIFT, S.; RAY, S.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; JIN, J.; PERERA, C. O. Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. **Food Chenistry**, v.141, p.3192-3200, 2013b.

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica, 1ª edição, 2012.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, p. 655-663, 2005.

PACHECO, M. T. B.; ANTUNES, A. E. C. **Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência**. 1º ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 2009.

PATRÍCIO, T.; DOMINGOS, M.; GLORIA, A.; D'AMORA, U.; COELHO, J. F.; BÁRTOLO, P. J. Fabrication and characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering. **Rapid Prototyping Journal**, v.20, p. 145-156, 2014.

PELCZAR, M . J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo. Pearson, 2ª Ed., vol.1, 1997.

PEREIRA, M. G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave.** 2009. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PINO, L. M. **Estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, armazenada sob congelamento.** 2005. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R.J. Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* nantioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**. Springer, v. 44, p. 797-820, 2013.

RAMAKRISHNA, S.; FUKIHARA, K.; TEO, W. E.; LIM, T. C.; MA, Z. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. Singapura: World Scientific Publishing, 2005.

RANJBAR-MOHAMMADI, M.; BAHRAMI, S.H. Development of nanofibrous scaffolds containing gum tragacanth/poly(ε-caprolactone) for application as skin scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v.48, p. 71-79, 2015.

RHIM, J.W.; PARK, H.M.; HA,C.S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v.38, p. 1629-1652, 2013.

RICHMOND, A. **Handbook of microagal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell science. 1º ed, 2004.

SANTOS, R. D. **Produção enzimática de poli(ε-caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico**. 2011. 81p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SHANAB, S. M.; MOSTAFA, S. M; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2 (8), p.608-615, 2012.

STEFFENS, D.; LERSCH, M.; ROSA, A.; SCHER, C.; CRESTANI, T.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A.; PRANKE, P. A new biomaterial of nanofibers with the microalga *Spirulina* as scaffolds to cultivate with stem cells for use in tissue engineering. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, p. 1-10, 2012.

SUETSUNA, K.; CHEN,J. R. Identification of Antihypertensive Peptides from Peptic Digest of Two Microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. **Marine Biotechnology**, v.3, p.305-309, 2001.

TAKALA, P.N.; VU, K.D.; SALMIERI,S.; KHAN,R.A.; LACROIX,M. Antibacterial effect of biodegradable active packaging on the growth of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes in fresh broccoli stored at 4ºC. **LWT – Food Science and Technology**, v.53, p.499-506, 2013.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica.** 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

WANG, B.; LAN,C.Q.; HORSMAN,M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 904-912, 2012.

WOODRUFF, M.; HUTMACHER,D.W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, p.1-40, 2010.

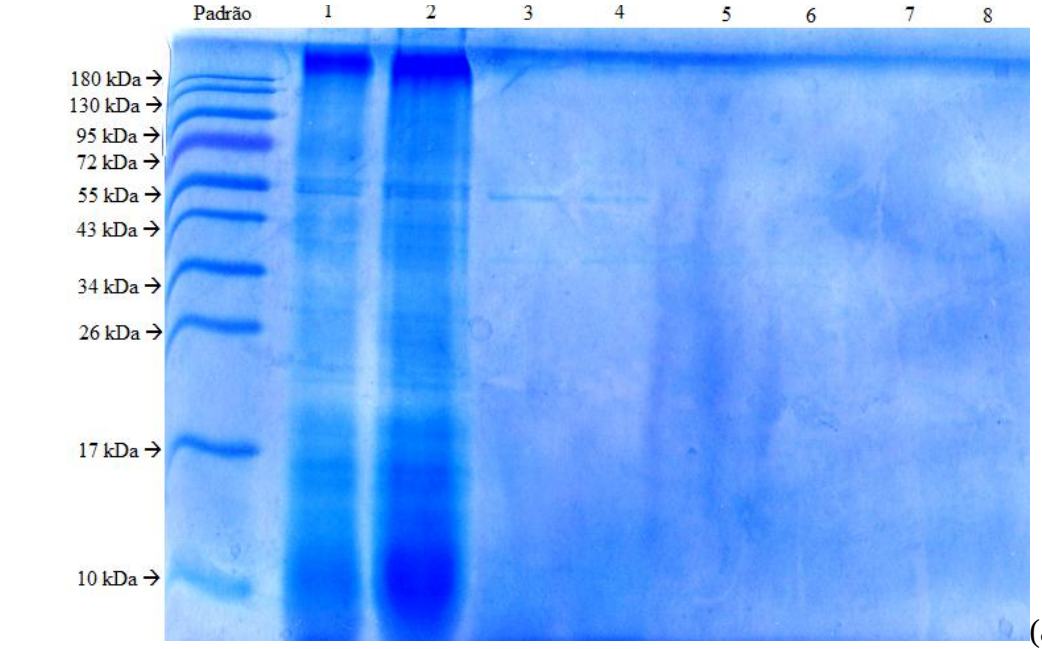
WU, J. C. C.; RAY, S.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; UY, B.; SWIFT, S.; JIN, J.; COONEY, R. P. Nanostructured bioactive material based on polycaprolactone and polyaniline fiber-scaffolds. **Synthetic Metals**, v.198, p.41-50, 2014.

ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C.M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v.32, p.1739-1743, 2009.

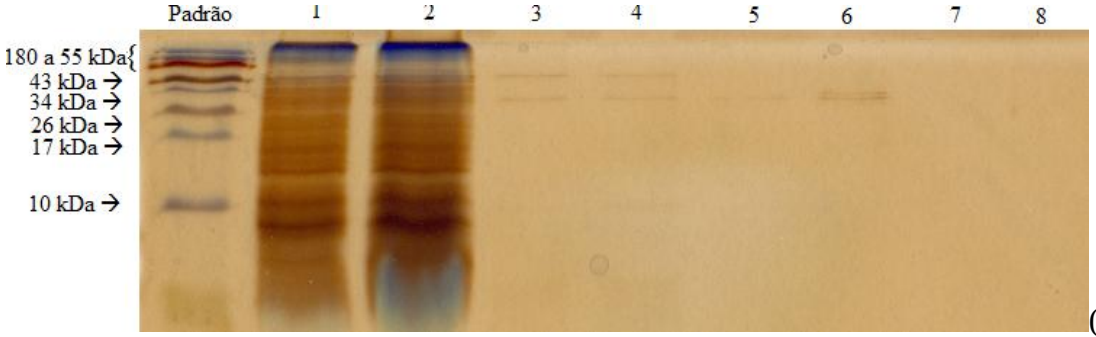
CAPÍTULO VI

9 APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Perfil eletroforético da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, hidrolisados e filtrados proteicos em gel SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie blue* (a) e gel SDS-PAGE 20% corado com nitrato de prata (b).



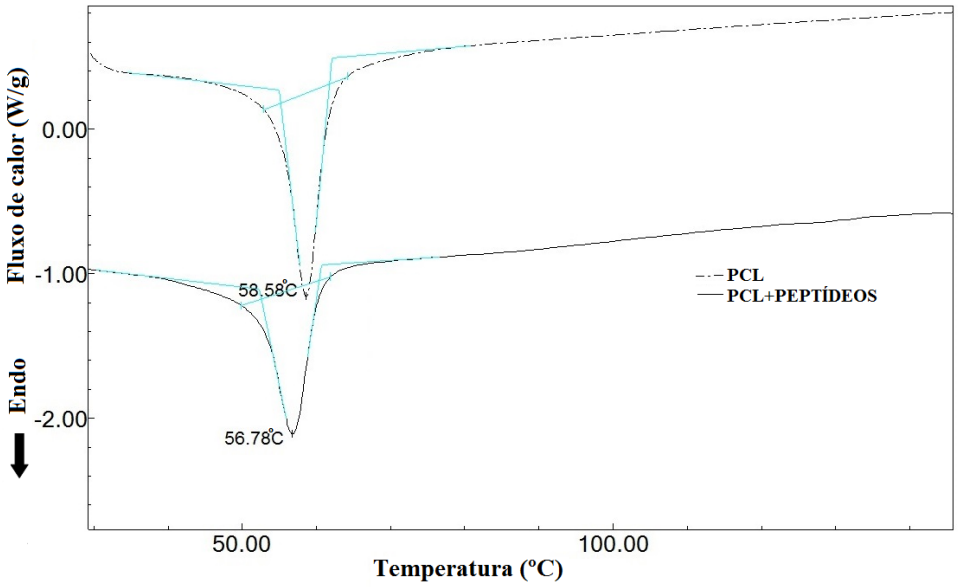
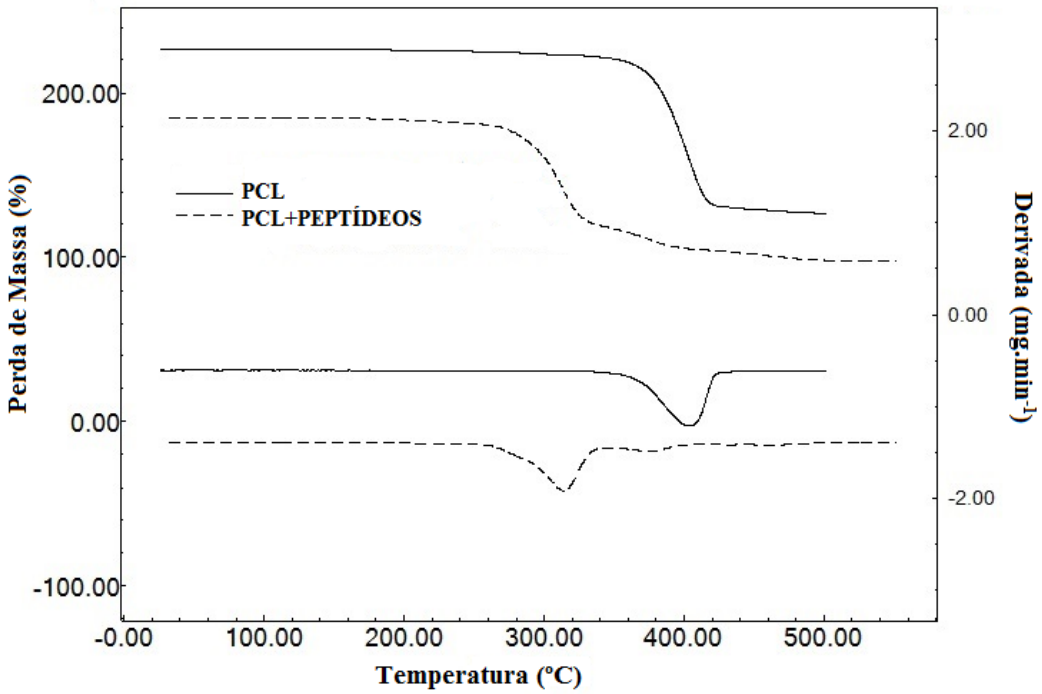
(a)



(b)

*1: 20 µg de biomassa não hidrolisada; 2: 40 µg de biomassa não hidrolisada; 3: hidrolisado proteico (t= 420min), 4: hidrolisado proteico (t= 240min), 5: filtrado em membrana 0,1µm (t= 420min); 6: filtrado em membrana 0,1µm (t= 240min); 7: filtrado em coluna Amicon® 10K (t= 420min) e 8: filtrado em coluna Amicon® 10K (t= 240min). O padrão (P) de massa molecular está indicado a esquerda e representado em kDa.

APÊNDICE 2 – Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) das nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos.



APÊNDICE 3 – Análise termogravimétrica das nanofibras de PCL e PCL com biopeptídeos.