



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO PEPTÍDEOS BIOATIVOS
DE MICROALGAS

Eng^a. Cristiane Reinaldo Lisboa

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Orientador

Rio Grande/RS

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO PEPTÍDEOS BIOATIVOS
DE MICROALGAS

Eng^a. Cristiane Reinaldo Lisboa

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Rio Grande/RS
2013

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus amados pais Getúlio (in memoriam) e Ilma, para os quais dedico este trabalho, que sempre estiveram do meu lado me apoiando e mostrando o caminho certo a seguir.

Obrigada pela confiança, dedicação e amor, pois sem eles não teria chegado onde cheguei. Ao meu marido Matheus que soube compreender meus momentos de ausência, impaciência e mau humor. E pela companhia nos Congressos.

Às minhas amadas irmãs Luciana, Simone e Daiana que sempre estão ao meu lado me incentivando e se orgulhando de cada passo que dou.

A Deus que me deu forças para seguir em frente e que sempre me acompanha em todos os momentos da minha vida.

Ao Professor Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, pela contribuição no meu crescimento profissional e orientação.

Ao Roque pela amizade, apoio e auxílio que sempre me prestou quando precisei.

A minha querida Aline, que me ajudou no desenvolvimento da parte prática deste trabalho, bem como pela ótima companhia e dedicação.

Às amigas Ana Cláudia, Ana Priscila, Célia, Elisângela, Etiele, Lisiane, Sabrina, Shana e Thaisa, pelas conversas animadas (muitas vezes animadas até demias).

Á amiga Shana pela colaboração na etapa inicial da minha tese, obrigada.

Às amigas Thaisa e Ana Cláudia pelas idas ao cinema (para assistir “ótimos” filmes, dependendo do ponto de vista) sempre muito divertidas!!!!

Em especial às amigas Ana Cláudia, Elisângela e Etiele que sempre muito dispostas, me ajudaram nesta etapa final da minha tese, muito obrigada!!!

A todos colegas do laboratório de Engenharia de Bioquímica pela companhia e convivência sempre muito divertida e agradável.

À CAPES pela concessão de bolsa de pós-graduação.

Por fim, dedico este trabalho ao meu amado pai Getúlio Lisbôa, que com certeza deve estar muito orgulhoso da sua “pipoquinha”!!!

RESUMO

A produção de peptídeos bioativos de distintas fontes de proteínas vem ganhando espaço na produção científica e tecnológica, despertando interesse do setor empresarial. Paralelamente a isso, devido à elevada concentração de proteínas na biomassa das microalgas *Spirulina* e *Chlorella*, estas apresentam grande potencial para a extração de biocompostos com alto valor agregado, como biopeptídeos de microalgas. As proteínas são uma importante fonte de peptídeos bioativos, mas estes não estão ativos na proteína precursora e devem ser liberados para que apresentem efeitos fisiológicos desejados. Essa liberação pode ser feita através de hidrólise enzimática a partir de proteases, sendo um dos métodos mais utilizados para a produção destes biocompostos. Dentro deste contexto, vários estudos vêm mostrando o uso da tecnologia por secagem em spray dryer para a obtenção de nanopartículas que contenham compostos bioativos, sendo, essa técnica, amplamente utilizada para transformar líquidos em pós, podendo ser aplicada em materiais sensíveis à temperatura. Este estudo teve como objetivo obter peptídeos bioativos através da reação enzimática, tendo como substrato a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella pyrenoidosa* e, na sequência, obter nanopartículas contendo os biopeptídeos. Primeiramente, foram testadas as 3 proteases comerciais (Protamax 580 L, Protamax N 200 e pepsina) para a produção de hidrolisados proteicos de microalgas, para isso foram realizados 3 delineamentos compostos centrais para cada microalga em estudo (*Chlorella* e *Spirulina*). Os delineamentos utilizados foram do tipo 2^3 com três repetições no ponto central, variando-se a concentração de enzima (5 a 10 U.mL⁻¹), a concentração de substrato (5 a 10 %) e o tempo de reação (60 a 240 min). Após, realizou-se 2 delineamentos compostos rotacionais do tipo 2^2 com pontos centrais, um para cada microalga, utilizando-se para a hidrólise a enzima Protamax 580L (5 U.mL⁻¹) variando-se a concentração de substrato e tempo de reação, para todos ensaios estudou-se a solubilidade, capacidade de retenção de água, atividade antioxidante e digestibilidade. Foi selecionado um ensaio para cada microalga, levando em conta os melhores resultados. Então nova hidrólise enzimática foi realizada sendo o sistema reacional composto pela enzima Protamax 580 L (5 U.mL⁻¹) e pela biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 ou *Chlorella pyrenoidosa* (4% de proteína) durante tempo de 200 min. Os hidrolisados foram purificados por filtração a vácuo com membranas millipores de diferentes tamanhos (0,45; 0,2 e 0,1 µm) e por colunas com membrana vertical Amicon® Ultra 0.5 (3K e 10K), sendo que após cada etapa, foi realizado teste de atividade antioxidante pelos métodos de poder redutor, DPPH e ABTS, a fim de verificar a permanência da atividade antioxidante. Utilizou-se nano spray dryer Büchi modelo B 90 para a secagem das amostras, sendo o tamanho das partículas obtidas analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por fim, conclui-se que a biomassa de microalgas pode ser utilizada como fonte de produção de peptídeos bioativos com elevada atividade antioxidante e que dentre as microalgas estudadas, *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou melhores resultados, em todas as análises realizadas, quando comparada com *Chlorella pyrenoidosa*. Esse estudo, também visou utilizar a nanobiotecnologia para obtenção de nanopartículas contendo os biopeptídeos, para tal, utilizou-se o nano Buchi Spray Dryer B-90, o qual gerou partículas nanométricas de 14 a 18 nm para o hidrolisado de *Spirulina* e de 72 a 108 nm para o hidrolisado de *Chlorella*.

Palavras-chave: Peptídeos bioativos, *Spirulina*, *Chlorella*, nanopartículas

ABSTRACT

The bioactive peptides production from different protein sources has been earning ground in scientific and technological production, arousing interest from the corporate sector. Alongside this, due to high protein concentration in *Spirulina* and *Chlorella* biomass, these have great potential for extracting biocompounds with high value, such as biologically active peptides. Proteins are an important source of bioactive peptides, but these are not active on the precursor protein and must be released to present the intended physiological effects. This release can be done by enzymatic hydrolysis from proteases, one of the most widely used method for biocompounds producing. In this context, several studies have shown the use of spray drying technology to obtain nanoparticles with bioactive compounds, and this is a widely used technique to transform liquids in powders and can be applied in temperature sensitive materials. The aimed of this study was to obtain bioactive peptides by enzymatic reaction using as substrate *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella pyrenoidosa* biomass and, subsequently, obtain nanoparticles containing biopeptides. First, were tested three commercial proteases (Protamax 580 L, Protamax N 200 and pepsin) to produce protein hydrolysates of microalgae that have been conducted for three central composites studied for each microalgae (*Chlorella* and *Spirulina*). The designs used were of 2^3 type with three replications at the center point varying the enzyme concentration (5 to 10 U.mL⁻¹), substrate concentration (5 to 10%) and reaction time (60-240 min). After, 2 rotational composite designs 2^2 type with center points, one for each microalgae, using Protamax 580L (5 U.mL⁻¹) enzyme for hydrolysis varying the substrate concentration and reaction time, for all assays was studied solubility, water holding capacity, digestibility and antioxidant activity. Were selected an assay for each microalgae, considering the best results. Then new enzymatic hydrolysis was performed with the reaction system comprising by Protamax 580 L (5 U.mL⁻¹) enzyme and *Spirulina platensis* sp. LEB-18 or *Chlorella pyrenoidosa* biomass (4% protein) during 200 min. The hydrolysates were purified by vacuum filtration with millipore membranes of different sizes (0.45, 0.2 and 0.1 mM) and vertical columns Amicon® ultra 0.5 (3K and 10K) membrane, after each step, tests were performed by reducing power methods, DPPH and ABTS in order to assess the continuing antioxidant activity. Büchi nano spray dryer model B 90 were used for drying the samples, the particle size obtained were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Finally, it was concluded that the microalgae biomass can be used as a source for the bioactive peptides with antioxidant activity production and among the studied microalgae, *Spirulina* sp. LEB 18 showed the best results in all analyzes compared with *Chlorella pyrenoidosa*. This study also aimed to use nano-biotechnology to obtain nanoparticles containing biopeptides, to achieve this, were used B-90 nano spray dryer, which generated nano-sized particles from 14 to 18 nm for *Spirulina* hydrolysate and 72-108 nm for *Chlorella* hydrolysate.

Keywords: bioactive peptides, *Spirulina*, *Chlorella*, nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica a partir de dois aminoácidos com distintas cadeias laterais (grupos R) na cadeia peptídica os aminoácidos são chamados de resíduos.	25
Figura 2 - Representação de uma hidrólise proteica catalisada por uma protease.	28
Figura 3 - Estabilização do radical DPPH.	33
Figura 4 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	34
Figura 5 - Diagrama esquemático do nano <i>spray dryer</i>	37
Figura 6 - Princípio de funcionamento de um coletor de eletrostático de partículas no Nano Spray dryer B-90.	38

CAPÍTULO III

ARTIGO 1: OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO A PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL

Figura 1- Superfícies de resposta do GH em relação as variáveis independentes concentração de substrato, concentração de enzima e tempo de reação: (a), (b) e (c) superfícies de respostas para a microalga <i>Chlorella</i> com Protemax 580L; (d), (e) e (f) representam as superfícies de respostas para a microalga <i>Chlorella</i> e Protemax N200; (g), (h) e (i) representam as superfícies de respostas para micrialga <i>Chlorella</i> com pepsina.	55
Figura 2 -Superfícies de resposta do GH em relação às variáveis independentes: concentração de substrato, concentração de enzima e tempo de reação: (a), (b) e (c) superfícies de respostas para a microalga <i>Spirulina</i> com Protemax 580L; (d), (e) e (f) representam as superfícies de respostas para a microalga <i>Spirulina</i> e Protemax N200; (g), (h) e (i) representam as superfícies de respostas para micrialga <i>Spirulina</i> com pepsina.	56

ARTIGO 2: OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS CONTENDO BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18

Figura 1 - Superfície de resposta em função da concentração de substrato e tempo de reação para o grau de hidrólise	76
Figura 2 - Curva de solubilidade dos hidrolisados de <i>Spirulina</i> , ensaio 1(◆) ensaio 2 (■), ensaio 3 (-), ensaio 4 (□), ensaio 5 (*), ensaio 6 (●), ensaio 7 (◇), ensaio 8 (×), ensaio 9 (○), ensaio 10 (+), ensaio 11 (Δ) e <i>Spirulina</i> não hidrolisada (▲).....	78
Figura 3 - Curva de capacidade de retenção de água dos hidrolisados proteicos, ensaio 1(◆) ensaio 2 (■), ensaio 3 (-), ensaio 4 (□), ensaio 5 (*), ensaio 6 (●), ensaio 7 (◇), ensaio 8 (×), ensaio 9 (○), ensaio 10 (+), ensaio 11 (Δ) e <i>Spirulina</i> não hidrolisada (▲).	79
Figura 4 - Perfil eletroforético das proteínas presentes no padrão (P), na biomassa da <i>Spirulina</i> (S) e as proteínas do s hidrolisados de <i>Spirulina</i>	80

ARTIGO 3: OBTENÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa*

Figura 1 - Superfície de resposta em função da concentração de substrato e tempo de reação para o grau de hidrólise	101
Figura 2 - Curva de solubilidade dos hidrolisados de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ensaio 1(◆) ensaio 2 (■), ensaio 3 (-), ensaio 4 (□);ensaio 5 (*), ensaio 6 (●), ensaio 7 (◇), ensaio 8 (×);ensaio 9 (○), ensaio 10 (+), ensaio 11 (Δ) e <i>Chlorella</i> não hidrolisada (▲).....	103
Figura 3 - Curva de capacidade de retenção de água dos hidrolisados proteicos, ensaio 1(◆) ensaio 2 (■), ensaio 3 (-), ensaio 4 (□); ensaio 5 (*), ensaio 6 (●), ensaio 7 (◇), ensaio 8 (×); ensaio 9 (○), ensaio 10 (+), ensaio 11 (Δ) e <i>Chlorella</i> não hidrolisada (▲).....	105
Figura 4 - Perfil eletroforético das proteínas presentes no padrão (P), na biomassa da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (C) e as proteínas dos hidrolisados de <i>Chlorella</i>	106

ARTIGO 4: OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Figura 1- Centricons (Centrifugal Filter Devices, Amicon Ultra 0.5, Ultracel - 10K)	121
Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de peptídeos bioativos dos hidrolisados da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	129
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de peptídeos bioativos dos hidrolisados da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	130

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO 1: OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO A PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL

Tabela 1 - Matriz do delineamento composto central 2^3 com os níveis das variáveis reais e codificadas.....	48
Tabela 2 - Composição proximal das microalgas <i>Chlorella pyrenoidosa</i> e <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	50
Tabela 3 - Matriz do delineamento composto central 2^3 e a resposta grau de hidrólise utilizando <i>Chlorella pyrenoidosa</i> e <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 para os ensaios com as enzimas Protemax 580L, Protemax N200 e pepsina.	51
Tabela 4 - Análise de variância dos valores de grau de hidrólise dos hidrolisados de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> e <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 obtidos com Protemax 580L, Protemax N200 e pepsina a um nível de confiança de 95%.....	53
Tabela 5 - Equações obtidas para os modelos matemáticos a partir dos valores de grau de hidrólise das microalgas <i>Chlorella pyrenoidosa</i> e <i>Spirulina</i> sp.....	54

ARTIGO 2: OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS CONTENDO BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18

Tabela 1 - Composição proximal da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	73
Tabela 2 - Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 para a resposta grau de hidrólise.	74
Tabela 3 - Análise de variância para a avaliação da significância do modelo para a resposta.....	75
Tabela 4 - Atividade antioxidante dos hidrolisados de microalgas determinada pelo método do poder redutor, DPPH e ABTS ⁺	82

ARTIGO 3: OBTENÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa*

Tabela 1 - Composição proximal da biomassa de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99
--	----

Tabela 2 - Matriz do delineamento composto central rotacional 2 ² para a resposta grau de hidrólise.	99
Tabela 3 - Análise de variância para a avaliação da significância do modelo para a resposta.	100
Tabela 4 - Atividade antioxidante dos hidrolisados da microalga determinada pelo método do poder redutor, DPPH e ABTS ⁺	107

ARTIGO 4: OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Tabela 1 - Composição proximal das microalgas <i>Chlorella pyrenoidosa</i> e <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	123
Tabela 2 - Atividade antioxidante para biomassa de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> não hidrolisada e hidrolisada após os tratamentos.	126
Tabela 3 - Atividade antioxidante para biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 não hidrolisada e hidrolisada após os tratamentos de filtração.	127
Tabela 4 - Atividade antioxidante dos hidrolisados de <i>Chlorella</i> e <i>Spirulina</i> após filtração com Amicon® Ultra 0.5.	128
Tabela 4 - Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados após secagem em nano <i>spray dryer</i> B 90.	131

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 JUSTIFICATIVA.....	18
CAPÍTULO II	20
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
4.1 Microalgas.....	21
4.1.1 <i>Spirulina</i>	22
4.1.2 <i>Chlorella</i>	23
4.2 Proteínas.....	24
4.3 Proteases.....	26
4.4 Hidrólise de proteínas	27
4.4.1 Hidrólise Enzimática de proteínas	27
4.5 Peptídeos Bioativos (PBAs).....	29
4.6 Atividade antioxidante	31
4.7 Medida da atividade antioxidante	31
4.7.1 Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	32
4.7.2 Sequestro do radical ABTS.....	33
4.7.3 Poder redutor.....	34
4.8 Deliniamento Composto Central ou Planejamento fatorial	35
4.9 Nanobiotecnologia	35
4.9.1 Nano Spray Dryer	36
CAPÍTULO III.....	40
5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	41
ARTIGO 1: OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO A PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL.....	42
RESUMO	43
ABSTRACT.....	44
1 INTRODUÇÃO	45

2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Microalgas.....	46
2.2 Enzima	46
2.3 Atividade Enzimática.....	46
2.4 Composição Proximal	46
2.5 Delineamento experimental	47
2.6 Processo de Hidrólise Enzimática.....	48
2.7 Determinação do Grau de Hidrólise.....	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60
ARTIGO 2 : OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS CONTENDO BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 Microalga	67
2.2 Enzima	67
2.3 Composição Proximal	68
2.4 Hidrólise Enzimática.....	68
2.5 Determinação do Grau de Hidrólise.....	69
2.6 Delineamento composto central rotacional.....	69
2.7 Digestibilidade	70
2.8 Solubilidade Proteica	70
2.9 Capacidade de retenção de água	71
2.10 Eletroforese (SDS-PAGE)	71
2.11 Atividade Antioxidante	72
2.11.1 Poder Redutor	72
2.11.2 Capacidade de sequestro da radical livre DPPH.....	72
2.11.3 Captura do radical livre ABTS.....	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73

4 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
ARTIGO 3: OBTENÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>Chlorella</i> <i>pyrenoidosa</i>	89
RESUMO	90
ABSTRACT	91
1 INTRODUÇÃO	92
2 MATERIAL E MÉTODOS	93
2.1 Microalga e Enzima	93
2.2 Composição Proximal	93
2.3 Hidrólise Enzimática	94
2.4 Determinação do Grau de Hidrólise	94
2.5 Delineamento composto central rotacional	95
2.6 Digestibilidade	95
2.7 Solubilidade Proteica	95
2.8 Capacidade de retenção de água	96
2.9 Eletroforese (SDS-PAGE)	96
2.10 Atividade Antioxidante	97
2.10.1 Poder Redutor	97
2.10.2 Capacidade de sequestro da radical livre DPPH	97
2.10.3 Captura do radical livre ABTS	98
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4 CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS	109
ARTIGO 4: OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	114
RESUMO	115
ABSTRACT	116
1 INTRODUÇÃO	117
2 MATERIAL E MÉTODOS	118
2.1 Microalgas e Enzima	118
2.2 Atividade Enzimática	119

2.4 Hidrólise Enzimática.....	119
2.5 Determinação do Grau de Hidrólise.....	120
2.6 Purificação	120
2.6.1 Filtragem em Millipore	120
2.6.2 Centrifugação em membrana vertical Amicon® Ultra 0.5	121
2.7 Poder Redutor	121
2.8 Capacidade de sequestro da radical livre DPPH.....	122
2.9 Captura do radical livre ABTS.....	122
2.10 Secagem por Nano spray dryer B-90	122
2.11 Tamanho e morfologia das partículas	123
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
4 CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS	132
CAPÍTULO IV.....	136
6 CONCLUSÕES GERAIS	137
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	138
CAPÍTULO V	139
REFERÊNCIAS.....	140

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido a sua importância nutricional, econômica e ecológica (COSTA et al., 2006). São micro-organismos fotossintéticos capazes de produzir biomassa a partir de energia solar, CO₂ e nutrientes. As biomassa de microalgas e seus derivados apresentam aplicação em diversas áreas, como na utilização em suplementos para alimentação animal, nutrição humana, produção de fármacos (MOSTAFA, 2012), além de biocombustíveis (biometano, bioetanol e biodiesel).

A biomassa microalgal e os extratos obtidos de biomassa estão ganhando destaque no mercado mundial. O aumento na demanda de produtos de origem algal deve-se, principalmente, ao fato de apresentarem substâncias com efeitos antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados e proteínas imunologicamente efetivas (COHEN, 1997).

Spirulina e *Chlorella* são microalgas que possuem biomassa rica em proteínas com valores acima de 50%, apresentando grande potencial para a extração de biocompostos com alto valor agregado. Estas microalgas destacam-se por possuir o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*) o que garante o seu uso como alimento e fármaco (ANDRADE e COSTA, 2006). Dessa forma, estas microalgas apresentam grande potencial tanto para aplicação na alimentação, quanto para a extração de biocompostos.

As proteínas, além de fornecerem aminoácidos essenciais, são importante fonte de biopeptídeos. Na proteína precursora os peptídeos estão inativos e, para possuírem efeito fisiológico, precisam ser liberados. Esta liberação pode ser realizada hidrólise enzimática, através da ação de enzimas proteolíticas. Geralmente são compostos por cerca de 2-20 resíduos de aminoácidos por molécula e sua atividade baseia-se na respectiva composição e sequência destes resíduos (KORHONEN, 2009).

A hidrólise enzimática de proteínas celulares de microalgas tem sido descrita como um método muito promissor para melhorar a digestibilidade da proteína e para obter um produto equilibrado de proteína destinado à alimentação humana (WANG e ZHANG, 2012; MORRIS et al., 2011), além de gerar biocompostos. No entanto, poucos dados estão disponíveis na literatura sobre o uso da proteína de *Chlorella* e *Spirulina* em hidrolisados proteicos destinados a nutrição humana.

Os biopeptídeos podem apresentar diferentes funções no organismo, exercendo efeitos sobre os sistemas cardiovascular, digestivo, imunológico e nervoso. Algumas dessas biomoléculas apresentam propriedades antihipertensora, antitrombótica, antioxidante e

antimicrobiana (HARTMANN e MEISEI, 2007; KORHONEN, 2009). Os biopeptídeos já foram produzidos de diferentes fontes de proteínas, tais como: proteína de soja (GIBBS et al., 2004), proteína de pescado (KRISTINSSON e RASCO, 2000), proteína de leite (GOBBETTI et al., 2000) e proteína de *Spirulina* (NI et al., 2009; MA et al., 2007), cujos estudos mostraram o uso de diferentes proteases capazes de hidrolisar essas proteínas.

A nanobiotecnologia vem sendo amplamente estudada em diversas áreas de tecnologia, apresentando enormes inovações e potencialidades. Áreas importantes da nanobiotecnologia incluem a nanomedicina, a fisicamédica, o desenvolvimento de nanofármacos e a nanocosmectútica (BRUNE, 2006). Tais inovações fazem da nanobiotecnologia um campo de conhecimento e investigação dos mais promissores da atualidade (WEISS et al., 2006).

A secagem em nano *Spray dryer* (secagem por atomização), é uma técnica muito utilizada para obtenção de nanopartículas (Li et al., 2010; BÜRKI et al., 2011; PAUDEL et al., 2013). Esta técnica oferece algumas vantagens, como a reprodutibilidade para obtenção de nanopartículas, aplicabilidade tanto com materiais sensíveis quanto resistentes à temperatura, capacidade de processar diversas matérias primas e fácil e rápida operação do equipamento. Os fatores de formulação e os parâmetros de processo determinam as propriedades das partículas produzidas (RÉ, 2006).

Embora as proteínas da biomassa das microalgas *Spirulina* e *Chlorella* possuam elevada digestibilidade e serem rapidamente absorvidas pela circulação sanguínea, sabe-se que os hidrolisados proteicos, contendo biopeptídeos, são absorvidos numa velocidade maior, devido a isso é importante desenvolver estudos direcionados a obtenção de novas fontes de hidrolisados proteicos, os quais podem ser destinados para diversos fins. Este trabalho visou contribuir nestes estudos, utilizando a nanobiotecnologia para a obtenção de nanopartículas contendo peptídeos com atividade antioxidante, produzidos pela hidrólise enzimática de microalgas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir de nanopartículas contendo peptídeos bioativos a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella pyrenoidosa*.

2.2 Objetivos específicos

Testar três proteases comerciais na reação de hidrólise enzimática, tendo como substratos biomassas de *Spirulina* sp. LEB 18 ou *Chlorella pyrenoidosa*, selecionando o sistema reacional com amior grau de hidrólise;

Maximizar as condições de hidrólise nos sistemas reacionais selecionados, como temperatura, concentração da enzima e de substrato para a produção de hidrolisados proteícos com elevado grau de hidrólise utilizando a técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta;

Avaliação das propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos: solubilidade, capacidade de retenção de água e digestibilidade;

Avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos, utilizando diferentes métodos analíticos;

Obter nanopartículas (nanoesferas) de peptídeos bioativos através de secagem por atomização.

3 JUSTIFICATIVA

Os biopeptídeos são extraídos geralmente de proteínas de origem animal (leite e peixes) e vegetais superiores (soja), os quais muitas vezes necessitam ser processados e concentrados para obtenção de alto teor protéico. Já a biomassa de microalgas como *Spirulina* e *Chlorella* possuem elevada concentração de proteína e as condições de cultivo podem ser direcionadas para se obter maior concentração.

Devido ao elevado conteúdo de proteínas dessas microalgas, elas se tornam uma das principais razões para escolha destes organismos tão pouco convencionais como fontes de proteínas para obtenção de peptídeos com atividade antioxidante. Além disso, as microalgas *Spirulina* e *Chlorella* destacam-se das demais já estudadas por possuírem o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*), possibilitando desse modo, a aplicação dos peptídeos produzidos por essas fontes de proteínas em alimentos ou fármacos.

Os biopeptídeos obtidos a partir da biomassa de microalgas podem ser produzidos através de hidrólise enzimática das proteínas, a qual tem sido descrita como um método promissor para melhorar a digestibilidade destas proteínas, o que as tornam mais disponíveis para a nutrição humana.

As microalgas *Spirulina* e *Chlorella* vêm sendo estudadas quanto a sua utilização como suplemento alimentar e apresentando grande potencial para produção de compostos bioativos (GAD et al., 2011; GARCIA et al., 2012; CHAIKLAHAN et al., 2012; ZENG et al., 2012).

Desde 1996 o Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURG estuda o cultivo de microalgas, objetivando otimizar a produção de biomassa destes micro-organismos para extração de vários biocompostos como ácidos graxos, ficocianina e produção de biopolímero como o PHB, bem como para formulação de produtos alimentícios enriquecidos de *Spirulina* e produção de biocombustíveis.

Paralelamente a isso, a nanobiotecnologia vem ganhando espaço na produção científica e tecnológica no país, despertando interesse do setor empresarial. Esta tecnologia aplicada no contexto já existente no Laboratório de Engenharia Bioquímica vêm agregar valor aos bioprodutos obtidos e gerar conhecimento através da pesquisa. Desde 2008, a equipe do LEB aprovou 2 projetos de pesquisa na área de nanotecnologia, nos quais este estudo está inserido. O primeiro em 2008 intitulado Rede NANOFOTOBIOTEC – Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e

Formação de Recursos Humano, Edital 04/CII-2008 - REDE NANOBIOTEC BRASIL – CAPES e o segundo em 2010 intitulado Rede NANOFOTOBIOTEC – Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humano, Edital MCT/CNPq nº 74/2010 - Nanociência e Nanotecnologia. Esses projetos incluem parceria entre as seguintes Instituições: Universidade Federal do Rio Grande (FURG); University of Alaska Fairbanks - USA; Università Degli Studi Di Firenze – UniFi, Itália; Centro de Tecnologia Canavieira (CTC); Universidade Estadual de Londrina (UEL); Universidade Federal da Bahia (UFBA); Universidade de Passo Fundo (UPF); Fundação ZERI Brasil; Universidade Federal de Goiás – UFG; Universidade Federal do Rio Grande Do Sul - UFRGS; Universidade Federal do Pampa – Unipampa; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – IFETSC.

Devido à elevada biodiversidade das microalgas existentes, estas constituem uma fonte quase inexplorada de antioxidantes naturais. Estudos científicos sobre a atividade antioxidante de microalga e seus compostos bioativos são limitados, especialmente a respeito da capacidade antioxidante de peptídeos obtidos através hidrólise enzimática das proteínas de microalgas. Portanto, torna-se necessário estudar a possibilidade de obter antioxidantes naturais de novas fontes, como de microalgas.

CAPÍTULO II

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Microalgas

As microalgas podem ser encontradas em quase todos os ambientes da Terra, vivendo de forma isolada ou associada a outros organismos, como fungos e bactérias. Na maioria desses ambientes, seu papel é de produtor primário na cadeia alimentar, produzindo matéria orgânica a partir da luz solar, dióxido de carbono e água. A biomassa microalgal possui diversas aplicações, dentre elas a produção de biocombustíveis, alimentos, produção de cosméticos, medicamentos, dentre outras. Por um longo período, as microalgas foram colhidas de fontes naturais para o consumo de humanos e animais (GUALTIERI e BARSANTI, 2006).

As microalgas formam um grupo heterogêneo de organismos que englobam todos os micro-organismos fotossintetizantes, sejam eucarióticos ou procarióticos. São geralmente unicelulares, gram-negativos, coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos, e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos (OLAIZOLA, 2003). São micro-organismos fotossintéticos capazes de produzir biomassa facilmente a partir de energia solar, CO₂ e nutrientes. Biomassa de microalgas e seus derivados apresentam aplicação em diversas áreas, desde utilização em suplementos para alimentação animal à nutrição humana, fármacos (MOSTAFA, 2012), biocombustíveis (biometano, bioetanol e biodiesel), no tratamento de águas residuais e na produção de energia (RICHMOND, 2004).

A biomassa microalgal e seus extratos estão ganhando destaque no mercado mundial. O aumento na demanda de produtos de origem algal deve-se, principalmente, ao fato de apresentarem substâncias com efeitos antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados e proteínas imunologicamente efetivas (COHEN, 1999).

As microalgas, sob o ponto de vista biotecnológico, não constituem um grupo de micro-organismos muito estudados. Dentre as dez mil espécies de microalgas que se acredita existirem, pouco mais de mil linhagens são mantidas em coleções ao redor do mundo, apenas algumas centenas foram investigadas por seu conteúdo químico e, somente uma pequena quantidade tem sido cultivada em escala industrial. Por serem pouco exploradas, representam rica oportunidade para novas descobertas (OLAIZOLA, 2003).

O interesse na pesquisa por novas fontes proteicas não convencionais para aplicação na indústria alimentícia é cada vez maior. Recentemente, a biomassa de microalgas têm sido

proposta como uma fonte alternativa devido a seu elevado conteúdo de proteínas (GARCIA et al., 2012).

De acordo com Spolaore et al. (2006) o interesse no estudo das microalgas é resultado da sua importância em diversas cadeias tróficas e nas inúmeras possibilidades de aplicação. Excluindo as produtoras de toxinas, as microalgas são capazes de incrementar o conteúdo nutricional da alimentação e influenciar positivamente a saúde de humanos e animais, graças à sua composição química, que é rica em proteínas, grande variedade de aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos saturados e insaturados, vitaminas e pigmentos.

4.1.1 *Spirulina*

Spirulina é uma cianobactéria que tem despertado interesse de muitos pesquisadores devido ao seu elevado poder nutricional (SARADA et al., 1999). Possui biomassa rica em proteínas (50 a 70%), apresentando grande potencial para a extração de biocompostos com alto valor agregado (MORAIS et al., 2009).

As proteínas da microalga *Spirulina* contêm todos os aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, fenilalanina e valina) que representam 47% do peso total das proteínas (DILLON et al., 1995).

Desde 1981 a microalga *Spirulina* foi legalmente aceita pelo FDA (Food Drug Administration), como sendo fonte de proteínas, vitaminas e minerais, podendo ser legalmente comercializada como alimento ou complemento alimentar desde que precisamente qualificada, livre de contaminantes e de adulteração (FOX, 1996).

A *Spirulina* apresenta elevado conteúdo protéico e é considerada uma das fontes mais ricas de pró-vitamina A (beta-caroteno) e de ferro absorvível, além de apresentar altos níveis de vitaminas e outros minerais, compostos fenólicos, ficocianina, ácido gamalinolênico e outros ácidos graxos essenciais (VON DER WEID et al., 2000).

Dentre as vantagens de se cultivar *Spirulina* destaca-se a sua capacidade de duplicar a sua biomassa em 2 a 5 dias, além de possibilitar a obtenção da mesma quantidade de proteínas que as culturas tradicionais em áreas muito menores. Quando cultivadas em meios adequados, certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com teor protéico superior a 50% e alcançando produtividades de $30 - 50 \text{ g.m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ em peso seco (GOLDMAN, 1980).

Para a produção de biomassa com determinadas características desejadas, a composição do meio de cultivo é um fator fundamental. A deficiência de nutrientes no meio

pode fazer com que a microalga adapte seu metabolismo à nova condição. Em geral, as modificações no meio mudam a composição bioquímica da biomassa, principalmente a composição de proteínas, lipídeos e pigmentos (CAMPO et al., 2007).

Alguns trabalhos relatam o uso de *Spirulina* como estimulante dos mecanismos de reparo do DNA danificado por efeitos da radiação, atribuindo esta propriedade aos polissacarídeos da microalga. Alguns destes também apresentam ação imunoestimuladora e reguladora (ANDRADE, 2009).

Alguns estudos avaliaram a capacidade da microalga *Spirulina* de fixar CO₂ (MORAIS, 2006; MORAIS e COSTA, 2007; RADMANN, 2007), bem como a produção de compostos bioativos como biosurfactantes (RADMANN, 2011), o potencial antioxidante (GUARIENTI, 2009) e o enriquecimento de alimentos para esportistas com sua biomassa (CARVALHO, 2010).

4.1.2 *Chlorella*

A *Chlorella* é uma microalga verde eucariótica unicelular esférica do gênero das clorofíceas, e com diâmetro variando entre 5-10 µm, dependendo da espécie (ILLMAN et al., 2000). Encontrada espontaneamente em tanques e lagos, com elevada capacidade fotossintética. Além disso, esta microalga apresenta biomassa rica em proteínas, podendo atingir valores de 53%, grandes quantidades de vitaminas, minerais, fibras dietéticas e ácidos nucleicos podendo ser utilizada como suplemento alimentar. No entanto, as proteínas dessa microalga não são eficientemente digeridas pelo organismo humano, devido a essa microalga possuir parede celulósica (KO et al., 2012).

A microalga *Chlorella pyrenoidosa* é um dos suplementos para a saúde mais utilizados em países como Japão, Estados Unidos e países europeus. Em comparação com as plantas e outras algas verdes, *Chlorella pyrenoidosa* possui maior concentração de proteínas e clorofila além de conter grandes quantidades de vitaminas, minerais, fibras dietéticas e ácidos nucleicos, sendo que as proteínas da microalga incluem todos os aminoácidos essenciais para o crescimento e saúde humana (TAKEKOSHI et al., 2005).

A microalga *Chlorella* é unicelular e uma das mais completas em termos de aminoácidos, contém mais de 20 tipos de vitaminas e minerais, com destaque para beta-caroteno (precursor da vitamina A) e vitamina B12, difícil de ser obtida por meio de outros alimentos. Promove a desintoxicação orgânica, inclusive de metais pesados como o chumbo e cádmio, limina toxinas retidas nos tecidos orgânicos, provenientes de alimentação

industrializada, tem ação protetora contra agentes tóxicos, poluentes e contra diversos tipos de radiação, principalmente atômica e solar (raios ultravioletas). Sua alta concentração em clorofila indica que possui capacidade desintoxicante, e auxiliar no sistema digestivo. Pode ainda ser usado como auxiliar no controle da obesidade promovendo uma sensação de saciedade quando ingerida antes das refeições, além de fornecer elementos normalmente ausentes nos regimes de emagrecimento (SOUZA, 2008).

Espécies do gênero *Chlorella* são produzidas em massa para alimentação humana, sendo atualmente produzidas por mais de 70 empresas no mundo todo, onde a maior produtora mundial gera 400 ton de biomassa seca ao ano. Essa produção é inteiramente dedicada ao consumo humano, sendo comercializada nas formas de pílulas, em pó (para misturas em alimentos), sucos, extratos concentrados líquidos e barras gelatinosas. A produção mundial anual de *Chlorella* atinge mais de 2.000 ton ao ano. Foi a primeira microalga comercializada como pílulas formadas por biomassa em pó prensada para consumo humano, tendo ocorrido no Japão, em 1964 (LOURENÇO, 2006).

A microalga *Chlorella* apresenta alta capacidade de fixação de CO₂ (MORAIS e COSTA, 2007; RADMANN, 2007), produção de compostos bioativos como biossurfactantes (RADMANN, 2011) e produção de biocombustíveis como o bioetanol (MARGARITES, 2010).

4.2 Proteínas

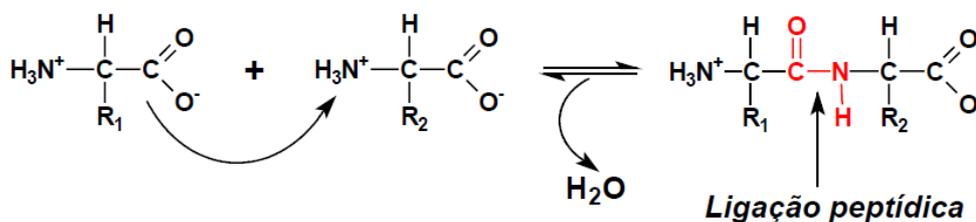
As proteínas são polímeros complexos, formados fundamentalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. São formadas de um grande número de unidades fundamentais chamadas de aminoácidos (compostas por 21 aminoácidos diferentes) que estão ligados entre si por ligações peptídicas (DAMODARAN et al., 2010).

Representam uma classe variada e heterogênea de macromoléculas, formadas por polipeptídeos de alto peso molecular. Quimicamente, dividem-se em proteínas simples, constituídas apenas de polipeptídeos, e complexas, que contém grupamentos adicionais, como carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos. Com relação à sua forma, dividem-se em duas grandes classes: proteínas globulares, caracterizadas pela presença de cadeias polipeptídicas dobradas ou envolvidas de maneira muito compacta, e a das proteínas fibrosas, altamente assimétricas e consistem de longas cadeias ou grupos de cadeias peptídicas (HARPER et al., 1982).

As inúmeras funções biológicas desempenhadas por proteínas não poderiam ser possíveis sem a complexidade de sua composição, o que dá origem a diversas formas estruturais tridimensionais, com diferentes funções biológicas. Para mostrar sua importância biológica essas macromoléculas foram chamadas de proteínas, nome que deriva da palavra *proteois*, que significa o primeiro tipo (DAMODARAN et al., 2010).

As proteínas pertencem à classe dos peptídeos, pois são formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Uma ligação peptídica é a união do grupo amina (-NH₂) de um aminoácido com o grupo carboxila (-COOH) de outro aminoácido, através da formação de uma amida (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica a partir de dois aminoácidos com distintas cadeias laterais (grupos R) na cadeia peptídica os aminoácidos são chamados de resíduos.



Fonte: DAMODARAN et al., 2010.

As proteínas são polímeros compostos por dois, três, “poucos” (aproximadamente de 1 a 10) e muitos aminoácidos, sendo conhecidos, respectivamente, como dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos e polipeptídeos. Os polipeptídeos possuem aproximadamente de 40 a acima de 4.000 resíduos de aminoácidos e têm massa molecular em torno de 4 a acima de 440 kDa (VOET, 2010).

Todas as proteínas são essencialmente compostas dos mesmos 20 aminoácidos primários; entretanto, algumas não contêm todos os 20. As diferenças de estruturas das milhares de proteínas surgem a partir do fato de que os aminoácidos são ligados entre si por meio de ligações peptídicas. Literalmente, bilhões de proteínas com propriedades únicas podem ser sintetizadas pela alteração da sequência de aminoácidos, do tipo de proporção dos aminoácidos e do comprimento da cadeia polipeptídica (DAMODARAN et al., 2010).

Todas as proteínas biologicamente produzidas podem ser utilizadas como proteínas alimentares. Entretanto, para efeitos práticos, as proteínas alimentares podem ser definidas como aquelas que apresentam fácil digestão, são atóxicas, adequadas no aspecto nutricional, funcionalmente utilizáveis em produtos alimentícios e disponíveis em abundância. No entanto, devido ao aumento crescente da população mundial, fontes não tradicionais de proteínas para a alimentação humana precisam ser desenvolvidas para atendimento de demandas futuras (DAMODARAN et al., 2010).

4.3 Proteases

As enzimas proteolíticas ou proteases são uma classe única de enzimas com capacidade de catalisar a quebra das ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas, possuem grande importância fisiológica e comercial. Essas enzimas causam reações irreversíveis, que do ponto de vista biológico podem ser importantes em processos fisiológicos, patológicos e tecnológicos. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptidases (BARRET et al., 2001).

Devido à grande diversidade e de atividade e estrutura as proteases não são inseridas nos sistemas gerais de nomenclatura de enzimas. Essa classe de enzimas é dividida segundo três critérios principais: quanto ao tipo de reação catalisada, exopeptidases (clivam ligações peptídicas nas extremidades das cadeias) e endopeptidases (clivam ligações no interior da cadeia); quanto a natureza química do sítio ativo, dividem-se em serina, aspartil, cisteína e metalopeptidases e quanto a relação evolutiva, onde são classificadas em famílias, de acordo com a convergência ou divergência de um ancestral em comum (BARRET et al., 2001).

As serina-proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina em seu sítio ativo, são amplamente distribuídas entre vírus, procariotos e eucariotos, apresentando funções diversas. Já as proteases aspártica, também conhecidas como proteases ácidas, são endopeptidases que dependem de resíduos de ácido aspártico para sua atividade catalítica, a maioria dessas proteases apresentam máxima atividade em baixos valores de pH. A atividade das cisteína proteases depende da presença de uma cisteína (Cys) e histidina (His) no sítio ativo, sendo que a ordem desses resíduos difere dentro das famílias. Por fim, as metaloproteases encontram-se na maioria dos organismos vivos e são as enzimas que apresentam maior diversidade de sítios ativos, podendo ser endopeptidase ou exopeptidase (BARRET et al., 2001; RAO et al., 1998)

As proteases provenientes de diferentes fontes são habitualmente utilizadas para se obter uma hidrólise mais seletiva, devido à alta especificidade destas enzimas em quebrar ligações peptídicas adjacentes gerando resíduos de aminoácidos (KHANTAPHANT e BENJAKUL, 2008).

4.4 Hidrólise de proteínas

A utilização de hidrolisados proteicos, em formulações específicas, é uma área de crescente interesse. Estes hidrolisados vêm sendo empregados na fabricação de alimentos especiais, para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção e pessoas com intolerância a proteínas (AKYIAMA et al. 2006).

A hidrólise proteica é denominada o processo de clivagem das ligações peptídicas, originando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. Este processo pode ser catalisado por ácidos, bases ou enzimas (hidrólise química ou enzimática).

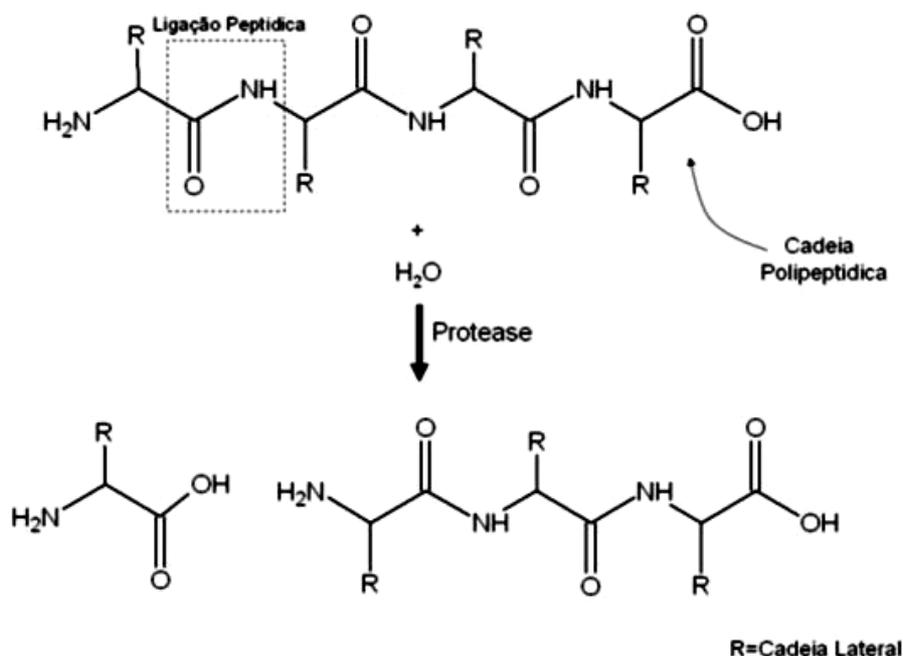
Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por três métodos: a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida. A utilização de proteases específicas apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação e o menor conteúdo de sal no hidrolisado final. Além disso, as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sendo desnecessária sua remoção (ZAVAREZE et al., 2009).

4.4.1 Hidrólise Enzimática

A hidrólise parcial de proteínas com o uso de enzimas proteolíticas (peptidases) é uma das estratégias para melhorar as propriedades funcionais de hidrolisados proteicos, como solubilidade, digestibilidade, dispersibilidade, formação de espuma e emulsificação, bem como a redução da alergenicidade (DAMODARAN et al., 2010).

Algumas enzimas são capazes de quebrar ligações peptídicas de cadeias protéicas, sendo denominadas assim de proteases. A representação de uma reação catalisada por essas enzimas pode ser verificada, na Figura 2, a qual mostra a hidrólise enzimática de ligações peptídicas em proteínas.

Figura 2 - Representação de uma hidrólise proteica catalisada por uma protease.



Fonte: DAMODARAN et al., 2010.

Nesta reação, para cada ligação peptídica clivada pela proteína, libera-se 1 mol de grupo carboxila e 1 mol de grupo amino. As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem do grau de hidrólise (DAMODARAN et al., 2010).

Os hidrolisados proteicos possuem muitos usos em alimentos para fins especiais, como alimentos geriátricos, formas infantis não alérgicas, bebidas para esportistas e alimentos dietéticos. Como podem ser digeridos com facilidade, devido à elevada digestibilidade, eles são muito aplicados em formulações infantis (DAMODARAN et al., 2010).

A introdução na dieta de hidrolisados ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar melhor utilização das proteínas, principalmente em determinadas situações como a que ocorre em indivíduos com intolerância alimentar, nos casos de deficiência enzimática (GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994).

Os hidrolisados protéicos têm sido utilizados em países desenvolvidos na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como os recém-nascidos prematuros, as crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção e fenilcetonúria e ainda para pessoas com alergia a determinadas proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos tem relação direta com a diminuição da imunogenicidade (FREITAS et al., 1993).

As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem do tipo de enzimas utilizadas em sua preparação. Isso deve principalmente às diferenças de tamanho e a outras

propriedades físico-químicas dos polipeptídeos liberados durante a hidrólise. Em geral, a solubilidade da maioria das proteínas depois da hidrólise aumenta, independentemente da enzima utilizada e quanto maior o grau de hidrólise das proteínas maior será a solubilidade (DAMODARAN et al., 2010).

Várias proteínas alimentares como de leite de vaca, proteína de soja, glúten, proteínas de ovo, proteínas de amendoim, entre outras, ocasionam várias reações alérgicas em crianças e adultos. Entre a população que é alérgica as proteínas do leite, cerca de 60% são alérgicos a caseína, 60-80% são alérgicos a β -lactoglobulina e 50%, à α -lactoalbumina. Entretanto os hidrolisados dessas proteínas possuem menor alergenicidade do que seus equivalentes naturais (CALDARELLI e RIOS, 2001).

A alergenicidade das proteínas intactas origina-se da presença de sítios antigênicos (epitopos) que se ligam à imunoglobulina E (IgE). Nos hidrolisados proteicos os epitopos são destruídos pela clivagem proteolítica. Dessa forma, os hidrolisados proteicos são a fonte preferida de proteína/aminoácidos para bebês e crianças que apresentam pré-disposição ou alto risco de desenvolvimento de reação alérgica às proteínas alimentares (CLAVER e ZHOU, 2005)

A redução na alergenicidade dos hidrolisados proteicos depende do tipo de protease utilizada. As proteases inespecíficas ou uma mistura de proteases são mais eficazes do que as de sítio específico, na redução da alergenicidade das proteínas. O grau de hidrólise das proteínas também exerce seu papel na redução da alergenicidade (DAMODARAN et al., 2010).

Em valores de grau de hidrólise (GH) de 3-6%, o tamanho médio dos peptídeos pode atingir de 2-5 kDa. Estes peptídeos costumam ser destinados para melhorar as propriedades físico-química de produtos alimentícios. GH acima de 8% com 1 a 2 kDa de tamanho de peptídeos com elevada solubilidade são utilizados para uso em produtos esportivos ou nutrição clínica, já os com GH mais extensivos (como 50-70%) com geração de peptídeos e aminoácidos menores que 1 kDa de tamanho médio são aplicados para uso em alimentos infantis e hipoalergênicos (DAMODARAN et al., 2010).

4.5 Peptídeos Bioativos (PBAs)

Compostos bioativos são constituintes extra nutricionais e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos. Para ser considerado bioativo, o componente da dieta

deve exercer um efeito biológico fisiologicamente significativo e a bioatividade deverá afetar a saúde de maneira benéfica (MOLLER et al., 2008)

PBAs ou bio-funcionais foram definidos inicialmente como componentes (genuínos ou liberados) de alimentos prontos para o consumo, capazes de exercer uma atividade reguladora no organismo humano, independentemente de seu valor nutritivo. Posteriormente, foram descritos como fragmentos específicos de proteínas com um impacto positivo nas funções ou condições corpóreas, podendo finalmente influenciar a saúde. Finalmente, como peptídeos com atividade similar a uma droga ou hormônio, que eventualmente modulam a função fisiológica ao se ligarem a receptores específicos da célula alvo, levando a indução de respostas fisiológicas (KORHONEN, 2009).

De acordo com Kittis e Weiler (2003) peptídeos são fragmentos de proteínas específicas que exercem um impacto positivo sobre algumas funções do corpo e dessa forma acabam influenciando a saúde.

Os PBAs contêm de 2 a 20 resíduos de aminoácidos por molécula e normalmente são inativos dentro da seqüência da molécula. Estudos têm identificado grande número de seqüências de PBAs nas proteínas do leite, além das condições para sua liberação. Muitos PBAs possuem propriedades biológicas específicas, que fazem desses componentes potenciais ingredientes de alimentos promotores de saúde. Além dos estudos envolvendo identificação e condições para a liberação dos PBAs, há também estudos mostrando que estes peptídeos exercem várias atividades biológicas “*in vitro*” e “*in vivo*” e que alguns deles possuem propriedades multifuncionais. Por administração oral, dependendo da seqüência de aminoácidos, os PBAs podem atuar nos principais sistemas: cardiovascular, digestivo, imune e nervoso (KORHONEN, 2009).

Alguns apresentam atividade antioxidante a qual está associada aos peptídeos presentes em determinadas seqüências da proteína, sendo que sua atividade baseia-se na respectiva composição e seqüência dos resíduos de aminoácidos (COSTA et al., 2007). Estes peptídeos com atividade antioxidante além de serem úteis para a saúde dos indivíduos também podem ser utilizados como antioxidantes naturais para a conservação de alimentos (NEVES et al., 2006).

Peptídeos com massa molecular inferior a 1 kDa e prevalecente de resíduos de aminoácidos aromáticos possuem maior capacidade antioxidante (BEERMANN et al., 2009).

Embora existam vários estudos a cerca da atividade antioxidante de biopeptídeos de diversas fontes de proteínas, mostrando a capacidade de sequestro de radicais livres, a inibição da peroxidação lipídica e quelação de íons metálicos, o mecanismo responsável pela

atividade antioxidante de peptídeos não está completamente esclarecido. As propriedades antioxidantes estão mais relacionadas à composição, estrutura e hidrofobicidade dos aminoácidos (SARMADI e ISMAIL, 2010).

4.6 Atividade antioxidante

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas para ajudar na manutenção da homeostase celular ou regulação de reações de redução e oxidação em tecidos saudáveis (DEVASAGAYAM et al., 2004). As ROS formados em baixas concentrações podem atuar de maneira benéfica em defesa contra agentes infecciosos e atuando na regulação do crescimento celular. A produção descontrolada de ROS ou a deficiência de mecanismo de defesa prejudicam o equilíbrio gerando o estresse oxidativo ou danos oxidativos. Assim, quando em concentração excedente ao normal, essas espécies podem causar efeitos potencialmente deletérios como danos celulares, ao atacar membranas, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos, com consequente alteração funcional e prejuízo das alterações funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos adiposo, vascular e cerebral, e órgãos, como músculo e fígado (MULLER et al., 2007).

Devido à incompleta eficiência de nosso sistema endógeno de defesa, que produz enzimas antioxidantes, a influência de fatores externos como poluição, fumo, radiação UV e a alimentação bem como o envelhecimento, obesidade e esquiemia, está estabelecida a importância de compostos antioxidantes provenientes da dieta que podem ajudar a suprir esta deficiência e também promover proteção, prevenção ou redução dos efeitos causados pelo estresse oxidativo (HUANG et al., 2005).

Segundo Chanput et al. (2009) antioxidantes são compostos que podem agir como doadores de hidrogênio, estabilizando os radicais livres que são formados naturalmente no metabolismo celular e que são responsáveis por diversas doenças degenerativas, como as cardiovasculares, diabetes e Alzheimer.

4.7 Medida da atividade antioxidante

Atualmente não existe um método padrão para determinação da atividade antioxidante de compostos. Devido a isso vários métodos vêm sendo usados para quantificar a capacidade

antioxidante, muitas vezes sendo utilizados em conjunto. Alguns métodos avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, ou medindo a inibição da oxidação, e outros métodos determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio (HUANG et al., 2005).

Segundo Campos et al. (2008) devido à variedade de mecanismos e locais de atuação é difícil definir qual o melhor método a ser empregado. Isso tem dificultado a comparação de resultados entre estudos.

Dentre os diversos métodos utilizados podem-se citar aqueles que medem a habilidade de um antioxidante de reduzir um radical livre por doação de hidrogênio ou elétron: ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio), TRAP (capacidade antioxidante total), ensaio com ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio), e ensaio do DPPH (1,1- difenil -2- picrilhidrazil). Esses métodos baseiam-se na habilidade do antioxidante de sequestrar o radical escolhido e impedir a reação do radical com o substrato. A avaliação da reação é feita por meio da medida da variação da absorbância. Pode ser medida a alteração da absorbância característica do próprio radical (como é o caso de ABTS e DPPH, cuja absorbância reduz à medida que vão sendo reduzidos) ou por meio da escolha de um padrão (HUANG et al., 2005).

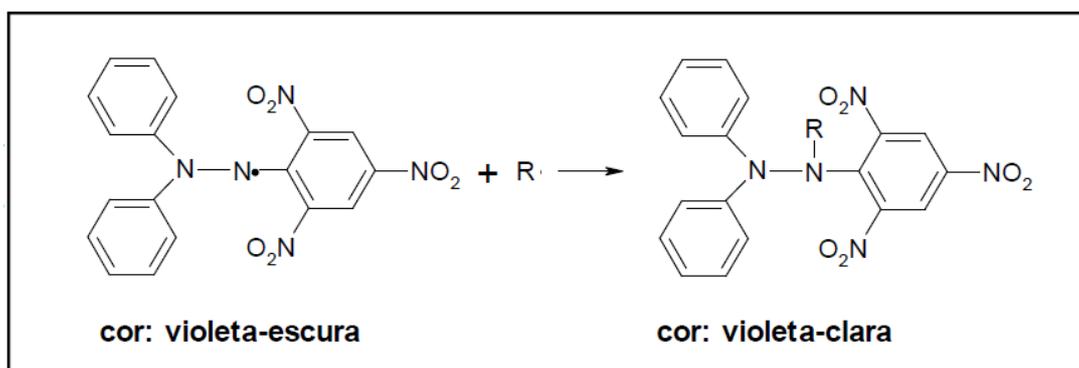
Para os testes de poder redutor e capacidade quelante de íons ferrosos é utilizado como parâmetro de avaliação a medida da absorbância. O método do poder redutor avalia a capacidade do antioxidante de reduzir íon ferricianeto a ferrocianeto (maior a absorbância, maior a capacidade antioxidante). Já a capacidade quelante de íons ferrosos baseia-se na medida da quelação do ferro disponível pelo antioxidante (maior a quantidade de ferro quelado, menor o número de íons disponíveis e maior a absorbância) (SANTOS et al., 2007).

4.7.1 Método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O teste de DPPH é um dos métodos indiretos mais antigos para se determinar a atividade antioxidante sendo sugerido originalmente em 1950 para avaliar os compostos doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos e alimentos, bem como amostras biologicamente relevantes (ROGINSKY e LISSI, 2005). Uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA et al., 1999).

Este método é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo redução da absorbância a 515 nm. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. A Figura 3 apresenta a estabilização do radical, em solução, com a adição do antioxidante.

Figura 3 - Estabilização do radical DPPH.



Fonte: RUFINO et al., 2007b.

O teste determina o potencial antioxidante de compostos presentes em alimentos e outras amostras biológicas. O método do DPPH avalia a capacidade do radical livre estável em reagir com compostos doadores de H^+ , o que pode interromper as reações oxidativas em cadeia (SANTOS et al., 2007).

4.7.2 Sequestro do radical ABTS

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (KUSKOSKI et al., 2005).

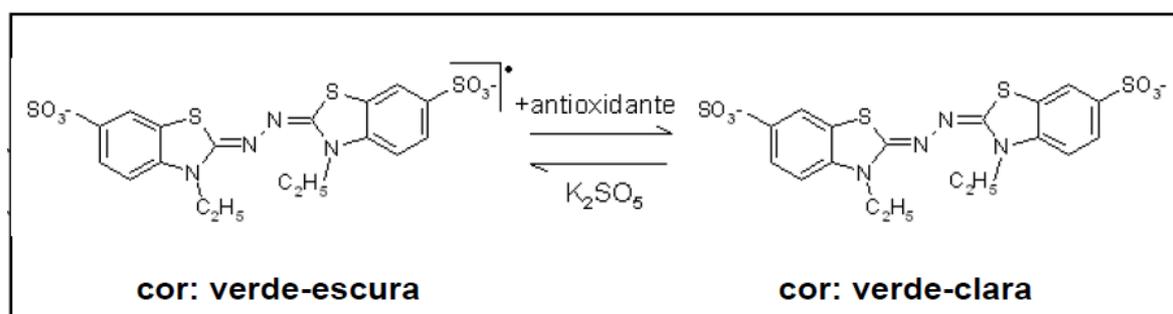
O método indireto do sequestro do radical $ABTS^+$ também é muito utilizado, e foi primeiramente sugerido por Miller et al. (1993). Assim como o radical DPPH, o $ABTS^+$ apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise. Porém, estes radicais apresentam algumas diferenças importantes. O radical DPPH já vem pronto para o uso e é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o $ABTS^+$ necessita ser gerado antes por reações químicas (como o persulfato de potássio) ou enzimáticas, e, é insolúvel tanto em água como

em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas (ARNAO, 2000).

Por meio da adição de persulfato de potássio, ocorre a formação do radical ABTS, que apresenta cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do $ABTS^+$ a ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional (KUSKOSKI et al., 2005). Os resultados são expressos em função do Trolox, um padrão antioxidante submetido às mesmas condições de análise.

A Figura 4 apresenta a reação de redução do radical $ABTS^+$ para ABTS em presença de um antioxidante.

Figura 4 - Estabilização do radical $ABTS^+$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: RUFINO et al., 2007a.

O teste da medida do sequestro do radical $ABTS^+$ pode ser determinado espectrofotometricamente, pois este radical apresenta forte absorção no intervalo de 600-750 nm, sem a presença de antioxidante é um radical estável.

4.7.3 Poder redutor

Os métodos baseados na redução do Fe^{+3} , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de compostos reduzirem o Fe^{+3} , com conseqüente formação de um complexo colorido com Fe^{+2} (ROGINSKI e LISSI, 2005).

É um método baseado na transferência de elétrons e mede a habilidade de um potencial antioxidante transferir um elétron a fim de reduzir radicais, metais ou carbonilas, o qual usa como indicativo a mudança de cor do oxidante (SUN e TANUMIHARDJO, 2007).

Conforme aumenta a capacidade dos compostos em doar elétrons para que a reação de redução ocorra, a solução fica mais escura. Portanto o aumento da absorvância indica maior potencial redutor da amostra (YEN e CHEN, 1995).

4.8 Delineamento Composto Central ou Planejamento fatorial

A metodologia de superfície de resposta se baseia no método do planejamento fatorial consistindo em grupo de técnicas utilizadas para estudar as relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente e um número de variáveis de entrada, ou variáveis independentes que podem ser controladas. Esta ferramenta vem sendo muito utilizada nos últimos anos, principalmente em processos bioquímicos, em que muitas variáveis devem ser estudadas (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O delineamento composto central é empregado para se obter as melhores condições operacionais de um sistema sob estudo, realizando-se menor número de experimentos quando comparado com o processo univariado de otimização do processo. Determina que fatores têm efeitos relevantes na resposta e, também, como este efeito varia com os níveis de outros fatores. Também, o planejamento fatorial permite medir as interações entre diferentes fatores. Essas interações são a principal componente de muitos processos de otimização. Sem o uso de planejamentos fatoriais de experimentos, importantes interações de fatores não são detectadas e a otimização máxima do sistema pode levar mais tempo para ser alcançada (BARROS et al., 2010).

Segundo Barros et al. (2010) a metodologia de Superfície de Respostas (MSR) é uma ferramenta eficiente para otimizar as propriedades dos alimentos. Baseia-se na variação simultânea de vários fatores (variáveis independentes), previamente selecionados por sua influência nas propriedades do processo (variáveis dependentes ou respostas). Utilizando técnicas matemáticas e estatísticas, os resultados experimentais indicam uma combinação de níveis dos fatores dentro de uma região ótima.

4.9 Nanobiotecnologia

Para Durán et al. (2006), a nanotecnologia significa de maneira geral, a habilidade de manipulação dos átomos na escala compreendida entre 0,1 e 100 nm, visando criar estruturas maiores fundamentalmente com nova organização estrutural e, normalmente com fins comerciais. Estas estruturas alteradas proporcionarão materiais nunca antes imaginados pelo

ser humano, além de que estes materiais modificarão de maneira complexa as formas de produção de empresas de todos os setores.

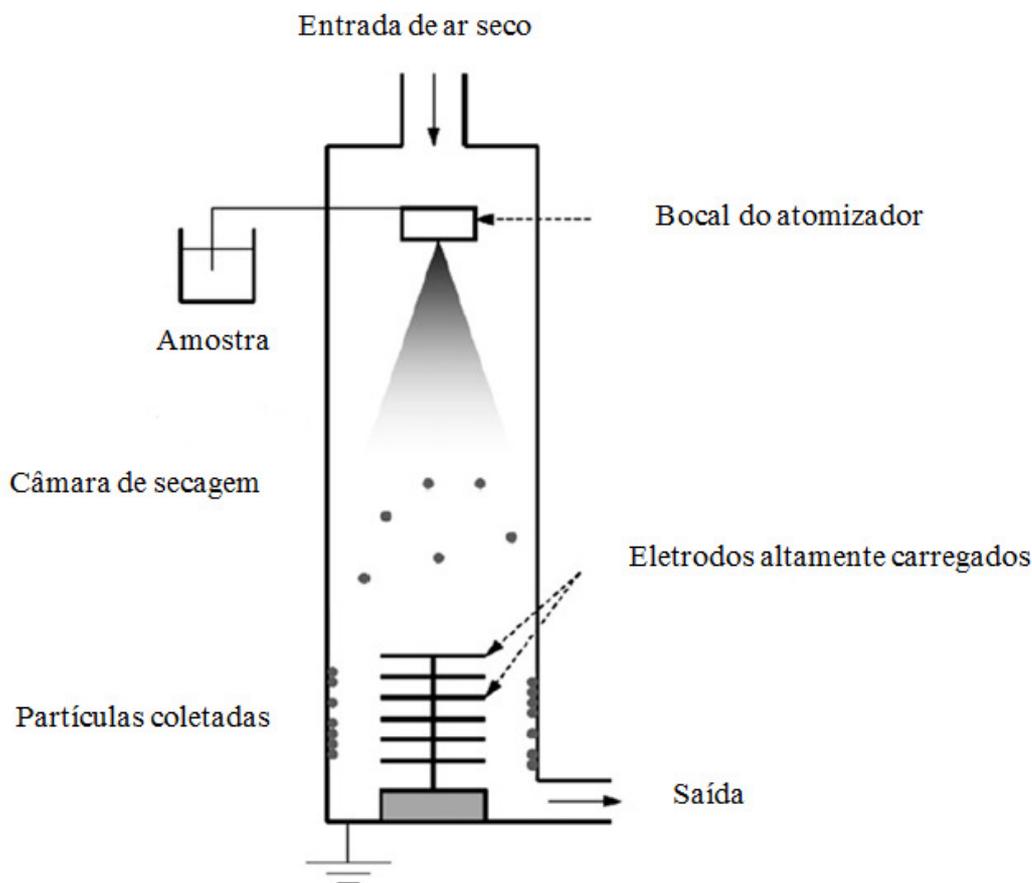
A nanobiotecnologia refere-se à fusão de duas abordagens de tecnologias, a biotecnologia e a nanotecnologia, apresentando grandes inovações e potencialidades. A nanobiotecnologia pode ser, portanto, definida como o estudo, processamento, fabricação e desenho de dispositivos orgânicos, nanomateriais para atuação biológica ou biomateriais, nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico. Áreas importantes da nanobiotecnologia incluem a nanomedicina (biologia molecular e genética), a física-médica (diagnóstico), o desenvolvimento de nanofármacos (fármacos encapsulados), além da nanocosmética (cosméticos com efeitos farmacológicos consideráveis). Uma das abordagens da nanobiotecnologia envolve o uso de sistemas biológicos como moldes (*templates*) no desenvolvimento de produtos novos na nanoescala (DURAN et al., 2006).

4.9.1 Produção de Nanopartícula através de Nano Spray Dryer

O princípio do *spray drying* consiste na atomização de uma solução, suspensão ou emulsão em pequenas gotículas, seguida de evaporação quase instantânea do líquido e resultando um pó, de baixa umidade. A natureza do pó é função de diversas variáveis incluindo a concentração inicial de soluto, a distribuição do tamanho das gotículas e a taxa de remoção do solvente (XIONG et al., 2006).

Na secagem por pulverização, uma solução da amostra (aquosa ou orgânica) é atomizada. Pequenas gotículas da amostra são evaporadas numa corrente de ar quente e seco para formar partículas. No entanto, a secagem por pulverização convencional, não é adequado para a produção de nanopartículas, porque estas são muito pequenas para serem recolhidos pelo ciclone (diâmetro de 1-2 μm) do secador de pulverização. Recentemente, um novo equipamento de escala de laboratório tornou-se disponível que é capaz de capturar as nanopartículas por um coletor eletrostático (Figura 5). Além disso, um atomizador é utilizado o que permite a produção de gotas mais finas (diâmetro médio de 5-7 μM , variando de tamanho podendo atingir 300 nm, dependendo do tamanho da abertura) (BURKI et al., 2011).

Figura 5 - Diagrama esquemático do nano *spray dryer*.



Fonte: BURKI et al., 2011.

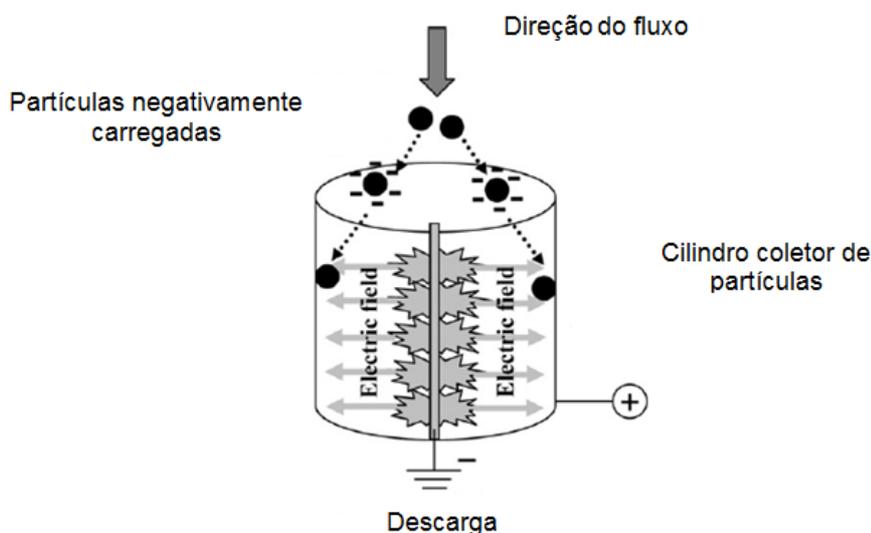
As partículas secas são separadas pela utilização de um coletor de partículas com eletrodos altamente carregados elevando as taxas de recuperação de partículas, mesmo para baixas quantidades de amostras. O Nano Spray Dryer pode ser utilizado, no desenvolvimento de produtos para uma variedade de aplicações, incluindo a secagem por pulverização de soluções, nanoemulsões, bem como transformações estruturais de microencapsulação em nanoencapsulação. O Nano Spray foi avaliado em alguns estudos para encapsulação de nanoemulsões (LI et al., 2010), bem como a secagem de produtos farmacêuticos (SCHMID et al., 2010). Recentemente, a secagem por atomização foi aplicada para a produção de nanopartículas de proteínas (LEE et al., 2011).

Embora o fluxo turbulento de um secador de pulverização promova maior eficiência de secagem devido a maior eficiência de transferência de calor, a exposição das partículas a temperaturas elevadas, por vezes, pode resultar em perda de atividade de materiais sensíveis ao calor. No Nano Spray Dryer, que opera com fluxo laminar, as taxas de aquecimento são

curtas devido a rápida evaporação do solvente mantendo baixa a temperatura do composto. Devido ao fluxo laminar, um suave aquecimento é possível, tornando assim o sistema extremamente ideal para produtos bioativos sensíveis ao calor. Além disso, a configuração vertical do secador por pulverização direta facilita a coleta das partículas, o que minimiza a aderência das partículas às paredes laterais do corpo permitindo rendimentos de captura das partículas mais elevados (LEE et al., 2011).

Em contraste com a tecnologia comum de ciclone, onde as partículas de tamanho menor que $2\ \mu\text{m}$ são dificilmente recuperadas, a separação de partículas no Nano Spray Dryer envolve a utilização de um precipitador eletrostático no qual o mecanismo de recolhimento é independente do tamanho das partículas. A coleta de partículas menores que $2\ \mu\text{m}$, com alta eficiência, é obtido com coletor de partículas eletrostático. Devido a presença de uma elevada tensão todo o coletor de partículas cria um campo eletrostático que acelera a deposição de partículas carregadas negativamente. Isto é seguido por uma descarga no processo. A Figura 6 ilustra o princípio de funcionamento de um coletor eletrostático de partículas no Nano Spray Dryer B-90 (LEE et al., 2011).

Figura 6 - Princípio de funcionamento de um coletor eletrostático de partículas no Nano Spray dryer B-90.



Fonte: BURKI et al., 2011.

É uma técnica de obtenção de nanopartículas relativamente simples e rápida, que permite a obtenção da forma final do bioproduto sem ter que ocorrer isolamento e recuperação ou eliminar resíduos de solventes.

CAPÍTULO III

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em 4 artigos científicos:

Artigo 1: Obtenção de hidrolisado proteico a partir de biomassa microalgal.

Artigo 2: Obtenção de hidrolisados proteicos contendo biopeptídeos com atividade antioxidante da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

Artigo 3: Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante através da hidrólise enzimática da biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.

Artigo 4: Obtenção de nanopartículas de peptídeos com atividade antioxidante.

**ARTIGO 1: OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO A PARTIR DE
BIOMASSA MICROALGAL**

OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO A PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL

RESUMO

Spirulina e a *Chlorella* são microalgas que possuem biomassa rica em proteínas com valores acima de 50%, apresentando grande potencial para a extração de biocompostos com alto valor agregado. A hidrólise enzimática de proteínas de microalgas tem sido descrito como um método muito promissor para melhorar a digestibilidade desta proteína e para obter um produto equilibrado de proteína destinado à alimentação humana. Este trabalho objetivou estudar a reação de hidrólise da biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18, utilizando-se proteases comerciais (Protemax 580L, Protemax N200 e pepsina) que atuam em diferentes faixas de pH, para obtenção de hidrolisados proteicos com potencial aplicação em alimentos ou suplementos alimentares, aumentando as características funcionais e nutricionais dos alimentos. Foram realizados 3 delineamentos compostos central para cada microalga em estudo. O delineamento utilizado foi do tipo 2^3 com três repetições no ponto central, variando-se a concentração de enzima (5 a 10 U.mL⁻¹), a concentração de substrato (5 a 10%) e o tempo de reação (60 a 240 min), totalizando 11 experimentos por planejamento. Os maiores graus de hidrólise 55,31% e 52,9% foram atingidos para as microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella pyrenoidosa*, respectivamente, foram obtidos após 4 h de reação, correspondendo ao sistema reacional composto por 10 U.mL⁻¹ de enzima (Protemax 580L) e 5% de substrato.

Palavras-chave: *Chlorella pyrenoidosa*, hidrólise enzimática, proteases, *Spirulina* sp. LEB 18.

OBTAINING PROTEIN HYDROLYSATE FROM MICROALGAL BIOMASS

ABSTRACT

Chlorella and *Spirulina* are microalgae having protein rich biomass with values above 50%, showing great potential for extracting biocompounds with high added value. Enzymatic hydrolysis of proteins from microalgae has been described as a promising method to improve the digestibility of this protein and to provide a balanced protein product for human consumption. This aim of this study was to assess the hydrolysis reaction of the biomass of *Chlorella pyrenoidosa* and *Spirulina* sp. LEB 18, using commercial proteases that act in different pH ranges, to obtain protein hydrolysates with promising application in food or food supplement, improving functional and nutritional food properties. Three central composite study designs were carried out for each microalga (*Chlorella* and *Spirulina*). The 2^3 type central composite design was utilized with three replications at the central point, varying the enzyme concentration (5 to 10 U.mL⁻¹), the concentration of substrate (5 to 10%) and reaction time (60 to 240 min), for a total of 11 experiments per planning. The highest degrees of hydrolysis (52.9% and 55.31%) for *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella pyrenoidosa*, respectively, were obtained with 4 h of reaction, corresponding to a reactional system consisting of 10 U.mL⁻¹ of enzyme (Protamax 580L) and 5% substrate. The results show that it is possible to obtain enzymatic protein hydrolysates with different DH from *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella pyrenoidosa* biomass.

Keywords: *Chlorella pyrenoidosa*; enzymatic hydrolysis; Proteases; *Spirulina* sp. LEB 18

1 INTRODUÇÃO

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido a sua importância nutricional, econômica e ecológica. Muitas microalgas são utilizadas para a produção de alimentos por produzirem diversas substâncias, como vitaminas, sais minerais, pigmentos, ácidos graxos e proteínas (COSTA et al., 2006).

Spirulina e a *Chlorella* são microalgas que possuem biomassa rica em proteínas com valores acima de 50%, apresentando grande potencial para a extração de biocompostos com alto valor agregado. Estas microalgas destacam-se por possuir o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*) o que garante o seu uso como alimento e fármaco (ANDRADE e COSTA, 2007).

A hidrólise enzimática de polímeros, em alimentos é um processo importante aplicado utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção das proteínas (GONZÁLES-TELLO et al., 1994). Hidrolisados proteicos têm sido constantemente relatados como fonte adequada de proteínas para a nutrição humana. Isto devido à absorção gastrointestinal ser mais eficaz do que quando são ingeridas proteínas intactas ou aminoácidos livres (MORRIS et al., 2011; SCHMIDT e MELLADO, 2009; MORRIS et al., 2007).

Muitos estudos científicos têm sido realizados, em diferentes condições experimentais, para obter hidrolisados de distintas fontes de proteína tais como: soro de leite (WELDERUFAEL et al., 2012, PUGLISI et al., 2012), pescado (HE et al., 2013; OVISSIPOUR et al., 2012) e frango (SCHMIDT e MELLADO, 2009). Recentemente, as proteínas de microalgas têm sido propostas como fonte alternativa devido a seu conteúdo abundante de proteínas e perfil de aminoácidos (GARCIA et al., 2012). Neste contexto, as microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella pyrenoidosa* por possuírem elevada concentração proteica em sua biomassa são fonte promissora de proteínas para obtenção de hidrolisados.

A hidrólise enzimática de polímeros celulares de algas verdes tem sido descrito como um método muito promissor para melhorar a digestibilidade da proteína e para obter um produto equilibrado de proteína destinado à alimentação humana (WANG e ZHANG, 2012; MORRIS et al., 2011). No entanto, poucos dados estão disponíveis sobre o uso da proteína de *Chlorella* e *Spirulina* em hidrolisados proteicos destinados a nutrição humana.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência das variáveis de processo envolvidas nas reações enzimáticas para a obtenção de hidrolisados proteicos para aplicação

em alimentos, utilizando três diferentes proteases comerciais que atuam em diferentes faixas de pH (alcalino, neutro e ácido), tendo como substrato biomassa microalgal de *Spirulina* e *Chlorella*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microalgas

As microalgas utilizadas para a obtenção dos hidrolisados proteicos foram *Chlorella pyrenoidosa*, adquirida em pó, produzida por Fuqing King Dnarmsa Co. Ltd., China e a microalga *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira (MORAIS et al., 2008) e produzida na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada as margens da Lagoa Mangueira (33° 30' 13''S e 53° 08' 59'' W) na cidade de Santa Vitória do Palmar, Brasil. A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi moída em moinho de bolas (Modelo Q298, QUIMIS) e peneirada.

2.2 Enzima

As enzimas utilizadas foram Protemax 580L de *Bacillus licheniformis*, Protemax N200 de *Bacillus subtilis*, (Prozyn, São Paulo, Brasil) e a pepsina de origem animal extraída de estômago de porco (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil).

2.3 Atividade Enzimática

A atividade enzimática das proteases comerciais foram determinadas segundo o método descrito por Ma et al. (2007). O conteúdo de tirosina do sobrenadante foi determinado por colorimetria a 650 nm via reagente de Folin-Fenol (LOWRY et al., 1951). A enzima foi inativada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 10% e a atividade definida como a quantidade de enzima que libera 1µg de tirosina por minuto, dentro das condições utilizadas no estudo.

2.4 Composição Proximal

As análises realizadas para a avaliação da composição proximal das microalgas foram proteína total, cinzas, umidade e lipídeos foram determinadas segundo métodos descritos pela AOAC, 2005. Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25. Cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600°C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105°C). Os lipídeos foram extraídos com 2:1 (v/v) clorofórmio/metanol, purificado com 0,9% (p/v) NaCl e a 2:1 (v/v) metanol/água misturados de acordo com Folch e Lees (1957) e transferidos para um evaporador rotatório sendo o solvente removido a aproximadamente 37 °C. O conteúdo de lipídeos foi determinado por gravimetria. Os carboidratos foram determinados por diferença.

2.5 Delineamento experimental

Neste estudo o planejamento experimental foi utilizado para verificar quais variáveis apresentaram efeitos significativos sobre o grau de hidrólise. Assim, foi estudada a influência da concentração de enzima, concentração de substrato e o tempo de reação. Foram realizados 6 delineamentos compostos centrais do tipo 2^3 com 3 repetições no ponto central, considerando como variável dependente o grau de hidrólise das proteínas (Tabela 1). As análises foram realizadas em duplicata e os níveis propostos para cada variável foram baseados em ensaios preliminares (dados não apresentados).

Tabela 1 - Matriz do delineamento composto central 2^3 com os níveis das variáveis reais e codificadas

Ensaio	CE (U.mL ⁻¹)	CS (%)	t (min)
1	-1 (5)	-1 (5)	-1 (60)
2	+1 (10)	-1 (5)	-1 (60)
3	-1 (5)	+1 (10)	-1 (60)
4	+1 (10)	+1 (10)	-1 (60)
5	-1 (5)	-1 (5)	+1 (240)
6	+1 (10)	-1 (5)	+1 (240)
7	-1 (5)	+1 (10)	+1 (240)
8	+1(10)	+1 (10)	+1 (240)
9	0 (7,5)	0 (7,5)	0 (150)
10	0 (7,5)	0 (7,5)	0 (150)
11	0 (7,5)	0 (7,5)	0 (150)

CE= concentração de enzima; CS= concentração de substrato; t= tempo

A influência das variáveis estudadas sobre a resposta grau de hidrólise foi avaliada estatisticamente de modo a fazer verificação de modelos empíricos através dos coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) com significância de 95%.

2.6 Processo de Hidrólise Enzimática

No processo de hidrólise enzimática foram realizados 6 planejamentos experimentais, denominadas de C1, C2 e C3, para a hidrólise utilizando como fonte de proteína *Chlorella pyrenoidosa*, e S1, S2 e S3 para as reações utilizando *Spirulina* sp. LEB 18. Os números representam o uso das diferentes enzimas em estudo (1: Protemax 580L, 2: Protemax N200 e 3: Pepsina), as biomassas foram previamente caracterizadas quanto à composição proximal (AOAC, 2005).

Os ensaios C1 e S1 foram realizados com a enzima Protemax 580L, em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5 a temperatura ótima de atividade da enzima de 60°C. Os ensaios C2 e S2 com a enzima Protemax N200, em tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,0 a temperatura ótima de atividade da enzima de 55°C e o ensaios C3 e S3 com a enzima pepsina, em tampão KCL-HCl 0,1 M pH 2,3 e a temperatura ótima de 37°C.

Todos os experimentos foram realizados com agitação de 180 rpm em “Shaker” (Certomat BS-1), em meio aquoso, com volume total correspondente a 100 mL nos reatores

do tipo frasco Erlenmeyer. As quantidades de enzima e de substrato adicionadas corresponderam ao estabelecido pelo planejamento fatorial realizado. As reações de hidrólise foram acompanhadas por até 4 h, sendo as enzimas inativadas termicamente em banho de 85° C por 10 min.

2.7 Determinação do Grau de Hidrólise

A análise de determinação do grau de hidrólise (GH) foi realizada em 0, 1, 2,5 e 4 h. Após transcorrido cada tempo, alíquotas de 1 mL de hidrolisado foram inativadas pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% e mantidas em repouso por 10 min. Posteriormente foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis no filtrado utilizando o método de Folin-Lowry, expresso em mg de albumina.

O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por Hoyle e Marrit (1994) com modificações, sendo expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado segundo a Equação 1.

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

onde o branco, PS_{t0} , correspondeu à quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25% antes da adição da enzima; PS_{tf} foi a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P_t foi a quantidade de proteína total na amostra determinada por micro Kjeldahl ($N \times 6,25$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de diferentes proteases tem por finalidade avaliar o comportamento da hidrólise em diferentes pH (alcalino, neutro e ácido) bem como possibilitar uma comparação entre proteases não existentes no trato gastrointestinal (TGI) humano, com a pepsina, para a obtenção de hidrolisados proteicos.

O elevado conteúdo de proteína de algumas microalgas é a principal razão para a seleção desses micro-organismos como fonte não convencional de proteínas. A composição

proximal média e o desvio padrão das microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18 utilizadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição proximal das microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18

Determinações	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (%)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (%)
Umidade	11,99±0,07	6,91±0,06
Proteínas	51,66±1,87	50,80±0,63
Cinzas	7,84±0,02	6,66±0,04
Lipídios	7,06±0,11	13,53±0,22
Carboidratos**	27,45±0,00	22,10±0,00

*resultados expressos como média e desvio padrão de três determinações

**determinados por diferença

A concentração de proteínas da biomassa das microalgas foi utilizada para calcular a quantidade de biomassa necessária para obter as suspensões de cada experimento estudado. Os valores encontrados de concentração de proteína para ambas as microalgas estudadas se assemelham aos encontrados em estudos anteriores (MORAIS et al., 2009), justificando a escolha adequada e o elevado potencial da biomassa desses micro-organismos para a produção de hidrolisados proteicos com alto valor agregado. A Tabela 3 apresenta a matriz delineamento composto central 2^3 com as variáveis reais e codificadas e a resposta grau de hidrólise correspondentes aos valores médios alcançados em cada experimento.

Tabela 3 - Matriz do delineamento composto central 2³ e a resposta grau de hidrólise utilizando *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18 para os ensaios com as enzimas Protemax 580L, Protemax N200 e pepsina.

Exp.	Valores codificados			Grau de Hidrólise (%)					
	CE	CS	tempo	Protemax 580L		Protemax N200		Pepsina	
	(U.mL ⁻¹)	(%)	(min)	C1	S1	C2	S2	C3	S3
1	-1	-1	-1	34,4	38,2	14,6	24,6	1,4	2,3
2	+1	-1	-1	34,8	42,7	18,7	24,4	2,3	2,8
3	-1	+1	-1	20,8	30,2	7,8	8,5	1,0	2,1
4	+1	+1	-1	25,2	33,9	10,3	12,2	1,6	1,9
5	-1	-1	+1	48,0	52,3	27,5	29,9	16,7	28,3
6	+1	-1	+1	52,9	55,3	29,8	35,3	18,3	31,8
7	-1	+1	+1	30,7	35,7	9,2	17,31	9,7	15,1
8	+1	+1	+1	34,0	42,1	16,3	22,8	10,6	16,7
9	0	0	0	32,5	49,7	13,1	27,3	8,6	8,2
10	0	0	0	33,0	48,8	12,6	26,6	8,5	8,2
11	0	0	0	33,6	49,7	12,7	26,1	8,4	8,1

*Exp. = experimento, CE = concentração de enzima, CS = concentração de substrato, t = tempo de reação, C1= Protemax 580L em *Chlorella pyrenoidosa*, C2= Protemax N200 em *Chlorella pyrenoidosa*, C3= pepsina em *Chlorella pyrenoidosa*, S1= Protemax 580L em *Spirulina* sp. LEB 18, S2= Protemax N200 em *Spirulina* sp. LEB 18, S3= pepsina em *Spirulina* sp. LEB 18.

Como podemos observar na Tabela 3 o grau de hidrólise (GH) apresentou variação de 1 % a 55,31 % dentre os experimentos estudados, isto pode ser explicado pela variedade de parâmetros utilizados na obtenção dos hidrolisados enzimáticos. O maior GH em todos os ensaios foi alcançado no experimento 6 em 4 h de reação, correspondendo ao sistema reacional composto por 10 U.mL⁻¹ de enzima e 5% de substrato. Schmidt e Salas-Mellado (2009) trabalhando com a mesma enzima no GH das proteínas do peito de frango, obtiveram variação de 20,93% a 57,42%. Zavareze et al. (2009) estudando a influência da ação de diferentes enzimas proteolíticas (Alcalase, Flavourzyme e Novozym) no GH da polpa de cabrinha (*Prionotus punctatus*), obtiveram valores entre 16,91% e 27,96% para os diferentes tempos de hidrólise.

Para as 3 enzimas em estudo observou-se que a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 demonstrou melhores resultados durante o processo. Estudos comparativos utilizando enzimas comerciais exógenas (Protemax 580L e Protemax N200) e enzima endógena (Pepsina) são dificilmente retratados, já que estas enzimas possuem diferentes condições ótimas de trabalho (pH, temperatura e tempo de atuação) e diferentes atividades específicas. Segundo Aspino et al. (2005), as enzimas têm sido comparadas através do uso das condições ótimas no processo em estudo utilizando dados fornecidos pelos fabricantes, sem levar em consideração que as condições ótimas devem depender também do substrato utilizado para a hidrólise. Neste estudo, ambas microalgas apresentam diferentes faixas de pH para seu crescimento, a *Spirulina* LEB – 18 cresce em meios de cultivo com pH alcalino na faixa de acima de 9,0 – 10,5 (MORAIS, RADMANN e COSTA, 2011; RADMANN et al., 2011; MORAIS et al., 2009; MORAIS et al., 2008) e *Chlorella pyrenoidosa* é cultivada em pH ao redor de 6,5-9,0 (KOTHARI et al., 2012; WANG et al., 2012).

Resultados baixos de grau de hidrólise foram observados com o uso de pepsina, podendo ter sido ocasionado pelo baixo pH do meio reacional gerando uma possível desconformação na estrutura da proteína dificultando assim a ação da enzima. Outro possível fator que influenciou o resultado do grau de hidrólise das proteínas pode ser associado as diferenças entre o pH ótimo de atuação da enzima pepsina e o pH de cultivo de ambas microalgas. Portanto, quando a reação de hidrólise foi realizada utilizando a enzima Protemax 580 L que atua em pH alcalino obteve-se os maiores valores de grau de hidrólise para ambas as microalgas em estudo.

A maioria dos experimentos com *Chlorella pyrenoidosa* como fonte de proteínas, apresentaram valores de grau de hidrólise menores do que os experimentos com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Este comportamento do grau de hidrólise em relação a matéria prima pode ser devido ao maior teor de lipídeos presentes na *Chlorella* (91,64 % maior do que o teor encontrado na *Spirulina*). Segundo Slizyte et al. (2009), a quantidade de lipídeos na matéria prima influencia o processo de hidrólise, devido a que uma quantidade relativamente elevada poderia formar complexos proteína/lipídeo, que podem ser mais resistentes à quebra enzimática.

Os dados obtidos nos planejamentos experimentais foram tratados por métodos estatísticos, permitindo a obtenção de seis modelos matemáticos codificados lineares de primeira ordem. Para avaliar se os modelos obtidos eram preditivos, realizou-se a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 4, para o GH das proteínas hidrolisadas de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18, obtidos com as 3 enzimas em estudo.

Tabela 4 - Análise de variância dos valores de grau de hidrólise dos hidrolisados de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18 obtidos com Protemax 580L, Protemax N200 e pepsina a um nível de confiança de 95%.

Resposta GH (%)	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F Calculado	F Tabelado
C1	Regressão	761,55	2	380,77	50,63	4,46
	Resíduos	60,21	8	7,52		
	Total	821,76	10			
C2	Regressão	400,07	2	200,03	14,80	4,46
	Resíduos	108,93	8	13,50		
	Total	509,00	10			
C3	Regressão	354,45	3	118,15	227,21	4,35
	Resíduos	3,69	7	0,52		
	Total	358,14	10			
S1	Regressão	273,06	1	273,06	6,49	5,12
	Resíduos	378,5	9	42,05		
	Total	651,56	10			
S2	Regressão	515,89	2	257,94	23,43	4,46
	Resíduos	88,13	8	11,01		
	Total	604,02	10			
S3	Regressão	1057,5	3	352,5	48,48	4,35
	Resíduos	50,92	7	7,27		
	Total	1108,42	10			

Através dos resultados observou-se que todos os modelos foram preditivos e na Tabela 5 são apresentadas as equações que descrevem o grau de hidrólise, em função das variáveis independentes significativas ($p < 0,05$). Os resultados foram analisados através do SS residual. Para todas as respostas o F calculado apresentou valores superiores ao valor tabelado. Segundo Bruns et al. (2010) quando obtém-se $F \text{ calculado} \geq F \text{ tabelado}$ podemos validar estatisticamente o modelo ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Equações obtidas para os modelos matemáticos a partir dos valores de grau de hidrólise das microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp.

Resposta	Equação do modelo preditivo	R ²
C1 (%)	$= 34,51 + 1,66CE - 7,49CS + 6,25t + 0,36CE*CS + 0,48CE*t - 1,67 CS*t$	0,9847
C2 (%)	$= 15,72 + 1,99CE - 5,88CS + 3,92t + 0,40CE*CS + 0,35CE*t - 2,09 CS*t$	0,9202
C3 (%)	$= 7,91 + 0,49CE - 1,96CS + 6,13t - 0,12CE*CS + 0,12CE*t - 1,70 CS*t$	0,9960
S1 (%)	$= 43,20 + 2,38CE - 5,73CS + 4,95t + 0,16CE*CS + 0,31CE*t - 1,54 CS*t$	0,8155
S2 (%)	$= 23,18 + 1,81CE - 6,67CS + 4,47t + 0,49CE*CS + 0,92CE*t - 0,39 CS*t$	0,9143
S3 (%)	$= 11,41 + 0,67CE - 3,67CS + 10,35t + 0,32CE*CS + 0,60CE*t - 3,40CS*t$	0,9608

*Valores em negrito representam significância a 95% de confiança.

A partir dos modelos obtidos foi possível obter as superfícies de resposta para estabelecer as melhores condições de concentração de substrato, concentração de enzima e tempo de reação que proporcionam o maior GH das proteínas. As superfícies de resposta estão apresentadas na Figura 1 (*Chlorella pyrenoidosa*) e 2 (*Spirulina* sp. LEB 18).

Nas Figuras 1 e 2 podem ser observadas as superfícies de respostas obtidas para as interações das variáveis estudadas nos planejamentos com a microalga *Chlorella pyrenoidosa*: C1, C2 e C3; e para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18: S1, S2 e S3.

Apesar da Protemax 580L, Protemax N200 e da pepsina se tratarem de enzimas distintas por atuarem em condições ótimas de pH e temperatura diferentes, estes estudos apresentaram comportamento semelhante de suas variáveis, podendo desse modo serem analisados em conjunto.

Figura 1- Superfícies de resposta do GH em relação as variáveis independentes concentração de substrato, concentração de enzima e tempo de reação: (a), (b) e (c) superfícies de respostas para a microalga *Chlorella* com Protemax 580L; (d), (e) e (f) representam as superfícies de respostas para a microalga *Chlorella* e Protemax N200; (g), (h) e (i) representam as superfícies de respostas para microalga *Chlorella* com pepsina.

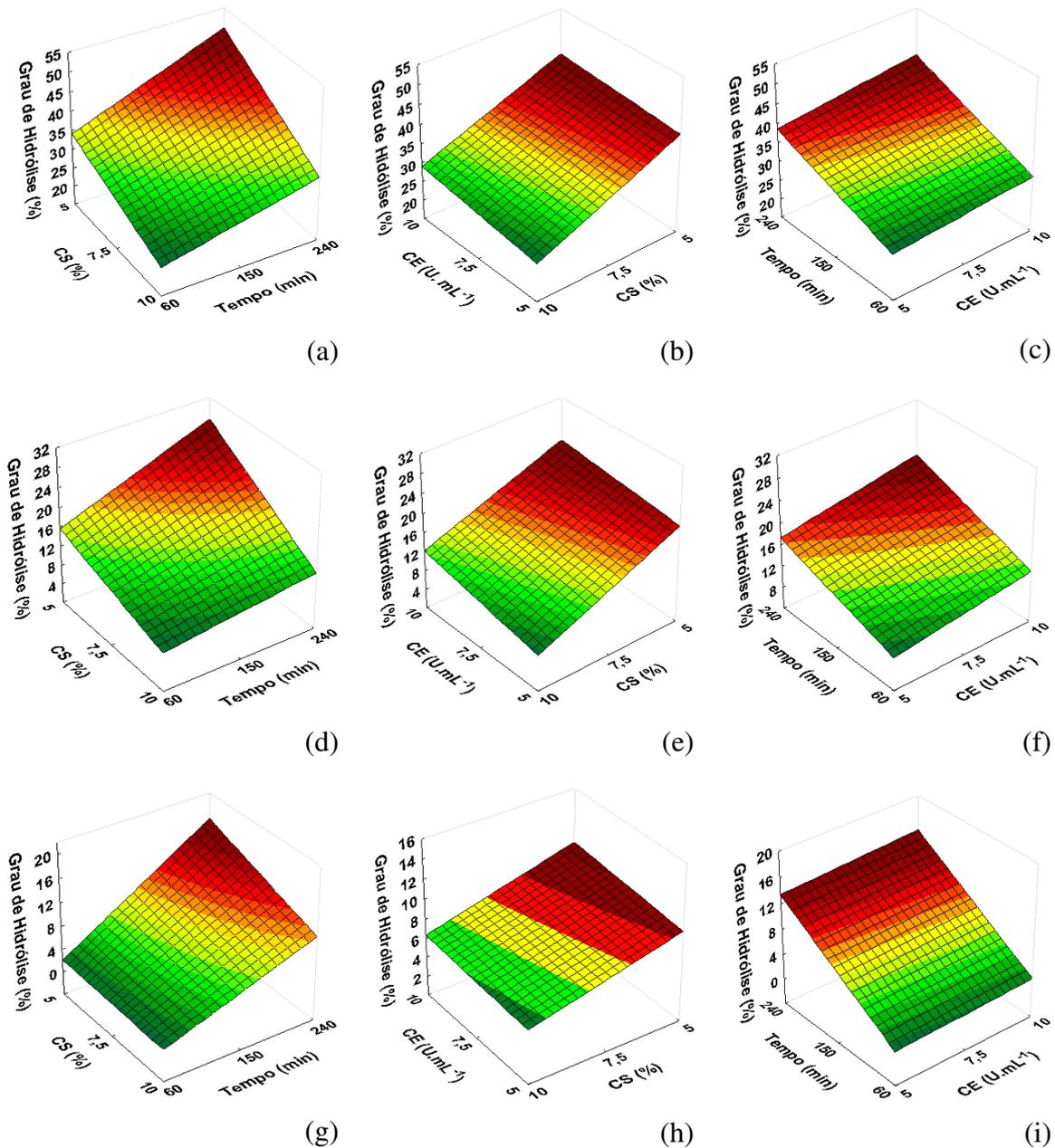
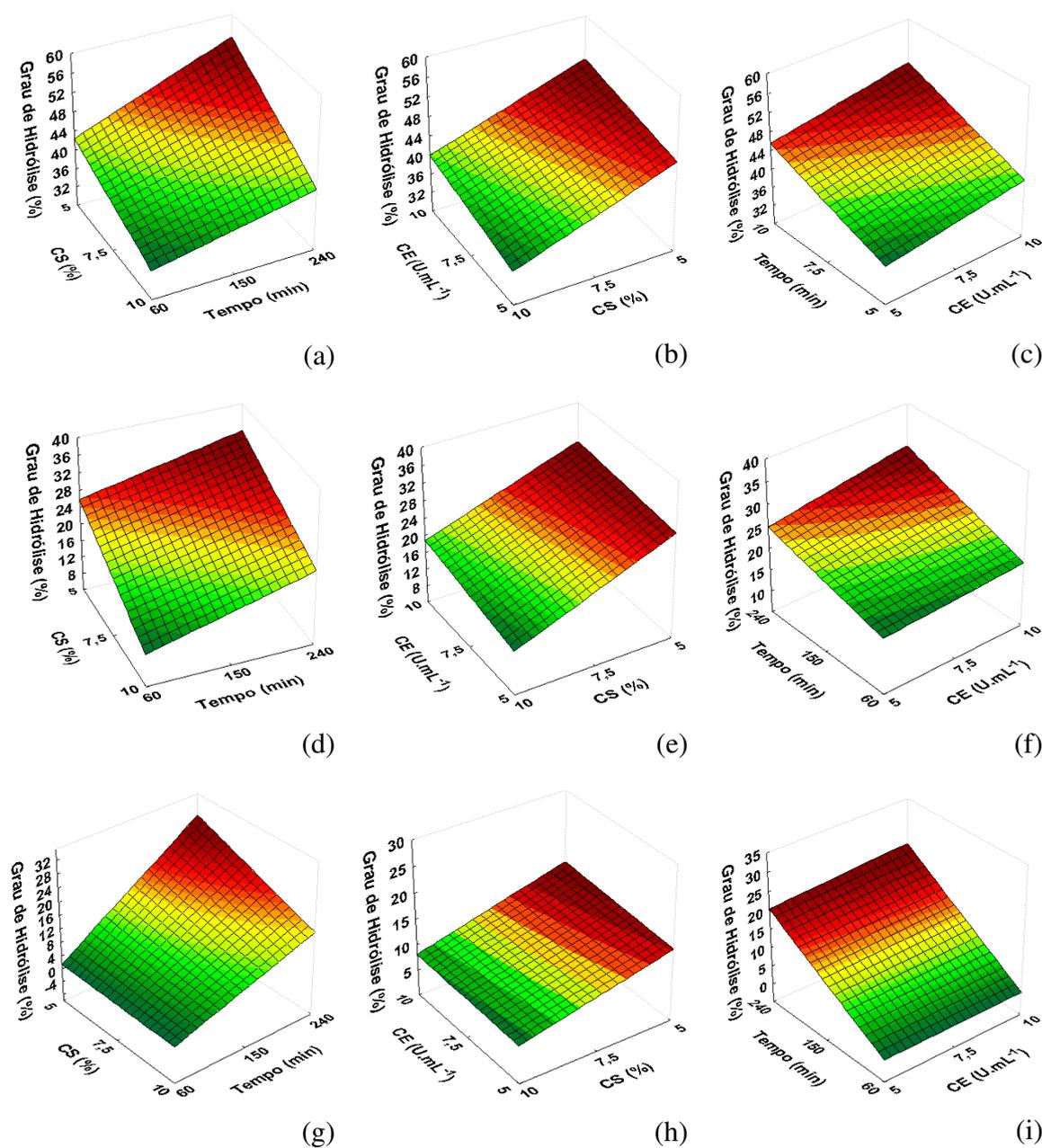


Figura 2 -Superfícies de resposta do GH em relação às variáveis independentes: concentração de substrato, concentração de enzima e tempo de reação: (a), (b) e (c) superfícies de respostas para a microalga *Spirulina* com Protemax 580L; (d), (e) e (f) representam as superfícies de respostas para a microalga *Spirulina* e Protemax N200; (g), (h) e (i) representam as superfícies de respostas para micrialga *Spirulina* com pepsina.



Nas Figuras 1a, 1d, 1g, 2a, 2d e 2g pode-se verificar que com o incremento da concentração de substrato nos diferentes níveis de tempo de reação avaliados houve redução do GH das proteínas, para ambas microalgas estudadas. Também foi observado que a

influência da concentração de substrato foi mais pronunciada nos planejamentos que se utilizou como fonte de proteína a microalga *Spirulina* sp. LEB 18, podendo atingir valores de 56% de GH (Figura 2a). A concentração de substrato é um dos fatores que pode afetar a taxa inicial de hidrólise enzimática da proteína. Altas concentrações do substrato podem causar inibição pelo produto formado, uma vez que a atividade enzimática das enzimas envolvidas neste estudo pode ser inibida pelo produto formado durante a hidrólise. Por outro lado, pode-se esperar competição, pelo sítio ativo da enzima, entre o substrato original e os peptídeos que são continuamente liberados durante o processo de hidrólise. Considera-se inibidor cada acil-terminal produzido após a hidrólise de uma ligação peptídica, o qual pode se ligar ao sítio ativo da enzima, formando um complexo acil-enzima.

Santos e colaboradores (2009) estudando o grau de hidrólise das proteínas da cabrinha (*Prionotus punctatus*) e corvina (*Micropogonias furnieri*) verificaram um efeito negativo para a concentração de substrato. Resultados semelhantes foram encontrados por Schmidt e Salas-Mellado (2009) que estudaram o grau de hidrólise das proteínas da carne de frango.

O aumento da concentração de substrato, para a Figura 1b e 2b, gerou redução no GH para toda a faixa de concentração de enzima estudada, atingindo aproximadamente 50% de GH e 56% quando utilizou-se 5% de concentração de substrato, respectivamente. Conforme mostram as Figuras 1e, 1h, 2 e 2h pode-se verificar que com o aumento da concentração de enzima de 5 U.mL⁻¹ para 10 U.mL⁻¹, bem como a redução da concentração de substrato de 10% para 5% gerou um pequeno aumento no GH, podendo este atingir valores superiores a 30% (Figura 1e) e 36% (Figura 2b). A concentração de enzima não influenciou a resposta de modo significativo e quando esta variável é avaliada em conjunto com outra variável estudada, como a concentração de substrato, esta interação gera aumento na resposta GH.

Nas Figuras 1c, 1f, 1i, 2c, 2f e 2i pode-se observar que o aumento da concentração de enzima apresentou um efeito positivo, mas não significativo nos planejamentos estudados, era esperada uma relação positiva da concentração de enzima com a resposta, porém observou-se que esta variável não apresentou efeito significativo na faixa de concentração estudada (5 U.mL⁻¹ para 10 U.mL⁻¹), já a interação entre esta variável com o tempo de reação (60 min para 240 min) gerou um aumento no grau de hidrólise até 54% (Figura 1c) para hidrolisados com *Chlorella* e 56% (Figura 2c) para hidrolisados de *Spirulina*. O aumento da concentração de enzima resulta em maior cisão das cadeias protéicas, aumentando a quantidade de proteínas de menor tamanho molecular e também o GH do produto obtido, que com o aumento da concentração de enzima aumentou, mas não de forma significativa. No entanto, se não houver

inibição pelo produto, o aumento da concentração de enzima somente acelerará a reação, mas atingirá o mesmo GH com uma concentração mais baixa de enzima.

O efeito do tipo de enzima foi avaliado com o intuito de se obter o hidrolisado com o maior percentual de grau de hidrólise para aplicação em alimentos comparando enzimas de origem microbiana com a pepsina (origem animal) enzima existente no trato gastrointestinal humano. A relação enzima e substrato (E:S) foi analisado levando-se, em consideração a redução dos custos do processo para adaptação em grande escala. Assim, o emprego de uma menor relação E:S está associado à utilização de menor quantidade de enzima necessária para hidrólise e também a utilização de menor concentração da matéria-prima.

A concentração de substrato foi a variável mais importante do processo global. O valor negativo de seu coeficiente significou que o grau de hidrólise das proteínas das microalgas em estudo foi favorecido em valores de concentração de substrato de 5%. Outras variáveis que apresentaram significância foram o tempo de reação e a interação entre a concentração de substrato e tempo de reação. Nestes casos quanto se trabalhou com o maior tempo de reação e com a menor concentração de substrato foram obtidos maiores resultados de grau de hidrólise.

Quando foi aumentada a concentração de substrato, esta gerou um efeito inibidor na hidrólise das proteínas, tal comportamento foi observado em todos os experimentos. Este tipo de inibição causada pela elevada concentração de substrato, conforme Whitaker (1994), comporta-se como uma competição entre moléculas de substrato, pois uma segunda molécula de substrato se liga a um local próximo ao sítio ativo da enzima, reduzindo a velocidade inicial de reação, impedindo que a primeira molécula se ligue corretamente ao sítio ativo ou que ela seja transformada em produto.

Muitas enzimas atuam preferencialmente sobre um único substrato, ou sobre vários, mas, neste caso, com reduzida eficiência. Segundo Tauber (1949), a pepsina hidrolisa proteínas intactas, mas não algumas proteínas como queratina, mucinas, e hidrolisa lentamente albumina. Para os planejamentos experimentais que utilizou-se a enzima pepsina a variável que mais influenciou o processo foi o tempo de reação, o que não foi observado para os outros experimentos. Logo, o fato do grau de hidrólise apresentar maior resultado quando trabalhou-se com maiores tempos de reação é justificada pela lenta hidrólise das proteínas da biomassa de ambas microalgas.

As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem do tipo de enzimas utilizadas em sua preparação. Isso deve principalmente às diferenças de tamanho e a outras propriedades físico químicas dos polipeptídeos liberados durante a hidrólise (DAMODARAN et al., 2010).

A hidrólise enzimática das proteínas resulta em uma mistura de aminoácidos livres, di-, tri- e oligopeptídeos, aumenta o número de grupos polares e a solubilidade do hidrolisado e, portanto, modifica as características funcionais das proteínas, o que geralmente melhora a qualidade funcional (SCHMIDT e SALAS-MELLADO, 2009). Como as enzimas pepsina, Protemax N200 e Protemax 580L apresentam diferentes especificidades, hidrólises com estas enzimas irão produzir hidrolisados proteicos com diferentes perfis de peptídeos. Os hidrolisados obtidos com estas enzimas, mesmo possuindo valores semelhantes de GH (entre as enzimas Protemax N200 e 580L), poderão ter um perfil peptídico muito distinto.

As microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. vêm sendo estudadas devido ao seu alto teor proteico, podendo ser utilizadas como fonte de proteínas, sendo que essas proteínas incluem todos os aminoácidos essenciais para o crescimento humano e para a saúde. A hidrólise enzimática de proteínas é importante na obtenção de produtos proteicos que podem ser utilizados em suplementos alimentares, aumentando as características funcionais e nutricionais dos alimentos. Esses hidrolisados proteicos são digeridos e absorvidos mais facilmente pelo organismo humano do que proteínas intactas. A ingestão de hidrolisados ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar melhor utilização das proteínas, principalmente em indivíduos com alergias a determinadas proteínas ou com intolerância alimentar, nos casos de deficiência enzimática.

4 CONCLUSÃO

Para as 3 enzimas em estudo observou-se que a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 gerou melhores resultados durante o processo, sendo que a enzima Protemax 580L apresentou-se mais eficaz na hidrólise das proteínas de ambas microalgas estudadas.

As variáveis que mais influenciaram o processo, foram a concentração de substrato e o tempo de reação, sendo que a concentração de enzima foi a menos pronunciada. A análise estatística dos resultados mostrou um efeito negativo para a concentração de substrato e um efeito positivo para o tempo de reação e concentração de enzima no grau de hidrólise.

A produção de hidrolisados proteicos com uma ampla faixa de grau de hidrólise como os obtidos neste estudo, podem ser utilizados como ingredientes para alimentos destinados a indivíduos com alergias a determinadas proteínas ou com intolerância alimentar. Os resultados apresentados mostram que é possível obter hidrolisados proteicos enzimáticos, com diferentes GH, a partir de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella pyrenoidosa*.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, p.130–134, 2007.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**, 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international. 17.ed. Washington, D.C.
- ASPMO, S. I., HORN, S. J., EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v.40, p.1957–1966, 2005.
- BRUNS, R.E., NETO, B.B., SCARMINIO, I.S. **Como fazer experimentos**. Porto Alegre. 4.ed. Editora Artmed, pp.414, 2010.
- COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.61c, p.105-110, 2006.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K. L., FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. São Paulo. 4. Ed. Editora Artmed. pp.900, 2010.
- 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.
- GARCIA, J. M. R., FERNANDEZ, F. G. 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.
- GONZÁLES-TELLO, P., CAMACHO, F., JURADO, E., PÁEZ, M. P., GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, p.523-528, 1994.
- HE, S., FRANCO, C., ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, p.289–297, 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.
- KOTHARI, R., PATHAK, V. V., KUMAR, V., SINGH, D. P. Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production. **Bioresource Technology**, v.116, p.466–470, 2012.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal of Biological 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.

- 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., RADMANN E. M., COSTA, J. A. V. Biofixation of CO₂ from synthetic combustion gas using cultivated microalgae in three-stage serial tubular photobioreactors. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.66, p.313-318, 2011.
- MORAIS, M. G., REICHERT, C. C., DALCANTON, F., DURANTE, A. J., MARINS, L. F., COSTA, J. A. V. Isolation and cultivation of a new strain of *Arthrospira* from Mangueira Lagoon in Southern Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p.144-150, 2008.
- MORRIS, H. J., CARRILLO, O., ALMARALES, A., BERMÚDEZ, R. C., LEBEQUE, Y., FONTAINE, R., LLAURADÓ, G., BELTRÁN, Y. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.456–460, 2007.
- MORRIS, H. J., CARRILLO, O., ALMARALES, A., BERMÚDEZ, R. C., LEBEQUE, Y., FONTAINE, R., LLAURADÓ, G., BELTRÁN, Y. Oral Administration of an Enzymatic Protein Hydrolysate from the Green Microalga *Chlorella vulgaris* Enhances the Nutritional Recovery of Malnourished Mice. **Journal of Medicinal Food**, v.12, p.1583–1589, 2011.
- OVISSIPOUR, M., KENARI, A. A., MOTAMEDZADEGAN, A., NAZARI, R. M. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellow fin Tuna (*Thunnus albacares*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p.696-705, 2012.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, p.15-23, 1995.
- PUGLISI, I., PETRONE, G., PIERO, A. R. L. Role of actinidin in the hydrolysis of the cream milk proteins. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, p.449–452, 2012.
- RADMANN, E. M., CAMERINI, F. V., SANTOS, T. D., COSTA, J. A. V. Isolation and application of SOX and NOX resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v.52, p.3132–3136, 2011.
- SANTOS, S. D., MARTINS, V. G., SALAS-MELLADO, M., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v.32, p.72-77, 2009.
- SCHMIDT, C. G., SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v.32, p.1144-1150, 2009.
- SLIZYTE, R., MOZURAITYTE, R., MARTINEZ-ALVAREZ, O., FALCH, E., FOUCHEREAU-PERON, M., RUSTAD, T. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v.44, p.668–677, 2009.
- TAUBER, H. **The chemistry and technology of enzymes**. Journal Wiley. New York. Editora Wiley, 1949.

WANG, H., XIONG, H., HUI, Z., ZENG, X. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggy wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, v.104, p.215–220, 2012.

WANG, X., ZHANG, X. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v.126, p.307–313, 2012.

WELDERUFAEL, F. T., GIBSON T., METHVEN L., JAUREG, P. Chemical characterisation and determination of sensory attributes of hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis of whey proteins following a novel integrative process. **Food Chemistry**, v.134, p.1947–1958, 2012.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2.ed. New York. Editora Marcel Dekker, 1994.

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

**ARTIGO 2 : OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS CONTENDO
BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA *Spirulina*
sp. LEB 18**

OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS CONTENDO BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18

RESUMO

A *Spirulina* vem sendo comercializada em diversos países devido à sua aplicação em alimentos, principalmente pelo seu elevado conteúdo de proteínas. Os hidrolisados proteicos possuem propriedade fisiológica bastante importante, estes têm uma absorção gastrointestinal mais efetiva, quando comparada às proteínas intactas, ou mesmo à ingestão de aminoácidos livres. O objetivo deste trabalho foi obter diferentes hidrolisados enzimáticos a partir da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 verificando suas propriedades funcionais e seu potencial antioxidante. Realizou-se um delineamento composto rotacional do tipo 2^2 com pontos centrais, totalizando 11 ensaios, onde variou-se a concentração de substrato e tempo de reação. As reações hidrólise da biomassa de *Spirulina* com a enzima Protamax 580 L foram realizadas em tampão pH 9,5 à 180 rpm de agitação e temperatura constante de 60°C. A hidrólise enzimática das proteínas aumentou a digestibilidade, solubilidade, a capacidade de retenção de água e a capacidade antioxidante dos hidrolisados, verificando deste modo a obtenção de peptídeos biologicamente ativos da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

Palavras-chave: Atividade antioxidante, hidrolisado proteico, *Spirulina*

**OBTAINMENT OF PROTEIN HYDROLYSATES CONTAINING BIOPEPTIDES
WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MICROALGAE *Spirulina* sp. LEB 18**

ABSTRACT

Spirulina is being marketed in several countries due to its application in food, mainly to its high protein content. Protein hydrolysates have very important physiological property, they have a more effective gastrointestinal absorption as compared to the intact proteins, or to ingestion of free amino acids. The aim of this study was to obtain different enzymatic hydrolysates from biomass of *Spirulina* sp. LEB 18 checking its functional properties and its antioxidant potential. Was carried out a composite design type 2^2 with central points, totaling 11 trials, which was varied substrate concentration and reaction time. The reactions of *Spirulina* biomass hydrolysis with the enzyme Protamax 580 L were performed in pH 9.5 buffer at 180 rpm stirring and a constant temperature of 60 °C. Enzymatic hydrolysis increased the digestibility of the proteins, solubility, water holding and antioxidant capacity of the hydrolysates, checking thereby obtaining biologically active peptides biomass of microalgae *Spirulina* sp. LEB 18.

Keywords: antioxidant activity, protein hydrolysate, *Spirulina*

1 INTRODUÇÃO

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido a sua importância nutricional, econômica e ecológica (COSTA et al., 2006). São micro-organismos fotossintéticos capazes de produzir biomassa facilmente a partir de energia solar, CO₂ e nutrientes de corpos aquáticos. Biomassas de microalgas e seus derivados apresentam aplicação em diversas áreas, desde utilização em suplementos para alimentação animal à nutrição humana e fármacos (MOSTAFA, 2012). Por produzirem diversas substâncias, tais como vitaminas, sais minerais, pigmentos, proteínas e lipídios, apresentam vantagens na aplicação em alimentos.

A microalga *Spirulina* possui biomassa rica em proteínas com valores acima de 50%, apresentando grande potencial para a extração de biocompostos com alto valor agregado. Esta microalga destaca-se por possuir o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*) o que garante o seu uso como alimento e fármaco (ANDRADE e COSTA, 2007; MORAIS et al., 2010).

Recentemente esta microalga tem sido alvo de extensa pesquisa, quanto à extração de ficocianina e benefícios causados pela ingestão deste biocorante (WALTER et al., 2011; KUMAR et al., 2011; CHAIKLAHAN et al., 2012; ZENG et al., 2012), elaboração de alimentos enriquecidos com sua biomassa (FIGUEIRA et al., 2011; LEMES et al., 2012; RABELO et al., 2013), tratamento biológico de efluentes (MEZZOMO et al., 2010; MENG et al., 2012), preparo de nanofibras (MORAIS et al., 2010), efeitos benéficos à saúde proporcionados pela ingestão de sua biomassa (PEIRETTI e MEINERI, 2011; NAH et al., 2012; ZOTTE et al., 2013) e biofixação de CO₂ (RAMANAN et al., 2010; ZHAO et al., 2011; ZENG et al., 2012; CHEN et al., 2012). Alguns estudos têm relatado a *Spirulina* como fonte de antioxidantes naturais (COLLA et al., 2007 e GAD et al., 2011).

Microalgas são fontes de substâncias terapêuticas, especialmente cianobactérias. Esse grupo tem sido identificado como um dos maiores grupos de organismos em que produtos naturais biologicamente ativos podem ser isolados (MOSTAFA, 2012). Entre as cianobactérias, a *Spirulina*, por apresentar elevado teor de proteínas em sua biomassa é um alvo interessante para busca de peptídeos bioativos para alimentos funcionais com atividade antioxidante.

A atividade antioxidante pode estar associada aos peptídeos bioativos presentes em determinadas sequências da proteína, os quais são liberados após a hidrólise enzimática (COSTA et al., 2007). Na proteína precursora estes são inativos e, para possuírem efeito

fisiológico, precisam ser liberados, podendo ser produzidos através da ação de enzimas proteolíticas derivadas de animais ou plantas. Geralmente são compostos por cerca de 2 a 20 resíduos de aminoácidos por molécula e sua atividade baseia-se na respectiva composição e sequência destes resíduos (KORHONEN, 2009).

Estudos com hidrolisados de diferentes fontes protéicas vem sendo realizados de modo a avaliar sua função biológica, tais como: propriedades biológicas de hidrolisados de pescado (GALLA et al., 2012; CHALAMAIAH et al., 2012; BUENO-SOLANO et al., 2009; WANG et al., 2013), potencial biológico de chia (SEGURA-CAMPOS et al., 2013), atividade antioxidante de hidrolisado de farelo de arroz (CHANPUT et al., 2009) e de hidrolisado de proteína de milho (ZHOU et al., 2012). Hidrolisados de caseína de leite foram estudados recentemente, quanto à capacidade de reduzir o desenvolvimento de hipertensão e promover benefícios cardiovasculares (SÁNCHEZ et al., 2011). Outras proteínas hidrolisadas de leite e proteínas hidrolisadas de soja foram avaliadas pela habilidade em ativar enzima CCK, importante estratégia para tratamento da obesidade (STALJANSSENS et al., 2012).

Em função disto, o objetivo deste trabalho foi obter diferentes hidrolisados enzimáticos a partir da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 verificando seu potencial antioxidante e suas propriedades funcionais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microalga

A microalga utilizada para a obtenção dos hidrolisados proteicos foi a *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira (MORAIS et al., 2008) e produzida na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada as margens da Lagoa Mangueira (33° 30' 13''S e 53° 08' 59'' W) na cidade de Santa Vitória do Palmar, Brasil. A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 seca, foi moída em moinho de bolas (Modelo Q298, QUIMIS) e peneirada.

2.2 Enzima

Foi utilizada a enzima Protemax 580L uma serino endopeptidase de origem bacteriana de *Bacillus licheniformis* (Prozyn, São Paulo – SP). A atividade da enzima foi definida como a

quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina por minuto, dentro das condições usadas no estudo, segundo o método descrito por Ma et al. (2007).

2.3 Composição Proximal

As análises realizadas para a avaliação da composição proximal das microalgas foram proteína total, cinzas, umidade e lipídeos foram determinadas segundo métodos descritos pela AOAC, 2005. Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25. Cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C). Os lipídeos foram extraídos com 2:1 (v/v) clorofórmio/metanol, purificado com 0,9% (p/v) NaCl e a 2:1 (v/v) metanol/água misturados de acordo com FOLCH e LEES (1957) e transferidos para um evaporador rotatório sendo o solvente removido a aproximadamente 37 °C, o conteúdo de lipídeos foi determinado gravimetricamente. Os carboidratos foram determinados por diferença.

2.4 Hidrólise Enzimática

O sistema reacional foi composto pela enzima Protemax 580 L e pela biomassa de *Spirulina*, previamente caracterizada quanto a composição proximal (AOAC, 2005), em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5 , totalizando 100 mL. Os erlenmeyer foram dispostos em “shaker” (Certomat BS-1) com agitação de 180 rpm e temperatura constante de 60 °C, temperatura ótima de atividade da enzima, para todos os experimentos. Ao término da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 10 min. Após foram congelados por 24 h a -70 °C e liofilizados durante 48 h. Os hidrolisados proteicos de *Spirulina* foram acondicionados em recipientes herméticos até a realização de análises posteriores.

A quantidade de biomassa foi determinada pelo delineamento composto central rotacional estabelecido, assim como o tempo de reação. A quantidade de enzima adicionada foi fixa, igual a 5%, devido ao estudo feito anteriormente, no qual a variável concentração de enzima não apresentou efeito significativo na resposta grau de hidrólise (GH), dados não apresentados.

2.5 Determinação do Grau de Hidrólise

Depois de transcorrido o tempo de acordo com o delineamento composto central rotacional para cada ensaio, alíquotas de 1 mL de hidrolisado foram inativadas pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% e deixadas em repouso por 10 min. Posteriormente foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis no filtrado utilizando o método de Folin-Lowry, expresso em mg de albumina. O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por HOYLE e MERRIT (1994) com modificações, sendo expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado segundo a Equação 1.

$$\%GH = \frac{(PS_{tempo\ t} - PS_{tempo\ 0}) \times 100}{P_{total}} \quad (1)$$

onde o branco, $P_{S\ tempo\ 0}$, correspondeu à quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25% antes da adição da enzima; $P_{S\ tempo\ t}$ foi a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P_{total} foi a quantidade de proteína total na amostra determinada por micro Kjeldahl ($N \times 6,25$).

2.6 Delineamento composto central rotacional

Em estudo anterior foi utilizado um delineamento composto central do tipo 2^3 , (capítulo III, artigo 1), com três repetições no ponto central, sem pontos axiais, para verificar quais variáveis apresentaram efeitos significativos sobre o grau de hidrólise. As variáveis analisadas foram concentração de enzima, concentração de substrato e o tempo de reação. Assim foi observado que a concentração de enzima não influenciou significativamente a resposta grau de hidrólise. Foi realizado um novo delineamento composto central do tipo 2^2 , com três repetições no ponto central e com pontos axiais, totalizando 11 experimentos. Utilizou-se a mesma concentração de enzima (5%) para todos os ensaios. O teor inicial do substrato e o tempo de reação foram as variáveis estudadas através do delineamento composto central rotacional. O grau de hidrólise das proteínas da biomassa foi considerado como variável dependente. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados da análise

estatística, aplicados aos dados experimentais de grau de hidrólise, foram determinados por SS residual.

A influência da concentração de substrato e do tempo de reação sobre a resposta grau de hidrólise foi avaliada estatisticamente de modo a fazer análise de efeitos e verificação de modelos empíricos através dos coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA).

2.7 Digestibilidade da proteína

A digestibilidade *in vitro* das proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, e de seus hidrolisados dos ensaios 3 e 6 (ensaio 3 corresponde ao ensaio que apresentou maior grau de hidrólise e o ensaio 6 menor GH) foi realizada conforme Akesson e Stahmann (1964). Esses ensaios foram analisados de modo a verificar a relação do grau de hidrólise com a digestibilidade. Cerca de 1g de amostra foi hidrolisada com 10 mL de uma solução de pepsina em pH ácido a 37 °C por 3 h sob agitação. Em seguida centrifugou-se a 5000 rpm por 15 min e filtrou-se as soluções, armazenado-se o sobrenadante sob refrigeração. Foi adicionado ao precipitado 10 mL de uma solução de pancreatina em pH neutro, deixando-se reagir por 24 h a 37 °C em agitação contínua. Para interrupção da reação, utilizou-se de 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30%. Completou-se o volume com TCA 5% e centrifugou-se e filtrando-se as soluções. A quantificação de proteína solúvel foi determinada pelo método de Folin-Lowry tomando-se 0,5 mL da solução hidrolisada pela pepsina e 0,5mL da solução hidrolisada pela pancreatina. A tirosina foi empregada como padrão de referência.

2.8 Solubilidade Proteica

A solubilidade proteica foi determinada através do método de Morr et al. (1985) com variação de pH na faixa de 3 a 11. Uma amostra de 500 mg foi homogeneizada com 2 mL de solução de NaCl 0,1M obtendo uma pasta homogênea. A seguir adicionou-se 40 mL de tampão fosfato em pH 3, 5, 7, 9 e 11, a suspensão foi mantida sob agitação por 45 minutos em agitador magnético e o volume foi completado em balão volumétrico de 50 mL. Após a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos e no sobrenadante foi determinado a concentração de proteínas solúveis pelo método de LORRY et al. (1951) A porcentagem de proteína solúvel foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$P.S (%) = \frac{[A \text{ (mg/mL) } 50]}{[W \text{ (mg) } S]} \times 100 \quad (2)$$

$$\frac{100}{100}$$

Sendo:

P.S = teor de proteínas solúveis presentes na amostra [%];

A = concentração proteica do sobrenadante [mg/ml];

W = peso da amostra [mg];

S = concentração de proteína na amostra [%].

2.9 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com o método de REGENSTEIN et al. (1984), com algumas modificações. Dispersões proteicas a 1% foram homogeneizadas com 2 mL de solução de NaCl 0,1M e 38 mL de tampão fosfato em pH 3, 5, 7, 9 e 11. A dispersão proteica foi submetida à agitação por 15 min e centrifugada a 5000 rpm por 25 minutos. A CRA foi expressa em volume de água retida pela quantidade de proteína total presente na amostra (mL de água/g de proteína).

2.10 Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese (SDS–PAGE) foi baseada no método de Laemmli (1970). Eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poli(acrilamida) foi realizada em um sistema tampão contínuo: tampão tris 1,5 M e SDS 10% (p/v). O gel foi preparado com 12% de gel de separação e 4% em gel de concentração. A análise de eletroforese foi realizada em uma unidade de eletroforese vertical (GSR/ 300STS). Em tubo de ensaio foi adicionado 0,2% de proteína em 1,5 mL de água destilada, com posterior adição de 1,5 mL de tampão tris 0,5 M para que ficasse na proporção de 1:1(p/p) e em seguida os tubos foram agitados em Vórtex até a dissolução das amostras. Uma alíquota de 1 mL de amostra foi pipetado para o *ependorff* e adicionado 100µL de β-mercaptoetanol. Os *ependorffs* com as amostras foram colocados em água fervente por 4 min para desnaturar as proteínas. Após arrefecimento foram adicionadas 3 gotas de azul de bromofenol. Uma alíquota de 20 µL de amostra foi colocada em cada espaço de corrida (poço) e foi adicionado 10 µL de SDS. Após montou-se o aparelho (eletroforese), cobrindo este com solução tampão de corrida, com posterior aplicação de uma corrente de 40 mA durante 3 h. Após o gel foi retirado do aparelho e colocado em solução corante por 2 h sob agitação constante. Os géis foram descolorados por uma solução contendo ácido acético 7,5% (v/v) e metanol 5% (v/v), a solução foi adicionada e posteriormente removida até nítida

visualização das bandas. Como padrão foi usado uma mistura de proteínas (Bench Mark Ladder protein, Califórnia, EUA) que variou de 10 kDa a 220 kDa.

2.11 Atividade Antioxidante

Os métodos capacidade de sequestro do radical livre DPPH, captura do radical livre ABTS e poder redutor, baseados em diferentes princípios, foram selecionados para mensurar a atividade antioxidante dos hidrolisados de microalga.

A atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos não foram comparadas com os resultados de outros estudos, pois, não foi encontrados estudo similares, tornando as comparações com outras fontes de proteínas inadequadas.

2.11.1 Poder Redutor

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de Poder Redutor de acordo com OYAZIU (1986). Para esta determinação uma amostra de 2 mL de solução de hidrolisado 5 mg/mL foi misturada com 2 mL de tampão fosfato se sódio 0,2 M (pH 6,6) e 2 mL de ferrocianeto de potássio 1%. Essa mistura foi incubada a 50°C em banho-maria por 20 min. Em seguida foi adicionado 2 mL de TCA 10%. Alíquotas de 2 mL das amostras incubadas foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1%. Após 10 min absorvância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro. O aumento da absorvância da mistura da reação indica um aumento do poder redutor.

2.11.2 Capacidade de sequestro da radical livre DPPH

O Efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazol (DPPH) foi medido conforme descrito por RUFINO et al. (2007_b) com modificações. As amostras de 0,1mL (2,5mg/mL), foram adicionadas em 3,9 mL de DPPH 0,06 mmol/L em álcool metílico, em ambiente escuro. A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida a temperatura ambiente por 60 min. A absorvância resultante da solução foi medida a 517 nm em espectrofotômetro. Menor absorvância representa uma maior capacidade de sequestro do radical DPPH o qual foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$\text{Inibição (\%)} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}})/Abs_{\text{controle}}] \times 100 \quad (3)$$

2.11.3 Captura do radical livre ABTS

A capacidade captura do radical livre ABTS foi determinada conforme RUFINO et al. (2007a), com modificações. ABTS, 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi dissolvido em água a uma concentração de 7mM/L (solução estoque). O cátion radical (ABTS⁺) foi preparado a partir da reação de 5mL da solução estoque de ABTS com 88μL de solução de persulfato de potássio 140mM, deixando a mistura em repouso no escuro, à temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida, diluir 1mL desta mistura em álcool etílico até obter absorvância de 0,70nm ± 0,05 nm a 734 nm. Preparado e usado apenas no dia da análise. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 μL de amostra (2,5 mg/mL) para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS⁺, agitou-se em vórtex. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro após 6 min. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (derivado hidrossolúvel do α-tocoferol), sendo os resultados expressos como mM Trolox /g de amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peptídeos bioativos com atividade antioxidante são extraídos geralmente de proteínas de origem animal (leite e peixes) e vegetais superiores (soja), os quais necessitam ser processados e concentrados para obtenção de alto teor protéico. A biomassa de *Spirulina* possui elevada concentração de proteína e as condições de cultivo podem ser direcionadas para se obter uma maior conteúdo de proteína na biomassa.

A Tabela 1 apresenta a composição proximal da biomassa de *Spirulina* LEB 18 utilizada.

Tabela 1 - Composição proximal da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

Determinações	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (%)
Umidade	11,99 ± 0,07
Proteínas	51,66 ± 1,87
Cinzas	7,84 ± 0,02
Lipídeos	7,06 ± 0,11
Carboidratos**	21,45 ± 0,00

*médias (\bar{X}) e desvio padrão (D.P)

** determinados por diferença

A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento composta central com as variáveis codificadas, correspondente aos valores máximos alcançados em cada experimento para o grau de hidrólise.

O grau de hidrólise das proteínas da microalga *Spirulina* apresentou-se entre 26,9% e 62,8%. O ensaio 3 apresentou o maior GH, 62,8%, sendo seu meio reacional composto pela menor concentração de substrato (4%) e tempo de reação 200 min. O ponto axial 6, cuja concentração de substrato corresponde a 8,8%, apresentou o GH mais baixo (26,9%).

Tabela 2 - Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 para a resposta grau de hidrólise.

Ensaio	Valores codificados e reais		GH (%)
	CS (%)	t (min)	
1	-1 (4)	-1 (100)	55,1
2	+1 (8)	-1 (100)	38
3	-1 (4)	+1 (200)	62,8
4	+1 (8)	+1 (200)	42,5
5	-1,41 (3,2)	0 (150)	49,3
6	+1,41 (8,8)	0 (150)	26,9
7	0 (6)	-1,41 (80)	37,8
8	0 (6)	+1,41 (220)	44
9	0 (6)	0 (150)	47,3
10	0 (6)	0 (150)	47,6
11	0 (6)	0 (150)	47,0

*CS = Concentração de substrato; t = tempo de reação.

Analisando os dados do delineamento composto central rotacional para a resposta grau de hidrólise (GH), observou-se que os termos quadráticos não foram significativos para $p < 0,05$, desta forma, desconsiderou-se os pontos axiais, mesmo que o F calculado tenha apresentado resultado superior ao F tabelado (Tabela 3) e tratou-se o restante dos dados obtidos no delineamento composto central com seus valores codificados. A Tabela 3 apresenta a análise de variância para a resposta grau de hidrólise.

Tabela 3 - Análise de variância para a avaliação da significância do modelo para a resposta.

Delineamento composto								
Fonte de variação	Linear				Quadrático			
	SQ	GL	MQ	F calculado	SQ	GL	MQ	F calculado
Regressão	386,90	2	193,45	65,57	597,62	1	596,6	18,42
Resíduo	11,80	4	2,95		291,47	9	32,38	
Total	398,70	6			888,10	10		

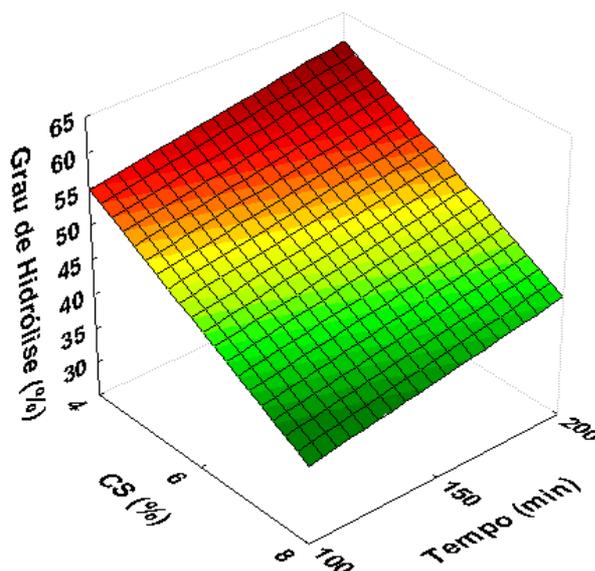
Linear: R= 0,97038; $F_{(0,95;2,4)} = 6,94$

Quadrático: R=0,6718; $F_{(0,95;1,9)} = 5,12$

Como o F calculado para o modelo linear foi 9,44 vezes maior que o F tabelado o modelo é significativo. Assim, foi possível obter um modelo codificado linear, a Equação (4) representa os coeficientes de regressão do modelo que descreve a resposta em função das variáveis independentes, sendo assim possível a construção da superfície de resposta. A superfície de resposta está apresentada na Figura 1.

$$\text{Grau de Hidrólise (\%)} = 48,61 - 9,35CS + 3,05T \quad (4)$$

Figura 1 - Superfície de resposta em função da concentração de substrato e tempo de reação para o grau de hidrólise



Pode-se observar pela Figura 1 que valores de GH próximos de 60% são atingidos quando o sistema reacional é composto pela menor concentração de substrato (4%) e maior tempo de reação (200 min). Dentro da faixa de trabalho escolhida, que varia de 4 a 8% para concentração de substrato e 100 a 200 min para tempo de reação, levando-se em consideração que as melhores condições para processo são as que possibilitam maior grau de hidrólise, opta-se pela seguinte condição ótima: concentração de substrato igual a 4% e tempo de reação igual a 200 min.

Maiores valores de grau de hidrólise foram obtidos com a menor concentração de substrato e maior tempo de reação. Isso pode ser possível devido a uma inibição não competitiva do substrato pela enzima. Quando a concentração de substrato é alta, a enzima pode ligar-se a uma unidade de substrato em outra região de afinidade que não o centro ativo, impedindo que se forme corretamente o complexo enzima-substrato com outra unidade do substrato e conseqüentemente impedindo a formação do produto.

Os hidrolisados proteicos possuem propriedade fisiológica bastante importante, estes têm absorção gastrointestinal mais efetiva, quando comparada às proteínas intactas, ou mesmo à ingestão de aminoácidos livres. São amplamente utilizados devido às suas propriedades funcionais (elevada digestibilidade e possuem peptídeos bioativos) e tecnológicas (têm alta solubilidade, devido ao processo de hidrólise).

A digestibilidade das proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou-se igual a 74,11%. Ambos os seus hidrolisados apresentaram digestibilidade superior a digestibilidade da biomassa original, sendo aproximadamente 100% para o ensaio 3 (maior grau de hidrólise) e 91,49% para o ensaio 6 (menor grau de hidrólise). Além disso, o ensaio que apresentou maior grau de hidrólise foi também o que alcançou maior digestibilidade, comprovando deste modo que a hidrólise das proteínas torna-as mais digeríveis. Estes resultados estão coerentes com os encontrados por Negrão et al. (2005) que avaliou a digestibilidade de hidrolisados de carne mecanicamente separada de frango.

De acordo com Cândido e Sgarbieri (2003), Furlan e Oetterer (2002), Roman e Sgarbieri (2005) o principal fator determinante das propriedades funcionais dos hidrolisados é o tamanho da proteína hidrolisada. Dependendo da extensão da hidrólise, enzimas endopeptídicas, como utilizada neste estudo podem produzir uma mistura de peptídeos de baixa massa molecular, assim, favorecendo as propriedades de solubilidade, capacidade de formação de espuma e também de digestibilidade destes hidrolisados.

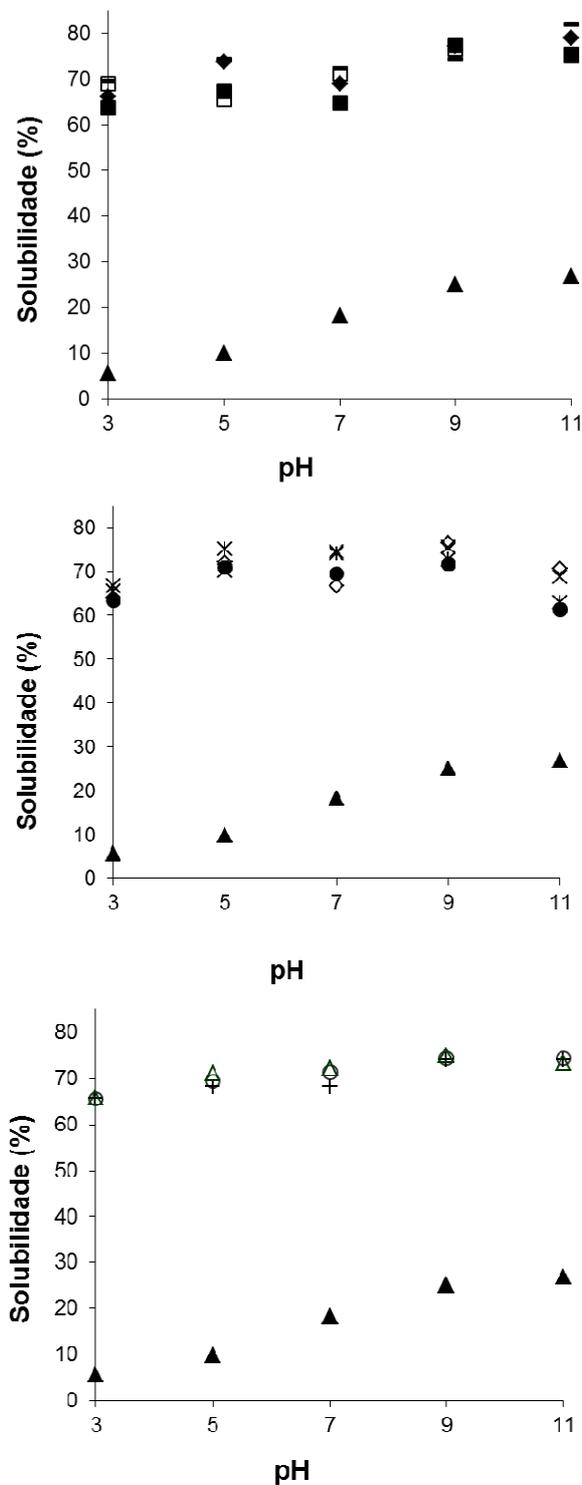
A Figura 2 mostra a curva de solubilidade proteica dos hidrolisados proteicos obtidos com a enzima Protemax 580 L, nos pH 3, 5, 7, 9 e 11.

Os menores valores de solubilidade foram observados quando se trabalhou com pH 3 e 5, aumentando a medida que o pH atinge a faixa de alcalinidade, como ocorre com a maioria das proteínas, pois em pH alcalinos, há um aumento nas interações entre as moléculas de proteína e água, aumentando a solubilidade.

Na Figura 2 está apresentado os 11 ensaios estudados para cada pH, observa-se que os maiores valores de solubilidade, para todos os ensaios, foram obtidos com o pH 11. Foi também observado, uma correlação entre o grau de hidrólise das proteínas e a solubilidade, pois quanto maior o grau de hidrólise maior será a solubilidade. O ensaio que apresentou maior solubilidade (81%) foi o 3 o qual apresentou o maior grau de hidrólise (62,8%).

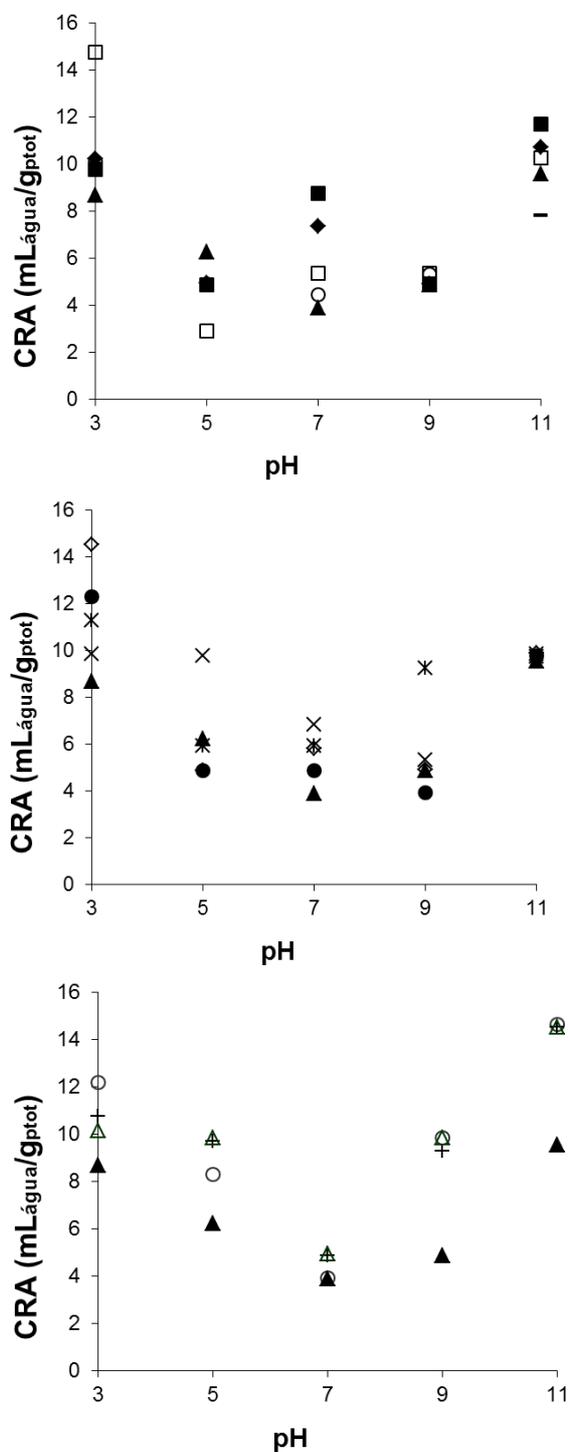
A quebra das proteínas da biomassa de *Spirulina* pela ação da enzima Protemax 580L levou um elevado aumento da solubilidade das proteínas. Esta quebra enzimática das proteínas envolve uma mudança estrutural, onde a proteína é gradualmente clivada em unidades menores de peptídeos, havendo assim, um aumento da solubilidade (MARTINS et al., 2009).

Figura 2 - Curva de solubilidade dos hidrolisados de *Spirulina*, ensaio 1(♦) ensaio 2 (■), ensaio 3 (-), ensaio 4 (□), ensaio 5 (*), ensaio 6 (●), ensaio 7 (◇), ensaio 8 (×), ensaio 9 (○), ensaio 10 (+), ensaio 11 (△) e *Spirulina* não hidrolisada (▲).



A Figura 3 apresenta os resultados obtidos para a capacidade de retenção de água da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e dos hidrolisados nos diferentes pHs estudados.

Figura 3 - Curva de capacidade de retenção de água dos hidrolisados proteicos, ensaio 1 (◆), ensaio 2 (■), ensaio 3 (-), ensaio 4 (□), ensaio 5 (*), ensaio 6 (●), ensaio 7 (◇), ensaio 8 (×), ensaio 9 (○), ensaio 10 (+), ensaio 11 (△) e *Spirulina* não hidrolisada (▲).



Todos os ensaios apresentaram o mínimo de capacidade de retenção de água a pH 5 e pH 7. Este fato pode ser consequência da redução da capacidade da proteína se ligar à água,

devido às interações intermoleculares e também por estar próximo da região do ponto isoelétrico destas proteínas.

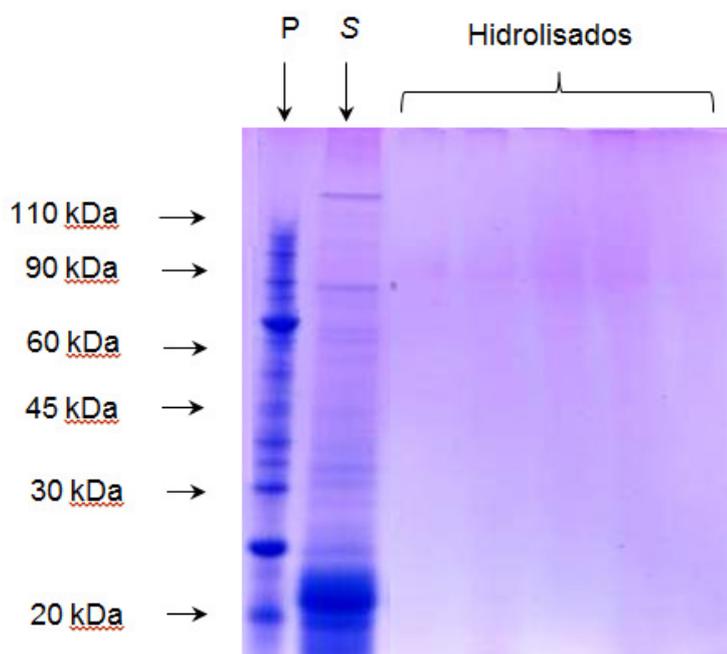
A grande quantidade de peptídeos com baixo peso molecular formados durante a hidrólise, também podem influenciar na baixa capacidade de retenção de água, já que, eles acabam prejudicando a absorção de água.

A hidrólise enzimática da biomassa conseguiu aumentar a capacidade de retenção de água em praticamente todos os experimentos nos pH estudados. Obtendo melhores resultados em pH 11.

Não foi observado relação entre solubilidade e capacidade de absorção de água, bem como com o grau de hidrólise e a capacidade de retenção de água.

Na Figura 4 está apresentado o perfil eletroforético das proteínas da biomassa da *Spirulina* não hidrolisada e os hidrolisados.

Figura 4 - Perfil eletroforético das proteínas presentes no padrão (P), na biomassa da *Spirulina* (S) e as proteínas dos hidrolisados de *Spirulina*.



Após a hidrólise enzimática foi realizada a eletroforese SDS-PAGE tanto do hidrolisado quanto da biomassa não hidrolisada. A análise das bandas eletroforéticas permitiu verificar que houve hidrólise das proteínas da microalga, um dos objetivos do presente trabalho.

Como observamos na Figura 4 o método de SDS-PAGE permitiu o monitoramento das mudanças ocorridas com a biomassa de *Spirulina* submetida às reações de hidrólise enzimática. Para a *Spirulina* não hidrolisada foram observadas várias bandas de peso molecular variando de 20 kDa a 110 kDa. Já nos hidrolisados não houve a detecção de bandas, pois não foi possível detectar bandas com peso molecular inferior a 20 kDa. Apesar de esta metodologia não ser específica para peptídeos de baixo peso molecular, verifica-se que a hidrólise gerou peptídeos de tamanho molecular menor que 20 kDa.

Os hidrolisados proteicos produzidos utilizando como fonte de proteína a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 podem apresentar peptídeos de diferentes tamanhos e sequência de aminoácidos, o que pode determinar a capacidade antioxidante (Tabela 4).

Para medida da capacidade antioxidante não há atualmente um método padrão. Vários ensaios vêm sendo usados para avaliar a capacidade antioxidante. Alguns determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio, outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, ou medindo a inibição da oxidação.

Dentre os métodos mais usados podem-se citar aqueles que medem a habilidade de um antioxidante de reduzir um radical livre por doação de hidrogênio ou elétron, como o ensaio com ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio), e ensaio do DPPH (1,1- difenil -2- picrilhidrazil). Esses métodos baseiam-se na habilidade do antioxidante de sequestrar o radical escolhido e impedir a reação do radical com o substrato. A avaliação da reação é feita por meio da medida da variação da absorbância. Pode ser medida a alteração da absorbância característica do próprio radical (absorbância reduz à medida que vão sendo reduzidos) ou por meio da adição de um marcador (HUANG et al., 2005).

A medida da absorbância é usada como parâmetro também no teste de poder redutor avaliando a capacidade do antioxidante de reduzir íon ferricianeto a ferrocianeto (quanto maior a absorbância, maior a capacidade antioxidante) (FERREIRA et al., 2007).

As análises de poder redutor, DPPH e ABST foram realizadas em triplicata, assim como o cálculo do potencial antioxidante os resultados foram avaliados por análise de variância e comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4 - Atividade antioxidante dos hidrolisados de microalgas determinada pelo método do poder redutor, DPPH e ABTS⁺.

Hidrolisado proteico	Poder redutor (Abs 700nm)	DPPH (% inibição)	ABTS⁺ (mMol de Trolox/g de amostra)
Ensaio 1	0,5043 ^a ± 0,0035	55,61 ^{g,i} ± 0,65	0,199 ^e ± 0,004
Ensaio 2	0,5753 ^c ± 0,0079	68,02 ^d ± 2,01	0,179 ^{g,h} ± 0,001
Ensaio 3	0,5283 ^f ± 0,0049	73,25 ^a ± 0,34	0,248 ^a ± 0,002
Ensaio 4	0,5390 ^{e, f} ± 0,0031	60,14 ^h ± 0,75	0,155 ^h ± 0,003
Ensaio 5	0,5473 ^{d, e, f} ± 0,0065	48,49 ^b ± 1,53	0,211 ^b ± 0,003
Ensaio 6	0,5533 ^{d, e} ± 0,0075	53,56 ^g ± 1,56	0,138 ^c ± 0,003
Ensaio 7	0,5676 ^{c, d} ± 0,0125	60,63 ^{f,h} ± 1,01	0,167 ^{f,g} ± 0,004
Ensaio 8	0,5426 ^{e, f} ± 0,0030	64,35 ^{d,f} ± 0,65	0,161 ^d ± 0,001
Ensaio 9	0,5470 ^{e, f} ± 0,0098	58,25 ^{h,i} ± 1,01	0,193 ^e ± 0,004
Ensaio 10	0,5430 ^{e, f} ± 0,0064	57,87 ^{h,i} ± 1,72	0,192 ^e ± 0,001
Ensaio 11	0,5446 ^{e, f} ± 0,0112	55,18 ^{g,i} ± 1,54	0,169 ^f ± 0,005
Microalga não hidrolisada	0,3086 ^b ± 0,0025	25,35 ^c ± 0,76	0,029 ^d ± 0,001

*Para todos os ensaios de hidrolisados proteicos realizados, nos valores de absorvância média, porcentagem de inibição e mMol de Trolox/g de amostra, letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas indicam diferença significativa a 95% de confiança.

Hidrolisados proteicos com maior grau de hidrólise obtiveram melhores resultados de atividade antioxidante para os 3 diferentes métodos de análise estudados, sabe-se que hidrolisados com elevado grau de hidrólise apresentam maior quantidade de peptídeos de baixo peso molecular, e conseqüentemente maior potencial de inibição de oxidação, em relação aos hidrolisados com baixo grau de hidrólise.

Os diferentes hidrolisados com variados graus de hidrólise, provavelmente possuem peptídeos de diferentes tamanhos e sequência de aminoácidos que podem determinar sua capacidade antioxidante.

De acordo com a Tabela 4, em todos os métodos de atividade antioxidantes estudados (poder redutor, DPPH e ABTS), foi observado que houve um aumento da atividade antioxidante, sendo esta diferença significativa a 95% de significância. Estes resultados

mostram digestibilidade que a hidrólise enzimática das proteínas da *Spirulina* gerou peptídeos com atividade antioxidante.

De acordo com Je et al. (2009), o poder redutor mais elevado pode ser atribuído ao maior conteúdo de peptídeos doadores de elétrons ou hidrogênio. Portanto, quanto maior o valor da absorbância observada, maior será a atividade antioxidante amostra analisada.

O DPPH é um radical estável que tem sido amplamente utilizado para testar a habilidade de captura de radicais livres de diferentes amostras (CAO et al., 2012; PANZELLA et al., 2012; BUKMAN et al., 2013). A atividade antioxidante, utilizando o método de captura dos radicais DPPH, da microalga e dos hidrolisados avaliadas neste estudo está apresentada na Tabela 4. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição. Observou-se que o efeito sequestrante do radical DPPH para os experimentos com a microalga hidrolisada (48,49 a 73,25%) aumentou consideravelmente quando comparado com a biomassa intacta (25,35%).

Os resultados da atividade antioxidante pelo método ABTS foram expressos como capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (valores TEAC). Constatou-se, a partir da Tabela 4, que, assim como no teste antioxidante pelo método de captura de radicais DPPH•, os hidrolisados proteicos apresentaram mais elevada capacidade antioxidante, atingindo valores máximos de TEAC 0,248 mMol de Trolox/g de amostra, gerando um aumento de 8,5 vezes na sua capacidade antioxidante quando comparado com a biomassa não hidrolisada.

4 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática das proteínas aumentou a digestibilidade, solubilidade e a capacidade de retenção de água dos hidrolisados, sendo observado uma correlação entre o grau de hidrólise das proteínas e a solubilidade, pois quanto maior o grau de hidrólise maior foi o valor de solubilidade encontrado. O ensaio que apresentou maior solubilidade (81%) foi o 3 o qual apresentou o maior grau de hidrólise (62,8%). O mesmo comportamento foi observado no estudo da digestibilidade, pois o ensaio que apresentou maior grau de hidrólise alcançou maior digestibilidade (100%), comprovando deste modo que a hidrólise das proteínas torna-as mais digeríveis.

A hidrólise enzimática da biomassa gerou aumento na capacidade de retenção de água em praticamente todos os experimentos em todos os pH estudados. Obtendo melhores resultados em pH 11, que foi o pH onde se alcançou a maior capacidade de retenção de água.

Os resultados de atividade antioxidante para microalga não hidrolisada, comparado com os dos ensaios hidrolisados para todos os métodos estudados, apresentou aumento da atividade antioxidante, sendo esta diferença significativa ao nível de 95%.

REFERÊNCIAS

- AKESON, W. R., STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.
- ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, p. 130–134, 2007.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. *Official Methods of Analysis of AOAC international*. 17th ed, Washington, D. C., 2005.
- BUENO-SOLANO, C., LÓPEZ-CERVANTES, J., CAMPAS-BAYPOLI, O. N., LAUTERIO-GARCÍA, R., ADAN-BANTE, N. P., SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, v. 112, p. 671–675, 2009.
- BUKMAN, L., MARTINS, A. C., BARIZÃO, E. O., VISENTAINER, J. V., ALMEIDA, V. C. DPPH Assay Adapted to the FIA System for the Determination of the Antioxidant Capacity of Wines: Optimization of the Conditions Using the Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, DOI 10.1007/s12161-012-9560-x, 2013.
- CAMPOS, F. M., MARTINO, H. S. D., SABARENSE, C. M., PINHEIRO-SANT'ANA, C. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Araraquara**, v.19, n.4, p. 481-490, 2008.
- CÂNDIDO, L. M. B., SGARBIERI, V. C. **Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.97, p.937, 2003.
- CAO, H., CHEN, X., YAMAMOTO, K. Bovine serum albumin significantly improves the DPPH free radical scavenging potential of dietary polyphenols and gallic acids. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.12, p.940-948, 2012.
- CHAIKLAHAN, R., CHIRASUWAN, N., BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 659–664, 2012.
- CHALAMAIAHA, M., KUMAR, B. D., HEMALATHA, R., JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, p. 3020–3038, 2012.
- CHANPUT, W., THEERAKULKAIT, C., NAKAI, S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 422–428, 2009.

- CHEN, H., YANG, T., CHEN, M., CHANG, Y., LIN, C., WANG, E. I., HO, C., HUANG, K., YU, C., YANG, F., WU, S., LU, Y., CHAO, L. K. Application of power plant flue gas in a photobioreactor to grow *Spirulina* algae, and a bioactivity analysis of the algal water-soluble polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 256–263, 2012.
- COLLA, L. M., FURLONG, E. B., COSTA, J. A. V. Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.
- COHEN, Z. **Chemicals from microalgae**. London: Taylor e Francis, 1999.
- COSTA, E. L., GONTIJO, J. A. R., NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 632-640, 2007.
- COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung, Tübingen**, v. 61, p. 105-110, 2006.
- FERREIRA, I. C. F. R., BATISTA, P., VILAS-BOAS, M., BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from Northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v.100, p.1511-1516, 2007.
- FIGUEIRA, F. S., CRIZEL, T. M., SILVA, C. R., SALAS-MELLADO, M. M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazil Journal of Food Technology**, v. 14, n. 4, p. 308-316, 2011.
- 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.
- FURLAN, E. F., OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. *Revista de Ciência e Tecnologia*, v. 10, p. 79-89, 2002.
- GAD, A. S., KHADRAWY, Y. A., EL-NEKEETY, A. A., MOHAMED, S. R., HASSAN, N. S., ABDEL-WAHHAB, M. A. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. **Nutrition**, v. 27, p. 582–589, 2011.
- GALLA, N. R., PAMIDIGHANTAM, P. R., AKULA, S., KARAKALA, B. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1479–1484, 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.
- HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, v. 53, p.1841-1856, 2005.
- JE, J. Y., LEE, K. H., LEE, M. H., AHN, C. B. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 42, p. 1266–1272, 2009.

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

KUMAR, M., KULSHRESHTHA, J., SINGH, G. P. Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1128-1135, 2011.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.

KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G. TRONCOSO, A. M., MANCINI-FILHO, J., FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

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

LEMES, A. C., TAKEUCHI, K. P., CARVALHO, J. C. M., DANESI, E. D. G. Fresh pasta production enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 55, n. 5, p. 741-750, 2012.

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.

MARTINS, V. G., COSTA, J. A. V., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, N. 1, p. 61-66, 2009.

MENG, H., XIA, Y., CHEN, H. Bioremediation of surface water co-contaminated with zinc (II) and linear alkylbenzene sulfonates by *Spirulina platensis*. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 47-48, p. 152-155, 2012.

MEZZOMO, N., SAGGIORATO, A. G., SIEBERT, R., TATSCH, P. O., LAGO, M. C., HEMKEMEIER, M., COSTA, J. A. V., BERTOLIN, T. E., COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 173-178, 2010.

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., REICHERT, C. C., DALCANTON, F., DURANTE, A. J., MARINS, L. F., COSTA, J. A. V., Isolation and cultivation of a new strain of *Arthrospira* from Mangueira Lagoon in Southern Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

- 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.
- MORR, C. V., GERMAN, B., KINSELLA, J. E., REGENSTEIN, J. E., VAN BUREN, J. P., KILARA, A., LEWIS, B. A., MANGINO, M. E., 1985. A collaborative study to develop a standardised food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v.50, p.1715-1718, 1985.
- NAH, W. H., KOH, I. K., AHN, H. S., KIM, M. J., KANG, H., JUN, J. H., GYE, M. C. Effect of *Spirulina maxima* on spermatogenesis and steroidogenesis in streptozotocin-induced type I diabetic male rats. **Food Chemistry**, v. 134, p. 173–179, 2012.
- NEGRÃO, C. C.; MIZUBUTTI, Y.; MORITA, M. C.; COLLI, C.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food Chemistry**, v. 90, p. 579-583, 2005.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307–315, 1986.
- PANZELLA, L., EIDENBERGER, T., NAPOLITANO, A., D'ISCHIA, M. Black sesame pigment: DPPH assay-guided purification, antioxidant/antinitrosating properties, and identification of a degradative structural marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8895–8901, 2012.
- PEIRETTI, P. G., MEINERI, G. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits. **Livestock Science**, v. 140, p. 218–224, 2011.
- RABELO, S. F., LEMES, A. C., TAKEUCHI, K. P., FRATA, M. T., CARVALHO, J. C. M., DANESI, E. D. G. Development of cassava doughnuts enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazil Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 42-51, 2013.
- RAMANAN, R., KANNAN, K., DESHKAR, A., YADAV, R., CHAKRABARTI, T. Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. And *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2616–2622, 2010.
- REGENSTEIN, J. M., JAUREGUI, C. A., BAKER, R. The effect of pH, phyphosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscles. **Journal of Food Biochemistry**, v. 8, p.123-131, 1984.
- ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p.468, 2005.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, 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, 2007a.

- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007b.
- SANTOS, M. H., BATISTA, B. L., DUARTE, S. M. S., ABREU, C. M. P., GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v.30, n.3, p.604-610, 2007.
- SÁNCHEZ, D., KASSAN, M., CONTRERAS, M. M., CARRÓN, R., RECIO, I., MONTERO, M., SEVILLA, M. Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 398–404, 2011.
- SEGURA-CAMPOS, M. R., SALAZAR-VEJA, I. M., CHEL-GUERRERO, L. A., BETANCUR-ANCONA, D. A. Biological potential of chia (*Salvia hispânica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 723-731, 2013.
- STALJANSSENS, D., CAMP, J. V., BILLIET, A., MEYER, T. D., SHUKOR, N. A., VOS, W. H. D., SMAGGHE, G. Screening of soy and milk protein hydrolysates for their ability to activate the CCK1 receptor. **Peptides**, v. 34, p. 226–231, 2012.
- MOSTAFA, S. S. M. Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications. **Plant Science**, DOI: 10.5772/53649, p. 275-314, 2012.
- WALTER, A., CARVALHO, J. C., SOCCOL, V. T., FARIA, A. B. B., GHIGGI, V., SOCCOL, C. R. Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 675-682, 2011.
- WANG, B., LI, L., CHI, C., MA, J., LUO, H., XU, Y. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1713–1719, 2013.
- ZENG, X., DANQUAH, M. K., ZHANG, S., ZHANG, X., WU, M., CHEN, X. D., NG, I., JING, K., LU, Y. Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 192-197, 2012.
- ZHAO, B., ZHANG, Y., XIONG, K., ZHANG, Z., HAO, X., LIU, T. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ fixation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 1758–1762, 2011.
- ZHOU, K., SUN, S., CANNING, C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1192–1197, 2012.
- ZOTTE, A. D., SARTORI, A., BOHATIR, P., RE MIGNON, H., RICCI, R. Effect of dietary supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and *Thyme* (*Thymus vulgaris*) on growth performance, apparent digestibility and health status of companion dwarf rabbits. **Livestock Science**, v. 152, p. 182–191, 2013.

**ARTIGO 3: OBTENÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA DA MICROALGA**

Chlorella pyrenoidosa

**OBTENÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS
DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA DA MICROALGA *Chlorella
pyrenoidosa***

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir hidrolisados proteicos que contenham peptídeos biologicamente ativos com atividade antioxidante a partir da biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Foi realizado delineamento composto rotacional do tipo 2^2 , sendo estudadas as variáveis concentração de substrato e tempo de reação. As reações de hidrólise da biomassa de *Chlorella* com a enzima Protamax 580 L foram realizadas em tampão pH 9,5 à 180 rpm e temperatura de 55 °C, posteriormente foram realizadas análises de digestibilidade, solubilidade, capacidade de retenção de água e atividade antioxidante dos hidrolisados (poder redutor, DPPH e ABTS^{•+}) e da biomassa não hidrolisada. A hidrólise enzimática das proteínas gerou aumento da digestibilidade, solubilidade e da capacidade antioxidante dos hidrolisados. Através dos resultados obtidos, constatou-se que é possível obter peptídeos biologicamente ativos com atividade antioxidante a partir de biomassa microalgal.

Palavras-Chave: Grau de hidrólise, microalga, atividade antioxidante

OBTAINING BIOPEPTÍDEOS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY THROUGH THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIOMASS MICROALGAE *Chlorella pyrenoidosa*

ABSTRACT

The aim of this study was to produce protein hydrolysates that contain biologically active peptides with antioxidant activity from the biomass of microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. Carried out a composite design of the type 2^2 , the variables being studied substrate concentration and reaction time. The reactions hydrolysis of *Chlorella* biomass with the enzyme Protamax 580L were performed in pH 9.5 buffer at 180 rpm and 55 °C, subsequent were performed analyzes digestibility, solubility, water holding capacity and antioxidant activity of the hydrolysates (reducing power, DPPH and ABTS) and biomass intact. Enzymatic hydrolysis increased the digestibility of the proteins, solubility and antioxidant activity hydrolysates. With the observed results verified that it is possible to obtain biologically active peptides with antioxidant activity from microalgal biomass.

Keywords: Degree of hydrolysis, microalgae, antioxidant activity

1 INTRODUÇÃO

Chlorella é um gênero das algas verdes unicelulares e vem sendo reportada como produto de gênero alimentício que contém proteína, minerais, vitaminas, clorofila e substâncias bioativas. Diversos estudos têm indicado a variedade de benefícios proporcionados pela microalga *Chlorella*, incluindo capacidade antioxidante (LEE et al., 2010), anti-diabetes (SENTHILKUMAR e ASHOKKUMAR, 2012) e capacidade de diminuir os níveis de colesterol (NOGUCHI et al., 2013).

Das fontes naturais de antioxidantes, que não causam efeito danoso ao organismo, diversos pesquisadores têm apresentado interesse em estudar fontes marinhas como um recurso biológico (BYUN et al., 2009). Existem estudos sobre o efeito antioxidante de hidrolisados de proteína de fígado de atum (AHN et al., 2010), pele de atum e linguado (ALEMAN et al., 2011) e algumas espécies de microalgas, como *Chlorella ellipsoidea* (KO et al., 2012).

Recentemente, peptídeos bioativos de recursos biológicos vêm sendo identificados e caracterizados (SARMADI e ISMAIL, 2010), podendo apresentar atividade antioxidante (LIU et al., 2010), antimicrobiana (KIM e WIJESSEKARA, 2010), efeito antihipertensivo (ZHAO et al., 2009), anticolesterol (ZHONG et al., 2007), entre outros. Estes obtidos a partir de hidrólise enzimática de proteínas e podem agir como modelador fisiológico no processo de metabolismo durante a digestão de alimentos (JE et al., 2005). A atividade desses peptídeos depende da sua estrutura, composição e sequência de aminoácidos (LEE et al., 2009).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas quimicamente reativas devido à presença de elétrons desemparelhados do átomo de oxigênio que atraem elétrons de outras substâncias, e assim causam estresse oxidativo às células e tecidos. Estes podem ser perigosos e geralmente são formados em condições de estresse em organismos aeróbios (GÜLÇİN, 2012). O aparecimento de aterosclerose, doenças coronárias, hipertensão, diabetes, envelhecimento, mal de Alzheimer e câncer podem ser conduzidos pela produção incontrolada de ROS e pelo desequilíbrio do sistema de proteção antioxidante (NGO et al., 2010). Além disso, a oxidação de gorduras e óleos nos produtos alimentares durante o processamento e armazenamento leva à produção de produtos secundários indesejáveis da peroxidação lipídica (SARMADI e ISMAIL, 2010). Portanto, antioxidantes são importantes para prevenção de doenças e no armazenamento e estocagem de produtos alimentícios.

A fim de diminuir o efeito danoso dos ROS, antioxidantes naturais obtidos a partir de plantas e antioxidantes sintéticos, tais como BHA (butil-hidroxi-anisól) e BHT (butil-hidroxi-

tolueno) podem ser utilizados. No entanto, o uso de antioxidantes artificiais apresentam certos riscos à saúde (POLÔNIO e PERES, 2009). Em estudos recentes, recursos biológicos tornaram-se o foco de considerável atenção dos pesquisadores à procura de agentes de proteção contra os efeitos induzidos pelos ROS (WANG et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi produzir hidrolisados proteicos que contenham peptídeos biologicamente ativos com atividade antioxidante a partir da biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa* utilizando a enzima comercial Protemax 580 L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microalga e Enzima

A microalga utilizada para a obtenção dos hidrolisados proteicos foi *Chlorella pyrenoidosa*, adquirida em pó, produzida por Fuqing King Dnarmsa Co. Ltd., China e a enzima utilizada foi a Protemax 580L de *Bacillus licheniformis* (Prozyn, São Paulo – SP).

A atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina por minuto, dentro das condições usadas no estudo, segundo o método descrito por Ma et al. (2007).

2.2 Composição Proximal

As análises realizadas para a avaliação da composição proximal das microalgas foram proteína total, cinzas, umidade e lipídeos foram determinados segundo AOAC (2005). Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25. Cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C). Os lipídeos foram extraídos com 2:1 (v/v) de clorofórmio/metanol, purificado com 0,9% (p/v) NaCl e a 2:1 (v/v) de metanol/água misturados de acordo com Folch e Lees (1957) e transferidos para um evaporador rotatório, sendo o solvente removido a aproximadamente 37 °C. O conteúdo lipídico foi determinado gravimetricamente e os carboidratos foram determinados por diferença.

2.3 Hidrólise Enzimática

O sistema reacional foi composto pela enzima Protemax 580L e pela biomassa de *Chlorella*, em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5, totalizando 100 mL. Os erlenmeyers foram dispostos em “shaker” (Certomat BS-1) com agitação de 180 rpm e temperatura constante de 55 °C (temperatura ótima de atividade da enzima), para todos os experimentos. Ao término da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 10 min. Após foram congelados por 24 h a – 70 °C e liofilizados durante 48 h. Os hidrolisados foram acondicionados em recipientes herméticos até a realização de análises posteriores.

A concentração de enzima adicionada foi fixada em 5 U. mL⁻¹, devido ao delineamento composto central realizado anteriormente, no qual a variável concentração de enzima não apresentou efeito significativo na resposta grau de hidrólise (GH).

2.4 Determinação do Grau de Hidrólise

Depois de transcorrido o tempo determinado pelo delineamento composto central rotacional para cada ensaio, alíquotas de 1 mL de hidrolisado foram inativadas pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% e deixadas em repouso por 10 min. Posteriormente foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis no filtrado utilizando o método de Folin-Lowry, expresso em mg de albumina. O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por Hoyle e Merrit (1994) com modificações, sendo expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado segundo a Equação 1.

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

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

2.5 Delineamento composto central rotacional

O delineamento composto central do tipo 2^2 , com três repetições no ponto central e com pontos axiais foi realizado, totalizando 11 experimentos. Utilizou-se a mesma concentração de enzima (5 U.mL^{-1}) para todos os ensaios. O teor inicial do substrato e o tempo de reação foram as variáveis estudadas através do delineamento composto central rotacional. O grau de hidrólise das proteínas da biomassa foi considerado como variável dependente. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de grau de hidrólise, foram determinados por SS residual.

A influência da concentração de substrato e do tempo de reação sobre a resposta grau de hidrólise foi avaliada estatisticamente de modo a fazer análise de efeitos e verificação de modelos empíricos através dos coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA).

2.6 Digestibilidade

A digestibilidade *in vitro* das proteínas da biomassa de *Chlorella pyrenoidosa*, e de seus hidrolisados do ensaio 3 e 7 foi realizada conforme Akesson e Stahmann (1964). Esses ensaios foram analisados de modo a verificar a relação do grau de hidrólise com a digestibilidade. Cerca de 1g de amostra foi hidrolisada com 10 mL de uma solução de pepsina em pH ácido a 37°C por 3 h sob agitação. Em seguida centrifugou-se a 5000 rpm por 15 min e filtrou-se as soluções, armazenado-se o sobrenadante sob refrigeração. Foi adicionado ao precipitado 10 mL de uma solução de pancreatina em pH neutro, deixando-se reagir por 24 h a 37°C em agitação contínua. Para interrupção da reação, utilizou-se de 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30%. Completou-se o volume com TCA 5%, centrifugou-se e filtrando-se as soluções. A quantificação de proteína solúvel foi determinada pelo método de Folin-Lowry tomando-se 0,5 mL da solução hidrolisada pela pepsina e 0,5mL da solução hidrolisada pela pancreatina. A tirosina foi empregada como padrão de referência.

2.7 Solubilidade Proteica

A solubilidade protéica foi determinada através do método proposto por Morr et al. (1985) com variação de pH na faixa de 3 a 11. Uma amostra de 500 mg foi homogeneizada com 2 mL de solução de NaCl 0,1 M obtendo uma pasta homogênea. A seguir adicionou-se

40 mL de tampão fosfato em pH 3, 5, 7, 9 e 11, a suspensão foi mantida sob agitação por 45 min em agitador magnético e o volume foi completado em balão volumétrico de 50 mL. Após a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 30 min e no sobrenadante foi determinado a concentração de proteínas solúveis pelo método de Lowry et al. (1951) A porcentagem de proteína solúvel foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$P.S (\%) = \frac{[A (\text{mg/mL}) 50]}{[W (\text{mg}) S]} \times 100 \quad (2)$$

$$\frac{100}{100}$$

sendo:

P.S = teor de proteínas solúveis presentes na amostra (%); A = concentração protéica do sobrenadante (mg.ml⁻¹); W = peso da amostra (mg); S = concentração de proteína na amostra (%).

2.8 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com o método de Regenstein et al. (1984), com algumas modificações. Dispersões proteicas a 1% foram homogeneizadas com 2 mL de solução de NaCl 0,1 M e 38 mL de tampão fosfato em pH 3, 5, 7, 9 e 11. A dispersão proteica foi submetida à agitação por 15 min e centrifugada a 5000 rpm por 25 min. A CRA foi expressa em volume de água retida pela quantidade de proteína total presente na amostra (mL de água/g de proteína).

2.9 Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese (SDS–PAGE) foi baseada no método de Laemmli (1970). Eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliácridamida foi realizada em um sistema tampão contínuo: tampão tris 1,5 M e SDS 10% (p/v). O gel foi preparado com 12% de gel de separação e 4% em gel de concentração. A análise de eletroforese foi realizada em uma unidade de eletroforese vertical (GSR/ 300STS). Em tubo de ensaio foi adicionado 0,2% de proteína em 1,5 mL de água destilada, com posterior adição de 1,5 mL de tampão tris 0,5 M para que ficasse na proporção de 1:1 (p/p) e em seguida os tubos foram agitados em Vórtex até a dissolução as amostras. Uma alíquota de 1 mL de amostra foi pipetado para o eppendorf e adicionado 100µL de β-mercaptoetanol. Os eppendorfs com as amostras foram colocados em

água fervente por 4 minutos para desnaturar as proteínas. Após arrefecimento foram adicionadas 3 gotas de azul de bromofenol. Uma alíquota de 20 µL de amostra foi colocada em cada espaço de corrida (poço) e foi adicionado 10 µL de SDS. Após montou-se o aparelho (eletroforese), cobrindo este com solução tampão de corrida, com posterior aplicação de uma corrente de 40 mA durante 3 h. Após o gel foi retirado do aparelho e colocado em solução corante por 2 h sob agitação constante. Os géis foram descolorados por uma solução contendo ácido acético 7,5% (v/v) e metanol 5% (v/v), a solução foi adicionada e posteriormente removida até nítida visualização das bandas. Como padrão foi usado uma mistura de proteínas (Bench Mark Ladder protein, Califórnia, EUA) que variou de 10 kDa a 220 kDa.

2.10 Atividade Antioxidante

Os métodos capacidade de sequestro do radical livre DPPH, captura do radical livre ABTS e poder redutor, baseados em diferentes princípios, foram selecionados para mensurar a atividade antioxidante dos hidrolisados de microalga.

2.10.1 Poder Redutor

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de Poder Redutor de acordo com Oyaizu (1986). Para esta determinação uma amostra de 2 mL de solução de hidrolisado 5 mg/mL foi misturada com 2 mL de tampão fosfato se sódio 0,2 M (pH 6,6) e 2 mL de ferrocianeto de potássio 1%. Essa mistura foi incubada a 50°C em banho-maria por 20 min. Em seguida foi adicionado 2 mL de TCA 10%. Alíquotas de 2 mL das amostras incubadas foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1%. Após 10 min absorbância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro. O aumento da absorbância da mistura da reação indica um aumento do poder redutor.

2.10.2 Capacidade de sequestro da radical livre DPPH

O Efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazol (DPPH) foi medido conforme descrito por Rufino et al. (2007_b) com modificações. As amostras de 0,1 mL (2,5 mg/mL), foram adicionadas em 3,9 mL de DPPH 0,06 mmol/L em álcool metílico, em ambiente escuro. A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida a temperatura ambiente por 60 min. A absorbância resultante da solução foi medida a 517 nm em espectrofotômetro.

Menor absorvância representa uma maior capacidade de sequestro do radical DPPH o qual foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$\text{Inibição (\%)} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}})/Abs_{\text{controle}}] \times 100 \quad (3)$$

2.10.3 Captura do radical livre ABTS

A capacidade captura do radical livre ABTS foi determinada conforme Rufino et al. (2007a), com modificações. ABTS, 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi dissolvido em água a uma concentração de 7 mM/L (solução estoque). O cátion radical (ABTS⁺) foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL de solução de persulfato de potássio 140 mM, deixando a mistura em repouso no escuro, à temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida, diluir 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter absorvância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm. Preparado e usado apenas no dia da análise. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 µL de amostra (2,5 mg/mL) para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS⁺, agitou-se em vórtex. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro após 6 min. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (derivado hidrossolúvel do α-tocoferol), sendo os resultados expressos como mM Trolox /g de amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peptídeos biologicamente ativos que possuem atividade antioxidante são extraídos geralmente de proteínas de origem animal como pescados (CHALAMAIAH et al., 2012; GALLA et al., 2012; WHANG et al., 2013), caseína ovina (GÓMEZ-RUIZ et al., 2008), gema de ovo (SAKANAKA et al., 2004) e de origem vegetal como farelo de arroz (CHANPUT et al., 2009), milho (ZHOU et al., 2012) e chia (SEGURA-CAMPOS et al., 2013). Não há na literatura muitos estudos utilizando a *Chlorella pyrenoidosa* como fonte de proteína, para obtenção de hidrolisados proteicos que contenham biopeptídeos com atividade antioxidante. A Tabela 1 apresenta a composição proximal da biomassa da microalga estudada.

Tabela 1 - Composição proximal da biomassa de *Chlorella pyrenoidosa*.

Determinações	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
	(%)
Umidade	6,91 ± 0,06
Proteínas	50,80 ± 0,63
Cinzas	6,66 ± 0,04
Lipídios	13,53 ± 0,22
Carboidratos**	22,10 ± 0,00

*médias (\bar{X}) e desvio padrão (D.P)

**determinado por diferença

A porcentagem de proteínas da biomassa da *Chlorella pyrenoidosa* foi utilizada para calcular a quantidade de biomassa necessária para obter as suspensões desejadas para cada experimento estudado pelo delineamento composto central rotacional.

A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento composto central com as variáveis reais e codificadas, correspondente aos valores médios alcançados em cada experimento para o grau de hidrólise.

Tabela 2 - Matriz do delineamento composto central rotacional 2² para a resposta grau de hidrólise.

Ensaio	Valores codificados e reais		GH (%)
	CS (%)	t (min)	
1	-1 (4)	-1 (100)	40,2
2	+1 (8)	-1 (100)	26,7
3	-1 (4)	+1 (200)	54,8
4	+1 (8)	+1 (200)	38,7
5	-1,41 (3,2)	0 (150)	41,3
6	+1,41 (8,8)	0 (150)	31,9
7	0 (6)	-1,41 (80)	25,4
8	0 (6)	+1,41 (220)	48
9	0 (6)	0 (150)	41,2
10	0 (6)	0 (150)	41,9
11	0 (6)	0 (150)	42,7

CS = Concentração de substrato; t = tempo de reação.

As proteínas da biomassa da microalga *Chlorella* obtiveram grau de hidrólise das proteínas da na faixa de 25,4% e 54,8%, sendo o ensaio 3 o que apresentou o maior GH 54,8%, o mesmo foi composto pela menor concentração de substrato (4%) e tempo de reação 200 min. O ponto axial 7, cuja concentração de substrato corresponde a 6%, apresentou o GH mais baixo (25,4%).

Analisando os dados do delineamento composto central rotacional para a resposta grau de hidrólise (GH), observou-se que os termos quadráticos não foram significativos para $p < 0,05$, desta forma, desconsiderou-se os pontos axiais, mesmo que F calculado tenha apresentado resultado superior ao F tabelado (Tabela 3) e tratou-se o restante dos dados obtidos no delineamento composto central com seus valores codificados. A Tabela 3 apresenta a análise de variância para a resposta grau de hidrólise.

Tabela 3 - Análise de variância para a avaliação da significância do modelo para a resposta.

Fonte de variação	Delineamento composto							
	Linear			Quadrático				
	SQ	GL	MQ	F calculado	SQ	GL	MQ	F calculado
Regressão	395,93	2	197,96	92,4	658,802	2	329,40	28,97
Resíduo	8,57	4	2,14		90,94	8	11,36	
Total	404,50	6			749,74	10		

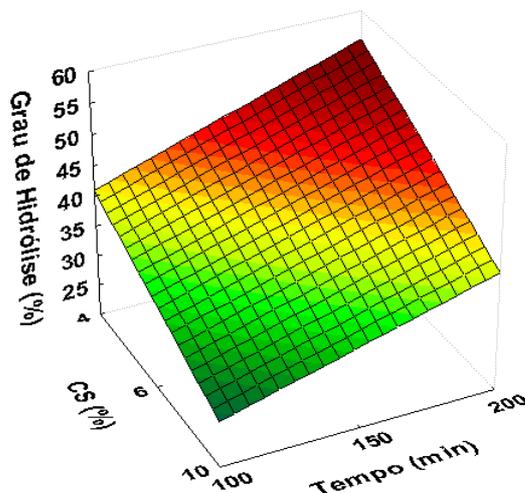
Linear: $R = 0,97879$; $F_{(0,95;2,4)} = 6,94$

Quadrático: $R = 0,8787$; $F_{(0,95;2,8)} = 5,05$

Como o F calculado para o modelo linear foi 13,31 vezes maior que o F tabelado o modelo é significativo. Assim, foi possível obter um modelo codificado linear, a Equação (4) representa os coeficientes de regressão do modelo que descreve a resposta em função das variáveis independentes, sendo assim possível a construção da superfície de resposta. A superfície de resposta está apresentada na Figura 1.

$$\text{Grau de Hidrólise} = 40,88 - 7,4CS + 6,65T \quad (4)$$

Figura 1 - Superfície de resposta em função da concentração de substrato e tempo de reação para o grau de hidrólise



Na Figura 1, observa-se que quando o sistema reacional é composto pela menor concentração de substrato (4%) e maior tempo de reação (200 min) são alcançados valores de GH próximos de 50%. De uma maneira geral, portanto, pode-se afirmar que o aumento da concentração de substrato gerou efeito negativo sobre a conversão das proteínas da biomassa.

O aumento da concentração de substrato gera efeito inibidor na hidrólise das proteínas. Este tipo de inibição causada pela elevada concentração de substrato, conforme Whitaker (1994), comporta-se como uma competição, pois uma segunda molécula de substrato se liga a um local próximo ao sítio ativo da enzima, reduzindo a velocidade inicial de reação, impedindo que a primeira molécula se ligue corretamente ao sítio ativo ou que ela seja transformada em produto.

A biomassa de *Chlorella* não hidrolisada apresentou 61,74% de digestibilidade, o hidrolisado no ensaio 3 apresentou 87,79% e no ensaio 7 de 85,38%. Pode-se observar que a biomassa não hidrolisada apresentou digestibilidade inferior do que a de seus hidrolisados, tanto para o ensaio 3 (maior grau de hidrólise) quanto para o ensaio 7 (menor grau de hidrólise). Além disso, a digestibilidade do ensaio que apresentou maior grau de hidrólise foi maior do que a do ensaio com menor grau de hidrólise. Segundo Kristinsson e Rasco (2000) o tamanho da proteína hidrolisada é o fator chave na determinação das propriedades funcionais dos hidrolisados. Enzimas que atuam principalmente em ligações endopeptídicas, como neste estudo, dependendo da extensão da hidrólise, irão produzir uma mistura de peptídeos de baixa massa molecular, assim, melhores propriedades de solubilidade, capacidade de formação de

espuma e também de digestibilidade serão apresentadas por estes hidrolisados, de acordo com Kristinsson e Rasco (2000), Cândido e Sgarbieri (2003), Roman e Sgarbieri (2005).

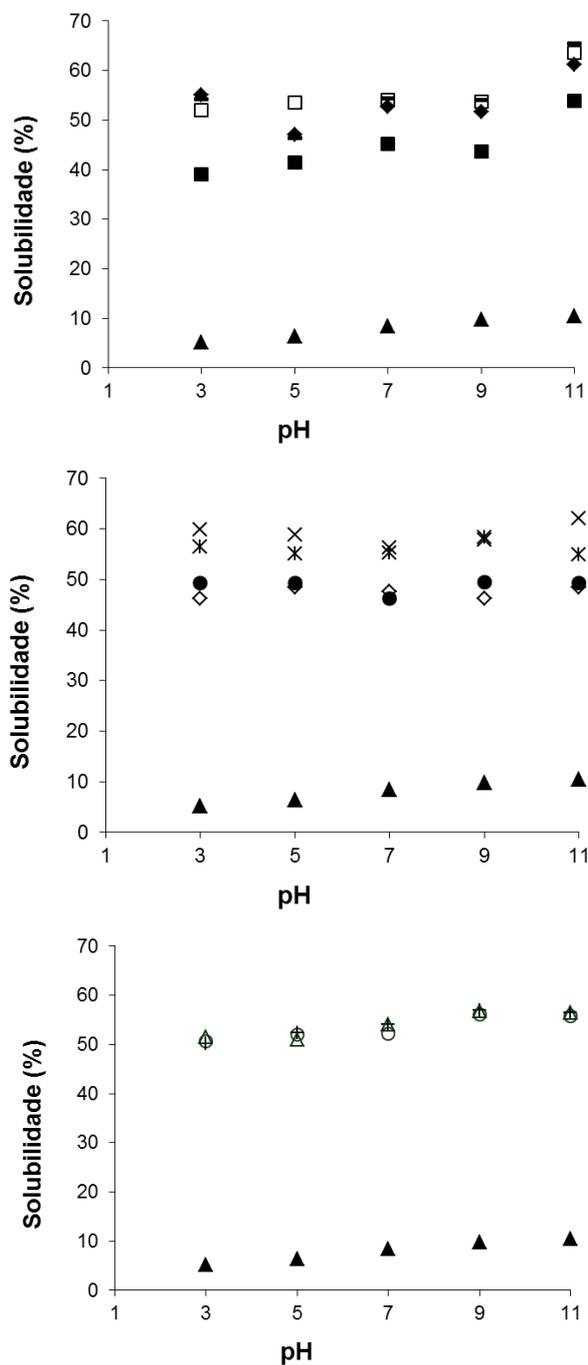
Segundo Sgarbieri (1996), proteínas de origem animal apresentam digestibilidade elevada (a cima de 95%) e as de origem vegetal possuem valores bem inferiores, sendo abaixo de 80%, sendo assim a digestibilidade da biomassa das microalgas assemelha-se a de proteínas de origem vegetal.

Maiores valores de digestibilidade de hidrolisados proteicos em relação a digestibilidade de seus substratos originais também foram encontradas por Negrão et. al. (2005) utilizando carne de frango mecanicamente separada. Dias et al. (2010) estudaram a digestibilidade de farinha de feijão e de seus hidrolisados, concluindo que a hidrólise aumenta significativamente a digestibilidade dessa matéria-prima, para todos os cultivares estudados.

Pode-se afirmar que a hidrólise enzimática de produtos proteicos é capaz de diminuir o tamanho das moléculas de proteína, facilitando então seu processo de digestão. O valor nutricional de uma proteína depende da sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais. Logo, o aumento da digestibilidade das proteínas da biomassa de *Chlorella*, através da hidrólise enzimática, aumenta seu valor nutricional para aplicação em alimentos.

A Figura 2 mostra a curva de solubilidade proteica dos hidrolisados proteicos obtidos com a enzima Protemax 580L, nos pH 3, 5, 7, 9 e 11.

Figura 2 - Curva de solubilidade dos hidrolisados de *Chlorella pyrenoidosa* ensaio 1(♦), ensaio 2 (■), ensaio 3 (-), ensaio 4 (□);ensaio 5 (*), ensaio 6 (●), ensaio 7 (◇), ensaio 8 (×);ensaio 9 (○), ensaio 10 (+), ensaio 11 (Δ) e *Chlorella* não hidrolisada (▲).



Observa-se na Figura 2, que na faixa de pH 3,0 a 7,0 os hidrolisados e a microalga não hidrolisada apresentam solubilidade mínima, já que, nessas condições, as interações proteína-proteína aumentam pelo fato de as forças eletrostáticas estarem num valor mínimo e menos

água interagir com as moléculas protéicas. Quando o pH passou para 9,0 e 11,0 houve um aumento considerável da solubilidade. Sendo que os valores máximos obtidos são observados quando se solubilizou com pH 11,0. Também foi observado, uma correlação entre o grau de hidrólise das proteínas e a solubilidade, pois quanto maior o grau de hidrólise maior será a solubilidade. O ensaio que apresentou maior solubilidade foi o 3 o qual também apresentou o maior grau de hidrólise (54,8%).

Os resultados obtidos com os hidrolisados contendo peptídeos biologicamente ativos foi diferente do apresentado pela biomassa com a proteína nativa, o que poderia ser explicado, pelo fato dos peptídeos apresentarem tamanhos moleculares inferiores e estruturas mais simples que as proteínas, proporcionando desse modo o aumento da solubilidade devido a quebra das proteínas da biomassa da *Chlorella pyrenoidosa* pela ação da enzima Protemax 580 L.

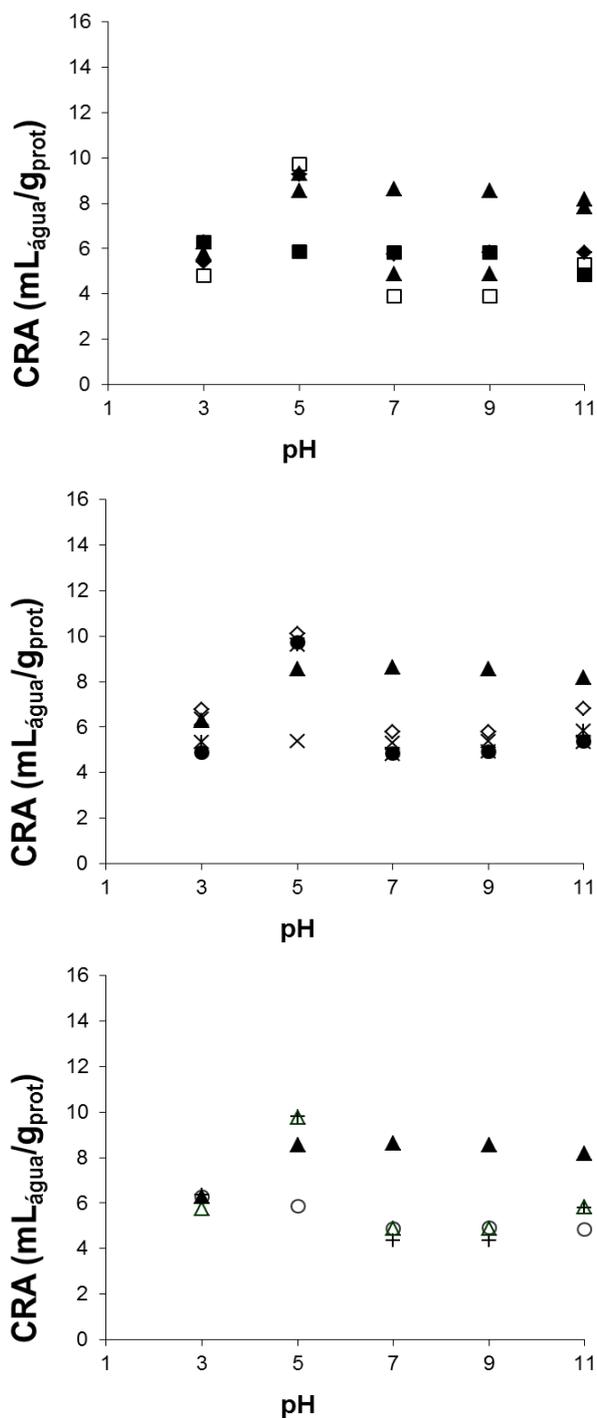
Segundo Panyam e Kilara (1996), uma das principais consequências da hidrólise enzimática é o aumento da solubilidade e, normalmente, este aumento está associado ao aumento do grau de hidrólise. O aumento da solubilidade dos hidrolisados deve-se à diminuição do tamanho das moléculas e consequente aumento da exposição de grupos hidrofílicos amino e carboxil ionizáveis.

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos para a capacidade de retenção de água da microalga e dos hidrolisados nos diferentes pH estudados.

A hidrólise enzimática da biomassa gerou na maior parte dos ensaios uma redução na capacidade de retenção de água em todos os pH estudados. Obtendo melhores resultados em pH 5, que foi o pH onde se alcançou a maior capacidade de retenção de água. Estes resultados podem ser justificados pela possível formação de elevada quantidade de peptídeos com baixo peso molecular formados durante a hidrólise, o que pode influenciar na baixa capacidade de retenção de água, já que, eles podem acabar prejudicando a absorção de água.

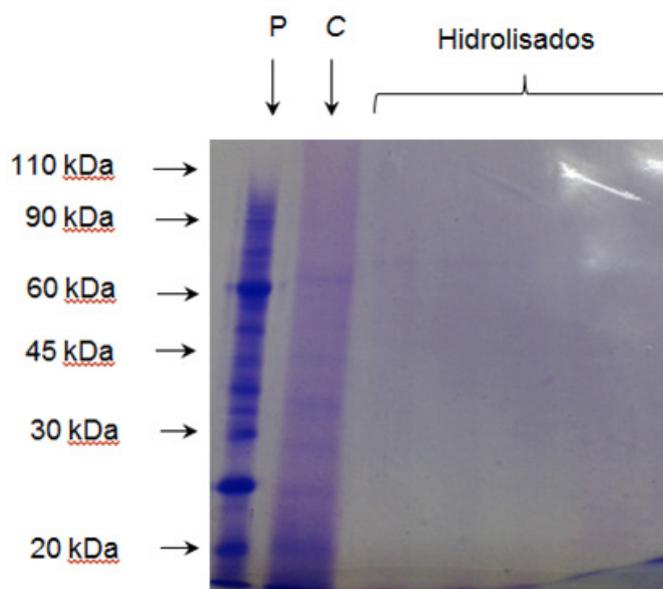
Não foi observado relação entre solubilidade e capacidade de absorção de água, bem com o grau de hidrólise e a capacidade de retenção de água.

Figura 3 - Curva de capacidade de retenção de água dos hidrolisados proteicos, ensaio 1 (◆), ensaio 2 (■), ensaio 3 (-), ensaio 4 (□); ensaio 5 (*), ensaio 6 (●), ensaio 7 (◇), ensaio 8 (×); ensaio 9 (○), ensaio 10 (+), ensaio 11 (△) e *Chlorella* não hidrolisada (▲).



A Figura 4 apresenta o perfil eletroforético das proteínas da biomassa da *Spirulina* não hidrolisada e os hidrolisados.

Figura 4 - Perfil eletroforético das proteínas presentes no padrão (P), na biomassa da *Chlorella pyrenoidosa* (C) e as proteínas dos hidrolisados de *Chlorella*.



Os resultados das análises de eletroforese SDS-PAGE para a biomassa e seus hidrolisados estão apresentados na Figura 4. Onde se pode verificar pela análise das bandas eletroforéticas que houve uma extensa hidrólise das proteínas da microalga.

O efeito da hidrólise enzimática utilizando a enzima comercial Protemax 580L sobre as proteínas da biomassa está demonstrado pela análise de SDS-PAGE (Figura 4). Percebe-se que o perfil das proteínas do hidrolisado foi substancialmente alterado em relação ao da biomassa não hidrolisada. Para a biomassa não hidrolisada (C) pode-se observar várias bandas de peso molecular variando de 20 kDa a 110 kDa. No entanto para os hidrolisados de *Chlorella* não houve a detecção de bandas, pois não foi possível detectar bandas com peso molecular inferior a 20 kDa. Apesar desta metodologia não ser específica para peptídeos de baixo peso molecular, verifica-se que a hidrólise enzimática extensa gerou peptídeos de baixo peso molecular.

A Tabela 4 apresenta os resultados da atividade antioxidante dos hidrolisados de microalga determinada pelos métodos de poder redutor, DPPH e ABTS^{•+}, os hidrolisados de *Chlorella pyrenoidosa* podem apresentar peptídeos de diferentes tamanhos e sequência de aminoácidos, produzidos durante o processo de hidrólise enzimática, o que pode determinar sua capacidade antioxidante.

Vários métodos vêm sendo usados para avaliar a capacidade antioxidante, já que não há atualmente um método padrão. Alguns métodos determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio, outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, ou medindo a inibição da oxidação.

As análises de poder redutor, DPPH e ABST foram realizadas em triplicata, assim como o cálculo do potencial antioxidante os resultados foram avaliados por análise de variância e comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4 - Atividade antioxidante dos hidrolisados da microalga determinada pelo método do poder redutor, DPPH e ABTS⁺.

Hidrolisado proteico	Poder redutor (Abs 700nm)	DPPH (% de inibição)	ABTS ⁺ (mM trolox/g de amostra)
Ensaio 1	0,4896 ^b ± 0,0038	33,55 ^f ± 1,60	0,145 ^d ± 0,006
Ensaio 2	0,5390 ^a ± 0,0110	39,06 ^c ± 2,57	0,093 ^e ± 0,002
Ensaio 3	0,4886 ^b ± 0,0083	47,27 ^b ± 1,31	0,151 ^d ± 0,001
Ensaio 4	0,5033 ^b ± 0,0035	43,35 ^{b,c} ± 1,18	0,117 ^{c,b} ± 0,005
Ensaio 5	0,4953 ^b ± 0,0049	39,90 ^c ± 1,28	0,157 ^d ± 0,015
Ensaio 6	0,5360 ^a ± 0,0099	31,96 ^{d,f} ± 0,84	0,094 ^e ± 0,006
Ensaio 7	0,5563 ^a ± 0,0055	31,75 ^{d,f} ± 1,15	0,126 ^b ± 0,003
Ensaio 8	0,4860 ^b ± 0,0035	32,90 ^f ± 1,28	0,161 ^d ± 0,001
Ensaio 9	0,5370 ^a ± 0,108	26,87 ^e ± 2,04	0,095 ^e ± 0,004
Ensaio 10	0,5463 ^a ± 0,0062	28,52 ^{d,e} ± 1,27	0,103 ^e ± 0,004
Ensaio 11	0,5376 ^a ± 0,0061	26,14 ^e ± 0,97	0,105 ^e ± 0,007
Microalga não hidrolisada	0,4933 ^b ± 0,0042	14,61 ^a ± 1,15	0,018 ^a ± 0,001

*Para todos os ensaios de hidrolisados proteicos realizados, nos valores de absorbância média, porcentagem de inibição e mMol de Trolox/g de amostra, letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas indicam diferença significativa a 95% de confiança.

Ao analisarmos os resultados para a microalga não hidrolisada, comparando-os com os resultados dos ensaios hidrolisados para os métodos de atividade antioxidantes DPPH e

ABTS, observou-se que houve um aumento da atividade antioxidante, sendo esta diferença significativa ao nível de 95%, ou seja, a hidrólise enzimática gerou peptídeos com atividade antioxidante, já para o método de poder redutor a biomassa não hidrolisada apresentou atividade antioxidante estatisticamente igual a 95% de confiança aos ensaios 1, 3, 4, 5 e 8.

Hidrolisados proteicos com maior grau de hidrólise obtiveram melhores resultados de atividade antioxidante para os 3 diferentes métodos de análise estudados, sabe-se que hidrolisados com elevado grau de hidrólise apresentam maior quantidade de peptídeos de baixo peso molecular, e conseqüentemente maior potencial de inibição de oxidação, em relação aos hidrolisados com baixo grau de hidrólise.

Segundo Moosman e Behl (2002), hidrolisados com elevado grau de hidrólise apresentam maior quantidade de peptídeos de baixo peso molecular, e conseqüentemente maior potencial da oxidação, em relação aos hidrolisados com baixo grau de hidrólise.

As propriedades antioxidantes dos biopeptídeos são altamente influenciadas pela sua estrutura e peso molecular. A maioria dos biopeptídeos relatados que apresentam efeitos antioxidantes são aqueles com baixo peso molecular, aumentando, desta forma a chance destes compostos de atravessar a barreira intestinal e exercer o efeito biológico desejado (SHEIH et al., 2009).

Os valores de absorvância a 700 nm para os 11 ensaios e microalga não hidrolisada analisados revelaram que todas as amostras apresentaram capacidade de reduzir o Fe^{+3} , o que podemos observar na Tabela 4, sendo que os hidrolisados com maior poder redutor apresentaram também maiores valores de grau de hidrólise, sugerindo que os hidrolisados com maior GH provavelmente contenham peptídeos de menor peso molecular, em relação aos hidrolisados com menor GH. Assim, pode-se dizer que o grau de hidrólise exerce importante efeito nas propriedades antioxidantes dos hidrolisados, e que os peptídeos de baixo peso molecular contribuem mais significativamente para a inibição oxidativa do que hidrolisados compostos por polipeptídeos.

Os radicais livres DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se, assim, a absorvância. A atividade antioxidante, utilizando o método de captura dos radicais DPPH, da microalga e dos hidrolisados avaliadas neste estudo está apresentada na Tabela 4. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição (%). Observou-se que o efeito sequestrante do radical DPPH para os experimentos com a microalga hidrolisada (26,14 - 47,27%) aumentou consideravelmente quando comparado com a biomassa intacta (14,61%), ou seja, a hidrólise

enzimática gerou um aumento de 3,2 vezes na sua capacidade antioxidante quando comparado com a biomassa intacta.

Os resultados da atividade antioxidante pelo método ABTS foram expressos como capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (valores TEAC). Constatou-se, a partir da Tabela 4, que, assim como no teste antioxidante pelo método de captura de radicais DPPH•, os hidrolisados proteicos apresentaram mais elevada capacidade antioxidante, atingindo valores máximos de TEAC 0,161 mMol de Trolox/g de amostra, gerando um aumento de 9 vezes na sua capacidade antioxidante quando comparado com a biomassa não hidrolisada.

4 CONCLUSÃO

A hidrólise das proteínas gerou aumento da solubilidade e da digestibilidade dos hidrolisados, também foi observado uma correlação entre o grau de hidrólise e a solubilidade, pois quanto maior o grau de hidrólise (54,8%) maior foi o valor de solubilidade (65,5%) alcançado. Também foi comprovado que a hidrólise das proteínas torna-as mais digeríveis, assim como na solubilidade das proteínas a digestibilidade também foi observado uma correlação com o grau de hidrólise, pois o ensaio que apresentou maior grau de hidrólise alcançou maior digestibilidade (87,79%).

Os hidrolisados proteicos de *Chlorella* obtiveram, na maior parte dos ensaios, uma redução na capacidade de retenção de água em todos os pH estudados, quando comparados com os resultados obtidos para biomassa não hidrolisada.

A hidrólise enzimática da proteína da microalga *Chlorella pyrenoidosa* gerou peptídeos com atividade antioxidante, pois ao comparar os resultados da microalga não hidrolisada com os ensaios hidrolisados, para todos os métodos estudados, houve aumento da atividade antioxidante, sendo esta diferença significativa ao nível 95%.

REFERÊNCIAS

AHN, C., LEE, K., JE, J. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: Effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 562–568, 2010.

AKESON, W. R., STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.

- ALEMAN, A., GIMENEZ, B., MONTERO, P., GOMEZ-GUILLEN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 407–413, 2011.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. *Official Methods of Analysis of AOAC international*. 17th ed, Washington, D. C., 2005.
- BYUN, H. G., LEE, J. K., PARK, H. G., JEON, J. K., KIM, S. K. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer *Brachionus rotundiformis*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 842–846, 2009.
- CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C. Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, p.937, 2003.
- CHANPUT, W., THEERAKULKAIT, C., NAKAI, S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 422–428, 2009.
- COLLA, L. M., FURLONG, E. B., COSTA, J. A. V. Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.
- DIAS, D. R., ABREU, C. M. P., SILVESTRE, M. P. C., SCHWAN, R. F. In vitro protein digestibility of enzymatically pre-treated bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour using commercial protease and *Bacillus* sp. protease. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 94-99, 2010.
- 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.
- GALLA, N. R., PAMIDIGHANTAM, P. R., AKULA, S., KARAKALA, B. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1479–1484, 2012.
- GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 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.
- JE, J. Y., PARK, P. J., KIM, S. K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 38, p. 45–50, 2005.
- KIM, S., WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 1–9, 2010.
- KO, S. C., KIM, D., JEON, Y. J. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2294–2302, 2012.

- KRISTINSSON, H. G., RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43-81, 2000.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, J. K., HONG, S., JEON, J. K., KIM, S. K., BYUN, H. G. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *brachionus rotundiformis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5255-5264, 2009.
- LEE, M. S. S. H., KANG, M. S. H. J., LEE, M. S. H. J., KANG, M. H., PARK, Y. K. Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. **Nutrition**, v. 26, p. 175-183, 2010.
- LIU, R., WANG, M, DUAN, J., GUO, J., TANG, Y. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from *Cornu Bubali* (Water buffalo horn). **Peptides**, v. 31, p. 786-93, 2010.
- 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.
- MOOSMAN, B., BEHL, C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure activity relationship. **Molecular Pharmacology**, v. 61, p. 260-268, 2002.
- MORR, C. V., GERMAN, B., KINSELLA, J. E., REGENSTEIN, J. E., VAN BUREN, J. P., KILARA, A., LEWIS, B. A., MANGINO, M. E., 1985. A collaborative study to develop a standardised food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1715-1718, 1985.
- NEGRÃO, C. C.; MIZUBUTTI, Y.; MORITA, M. C.; COLLI, C.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food Chemistry, London**, v. 90, p. 579-583, 2005.
- NGO, D., QIAN, Z., RYU, B., PARK, J. W., KIM, S. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 107-117, 2010.
- NOGUCHI, N., KONISHI, F., KUMAMOTO, S., MARUYAMA, I., ANDO, Y., YANAGITA, T. Beneficial effects of *Chlorella* on glucose and lipid metabolism in obese rodents on a high-fat diet. **Obesity Research e Clinical Practice**, v. 7, p. 95-105, 2013.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v.44, p.307-315, 1986.

- PANYAM, D., KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science e Technology**, v.7, p.120-125 , 1996.
- POLÔNIO, M. L. T., PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno Saúde Pública**, v. 25, p. 1653-1666, 2009.
- REGENSTEIN, J. M., JAUREGUI, C. A., BAKER, R. The effect of pH, phyphosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscles. **Journal of Food Biochemistry**, v. 8, p.123-131, 1984.
- ROMAN, J. A., SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 468, 2005.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, 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, 2007a.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007b.
- SARMADI, B. H., ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p. 1949–1956, 2010.
- SEGURA-CAMPOS, M. R., SALAZAR-VEJA, I. M., CHEL-GUERRERO, L. A., BETANCUR-ANCONA, D. A. Biological potential of chia (*Salvia hispânica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 723-731, 2013.
- SENTHILKUMAR, T., ASHOKKUMAR, N. Impact of *Chlorella pyrenoidosa* on the attenuation of hyperglycemia-mediated oxidative stress and protection of kidney tissue in streptozotocin-cadmium induced diabetic nephropathic rats. **Biomedicine e Preventive Nutrition**, v. 2, p. 125–131, 2012.
- ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p.468, 2005.
- 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.
- WANG, H. M., PAN, J. L., CHEN, C. Y., CHIU, C. C., YANG, M. H., CHANG, H. W., CHANG, J. S. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C–C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1865–1872, 2010.

ZHAO, Y., LI, B., DONG, S., LIU, Z. L., ZHAO, Z., WANG, J. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. **Peptides**, v. 30, p. 1028–33, 2009.

ZHONG, F., LIU, J., MA, J., SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International**, v. 40, p. 661–667, 2007.

ZHOU, K., SUN, S., CANNING, C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1192–1197, 2012.

**ARTIGO 4: OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE BIOPEPTÍDEOS COM
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas contendo peptídeos bioativos obtidos através de reação de hidrólise enzimática de biomassa microalgal. Os hidrolisados foram purificados por filtração a vácuo com membranas de diferentes tamanhos (0,45; 0,2 e 0,1 μm) e por colunas com membrana vertical (3K e 10K). Após cada etapa, foi realizado teste de atividade antioxidante através dos métodos de poder redutor, DPPH e ABTS. As amostras foram secas por atomização (secador por atomização), sendo o tamanho e morfologia das partículas analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os hidrolisados das microalgas apresentaram elevada atividade antioxidante, quando comparada com as biomassas não hidrolisadas, mesmo após a purificação. Foram obtidas nanopartículas de tamanhos variando de 14 a 18 nm para o hidrolisado de *Spirulina* e de 72 a 108 nm para o hidrolisado de *Chlorella*.

Palavras-chave: atividade antioxidante, hidrolisados proteicos, biopeptídeos

OBTAINMENT OF NANOPARTICLES OF PEPTIDES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY

ABSTRACT

This study aimed to obtain nanoparticles containing bioactive peptides produced by enzymatic hydrolysis reaction microalgal biomass. The hydrolysates were purified by vacuum filtration membranes of different sizes (0.45, 0.2 and 0.1 μm) and vertical columns membrane (3K and 10K), after each step was test carried out antioxidant activity by the methods of reducing power, DPPH and ABTS. The samples were dried by atomization (spray drier), and the size and morphology of the particles obtained analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The hydrolysates of microalgae showed antioxidant activity when compared to biomass is not hydrolysed, even after purification. Produced nanoparticles of sizes ranging from 14 to 18 nm for the hydrolyzate of *Spirulina* and from 72 to 108 nm for the hydrolysate *Chlorella*.

Keywords: antioxidant activity, protein hydrolysates, biopeptideo

1 INTRODUÇÃO

As microalgas vêm ganhando grande atenção no cenário mundial, devido a sua importância em diversas pesquisas biotecnológicas. Estudos vêm sendo desenvolvidos em relação a sua utilização na alimentação (GRAZIANI et al., 2013; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013), na obtenção de diversos compostos com alto valor agregado, como proteínas (GERDE et al., 2013; SARI et al., 2013), ácidos graxos (SAHUA et al., 2013), para a produção de biocombustíveis (WIJFFELS et al., 2010; DELRUE et al., 2012) e também para biofixar CO₂ de efluentes gasosos (LI et al., 2013; JIANG, 2013).

O interesse na pesquisa por novas fontes proteicas e peptídeos não convencionais para aplicação na indústria alimentícia é cada vez maior. (GARCIA et al., 2012).

As proteínas, além de fornecerem aminoácidos essenciais, são uma importante fonte de biopeptídeos. Na proteína precursora estes são inativos e, para possuírem efeito fisiológico, precisam ser liberados, podendo ser produzidos através da ação de enzimas proteolíticas derivadas de animais ou plantas. Geralmente são compostos por cerca de 2 a 20 resíduos de aminoácidos por molécula e sua atividade baseia-se na respectiva composição e sequência destes resíduos. Os biopeptídeos podem apresentar diferentes funções no organismo, exercendo efeitos sobre os sistemas cardiovascular, digestivo, imunológico e nervoso. Algumas dessas biomoléculas apresentam propriedades antihipertensora, antitrombótica, antioxidante, antimicrobiana e imunomoduladora (HARTMANN e MEISEI, 2007; KORHONEN, 2009).

A hidrólise enzimática de proteínas tem sido descrita como um método promissor para melhorar a digestibilidade das proteínas de origem microalgal, o que as tornam mais utilizáveis para a nutrição humana (MORRIS et al., 2008).

O progresso das técnicas de hidrólise levou à produção de hidrolisados de diversas proteínas alimentares, utilizando enzimas proteolíticas, tais como proteases pancreáticas, proteases bacterianas e pepsina (GUADIX et al., 2000). Hidrolisados de proteínas enzimáticas são mais eficazes que qualquer proteína intacta ou aminoácidos livres para serem utilizados em formulações específicas com aplicação clínica (VIOQUE et al., 2004; MORRIS et al., 2008).

Peptídeos com atividade antioxidante vêm sendo produzidos de diferentes fontes de proteínas, tais como leite (ALUĞUR e ONER, 2011; MOSLEHISHAD et al., 2013; POWER et al., 2013), soja (VERNAZA et al., 2012), ovos (TANZADEHPANAH et al., 2012), peixe (NAZEER et al., 2012; Ko et al., 2013), frango (SUN et al., 2012) e carne

bovina (ESCUADEROA et al., 2012; DI et al., 2011), mas na literatura existem poucos estudos avaliando a atividade antioxidante de peptídeos produzidos pela hidrólise enzimática de proteína de microalgas como *Spirulina* e *Chlorella*.

A nanotecnologia é focada em caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas (SAHOO et al., 2007) na escala nanométrica. As nanopartículas estão comumente descritas como sólidas partículas coloidais, variando em tamanho a partir de 10 nm para a 1 µm (ANTON et al., 2008; SINGH e LILLARD, 2009; LI et al., 2010).

A secagem em *Spray dryer* (secagem por atomização), é uma técnica muito utilizada para obtenção de nanopartículas (Li et al., 2010; BÜRKI et al., 2011; PAUDEL et al., 2013). Esta técnica oferece algumas vantagens, como a reprodutibilidade para obtenção de nanopartículas, a aplicabilidade tanto com materiais sensíveis quanto resistentes à temperatura, a capacidade de processar diversas matérias-primas e a rápida operação do equipamento. Os fatores de formulação e os parâmetros de processo determinam as propriedades das partículas produzidas (RÉ, 2006).

O objetivo deste estudo foi produzir nanopartículas de peptídeos com atividade antioxidante, obtidos pela hidrólise enzimática de microalgas, utilizando técnica de secagem por atomização, para aplicação em alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microalgas e Enzima

Foram utilizadas duas microalgas: *Chlorella pyrenoidosa* (em pó, comercializada por Fuqing King Dnarmsa Co. Ltd., China) e a microalga *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira (MORAIS et al., 2008) e cultivada na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada as margens da Lagoa Mangueira na cidade de Santa Vitória do Palmar, Brasil. A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 seca, foi moída em moinho de bolas (Modelo Q298, QUIMIS) e peneirada. A enzima utilizada foi Protemax 580L de *Bacillus lichenformis*, (Prozyn, São Paulo, Brasil).

2.2 Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada segundo o método descrito por Ma et al., (2007). O conteúdo de tirosina do sobrenadante foi determinado por colorimetria a 650 nm via reagente de Folin-Fenol (LOWRY et al., 1951). A enzima foi inativada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 10 % e a atividade definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina por minuto

2.3 Composição Proximal

As análises realizadas para a avaliação da composição proximal das microalgas foram proteína total, cinzas, umidade e lipídeos foram determinadas segundo métodos descritos pela AOAC, 2005. Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25. Cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600°C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105°C). Os lipídeos foram extraídos com 2:1 (v/v) clorofórmio/metanol, purificado com 0,9% (p/v) NaCl e a 2:1 (v/v) metanol/água misturados de acordo com Folch e Lees (1957) e transferidos para um evaporador rotatório sendo o solvente removido a aproximadamente 37 °C. O conteúdo de lipídeos foi determinado por gravimetria. Os carboidratos foram determinados por diferença.

2.4 Hidrólise Enzimática

Para a hidrólise enzimática o sistema reacional foi composto pela enzima Protemax 580L (5 U.mL⁻¹) e pela biomassa de *Spirulina* ou *Chlorella pyrenoidosa* (8% de proteína), previamente caracterizadas quanto à composição proximal (AOAC, 2005), em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5, totalizando 500 mL (2 erlenmeyers), para cada microalga em estudo. Os erlenmeyers foram dispostos em “shaker” (Certomat BS-1) com agitação de 180 rpm e temperatura constante de 60 °C, temperatura ótima de atividade da enzima, para todos os experimentos. Ao término da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85°C por 10 min.

2.5 Determinação do Grau de Hidrólise

A análise de determinação do grau de hidrólise (GH) foi realizada após 4 h de reação. Alíquotas de 1 mL de hidrolisado foi inativada pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% e mantida em repouso por 10 min. Posteriormente foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm, para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis no filtrado utilizando o método de Folin-Lowry, expresso em mg de albumina. O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por Hoyle e Marrit (1994) com modificações, sendo expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado segundo a Equação 1.

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

onde o branco, PS_{t0} , correspondeu à quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25% antes da adição da enzima; PS_{tf} foi a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P_t foi a quantidade de proteína total na amostra determinada por micro Kjeldahl ($N \times 6,25$).

2.6 Purificação

2.6.1 Filtragem

Para purificar as amostras e avaliar a redução da atividade antioxidante as microalgas não hidrolisadas e seus hidrolisados foram centrifugados por 10 min a 5000 rpm, após foram filtradas em membrana 0,45 μm , logo em seguida foram novamente filtradas em membrana 0,2 μm e por fim filtrados em 0,1 μm . Após cada etapa, foi realizado teste de atividade antioxidante pelos métodos de poder redutor, DPPH e ABTS, a fim de verificar a permanência da atividade antioxidante. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6.2 Centrifugação em membrana vertical

Os hidrolisados filtrados em membrana 0,1 μm foram purificados através de colunas com membrana vertical Amicon® Ultra 0.5 Centrifugal Filters (Millipore) com 3K e 10K de peso molecular de 3000 Da e 10000 Da, respectivamente, conforme instruções do fabricante. As colunas foram encaixadas em eppendorf de 2 mL (Figura 1) e então foi adicionado um volume final de 500 μL de amostra, os tubos foram centrifugados a 14.000 xg por 20 minutos, a temperatura ambiente. As análises de atividade antioxidante foram realizadas no filtrado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 1- Centricons (Centrifugal Filter Devices, Amicon Ultra 0.5, Ultracel – 10K).



2.7 Poder Redutor

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de Poder Redutor de acordo com OYAZIU (1986). Para esta determinação uma amostra de 2 mL de solução de hidrolisado 5 mg/mL foi misturada com 2 mL de tampão fosfato se sódio 0,2 M (pH 6,6) e 2 mL de ferrocianeto de potássio 1%. Essa mistura foi incubada a 50°C em banho-maria por 20 min. Em seguida foi adicionado 2 mL de TCA 10%. Alíquotas de 2 mL das amostras incubadas foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1%. Após 10 min absorvância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro. O aumento da absorvância da mistura da reação indica um aumento do poder redutor.

2.8 Capacidade de sequestro da radical livre DPPH

O Efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazol (DPPH) foi medido conforme descrito por RUFINO et al. (2007b) com modificações. As amostras de 0,1 mL (2,5 mg.mL⁻¹), foram adicionadas em 3,9 mL de DPPH 0,06 mmol.L⁻¹ em álcool metílico, em ambiente escuro. A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida a temperatura ambiente por 60 min. A absorvância resultante da solução foi medida a 517 nm em espectrofotômetro. Menor absorvância representa uma maior capacidade de sequestro do radical DPPH o qual foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$\text{Inibição (\%)} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}})/Abs_{\text{controle}}] \times 100 \quad (2)$$

2.9 Captura do radical livre ABTS

A capacidade captura do radical livre ABTS foi determinada conforme RUFINO et al. (2007a), com modificações. ABTS, 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi dissolvido em água a uma concentração de 7 mM/L (solução estoque). O cátion radical (ABTS⁺) foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88µL de solução de persulfato de potássio 140mM, deixando a mistura em repouso no escuro, à temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida, diluir 1mL desta mistura em álcool etílico até obter absorvância de 0,70nm ± 0,05 nm a 734 nm. Preparado e usado apenas no dia da análise. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 µL de amostra (2,5 mg/mL) para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS⁺, agitou-se em vórtex. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro após 6 min. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (derivado hidrossolúvel do α-tocoferol), sendo os resultados expressos como mMol de Trolox /g de amostra.

2.10 Secagem por atomização

As amostras filtradas em membranas 0,1 µm foram levadas ao secador por atomização *nano spray dryer* modelo B 90 da BÜCHI Labortechnik AG, onde se procedeu a atomização. As condições de secagem foram: pressão variando de 20 a 30 nBar, temperatura de entrada 110 °C, temperatura de saída aproximadamente 42 °C. Ar comprimido foi utilizado como gás

de secagem e a taxa de fluxo foi ajustada para cerca de 100-110 L.min⁻¹. A taxa de pulverização relativa foi definida como 100%.

2.11 Tamanho e morfologia das partículas

As amostras foram dispersas em acetona (1:2) e agitadas por 5 min em banho ultrassônico. Após foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JSM-6610LV-Scanning Electron Microscope) usando uma tensão de aceleração de 20 a 25 Kv. O preparo das amostras foi realizado à vácuo com pulverização de ouro (Dentron Vacuum Deskv). As análises foram realizados no Centro de Microscopia (CEMESUL) da Universidade Federal de Rio Grande – FURG.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O elevado conteúdo de proteína de algumas microalgas é a principal razão para a seleção desses micro-organismos como fonte não convencional de proteínas. A composição proximal média e o desvio padrão das microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18 utilizadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição proximal das microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18

Determinações	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (%)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (%)
Umidade	11,99±0,07	6,91±0,06
Proteínas	51,66±1,87	50,80±0,63
Cinzas	7,84±0,02	6,66±0,04
Lipídios	7,06±0,11	13,53±0,22
Carboidratos**	27,45±0,00	22,10±0,00

*resultados expressos como média e desvio padrão de três determinações

**determinados por diferença

O elevado teor de proteínas em microalgas é uma das principais razões para escolha destes organismos tão pouco convencionais como fontes de proteínas para obtenção de peptídeos com atividade antioxidante. Além disso, as microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e

Chlorella pyrenoidosa destacam-se das demais já estudadas por possuírem o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*), possibilitando, desse modo a aplicação dos peptídeos produzidos, por essas fontes de proteínas, em alimentos ou fármacos.

As microalgas constituem uma fonte quase inexplorada de antioxidantes naturais, devido à sua enorme biodiversidade. Estudos científicos sobre a atividade antioxidante de microalga são limitados, especialmente a respeito da capacidade antioxidante de peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de microalgas. Portanto, torna-se necessário estudar a possibilidade de obter novas fontes de antioxidantes naturais.

As proteínas da biomassa das microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e da *Spirulina* sp. LEB 18 obtiveram grau de hidrólise 46,3% e 54,6%, respectivamente.

Vários fatores podem influenciar na capacidade antioxidante, tais como concentração e tipo de amostra analisada. Por isso, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a atividade antioxidante irá refletir exatamente a atividade antioxidante presente na amostra estudada (HUANG et al., 2005).

Os métodos escolhidos, neste estudo, para avaliar a atividade antioxidante das microalgas intactas e seus hidrolisados, após os processos de filtração foram: capacidade de sequestro do radical livre DPPH, captura do radical livre ABTS e poder redutor, os quais baseiam-se em diferentes princípios.

O método do poder redutor é baseado na transferência de elétrons, medindo a habilidade do antioxidante de transferir um elétron a fim de reduzir radicais, indicando a mudança de cor do oxidante. Conforme aumenta a capacidade dos compostos em doar elétrons para que a reação de redução ocorra, a solução fica mais escura, conseqüentemente ocorre o aumento da absorbância que irá indicar elevado potencial redutor da amostra.

Os métodos espectrofotométricos são relativamente simples baseando-se invariavelmente, na capacidade “descolorante” da amostra. Os ensaios mais utilizados recebem o nome do reagente cuja absorção será atenuada pelo antioxidante, ou seja, ensaios de DPPH e ABTS. Indicam a capacidade antioxidante total do produto no que diz respeito a varrer radicais livres (BUTERA et al., 2002).

O método do sequestro do radical DPPH consiste em avaliar a capacidade do antioxidante de sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 517 nm. Por ação de um antioxidante o DPPH é reduzido formando difenil-

picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente redução da absorção. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais.

O radical ABTS é relativamente estável, mas prontamente reduzido por antioxidantes. A atividade de reduzir o radical ABTS por um antioxidante peptídico indica a capacidade de frações peptídicas para atuar como doadores de elétrons ou doadores de hidrogênio em reações com radicais livres (PRIOR et al., 2005).

As análises de poder redutor, DPPH e ABST foram realizadas em triplicata, assim como o cálculo do potencial antioxidante os resultados foram avaliados por análise de variância e comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de significância.

A Tabela 2 apresenta a avaliação dos métodos de atividade antioxidante, após os tratamentos de centrifugação e filtração, para a biomassa hidrolisada e não hidrolisada da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.

O poder redutor, a capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS apresentaram comportamento semelhante. Observou-se, na Tabela 2, que para os 3 testes de atividade antioxidante estudados o hidrolisado da microalga *Chlorella pyrenoidosa* apresentou maiores resultados, sendo essa diferença significativa a 95% de confiança dos da microalga não hidrolisada, comprovando deste modo a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante gerados durante o processo de hidrólise enzimática. Já para os tratamentos tanto para as biomassas não hidrolisadas como para biomassas hidrolisadas não foram observadas diferença significativa a 95% de confiança para centrifugação, filtração a 0,45 μm e 0,2 μm . No entanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o tratamento de filtração utilizando millipore 0,1 μm , o que indica que moléculas maiores que possuem atividade antioxidante ficaram retidas na membrana.

Tabela 2 - Atividade antioxidante para biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* não hidrolisada e hidrolisada após os tratamentos.

Amostras	Tratamento	DPPH (% Inibição)	Poder redutor (Abs 700nm)	ABTS (mMol Trolox/g)
Não hidrolisada	Centrifugada	9,89 ^d ± 0,09	0,183 ^d ± 0,010	0,0027 ^d ± 0,0001
	0,45µm	9,95 ^d ± 0,19	0,178 ^d ± 0,006	0,0027 ^d ± 0,0001
	0,2 µm	9,84 ^d ± 0,33	0,168 ^d ± 0,006	0,0027 ^d ± 0,0001
Hidrolisada	0,1 µm	7,27 ^b ± 0,19	0,133 ^b ± 0,001	0,0020 ^d ± 0,0003
	Centrifugada	31,69 ^c ± 1,09	0,287 ^c ± 0,002	0,0996 ^a ± 0,0013
	0,45 µm	31,31 ^c ± 0,59	0,281 ^c ± 0,005	0,0954 ^c ± 0,0003
	0,2 µm	31,37 ^c ± 0,84	0,275 ^c ± 0,004	0,0949 ^c ± 0,0007
	0,1 µm	27,05 ^a ± 0,71	0,258 ^a ± 0,001	0,0754 ^b ± 0,0011

*letras iguais, na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa e letras distintas, na mesma coluna, indicam diferença significativa a 95% de confiança.

A Tabela 2 apresenta a avaliação dos métodos de atividade antioxidante, após os tratamentos de centrifugação e filtração, para a biomassa hidrolisada e não hidrolisada da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

Os resultados obtidos para a microalga *Spirulina* e seus hidrolisados foram semelhantes para os três métodos de atividade antioxidante.

Na Tabela 3, foi avaliada a redução da atividade antioxidante pelos métodos de poder redutor, sequestro dos radicais DPPH e ABTS, para os hidrolisados da microalga *Spirulina* bem como para biomassa não hidrolisada. A produção de peptídeos biologicamente ativos foi comprovada pelo aumento da atividade antioxidante do hidrolisado nos 3 métodos avaliados, sendo esse aumento significativo a 95% de confiança. Já para os tratamentos de centrifugação, filtração a 0,45 µm e 0,2 µm, tanto para as biomassas não hidrolisadas como para biomassas hidrolisadas não foram observadas diferença significativa a 95% de confiança. Mas, quando utilizou-se a filtração membrana por filtrante de 0,1 µm, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$), indicando que peptídeos com atividade antioxidante de maiores tamanhos possam ter ficado retidos na membrana filtrante.

Tabela 3 - Atividade antioxidante para biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 não hidrolisada e hidrolisada após os tratamentos de filtração.

Amostras	Tratamento	DPPH (% inibição)	Poder redutor (Abs 700nm)	ABTS (mMol Trolox/g)
Não hidrolisada	Centrifugada	19,56 ^e ± 0,34	0,254 ^e ± 0,005	0,0104 ^c ± 0,0002
	0,45 μm	20,49 ^e ± 0,66	0,256 ^e ± 0,003	0,0089 ^e ± 0,0001
	0,2 μm	20,27 ^e ± 0,90	0,257 ^e ± 0,002	0,0081 ^e ± 0,0004
Hidrolisada	0,1 μm	12,90 ^b ± 0,09	0,174 ^c ± 0,003	0,0034 ^e ± 0,0003
	Centrifugada	45,52 ^c ± 0,53	0,445 ^a ± 0,006	0,1498 ^b ± 0,0001
	0,45 μm	44,64 ^{c,d} ± 0,93	0,423 ^d ± 0,005	0,1438 ^d ± 0,0019
	0,2 μm	43,39 ^d ± 0,84	0,419 ^d ± 0,001	0,1421 ^d ± 0,0015
	0,1 μm	40,00 ^a ± 0,56	0,401 ^b ± 0,005	0,1020 ^a ± 0,0021

*letras iguais, na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa e letras distintas, na mesma coluna, indicam diferença significativa a 95% de confiança.

Os hidrolisados de ambas microalgas apresentaram maior poder redutor comparado com as microalgas não hidrolisadas (Tabela 2 e 3). De acordo com Je et al. (2009), o maior poder redutor pode ser atribuído ao maior conteúdo de peptídeos doadores de elétrons e hidrogênio. O poder redutor dos hidrolisados pode servir como forte indicador da atividade antioxidante. A presença do antioxidante causou a redução do Fe⁺³ (complexo ferricianeto) para a forma ferroso (Fe⁺²), e esta redução é comprovada pela alteração da cor da reação de amarelo para vários tons de verde e azul, dependendo do poder redutor de cada composto (FERREIRA et al., 2007).

Os resultados obtidos sugerem que os hidrolisados continham aminoácidos ou peptídeos que são doadores de elétrons e podem reagir com os radicais livres (DPPH e ABTS) parando a reação da cadeia de radicais, convertendo-os em produtos mais estáveis.

Observou-se que mesmo com a filtração com membrana 0,1 μm os hidrolisados das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella pyrenoidosa* apresentaram uma elevada atividade antioxidante, quando comparada com as biomassas não hidrolisadas. Sugerindo, deste modo, que os peptídeos produzidos pela hidrólise enzimática possuíam baixo peso molecular, fato comprovado pela manutenção da atividade antioxidante após a filtração.

A Tabela 4 apresenta os resultados de atividade antioxidante dos hidrolisados após filtração em membranas Amicon® Ultra 0,5 mL (3k e 10K) pelos três métodos em estudo.

Tabela 4 - Atividade antioxidante dos hidrolisados de *Chlorella* e *Spirulina* após filtragem com Amicon® Ultra 0.5.

Método Antioxidante	Hidrolisado de <i>Spirulina</i>		Hidrolisado de <i>Chlorella</i>	
	Amicon 3 K	Amicon 10K	Amicon 3 K	Amicon 10K
DPPH (% de inibição)	30,11± 0,398	34,03 ± 0,588	21,11 ± 0,563	21,54 ± 0,130
Poder Redutor (abs 700 nm)	0,387 ± 0,001	0,402 ± 0,002	0,246 ± 0,004	0,252 ± 0,003
ABTS (mMol Trolox/g)	0,114 ± 0,001	0,120 ± 0,002	0,086 ± 0,001	0,085 ± 0,001

Após a filtragem por centrifugação com membrana vertical Amicon de peso molecular de 10000 Da e 3000 Da, verificou-se a presença de atividade antioxidante dos hidrolisados de *Spirulina* e *Chlorella* no filtrado para os três métodos avaliados, no entanto foi observada redução da atividade antioxidante após a centrifugação com Amicon 3K, indicando que possivelmente peptídeos com peso molecular superior a 3000 Da ficaram retidos na membrana. Estes resultados (Tabela 4) sugerem que foi possível obter peptídeos com capacidade antioxidante com peso molecular inferior a 10000 Da.

Alguns estudos avaliaram a contribuição do tamanho molecular e características estruturais de misturas de peptídeos obtidos por hidrolisados proteicos sobre a sua bioatividade. Estes estudos revelaram que as frações de baixo peso molecular, em geral, contêm peptídeos antioxidantes mais potentes (ALEMÁN et al., 2011; LIU et al., 2010; NALINANON et al., 2011). Em paralelo, outros pesquisadores têm sugerido que um elevado grau de hidrólise e, conseqüentemente baixos pesos moleculares dos peptídeos, produzidos de diferentes fontes de proteína, favorecem o poder sequestrante do radical DPPH e ABTS (BOUGATEF et al., 2009; LIU et al., 2010; PHANTURAT et al., 2010; UDENIGWE e ALUKO, 2011).

Para obtenção das nanopartículas foi utilizado um secador por atomização (*nano spray dryer* B 90) devido à sua capacidade de produzir partículas no tamanho nanométrico e apresentar elevados rendimentos com baixa perda de atividade do bioativo (LI et al., 2010; SCHMID et al., 2010). Atomização é um método bem estabelecido para a fabricação de produtos fármacos (VEHRING, 2008), no entanto, a aplicação de secadores por atomização

para obter partículas na faixa de tamanho nanométrico é tecnicamente difícil, devido à técnica de coleta da amostra, a qual favorece a aglomeração das partículas dificultando deste modo a análise de seu tamanho.

As nanopartículas foram fotografadas com aumento de 150.000X (Figura 2) e 20.000X (Figura 3) dependendo da amostra, a fim de avaliar o tamanho e a forma que apresentam.

Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de peptídeos bioativos dos hidrolisados da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

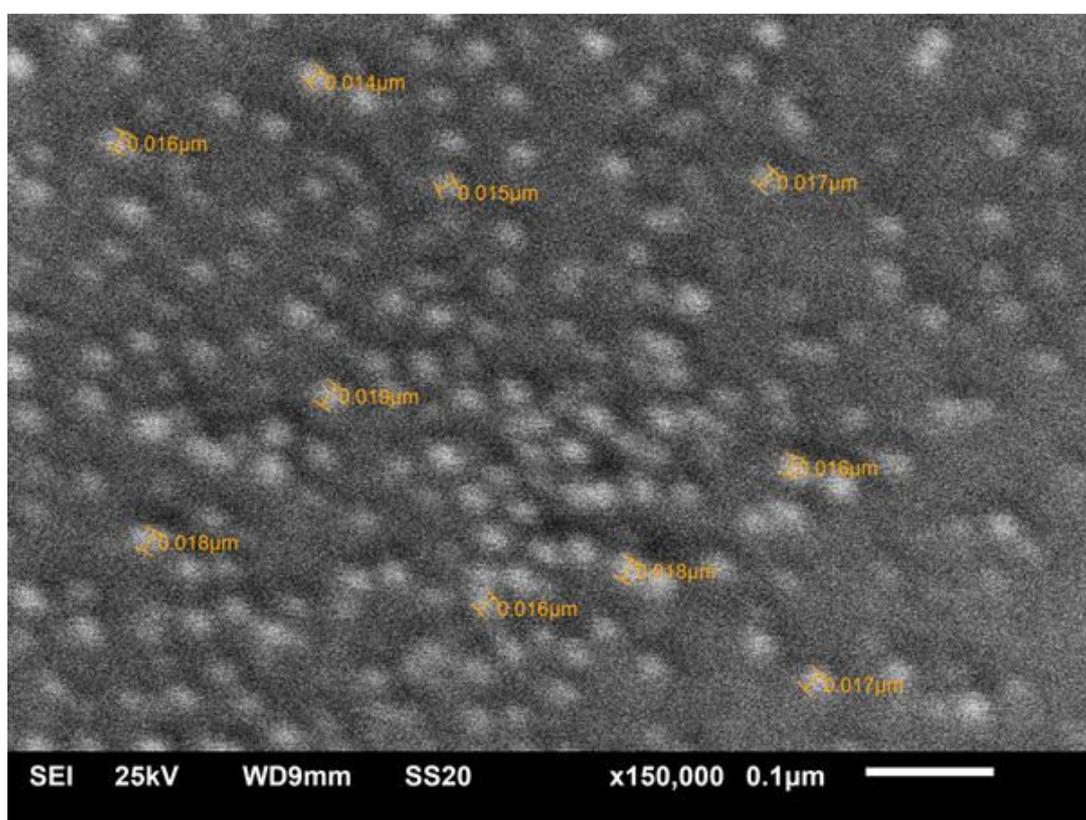
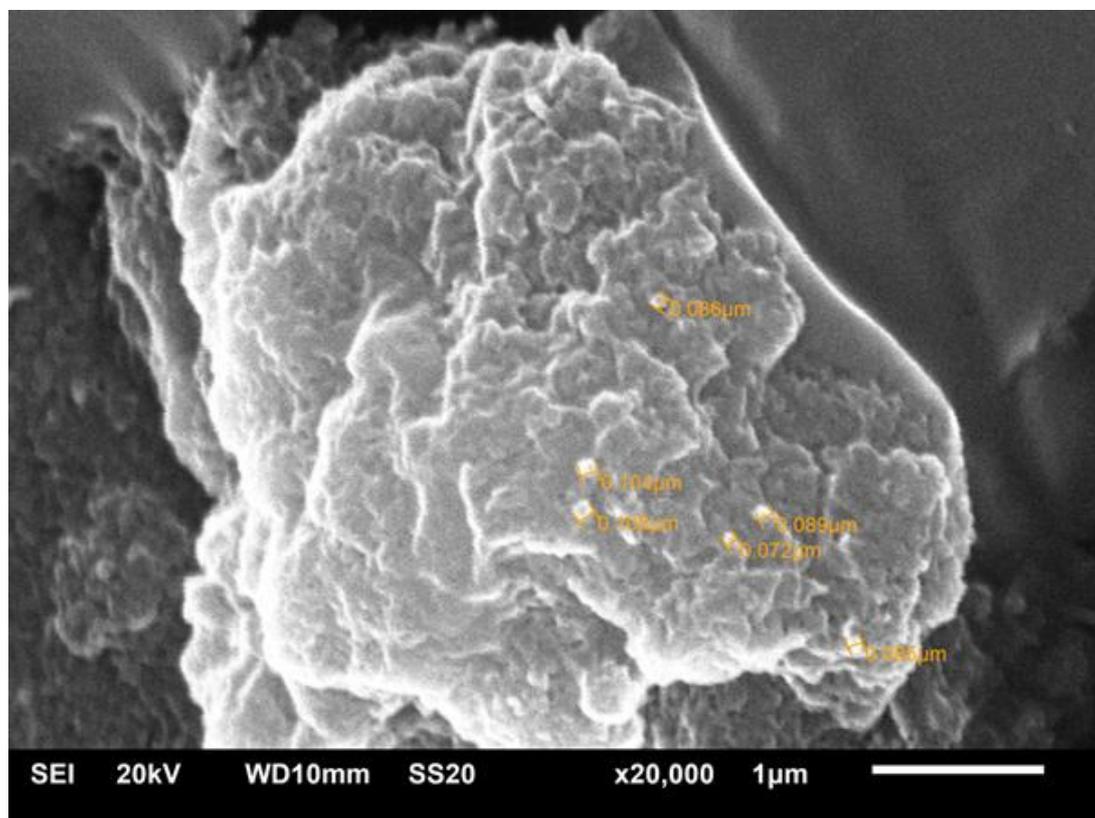


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de peptídeos bioativos dos hidrolisados da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.



Analisando as Figuras 2 e 3 constata-se que foi possível formar nanopartículas de tamanhos variando de 14 a 18 nm para o hidrolisado de *Spirulina* e 72 a 108 nm para o hidrolisado de *Chlorella* utilizando o nano spray dryer B 90. A secagem por atomização da amostra de *Spirulina* apresentou nanopartículas esféricas. A amostra de *Chlorella* apresentou formato esférico e nanopartículas aglomerados, o que pode ser justificado pela maior capacidade desta amostra de absorver água, mesmo quando armazenada em dessecador.

A avaliação da atividade antioxidante dos peptídeos obtidos através de hidrólise enzimática após a secagem por atomização em nano *spray dryer* B90 é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados após secagem em nano *spray dryer* B 90.

	Hidrolisado de <i>Spirulina</i>	Hidrolisado de <i>Chlorella</i>
DPPH (% de inibição)	33,78 ± 0,401	22,34 ± 0,951
Poder redutor (abs 700 nm)	0,3867 ± 0,003	0,2517 ± 0,004
ABTS (mMol de Trolox/g)	0,1006 ± 0,002	0,0751 ± 0,001

Após a secagem por atomização verificou-se, que a atividade antioxidante dos hidrolisados de *Spirulina* e *Chlorella* sofreram baixa redução quando comparados com os resultados anteriores à secagem por atomização (Tabela 1 e 2). Para os hidrolisados de *Spirulina* observou-se uma redução na atividade antioxidante nos métodos de sequestro do radical DPPH e ABTS, de 15,55% e 1,37%, respectivamente, e para o método do poder redutor de 3,64%. Nos hidrolisados de *Chlorella* também ocorreu uma redução na atividade antioxidante após processo de secagem de 17,41% e 0,39% para os métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, respectivamente, e para o método do poder redutor a redução foi de 2,55%.

A variação na porcentagem de redução da atividade antioxidante observada nos três métodos estudados, pode ser justificada pela degradação de algum componente antioxidante da amostra, durante o processo de secagem por atomização em nano *spray dryer* B90. Esta degradação foi mais significativa no método de sequestro do radical DPPH para as duas amostras analisadas. Este resultado sugere que a secagem pode ter degradado mais algum componente antioxidante que sequestra o radical DPPH.

4 CONCLUSÃO

Os hidrolisados das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella pyrenoidosa* apresentaram uma elevada atividade antioxidante, mesmo após purificação em membrana de 0,1 µm. O mesmo ocorreu após purificação com membranas verticais de pesos moleculares de 3 K e 10 K.

A secagem por atomização dos hidrolisados apresentou resultados satisfatórios para a formulação de partículas nanométricas, produzindo nanopartículas de tamanhos variando de 14 a 18 nm para o hidrolisado de *Spirulina* e de 72 a 108 nm para o hidrolisado de *Chlorella*.

Este estudo mostrou que é possível obter nanopartículas de peptídeos bioativos utilizando secagem por atomização, com reduzida perda de atividade antioxidante dos hidrolisados, favorecendo, deste modo, a aplicação destas nanopartículas contendo os compostos bioativos em alimentos funcionais.

REFERÊNCIAS

- ALEMÁN, A., GIMÉNEZ, B., PÉREZ-SANTÍN, E., GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., MONTERO, P. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. **Food Chemistry**, v.125, p. 334–341, 2011.
- ALOGLUR, H. S., ONER, Z. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.94 (11) p. 5305–5314, 2011.
- ANTON, N., BENOIT, J.P., SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - a review. **Journal Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. *Official Methods of Analysis of AOAC international*. 17th ed, Washington, D. C., 2005.
- BOUGATEF, A., HAJJI, M., BALTI, R. I. LASSOUED, TRIKI-ELLOUZ, Y., NASRI, M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1198–1205, 2009.
- BÜRKI, K., JEON, I., ARPAGAUS, C., BETZ, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408 (1-2), p.248-256, 2011.
- BUTERA, D., TESORIERE, L., DI GAUDIO, F., BONGIORNO, A., ALLEGRA, M., PINTAUDI, A.M., KOHEN, R., LIVREA, M.A. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6895-6901, 2002.
- DELRUE, F., SETIER, P.A., SAHUT, C., COURNAC, L., ROUBAUD, A., PELTIER, G., FROMENT, A.K. An economic, sustainability, and energetic model of biodiesel production from microalgae. **Bioresource Technology**, v.111, p. 191–200, 2012.
- DI, R., RAI, D. K., BOLTON, D., KERRY, J., O'NEILL, E., MULLEN, A. M., HARNEDY, P., HAYES, M. Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. **Peptides**, 32 (2), p.388-400, 2011.
- ESCUADEROA, E., ARISTOYA, M., HITOSHI N., KEIZO A., FIDEL T. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. **Meat Science**, v. 91(3), p. 306–311, 2012.

- FERREIRA, C.F.R., BAPTISTA, P., VILAS-BOAS, M., BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100(4), p. 1511–1516, 2007.
- GARCIA, J. M. R., FERNANDEZ, F. G. 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.
- GERDE, J. A., WANG, T., YAO, L., JUNG S., JOHNSON, L. A. LAMSAL, B. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. **Algal Research**, v. 2 (2), p. 145–153, 2013.
- GRAZIANI, G., SCHIAVO, S., NICOLAI, M. A., BUONO, S., FOGLIANO, V., PINTOAC, G. POLLIOAC, A. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. **Food e Function**, v.4, p.144-152, 2013.
- HARTMANN, R., MEISEI, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18. P. 163-169, 2007.
- HOYLE, N., MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p. 76–79, 1994.
- HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.53, 1841–1856, 2005.
- KO, J., LEE, J., SAMARAKOON, K., KIM, J., JEON, Y. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p.113-120, 2013.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.
- LI S., LUO S., GUO R. Efficiency of CO₂ fixation by microalgae in a closed raceway pond. **Bioresource Technolog**, v. 136, p.267-72, 2013.
- LI, X., ANTONA, N., ARPAGAUS, C., BELLETEIX, F., VANDAMMEA, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147 (2), p.304–310, 2010.
- LIU, Q., KONG, B., XIONG, Y.L., XIA, X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, p. 403–410, 2010.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A.L. Farr and R. J. Randall. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal Biology Chemistry**, v. 93, p. 265-275, 1951.
- MORAIS, M. G., REICHERT, C. C., DALCANTON, F., DURANTE, A. J., MARINS, L. F., COSTA, J. A. V., Isolation and cultivation of a new strain of *Arthrospira* from Mangueira Lagoon in Southern Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

- MORRIS, H.J., ALMARALES, A., CARRILLO, O., BERMÚDEZ, R.C. Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7723–7729, 2008.
- MOSLEHISHAD, M., EHSANI, M. R., SALAMI, M., MIRDAMADI, S., EZZATPANAH, H., NASLAJI, A. N., MOOSAVI-MOVAHEDI, A. The comparative assessment of ACE - inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637., **International Dairy Journal**, v. 29 (2), p.82-87, 2013.
- NALINANON, S., BENJAKUL, S., KISHIMURA, H., SHAHIDI, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v.124, p. 1354–1362, 2011.
- NAZEER, R. A., KUMAR, N. S. S., JAI GANESH, R. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. **Peptides**, v, 35 (2), p.261-268, 2012.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v.44, p.307–315, 1986.
- PAUDEL, A., WORKU, Z. A., MEEUS, J., GUNS, S., VAN DEN MOOTER, G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453 (1), p.253-284, 2013.
- PHANTURAT, P., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., ROYTRAKUL, S. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 86–97, 2010.
- POWER, O., JAKEMAN, P., FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino acids**, v. 44(3), p.797-820, 2013.
- PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.
- RÉ, M.I. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. **Drying Technology**, v.24, p.433–446, 2006.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, 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, 2007a.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da

Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007b.

SAHUA, A., PANCHAA, I., JAINA, D., PALIWALA, C., GHOSHA, T., PATIDARA, S., BHATTACHARYAB, S., MISHRA, S. **Fatty acids as biomarkers of microalgae. Phytochemistry**, v. 89, p. 53–58, 2013.

SAHOO, S. K., PARVEEN, S., PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3(1), p. 20–31, 2007.

SARI, Y. W., BRUINS, M. E., SANDERS J. P.M. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 78–83, 2013.

SCHMID, K., ARPAGAUS, C., FRIESS, W. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 4, p. 287–294, 2010.

SINGH, R., LILLARD, J. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, p. 215–223, 2009.

SUN, Y., PAN, D., GUO, Y., LI, J. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.50(10), p.3397–3404, 2012.

TANZADEHPANAH, H., ASOODEH, A., CHAMANI, J. An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 49 (1), p.105–111, 2012.

UDENIGWE, C.C., ALUKO, R.E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3148–3161, 2011.

VANTHOOR-KOOPMANS, M., WIJFFELSA, R. H., BARBOSAC, M. J., EPPINKA, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v.135 p.142–149, 2013.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 999–1022, 2008.

VERNAZA, M.G., DIA, V. P., GONZALEZ DE MEJIA, E., CHANG, Y. K. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. **Food Chemistry**, v. 134 (4), p.2217–2225, 2012.

VIOQUE, J., PEDROCHE, J., YUST, M.M., LOARI, H., MEGIAS, C., GIRÓN-CALLE, J., ALAIZ, M., MILLÁN, F. Bioactive peptides in storage plant proteins. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 2, p. 99–102, 2004.

WIJFFELS, R.H., BARBOSA, M.J., EPPINK, M.H.M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**, v.4 (3), p. 287–295, 2010.

CAPÍTULO IV

6 CONCLUSÕES GERAIS

A *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou melhores resultados de grau de hidrólise para as 3 enzimas comerciais estudadas durante o processo de hidrólise enzimática. Sendo que a enzima Protemax 580L apresentou-se mais eficaz perante a Protemax N 200 e pepsina na hidrólise das proteínas de ambas microalgas estudadas.

As variáveis que mais influenciaram o processo, foram a concentração de substrato e o tempo de reação, sendo que a concentração de enzima foi a menos pronunciada. A análise estatística dos resultados mostrou que o aumento da concentração de substrato gerou efeito negativo sobre a resposta grau de hidrólise.

A hidrólise das proteínas gerou considerável aumento da solubilidade, na capacidade de retenção de água e da digestibilidade dos hidrolisados, também foi observado uma correlação entre o grau de hidrólise e a solubilidade, pois quanto maior o grau de hidrólise maior foi o valor de solubilidade alcançado. Também foi comprovado que a hidrólise das proteínas torna-as mais digeríveis, assim como na solubilidade das proteínas a digestibilidade também foi observado uma correlação com o grau de hidrólise, pois o ensaio que apresentou maior grau de hidrólise alcançou maior digestibilidade para ambas microalgas.

Os resultados de atividade antioxidante para as microalgas não hidrolisadas, comparado com os dos ensaios hidrolisados para todos os métodos estudados, apresentou aumento da atividade antioxidante, sendo esta diferença significativa a 95% de significância, ou seja, a hidrólise enzimática das proteínas da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella pyrenoidosa* gerou peptídeos com atividade antioxidante.

O nano spray Dryer B-90 forneceu resultados satisfatórios para a formulação de partículas nanométricas, produzindo nanopartículas de tamanhos variando de 14 a 18 nm para o hidrolisado de *Spirulina* e de 72 a 108 nm para o hidrolisado de *Chlorella*, com baixa redução da atividade antioxidante.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar a obtenção de peptídeos bioativos a partir da proteína isolada de biomassa microalgal.

Estudar a obtenção de hidrolisados proteicos com enzimas imobilizadas.

Avaliar a atividade inibidora da enzima angiotensina (ECA) em hidrolisados produzidos por microalgas.

Identificar os peptídeos que possuem capacidade antioxidante das microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18.

Estudar a influência dos parâmetros de processo para a obtenção de nanopartículas por secagem com nano *spray dryer* B 90 na bioatividade da amostra.

Estudar a nanoencapsulação de peptídeos bioativos por metodologia de lipossomos.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS

- AHN, C., LEE, K., JE, J. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: Effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 562–568, 2010.
- ALEMÁN, A., GIMÉNEZ, B., PÉREZ-SANTÍN, E., GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., MONTERO, P. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. **Food Chemistry**, v.125, p. 334–341, 2011.
- ALEMÁN, A., GIMÉNEZ, B., MONTERO, P., GOMEZ-GUILLÉN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 407–413, 2011.
- ALOGLUR, H. S., ONER, Z. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.94 (11) p. 5305–5314, 2011.
- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogem radicals: a practical case. **Trends in Food Science e Technology** , v. 11, p. 419-421, 2000.
- ANDRADE, M. R. **Biosistema 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.
- ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, p. 130–134, 2007.
- ANTON, N., BENOIT, J. P., SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - a review. **Journal Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**, 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international. 17.ed. Washington, D.C.
- ASPMO, S. I., HORN, S. J., EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1957–1966, 2005.
- BARRET, A. J., RAWLINGS, N. D., O'BRIEN, E. A. The Merops database as a proteases information system. **Journal of Struvtrual Biology**, v. 134, p. 95-102, 2001.
- BARROS, B. N., SCARMINO, I. S., BRUNS, R. E. R. **Como fazer experimentos, pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Unicamp, 4º Edição, pp. 401, 2010.
- BEERMANN C., EULER, M., HERZBERG, J., STAHL, B. Anti-oxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 637-644, 2009.

- BOUGATEF, A., HAJJI, M., BALTI, R. I. LASSOUED, TRIKI-ELLOUZ, Y., NASRI, M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1198–1205, 2009.
- BUENO-SOLANO, C., LÓPEZ-CERVANTES, J., CAMPAS-BAYPOLI, O. N., LAUTERIO-GARCÍA, R., ADAN-BANTE, N. P., SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, v. 112, p. 671–675, 2009.
- BRUNE, H. **Nanobiotechnology: Assessment and Perspectives**. Ed. Springer. Germany, pp. 187, 2006.
- BRUNS, R.E., NETO, B.B., SCARMINIO, I.S. **Como fazer experimentos**. Porto Alegre. 4.ed. Editora Artmed, p.414, 2010.
- BUKMAN, L., MARTINS, A. C., BARIZÃO, E. O., VISENTAINER, J. V., ALMEIDA, V. C. DPPH Assay Adapted to the FIA System for the Determination of the Antioxidant Capacity of Wines: Optimization of the Conditions Using the Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, DOI 10.1007/s12161-012-9560-x, 2013.
- BURKI, K., JEONA, I., ARPAGAUSB, C., BETZ, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**, v.408, p. 248-256, 2011.
- BUTERA, D., TESORIERE, L., DI GAUDIO, F., BONGIORNO, A., ALLEGRA, M., PINTAUDI, A.M., KOHEN, R., LIVREA, M.A. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6895-6901, 2002.
- BYUN, H. G., LEE, J. K., PARK, H. G., JEON, J. K., KIM, S. K. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer *Brachionus rotundiformis*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 842–846, 2009.
- CALDARELLI, G., RIOS, P. Cold and warm denaturation of proteins. **Journal of Biological Physics**, v. 27, p. 229-241, 2001.
- CAMPO, J. A. D., GONZÁLEZ, M. G., GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.1163-1174, 2007.
- CAMPOS, F. M., MARTINO, H. S. D., SABARENSE, C. M., PINHEIRO-SANT'ANA, C. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Araraquara**, v.19, n.4, p. 481-490, 2008.
- CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C. Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromus niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, p.937, 2003.
- CAO, H., CHEN, X., YAMAMOTO, K. Bovine serum albumin significantly improves the DPPH free radical scavenging potential of dietary polyphenols and gallic acids. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.12, p.940-948, 2012.

- CARVALLHO, L. F. **Desenvolvimento de novos alimentos para praticantes de atividade física, adicionados ou não de *Spirulina***. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos – Universidade federal do Rio Grande. Rio Grande –RS, 2010.
- CHAIKLAHAN, R., CHIRASUWAN, N., BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 659–664, 2012.
- CHALAMAIAHA, M., KUMAR, B. D., HEMALATHA, R., JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: **A review. Food Chemistry**, v. 135, p. 3020–3038, 2012.
- CHANPUT, W., THEERAKULKAIT, C., NAKAI, S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 422–428, 2009.
- CHEN, H., YANG, T., CHEN, M., CHANG, Y., LIN, C., WANG, E. I., HO, C., HUANG, K., YU, C., YANG, F., WU, S., LU, Y., CHAO, L. K. Application of power plant flue gas in a photobioreactor to grow *Spirulina* algae, and a bioactivity analysis of the algal water-soluble polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 256–263, 2012.
- CLAVER, I. P., ZHOU, H. Enzymatic hydrolysis of defatted wheat germ by proteases and the effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 13-26, 2005.
- COLLA, L. M., FURLONG, E. B., COSTA, J. A. V. Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.
- COHEN, Z. **The chemicals of Spirulina**. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. London: Taylor e Francis, 1997.
- COHEN, Z. **Chemicals from microalgae**. London: Taylor e Francis, 1999.
- COSTA, E. L., GONTIJO, J. A. R., NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 632-640, 2007.
- COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 61, p. 105-110, 2006.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. São Paulo. 4. Ed. Editora Artmed, pp.900, 2010.
- DEL RUE, F., SETIER, P.A., SAHUT, C., COURNAC, L., ROUBAUD, A., PELTIER, G., FROMENT, A.K. An economic, sustainability, and energetic model of biodiesel production from microalgae. **Bioresource Technology**, v.111, p. 191–200, 2012.
- DEVASAGAYAM, T. P. A., TILAK, J. C., BOLOOR, K. K., SANE, K. S., GHASKADBI, S. S., LELE, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794–804, 2004.

- DI, R., RAI, D. K., BOLTON, D., KERRY, J., O'NEILL, E., MULLEN, A. M., HARNEDY, P., HAYES, M. Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. **Peptides**, 32 (2), p.388-400, 2011.
- DIAS, D. R., ABREU, C. M. P., SILVESTRE, M. P. C., SCHWAN, R. F. In vitro protein digestibility of enzymatically pre-treated bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour using commercial protease and *Bacillus* sp. protease. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 94-99, 2010.
- DURÁN, N., MATTOSO, L. H. C., MORAIS, P. C. **Nanotecnologia introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artlier, p. 17-19, 2006.
- ESCUDEROA, E., ARISTOYA, M., HITOSHI N., KEIZO A., FIDEL T. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. **Meat Science**, v. 91(3), p. 306–311, 2012.
- FERREIRA, I. C. F. R., BATISTA, P., VILAS-BOAS, M., BARROS, L. Free-radiacal scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from Northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.
- FIGUEIRA, F. S., CRIZEL, T. M., SILVA, C. R., SALAS-MELLADO, M. M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazil Journal of Food Technology**, v. 14, n. 4, p. 308-316, 2011.
- 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.
- FOX, R. D. **Spirulina Production e potencial**. France: Edisud, p. 232, 1996.
- FREITAS, O., PADOVAN, G. J., VILELA, L., SANTOS, J. E., OLIVEIRA, J. E. D., GREENE, L. J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1432-1438, 1993.
- FURLAN, E. F., OETTERER, M. Hidrolisado proteico de pescado. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 10, p. 79-89, 2002.
- GAD, A. S., KHADRAWY, Y. A., EL-NEKEETY, A. A., MOHAMED, S. R., HASSAN, N. S., ABDEL-WAHHAB, M. A. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. **Nutrition**, v. 27, p. 582–589, 2011.
- GALLA, N. R., PAMIDIGHANTAM, P. R., AKULA, S., KARAKALA, B. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1479–1484, 2012.
- GARCIA, J. M. R., FERNANDEZ, F. G. 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.
- GERDE, J. A., WANG, T., YAO, L., JUNG S., JOHNSON, L. A. LAMSAL, B. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. **Algal Research**, v. 2 (2), p. 145–153, 2013.

- GIBBIS, B. F., ZOUGMANB, A., MASSEA, R., MULLIGAN, C. Production and Characterization of bioactives peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, v. 37, p. 123-131, 2004.
- GOBBETTI, M. FERRANTI, P., SMACCHI, E., GOFFREDI, F., ADDEO, F. Production of antiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milk stared by *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* SS1 and *L. lactis* subsp. *cremoris* FT4. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3893-3904, 2000.
- GOLDMAN, J. C. Outdoor algal mass cultures – II. Photosynthetic yield limitations. **Algal Biomass**, v. 11, p. 119 – 135, 1980.
- GONZÁLES-TELLO, P., CAMACHO, F., JURADO, E., PÁEZ, M. P., GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 523-528, 1994.
- GUADIX, A., GUADIX, E.M., PAEZ-DUENÑAS, M.P., GONZÁLEZ-TELLO, P., CAMACHO, F. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. **ARS Pharmaceut**, v. 41, p.79–89, 2000.
- GUALTIERI, P., BARSANTI, L. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC Press, Taylor e Francis Group, 2006, 301 p.
- GUARIENTI, C. **Potencial antioxidante da microalga *Spirulina* frente as condições de estresse oxidativo**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos – Universidade federal do Rio Grande. Rio Grande –RS, 2009.
- GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 2012.
- HARPER, H. A.; RODWELL, V. W. e MAYES, P. A. **Manual de química fisiológica**. Editora Ateneu, 5° ed, São Paulo:, pp. 736, 1982.
- HARTMANN, R., MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18. p. 163-169, 2007.
- HE, S., FRANCO, C., ZHANG , W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, p. 289–297, 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.
- HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, v. 53, p.1841-1856, 2005.
- ILLMAN, A. M., SCRAGG, A. H., SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when in low nitrogen médium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.

- JE, J. Y., PARK, P. J., KIM, S. K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 38, p. 45–50, 2005.
- JE, J. Y., LEE, K. H., LEE, M. H., AHN, C. B. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 42, p. 1266–1272, 2009.
- 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 (4), p. 410–419, 2008.
- KIM, S., WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 1–9, 2010.
- KITTS, D. D., WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309-1323, 2003.
- KO, S. C., KIM, D., JEON, Y. J. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2294–2302, 2012.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.
- KOTHARI, R., PATHAK, V. V., KUMAR, V., SINGH, D. P. Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 466–470, 2012.
- KUMAR, M., KULSHRESHTHA, J., SINGH, G. P. Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1128-1135, 2011.
- KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.
- KRISTINSSON, H. G., RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43-81, 2000.
- KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M., MANCINI-FILHO, J., FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227, 680-685, 1970.
- LEE, S., HENG, D., KIONG N. G., W., CHAN, H., TAN, H. Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal Pharmacy**, v. 403, p. 192-200, 2011.

LEE, J. K., HONG, S., JEON, J. K., KIM, S. K., BYUN, H. G. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *Brachionus rotundiformis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5255-5264, 2009.

LEE, M. S. S. H., KANG, M. S. H. J., LEE, M. S. H. J., KANG, M. H., PARK, Y. K. Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. **Nutrition**, v. 26, p. 175–183, 2010.

LEMES, A. C., TAKEUCHI, K. P., CARVALHO, J. C. M., DANESI, E. D. G. Fresh pasta production enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 741-750, 2012.

LI S., LUO S., GUO R. Efficiency of CO₂ fixation by microalgae in a closed raceway pond. **Bioresource Technolog**, v. 136, p.267-72, 2013.

LI, X., ANTON, N., ARPAGAUS, C., BELLETEIX, F., VANDAMME, T.F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p.304–310, 2010.

LIU, R., WANG, M, DUAN, J., GUO, J., TANG, Y. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from *Cornu Bubali* (Water buffalo horn). **Peptides**, v. 31, p. 786–93, 2010.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, pp.606, 2006.

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.

MARGERITES, A. C. F. **Seleção e cultivo de microalgas para a produção de bioetanol**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos – Universidade federal do Rio Grande. Rio Grande –RS, 2010.

MARTINS, V. G., COSTA, J. A. V., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

MENG, H., XIA, Y., CHEN, H. Bioremediation of surface water co-contaminated with zinc (II) and linear alkylbenzene sulfonates by *Spirulina platensis*. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 47–48, p. 152–155, 2012.

MEZZOMO, N., SAGGIORATO, A. G., SIEBERT, R., TATSCH, P. O., LAGO, M. C., HEMKEMEIER, M., COSTA, J. A. V., BERTOLIN, T. E., COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 173-178, 2010.

- MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.
- MOOSMAN, B., BEHL, C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure activity relationship. **Molecular Pharmacology**, v. 61, p. 260-268, 2002.
- MORAIS, M. G. **Fixação de CO₂ e produção de ácidos graxos por microalgas**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos – Universidade federal do Rio Grande. Rio Grande –RS, 2006.
- 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., RADMANN E. M., COSTA, J. A. V. Biofixation of CO₂ from synthetic combustion gas using cultivated microalgae in three-stage serial tubular photobioreactors. **Zeitschrift für Naturforschungvol**, v. 66, p. 313-318, 2011.
- MORAIS, M. G., REICHERT, C. C., DALCANTON, F., DURANTE, A. J., MARINS, L. F., COSTA, J. A. V. Isolation and cultivation of a new strain of *Arthrospira* from Mangueira Lagoon in Southern Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.
- 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.
- MORR, C. V., GERMAN, B., KINSELLA, J. E., REGENSTEIN, J. E., VAN BUREN, J. P., KILARA, A., LEWIS, B. A., MANGINO, M. E., 1985. A collaborative study to develop a standardised food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v.50, p.1715-1718, 1985.
- MORRIS, H. J., ALMARALES, A., CARRILLO, O., BERMÚDEZ, R. C. Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7723–7729, 2008.
- MORRIS, H. J., CARRILLO, O., ALMARALES, A., BERMÚDEZ, R. C., LEBEQUE, Y., FONTAINE, R., LLAURADÓ, G., BELTRÁN, Y. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 456–460, 2007.
- MORRIS, H.J., CARRILLO, O., ALMARALES, A., BERMÚDEZ, R.C., LEBEQUE, Y., FONTAINE, R., LLAURADÓ, G., BELTRÁN, Y. Oral Administration of an Enzymatic Protein Hydrolysate from the Green Microalga *Chlorella vulgaris* Enhances the Nutritional Recovery of Malnourished Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 1583–1589, 2011.
- MOSLEHISHAD, M., EHSANI, M. R., SALAMI, M., MIRDAMADI, S., EZZATPANAH, H., NASLAJI, A. N., MOOSAVI-MOVAHEDI, A. The comparative assessment of ACE - inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. **International Dairy Journal**, v. 29 (2), p.82-87, 2013.

- MOSTAFA, S. S. M. Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications. **Plant Science**, DOI: 10.5772/53649, p. 275-314, 2012.
- MULLER, F. L., LUSTGARTEN, M., JANG, Y., RICHARDSON, A., VAN, R. H. Free radical. **Biology Medicine**, v. 43, p. 477, 2007.
- NAH, W. H., KOH, I. K., AHN, H. S., KIM, M. J., KANG, H., JUN, J. H., GYE, M. C. Effect of *Spirulina maxima* on spermatogenesis and steroidogenesis in streptozotocin-induced type I diabetic male rats. **Food Chemistry**, v. 134, p. 173–179, 2012.
- NALINANON, S., BENJAKUL, S., KISHIMURA, H., SHAHIDI, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v.124, p. 1354–1362, 2011.
- NAZEER, R. A., KUMAR, N. S. S., JAI GANESH, R. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. **Peptides**, v, 35 (2), p. 261-268, 2012.
- NEGRÃO, C. C.; MIZUBUTTI, Y.; MORITA, M. C.; COLLI, C.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food Chemistry**, v. 90, p. 579-583, 2005.
- NEVES, R. A. M., CAMPOS, T., MAEQUEZ, U. M. L. Modulação da pressão arterial por hidrolisados proteicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 81-86, 2006.
- NGO, D., QIAN, Z., RYU, B., PARK, J. W., KIM, S. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 107–117, 2010.
- NI, X. YUE, L., CHI, Z., LI, J., WANG, X., MADZAK, C. Alkaline Protease Gene Cloning from the Yeast *Aureobasidium pullulans* HN2-3 and the Protease Surface Display on *Yarrowia lipolytica* for Bioactive Peptide Production. **Marine Biotechnology**. v. 11, p. 81-89, 2009.
- NOGUCHI, N., KONISHI, F., KUMAMOTO, S., MARUYAMA, I., ANDO, Y., YANAGITA, T. Beneficial effects of *Chlorella* on glucose and lipid metabolism in obese rodents on a high-fat diet. **Obesity Research e Clinical Practice**, v. 7, p. 95-105, 2013.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.
- OVISSIPOUR, M., KENARI, A.A., MOTAMEDZADEGAN, A., NAZARI, R.M. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellow fin Tuna (*Thunnus albacares*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 696-705, 2012.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307–315, 1986.
- PANZELLA, L., EIDENBERGER, T., NAPOLITANO, A., D'ISCHIA, M. Black sesame pigment: DPPH assay-guided purification, antioxidant/antinitrosating properties, and

identification of a degradative structural marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8895–8901, 2012.

PANYAM, D., KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science e Technology**, v. 7, p.120-125, 1996.

PAUDEL, A., WORKU, Z. A., MEEUS, J., GUNS, S., VAN DEN MOOTER, G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453 (1), p.253-284, 2013.

PHANTURAT, P., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., ROYTRAKUL, S. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 86–97, 2010.

PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 50, p. 15-23, 1995.

PEIRETTI, P. G., MEINERI, G. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits. **Livestock Science**, v. 140, p. 218–224, 2011.

POLÔNIO, M. L. T., PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno Saúde Pública**, v. 25, p. 1653-1666, 2009.

POWER, O., JAKEMAN, P., FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino acids**, v. 44(3), p.797-820, 2013.

PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

PUGLISI, I., PETRONE, G., PIERO, A. R. L. Role of actinidin in the hydrolysis of the cream milk proteins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 449–452, 2012.

RABELO, S. F., LEMES, A. C., TAKEUCHI, K. P., FRATA, M. T., CARVALHO, J. C. M., DANESI, E. D. G. Development of cassava doughnuts enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazil Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 42-51, 2013.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas com gases de combustão formados da geração termoelétrica**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos – Universidade federal do Rio Grande. Rio Grande –RS, 2007.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para a produção de biosurfactantes**. Tese de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande - RS, 2011.

RADMANN, E. M., CAMERINI, F. V., SANTOS, T. D., COSTA, J. A. V. Isolation and application of SOX and NOX resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132–3136, 2011.

- RAMANAN, R., KANNAN, K., DESHKAR, A., YADAV, R., CHAKRABARTI, T. Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2616–2622, 2010.
- RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGEM, M. S. DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.
- RÉ, M.I. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. **Drying Technology**, v.24, p.433–446, 2006.
- REGENSTEIN, J. M., JAUREGUI, C. A., BAKER, R. The effect of pH, pyrophosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscles. **Journal of Food Biochemistry**, v. 8, p.123-131, 1984.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford, London: Blackwell Science, pp. 566, 2004.
- RODRIGUES, I. M., IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas – SP. Editora Casa do Pão, pp. 325, 2005.
- ROGINSKY, V., LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- ROMAN, J. A., SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 468, 2005.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, 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, 2007a.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007b.
- SÁNCHEZ, D., KASSAN, M., CONTRERAS, M. M., CARRÓN, R., RECIO, I., MONTERO, M., SEVILLA, M. Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 398–404, 2011.
- SARADA, R. Phycocyanin from *Spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795 -801, 1999.
- SARMADI, B. H., ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: **A review. Peptides**, v. 31, p. 1949–1956, 2010.

SANTOS, M. H., BATISTA, B. L., DUARTE, S. M. S., ABREU, C. M. P., GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SANTOS, S.D., MARTINS, V.G., SALAS-MELLADO, M., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v. 32, p.72-77, 2009.

SAHUA, A., PANCHAA, I., JAINA, D., PALIWALA, C., GHOSHA, T., PATIDARA, S., BHATTACHARYAB, S., MISHRA, S. Fatty acids as biomarkers of microalgae. **Phytochemistry**, v. 89, p. 53–58, 2013.

SAHOO, S. K., PARVEEN, S., PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3(1), p. 20-31, 2007.

SARI, Y. W., BRUINS, M. E., SANDERS J. P.M. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 78–83, 2013.

SCHMID, K., ARPAGAUS, C., FRIESS, W. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 4, p. 287-294, 2010.

SCHMIDT, C. G., SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, p. 1144-1150, 2009.

SEGURA-CAMPOS, M. R., SALAZAR-VEJA, I. M., CHEL-GUERRERO, L. A., BETANCUR-ANCONA, D. A. Biological potential of chia (*Salvia hispânica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 723-731, 2013.

SENTHILKUMAR, T., ASHOKKUMAR, N. Impact of *Chlorella pyrenoidosa* on the attenuation of hyperglycemia-mediated oxidative stress and protection of kidney tissue in streptozotocin-cadmium induced diabetic nephropathic rats. **Biomedicine e Preventive Nutrition**, v. 2, p. 125–131, 2012.

SILVA, F. A. M., BORGES, M. F. M., FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, 1999.

SINGH, R., LILLARD, J. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, p. 215–223, 2009.

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.

SLIZYTE, R., MOZURAITYTE, R., MARTINEZ-ALVAREZ, O., FALCH, E., FOUCHEREAU-PERON, M., RUSTAD, T. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 668–677, 2009.

- SOUZA, M. M. **Avaliação da atividade antifúngica e antimicotoxinas de extratos de farelo de arroz, cebola e microalga *Chlorella***. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2008.
- SPOLAORE, P., CASSAN, C. J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.
- STALJANSSENS, D., CAMP, J. V., BILLIET, A., MEYER, T. D., SHUKOR, N. A., VOS, W. H. D., SMAGGHE, G. Screening of soy and milk protein hydrolysates for their ability to activate the CCK1 receptor. **Peptides**, v. 34, p. 226–231, 2012.
- SUN, T., TANUMIHARDJO, S. A. An Integrated Approach to Evaluate Food Antioxidant Capacity. **Journal of Food Science**, v. 72, n.9, p. 159-1565, 2007.
- SUN, Y., PAN, D., GUO, Y., LI, J. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.50 (10), p.3397-3404, 2012.
- TANZADEHPANAH, H., ASOODEH, A., CHAMANI, J. An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 49 (1), p.105-111, 2012.
- TAKEKOSHI, H., SUZUKI, G., CHUBACHI, H., NAKANO, M. Effect of *Chlorella pyrenoidosa* on fecal excretion and liver accumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxin in mice. **Chemosphere**, v. 59, p. 297-304, 2005.
- TAUBER, H., **The chemistry and technology of enzymes**. Journal Wiley. New York. Editora Wiley, 1949.
- UDENIGWE, C. C., ALUKO, R. E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3148–3161, 2011.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M., WIJFFELSA, R. H., BARBOSAC, M. J., EPPINKA, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v.135 p.142–149, 2013.
- VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 999–1022, 2008.
- VERNAZA, M.G., DIA, V. P., GONZALEZ DE MEJIA, E., CHANG, Y. K. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. **Food Chemistry**, v. 134 (4), p.2217-2225, 2012.
- VIOQUE, J., PEDROCHE, J., YUST, M.M., LOARI, H., MEGIAS, C., GIRÓN-CALLE, J., ALAIZ, M., MILLÁN, F. Bioactive peptides in storage plant proteins. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 2, p. 99–102, 2004.
- VOET, D., VOET, J. Biochemistry. 4. Ed. New York: John wiley e Sons, Inc., pp. 1520, 2010.

- VON DER WEID, D., DILLON, J.C., FALQUET, J. **Malnutrition: a silent massacre.** Antenna Technology. 2000. 13p.
- XIONG, S., MELTON, L.D., EASTEAL, A., SIEW, D. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucana gel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.6201-6208, 2006.
- WALTER, A., CARVALHO, J. C, SOCCOL, V. T., FARIA, A. B. B., GHIGGI, V., SOCCOL, C. R. Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 675-682, 2011.
- WANG, B., LI, L., CHI, C., MA, J., LUO, H., XU, Y. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1713–1719, 2013.
- WANG, H. M., PAN, J. L., CHEN, C. Y., CHIU, C. C., YANG, M. H., CHANG, H. W., CHANG, J. S. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C–C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1865–1872, 2010.
- WANG, H., XIONG, H., HUI, Z., ZENG, X. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 215–220, 2012.
- WANG, X., ZHANG, X., Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 307–313, 2012.
- WEISS, J., TAKHISTOV, P., MCCLEMENTS, J. Functional Materials in Food Nanotechnology. **Journal of Food Science**. v. 71, p. 107-116, 2006.
- WELDERUFAEL, F.T., GIBSON T., METHVEN L., JAUREG, P. Chemical characterisation and determination of sensory attributes of hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis of whey proteins following a novel integrative process. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1947–1958, 2012.
- WIJFFELS, R. H., BARBOSA, M. J., EPPINK, M. H. M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**, v.4 (3), p. 287–295, 2010.
- WHITAKER, J.R. Principles of enzymology for the food sciences. 2.ed. New York. Editora Marcel Dekker, 1994.
- YEN, G. C., CHEN, N. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995.
- ZAVAREZE, E.R., SILVA, C.M., SALAS-MELLADO, M., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v. 32, p.1739-1743, 2009.
- ZENG, X., DANQUAH, M. K., ZHANG, S., ZHANG, X., WU, M., CHEN, X. D., NG, I., JING, K., LU, Y. Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 192– 197, 2012.

ZHAO, B., ZHANG, Y., XIONG, K., ZHANG, Z., HAO, X., LIU, T. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ fixation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 1758–1762, 2011.

ZHOU, K., SUN, S., CANNING, C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1192–1197, 2012.

ZHONG, F., LIU, J., MA, J., SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International**, v. 40, p. 661–667, 2007.

ZOTTE, A. D., SARTORI, A., BOHATIR, P., RE MIGNON, H., RICCI, R. Effect of dietary supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and *Thyme* (*Thymus vulgaris*) on growth performance, apparent digestibility and health status of companion dwarf rabbits. **Livestock Science**, v. 152, p. 182–191, 2013.