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

ENCAPSULAMENTO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE *Spirulina* PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Aline Massia Pereira

Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Thaisa Duarte Santos
Co-orientadora

Rio Grande, RS
2020

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

ENCAPSULAMENTO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE *Spirulina* PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Aline Massia Pereira

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

Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Thaisa Duarte Santos
Co-orientadora

Rio Grande, RS
2020

Ficha Catalográfica

P436e Pereira, Aline Massia.
Encapsulamento de hidrolisados proteicos de *spirulina* para aplicação em alimentos / Aline Massia Pereira. – 2020.
151 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.
Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.
Coorientadora: Dra. Thaisa Duarte Santos.

1. Compostos Bioativos 2. Encapsulamento 3. Gelatina 4. Microalgas 5. *Nanospray Drying* I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Santos, Thaisa Duarte III. Título.

CDU 338.45

Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Tese defendida por Aline Massia Pereira e aprovada em 14 de abril de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG

Drª. Eliana Badiale Furlong – FURG

Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG

Profa. Dra. Michele Greque Morais – FURG

Documento assinado digitalmente

Itaciara Larroza Nunes

Data: 15/04/2020 11:16:15-0300

CPF: 881.294.200-82

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer à FURG, uma Universidade pública, gratuita e de qualidade, a qual tenho muito orgulho de fazer parte.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações pelos recursos disponibilizados para que essa pesquisa fosse realizada.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica, pois sou grata e orgulhosa por fazer parte de um grupo tão forte dentro da Universidade, que inspira tantos outros grupos de pesquisa. Ao prof. Jorge agradeço pela confiança para fazer este trabalho e por todo aprendizado desde o início da minha trajetória.

Agradeço à minha co-orientadora Thaisa pela tranquilidade, competência, disponibilidade em me ajudar e pela amizade. A Thaisa foi essencial para realização deste trabalho!

Aos meus colegas do LEB tenho muito a agradecer pela contribuição no trabalho e aos pós-doutorandos que sempre nos ajudam. Agradeço à Cris que contribuiu muito na minha formação e por toda parceria e amizade. Um agradecimento especial ao Roque, que além de técnico foi um professor para mim, que muitas vezes me ajudou e me passou um pouco da sua grande experiência em laboratório.

Agradeço ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos que foi a minha segunda casa depois que ingressei como técnica, no início do 3° ano do doutorado. Agradeço a todos do LTA pelo apoio e compreensão!

Agradeço à minha amiga Méri, que foi uma incentivadora desse trabalho e por toda a amizade e carinho.

Agradeço ao Ênio por sempre me lembrar dos meus sonhos e por estar comigo nessa.

À minha irmã Karine, por ter o privilégio de compartilhar todos os momentos da minha vida com ela desde sempre, que é minha melhor amiga e minha inspiração. (Tu és tudo para mim!)

Agradeço e dedico esse trabalho ao meu pai Edi Terra Pereira. Nunca na minha vida imaginei que esse momento se realizaria “sem” ele. Ele sempre teve muito orgulho de suas filhas, embora às vezes nós achássemos exagero. Contemplar e agradecer esse orgulho com ele é o que eu mais gostaria nesse momento. A ele dedico eterna gratidão e amor.

Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de funcionamento de *Spray dryer*.....37
Figura 2 – Esquema de funcionamento do *Nanospray dryer* B-90.....40

ARTIGO 1

Figura 1 - Cinética da hidrólise enzimática de proteínas de *Spirulina* sp. LEB 18.....61
Figura 2 - Perfil eletroforético dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 obtidos da cinética enzimática. 62
Figura 3 - Estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 frente ao pH.....63
Figura 4 - Estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 frente ao tratamento térmico. 64
Figura 5 - Estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 frente a concentração de cloreto de sódio. 66
Figura 6 - Estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 frente à ação de enzimas digestivas. 68

ARTIGO 2

Figura 1 - Curvas termogravimétricas derivadas (DTG) de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados com gelatina em *Spray dryer* (a) e *Nanospray dryer* (b) 87
Figura 2 - Calorimetria exploratória diferencial de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados com gelatina em *Spray dryer* (a) e *Nanospray dryer* (b) 88
Figura 3 - Micrografias (MEV) de hidrolisados proteicos de *Spirulina* livres e encapsulados por *Spray drying*. Ampliação de 500 x.....90
Figura 4 - Micrografias (MEV) de hidrolisados proteicos de *Spirulina* livres e encapsulados por *Nanospray drying*. Ampliação de 500 x. 91
Figura 5 - Distribuição de diâmetro de partículas de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados com gelatina por *Spray drying* (a) e *Nanospray drying* (b). 92

ARTIGO 3

Figura 1 - Estabilidade de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado por *Nanospray drying* em relação ao pH. 110
Figura 2 - Estabilidade de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado por *Nanospray drying* em relação ao tratamento térmico.....111
Figura 3 - Estabilidade de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado por *Nanospray drying* em relação a concentração de cloreto de sódio. 112
Figura 4 - Estabilidade de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado por *Nanospray drying* em relação a ação de enzimas digestivas.....113
Figura 5 - Perfil de textura de gelatina de limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18.....117

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 em diferentes tempos de reação.....62

ARTIGO 2

Tabela 1 - Rendimento e eficiência de encapsulamento de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulados por *Spray drying* e *Nanospray drying*.....83
Tabela 2 - Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina sp.* LEB 18 livres e encapsulados com gelatina por *Spray drying* e *Nanospray drying*. 84
Tabela 3 - Potencial zeta de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulados por *Spray drying* e *Nanospray drying*.....85

ARTIGO 3

Tabela 1 - Formulação de gelatina sabor limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 (100 mL de água). 108
Tabela 2 - Atividade antioxidante de gelatina de limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18..... 115
Tabela 3 - Parâmetros de cor de gelatina com e sem adição de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulados *em Nanospray dryer*. 116

SUMÁRIO

CAPÍTULO I **17**

1 INTRODUÇÃO GERAL **23**

2 OBJETIVOS **27**
2.1 OBJETIVO GERAL 27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27

CAPÍTULO II **29**

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **31**
3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS 31
3.2 Spirulina 32
3.3 HIDROLISADOS PROTEICOS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS 33
3.4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE MICROALGAS 34
3.5 ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS 35
3.5.1 Spray drying **36**
3.5.2 Nanospray drying **39**
3.6 MATERIAIS DE REVESTIMENTO 41
3.6.1 Gelatina como material de revestimento **43**
3.7 ADIÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM SOBREMESA À BASE DE GELATINA 44

CAPÍTULO III **47**

ARTIGO 1 ..... **51**

1 INTRODUÇÃO **55**

2 MATERIAL E MÉTODOS **56**
2.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA 56
2.2 HIDRÓLISE E CINÉTICA ENZIMÁTICA 56
2.2.1 Grau de hidrólise **56**
2.2.2 Massa molecular dos peptídeos **57**
2.2.3 Atividade antioxidante **57**
2.2.3.1 Capacidade de inibição do radical DPPH 57
2.2.3.2 Capacidade de inibição do radical ABTS 58
2.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 58
2.3.1 Efeito do pH **58**
2.3.2 Efeito da temperatura **59**
2.3.3 Efeito da concentração salina **59**
2.3.4 Efeito da digestão *in vitro* **59**
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 60

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 60
3.1 HIDRÓLISE E CINÉTICA ENZIMÁTICA 60
3.2 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA 62
3.2.1 Efeito do pH na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 62
3.2.2 Efeito da temperatura na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 64
3.2.3 Efeito da concentração salina na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 65
3.2.4 Efeito da digestão *in vitro* na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 67

4 CONCLUSÃO 68

5 AGRADECIMENTOS 69

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

ARTIGO 2 73

1 INTRODUÇÃO 77

2 MATERIAL E MÉTODOS 78
2.1. MATERIAL 78
2.2. OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS 79
2.3. ENCAPSULAMENTO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS 79
2.3.1. *Spray drying* 79
2.3.2. *Nanospray drying* 80
2.4. RENDIMENTO 80
2.5. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO 80
2.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 81
2.7. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS 81
2.7.1. Potencial zeta 81
2.7.2. Análise termogravimétrica (TGA) 81
2.7.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 82
2.7.4. Morfologia e distribuição de tamanho 82

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 82
3.1. ENCAPSULAMENTO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS 82
3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 84
3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS 85
3.3.1. Potencial zeta 85
3.3.2. Análise termogravimétrica (TGA) 86
3.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 87
3.3.4. Morfologia e distribuição de tamanho 89

4. CONCLUSÃO 93

5. AGRADECIMENTOS 93

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 93

ARTIGO 3 99

1 INTRODUÇÃO 103

2 MATERIAL E MÉTODOS 104
2.1 MATERIAL 104
2.2 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO 105
2.3 ENCAPSULAMENTO DO HIDROLISADO PROTEICO 105
2.4 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO HIDROLISADO PROTEICO ENCAPSULADO 105
2.4.1 Efeito do pH, tratamento térmico, concentração de NaCl e digestão *in vitro* na atividade antioxidante do hidrolisado proteico encapsulado 106
2.4.2 Determinação da atividade antioxidante do hidrolisado proteico encapsulado. 106
2.5 APLICAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO EM SOBREMESA DE GELATINA SABOR LIMÃO 107
2.6 CARACTERIZAÇÃO DA SOBREMESA DE GELATINA SABOR LIMÃO ADICIONADA DE HIDROLISADO PROTEICO DE *Spirulina* sp. LEB 18 108
2.6.1 Atividade Antioxidante da sobremesa de gelatina sabor limão 108
2.6.2 Cor da sobremesa de gelatina sabor limão 109
2.6.3 Perfil de textura da sobremesa de gelatina sabor limão 109

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 109
3.1 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO PROTEICO ENCAPSULADO 109
3.1.1 Efeito do pH na atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado 109
3.1.2 Efeito da temperatura na atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado 110
3.1.3 Efeito da concentração salina na atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado 112
3.1.4 Efeito da digestão *in vitro* na atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado 113
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA SOBREMESA DE GELATINA SABOR LIMÃO ADICIONADA DE HIDROLISADO PROTEICO DE *Spirulina* sp. LEB 18 114
3.2.1 Atividade antioxidante da sobremesa de gelatina sabor limão 114
3.2.2 Cor da sobremesa de gelatina sabor limão 115
3.2.3 Perfil de textura da sobremesa de gelatina sabor limão 117

4 CONCLUSÃO 118

5 AGRADECIMENTOS 118

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 119

CAPÍTULO IV **123**

CONCLUSÃO GERAL **125**

CAPÍTULO V **127**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **129**

APÊNDICES **149**

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL

Neste estudo, hidrolisados proteicos contendo peptídeos com atividade antioxidante foram obtidos de *Spirulina* sp. LEB 18, com graus de hidrólise de 50,6 e 60 % em 90 (H90) e 120 min (H120) de reação, respectivamente. A estabilidade da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos em condições de processamento de alimentos (tratamento térmico, pH, concentração de NaCl) e após digestão *in vitro* foi avaliada. Além disso, os hidrolisados proteicos foram encapsulados com gelatina por atomização em *spray dryer* e *nanospray dryer* para aumentar sua estabilidade. As partículas obtidas foram caracterizadas quanto às suas propriedades térmicas, eletrostáticas, morfológicas e antioxidante. O hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer* (H120EN) foi avaliado quanto à estabilidade da atividade antioxidante sob condições de processamento de alimentos e após digestão *in vitro*, da mesma forma que os hidrolisados proteicos não encapsulados. O H120EN foi adicionado em sobremesa comercial a base de gelatina sabor limão e este alimento foi avaliado quanto aos parâmetros de cor, textura e atividade antioxidante (2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e poder redutor). Os resultados indicaram que a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos livres foi mantida após aplicação de tratamento térmico (−18°C, 63 °C e 100 °C). O processo de encapsulamento foi capaz de aumentar a atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH dos hidrolisados estudados em aproximadamente 2 vezes. As análises termogravimétricas e de calorimetria exploratória diferencial indicaram que o encapsulamento dos hidrolisados proteicos aumentou a termoestabilidade destes. O processo de encapsulamento em *nanospray dryer* apresentou maior rendimento para ambos os hidrolisados proteicos, sendo o H120EN o que apresentou a maior eficiência de encapsulamento (87,3 ± 1,2 %), maior potencial zeta em módulo (16 mV) e menor tamanho (1,17 µm). A capacidade de inibir o radical ABTS do H120EN aumentou em aproximadamente 25% após digestão *in vitro*. A sobremesa comercial de gelatina sabor limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado apresentou cor e textura sem alterações relevantes em relação à amostra controle, sem adição de hidrolisado proteico, porém com maior atividade antioxidante. Esses resultados contribuem para a aplicação de peptídeos bioativos de microalgas em alimentos. Além disso, o encapsulamento mediante secagem por atomização de hidrolisados proteicos de *Spirulina* é promissor para a indústria de alimentos, uma vez que foi possível aumentar a inibição do radical DPPH destes hidrolisados bem como torná-los termicamente estáveis. Este estudo indica que a aplicação de hidrolisados proteicos microalgais é capaz de proporcionar atividade antioxidante a alimentos, e que estes compostos após processados e armazenados ainda conferem sua propriedade após digestão.

Palavras-chave: Compostos bioativos, encapsulamento, gelatina, microalgas, *nanospray drying*.

ENCAPSULATION OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM *Spirulina*FOR FOOD APPLICATION

ABSTRACT

In this study, protein hydrolysates having peptides with antioxidant activity were obtained from *Spirulina* sp. LEB 18, with degree of hydrolysis of 50.6 % and 60 % in 90 min (H90) and 120 min (H120), respectively. The stability of the antioxidant activity of protein hydrolysates under food processing conditions (heat treatment, pH, NaCl concentration) and after in vitro digestion was evaluated. Furthermore, they were encapsulated with gelatin by spray drying with a spray dryer and a nanospray dryer to increase their stability. The obtained particles were characterized regarding their thermal, electrostatic, morphological and antioxidant properties. The protein hydrolysate obtained in 120 min of reaction encapsulated in nanospray dryer (H120EN) was evaluated for the stability of their antioxidant activity under food processing conditions and after in vitro digestion, equally as for non-encapsulated protein hydrolysates. The H120EN was added in a lemon-flavored gelatin-based commercial dessert and this food was evaluated for color, texture and antioxidant activity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and reducing power). The results indicated that the antioxidant activity of free protein hydrolysates was maintained after heat treatment (−18 °C, 63 °C and 100 °C). The encapsulation process was able to increase the antioxidant activity of scavenging the DPPH radical of the studied hydrolysates in approximately twice. Thermogravimetric and differential exploratory calorimetry analyzes indicated that the encapsulation of protein hydrolysates increased their thermostability. The encapsulation process in *nanospray dryer* presented the highest yield for both protein hydrolysates, being the H120EN which presented the highest encapsulation efficiency (87.3 ± 1.2%), highest absolute zeta potential (16 mV) and smallest size (1.17 µm). The ability to inhibit the ABTS radical of the H120EN increased in approximately 25 % after digestion. The lemon-flavored gelatin dessert with the encapsulated protein hydrolysate from *Spirulina* sp. LEB 18 showed color and texture without relevant changes in relation to the control sample, without the addition of protein hydrolysate, but with greater antioxidant activity. These results contribute to the application of bioactive peptides from microalgae in food. In addition, the encapsulation by spray drying of *Spirulina* protein hydrolysates is promising for the food industry, since it was possible to increase the inhibition of the DPPH radical of these hydrolysates as well as making them thermally stable. This study indicates that the application of microalgal protein hydrolysates is able to provide bioactivity to foods and that these compounds still confer their property after processing and stored and after digestion.

Keywords: Bioactive compounds, encapsulation, functional foods, gelatin, microalgae, *nanospray drying*.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Spirulina é uma microalga pertencente ao grupo das *Cyanophytas*, também denominadas algas azuis, que requer água, dióxido de carbono, energia luminosa e nutrientes inorgânicos para seu crescimento (RADMER; PARKER, 1994; WOOD; TOERIEN, 1991). Sua biomassa possui entre 50 e 70 % de proteínas, é fonte de vitaminas, minerais, ácidos graxos, apresentando potencial para extração de compostos com valor agregado (BELAY; HOUSTON, 2002; MORAIS et al., 2009). Efeitos favoráveis à saúde estão associados às proteínas, hidrolisados proteicos e/ou peptídeos obtidos dessa microalga (SAMARAKOON; JEON, 2012).

Peptídeos com atividade biológica, especialmente atividade antioxidante, vem sendo estudados, a fim de conferirem inibição de radicais livres no organismo e para substituírem aditivos alimentares sintéticos, como BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) e o BHT (2,6-diterc-butil-p-creso) (FARVIN et al., 2016; WANG et al., 2014). Eles podem ser obtidos de proteínas microalgais, que são fontes alternativas para obtenção de peptídeos bioativos, pois são micro-organismos autotróficos que não competem com solos destinados à produção de alimentos, apresentam altas taxas de crescimento celular, com requerimentos de baixo custo (CHRONAKIS; MADSEN, 2011).

A hidrólise enzimática das proteínas de *Spirulina* produz peptídeos com atividade antioxidante (LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016), porém pouco se sabe sobre a influência dos métodos de processamento, armazenamento de alimentos e condições do trato digestivo na atividade bioativa de hidrolisados proteicos e peptídeos de *Spirulina*. Para aplicar esses compostos em alimentos a fim de produzir alimentos é necessário que sejam estáveis ao processamento de alimentos, como tratamento térmico, pH, interação com outros componentes, e biodisponíveis no organismo (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

Estratégias de encapsulamento vêm sendo empregadas pois são capazes de aumentar a estabilidade de substâncias ativas e permitem sua liberação controlada (EZHILARASI et al., 2013). A encapsulação é um processo de revestir substâncias (composto ativo) dentro de uma ou mais classes de materiais de parede para produzir partículas em escala micrométrica (microencapsulação), nanométrica (nanoencapsulação) ou milimétrica (LAKKIS, 2007).

Entre as técnicas existentes de encapsulação, a secagem por atomização é a menos onerosa e mais usualmente utilizada na indústria de alimentos (NEDOVIC et al., 2011). Além

disso, é um processo semi-contínuo de fácil operação e escalonamento, pode ser utilizado para substâncias sensíveis ao calor com baixo risco de degradação e para substâncias hidrofílicas ou lipofílicas (ARPAGAUS et al., 2017). O encapsulamento por atomização consiste na dispersão de um polímero carreador em uma solução, que é atomizada em pequenas gotas, o solvente é evaporado utilizando um fluido de aquecimento e as partículas sólidas resultantes são recolhidas como um pó seco (FANG; BHANDARI, 2012). A secagem por atomização pode ser realizada em *nanospray dryer*, um equipamento em que pequenas gotículas são produzidas por um atuador piezoelétrico e as partículas são coletadas eletrostaticamente (ARPAGAUS et al., 2017).

Devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, e diversos grupos ativos disponíveis para interagir com moléculas alvo, a gelatina vem sendo amplamente estudada como carreadores de compostos ativos nas últimas décadas (ELZOGHBY, 2013). Gelatina é um polímero capaz de formar hidrogel, obtido de fontes naturais, comercialmente disponível a baixo custo e amplamente utilizado para conferir textura em alimentos (RAJABI et al., 2015; SCHRIEBER; GAREIS, 2007; WANG et a., 2012). Nesse contexto, além de ser utilizada para conferir textura, a gelatina tem sido estudada como material de parede para liberar de forma controlada e aumentar a estabilidade desses compostos (GÓMEZ-MASCARAQUE; LAGARÓN E; LÓPEZ-RUBIO, 2015; HORUZ; BELIBAĞLI, 2018; SILVA et al., 2018).

A adição de hidrolisados proteicos de *Spirulina* com atividade antioxidante em alimentos pode ser uma estratégia interessante para atender a busca por alimentos que proporcionem benefícios a saúde. Sobremesas à base de gelatina possuem entre 1 a 3 % de gelatina, açúcares, corantes, saborizantes e alguns aditivos (ZHOU e REGESTEIN, 2007). Esses alimentos são candidatos adequados à fortificação com agentes bioativos e estão entre as sobremesas de elevada aceitação por crianças e adolescentes e além disso, são alimentos amplamente consumidos e de fácil preparo (BARBOSA et al., 2013; KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2015).

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURG estuda o cultivo de microalgas desde 1996, objetivando otimizar a produção de biomassa destes micro-organismos para extração de vários compostos como ácidos graxos, ficocianina e polímeros, bem como para formulação de produtos alimentícios enriquecidos de *Spirulina*, produção de biocombustíveis e fixação de CO_2. A partir de 2009, a biomassa de microalgas começou a ser estudada quanto à hidrólise das proteínas abrangendo diversos objetivos, entre eles o estudo de diferentes enzimas, para obtenção de hidrolisados proteicos com elevada digestibilidade, maior

capacidade de retenção de água, solubilidade e atividade antioxidante (LISBOA, 2013). Em 2014, as proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram concentradas, isoladas e hidrolisadas, sugerindo a aplicação destes em alimentos funcionais (PEREIRA, 2016). A nanotecnologia vem sendo aplicada aos compostos obtidos das microalgas estudadas no laboratório e pode agregar ainda mais valor aos hidrolisados proteicos contendo peptídeos bioativos por encapsulamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 com elevada atividade antioxidante e avaliar a estabilidade dessa atividade com e sem encapsulamento por atomização a fim de aplicar em um alimento de elevado consumo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter hidrolisados proteicos com atividade antioxidante por hidrólise enzimática de proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18;
- Encapsular os hidrolisados proteicos com gelatina por *spray drying* e *nanospray drying*;
- Verificar a estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos livres, bem como encapsulados, frente a condições de processamento, armazenamento de alimentos e após digestão *in vitro*;
- Incorporar hidrolisado proteico encapsulado em sobremesa de gelatina sabor limão.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS

O interesse dos consumidores na prevenção de problemas de saúde, o aumento do custo dos cuidados com a saúde, o aumento da expectativa de vida e o desejo por melhorar a qualidade de vida tem motivado a busca por alimentos com propriedades funcionais (BIGLIARDI; GALATI, 2013; BOGUE; COLLINS; TROY, 2016). Nesse contexto, os compostos bioativos despertam a atenção de pesquisadores devido às suas propriedades funcionais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-carcinogênica e antimicrobiana (GIACONIA et al., 2020).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define substâncias bioativas com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde como nutrientes e não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica e classifica essas substâncias bioativas em carotenoides, fitoesterois, flavonoides, fosfolipídeos, organosulfurados, polifenois e probióticos (BRASIL, 2002). Segundo a ANVISA, a alegação de propriedade funcional dos alimentos refere-se ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999b). O Ministério da Saúde e Bem-estar do Japão divide os compostos biotivos com alegação de propriedades de saúde em fibras dietéticas, oligossacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas, glicosídeos, isoprenos e vitaminas, bactérias ácido láticas, ácidos graxos poli-insaturados minerais e outros (fitoquímicos e antioxidantes) (GOLDBERG, 1994).

Muitos desses compostos bioativos vêm sendo identificados e extraídos de diversas fontes para aplicação em alimentos. Alguns exemplos de alimentos adicionados de compostos bioativos são: suco de laranja adicionado de ácidos graxos poli-insaturados encapsulados (MARSANASCO et al., 2015); iogurte adicionado de vitamina D (JAFARI; VAKILI; DEHNAD, 2019) e ácido linolênico (NIEUWENHOVE et al., 2019).

Compostos bioativos de fonte microalgal vem sendo estudados pois microalgas são micro-organismos autotróficos que não competem com solos destinados à produção de alimentos, apresentam altas taxas de crescimento celular, com requerimentos de baixo custo (CHRONAKIS; MADSEN, 2011). Os principais gêneros de microalgas estudados por possuírem compostos bioativos são *Chlorella* (SIKIRU et al., 2019), *Dunaliella* (ZAMANI; RASTEGARI; VARAMINI, 2019), *Tetraselmis*, *Nannochloropsis* (LAFARGA et al., 2019b), *Haematococcus* (MACHADO et al., 2016), *Spirulina* (PEREIRA et al., 2019), entre outros.

3.2 Spirulina

A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria pertencente ao grupo das *Cyanophytas*, também denominadas algas azuis. Sua organização celular é procariótica, filamentosa, que forma tricomas cilíndricos, e se dispõe na forma espiralada (VONSHAK, 1997). Além de água, requer dióxido de carbono, energia luminosa e nutrientes inorgânicos para o crescimento (RADMER; PARKER, 1994; WOOD; TOERIEN, 1991).

A biomassa de *Spirulina* é constituída em cerca de 50 e 70% m m^{-1} de proteínas (BELAY; HOUSTON, 2002; MORAIS et al., 2009). As proteínas presentes em sua biomassa são, principalmente, ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas aumentam o espectro de captação de luz pela fotossíntese, mas também possuem uma importante função de atuar como reserva de nitrogênio. Elas são classificadas em três grandes grupos: ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004), sendo a ficocianina a proteína majoritária (PATIL; RAGHAVARAO, 2007). Fazem parte dessas proteínas todos os aminoácidos essenciais (leucina, isoleusina, lisina, metionina, treonina, triptofano, fenilalanina e valina), que representam 47 % do seu peso total seco de suas proteínas (DILLON; PHUN; DUBACQ, 1995).

Devido ao seu elevado valor nutritivo, diversos estudos estão direcionados à avaliação dos benefícios à saúde proporcionados pela ingestão de biomassa de *Spirulina* (ADEL et al., 2016; TEIMOURI; AMIRKOLAIE; YEGANEH, 2013) e à produção de biomassa visando aplicação em alimentos (COCA et al., 2015; SANTOS et al., 2016a). Efeitos bioativos, como atividade antioxidante de compostos presentes na biomassa (EL-TANTAWY, 2015) dessa microalga, em especial de peptídeos (LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016; MINIC et al., 2016) tem despertado atenção dos pesquisadores para aplicação em alimentos.

Desde 1981 a microalga *Spirulina* foi legalmente aceita pelo FDA (*Food Drug Administration*) como sendo fonte de proteínas, vitaminas e minerais, podendo ser comercializada como alimento ou complemento alimentar (FOX, 1996). No mercado, é possível encontrar sua biomassa na forma de *tablets*, cápsulas, em pó ou na forma líquida. Estima-se que a produção mundial de *Spirulina* ultrapasse 5000 toneladas (massa seca) por ano (BOROWITZKA, 2013). Estudos foram realizados a fim de incluir a biomassa em formulações de pão (FIGUEIRA et al., 2011; MARCO et al., 2014), massas (FRADINHO et al., 2020; FRADIQUE et al., 2010; MARCO et al., 2014), pudins (GOUVEIA et al., 2008), biscoitos (BATISTA et al., 2017; MORAIS; MIRANDA; COSTA, 2006), leites fermentados (BEHESHTIPOUR et al., 2013), *shake* (SANTOS et al., 2016b), sopas (LAFARGA et al.,

2019a), *snacks* (LUCAS et al., 2018), *shakes* substitutos de refeição e hipercalóricos para suplementação alimentar de atletas (FREITAS et al., 2019), repositor hidroeletrolítico, recuperador muscular e potencializador muscular (CARVALHO et al., 2016, 2017), iogurte liofilizado (YAMAGUCHI et al., 2019), entre outros.

3.3 HIDROLISADOS PROTEICOS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS

Hidrolisados proteicos são constituídos de peptídeos e aminoácidos livres que podem ser obtidos a partir de hidrólise química, enzimática ou por fermentação, sendo que a hidrólise enzimática é a mais utilizada para obtenção de peptídeos bioativos. A especificidade da enzima proteolítica afeta o tamanho, a quantidade, a composição de peptídeos e aminoácidos livres e sua sequência, que por sua vez influencia a atividade bioativa dos peptídeos gerados (CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995).

A hidrólise enzimática de proteínas resulta em diminuição da massa molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos protegidos na estrutura original da proteína (ROMAN; SGARBIERI, 2005). Isto proporciona tanto melhora das propriedades funcionais em sistemas alimentícios (YADA, 2004), quanto nutricionais (ALMEIDA et al., 2015), incluindo a liberação de peptídeos bioativos, que podem ser utilizados em alimentos (JAMDAR et al., 2010; UDENIGWE; ALUKO, 2012).

As aplicações de hidrolisados proteicos em alimentos para fins especiais incluem suplementação dietética de idosos (PENNINGS et al., 2011), de crianças que apresentam alergia à proteína intacta, intolerâncias alimentares (PENTERICH et al., 2010) ou erro inato de metabolismo, como a fenilcetonúria (BIZZOTO et al., 2006). Outros exemplos de aplicação são dietas para controle de peso (AIHARA; OSAKA; YOSHIDA, 2014; LILLEFOSSE et al., 2013) e nutrição de esportistas (DÉCOMBAZ, 2004; MOBLEY et al., 2015). Dois novos alimentos, patê enlatado e refeição congelada, foram desenvolvidos com adição de hidrolisado proteico de pepino do mar por possuir atividade antioxidante e anti-hipertensiva (GARCÍA et al., 2019).

Peptídeos bioativos são sequências de aminoácidos que apresentam bioatividade, purificados a partir dos hidrolisados proteicos, proporcionando benefícios à saúde (SARMADI; ISMAIL, 2010). Geralmente possuem entre 3 a 20 aminoácidos, que precisam ser liberados a partir da hidrólise da estrutura original de uma proteína para exercerem atividade biológica, dependendo da composição e sequência de aminoácidos (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2000).

Peptídeos com atividade antioxidante vem sendo obtidos a partir de hidrolisados proteicos de diversas proteínas alimentícias como de soja (CASTRO; SATO, 2014), milho (WANG et al., 2014), caseína (XIE et al., 2014), soro de leite (KONG et al., 2012), gelatina (LI et al., 2013), pescado (DE QUADROS et al., 2019; LIMA et al., 2019), entre outros. Proteínas de fontes microalgais têm se mostrado promissoras para obtenção de peptídeos com atividade biológica em alternativa às fontes convencionais de alimentos (PEREIRA, 2016).

3.4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE MICROALGAS

As proteínas de fontes microalgais vêm sendo hidrolisadas para obtenção de compostos que apresentam benefícios à saúde. Sheih, Fang e Wu (2009) hidrolisaram a biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* com pepsina e obtiveram um peptídeo, constituído de 11 aminoácidos, capaz de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), importante para o tratamento de hipertensão arterial. A atividade desse peptídeo foi estável em faixa de pH de 2 a 10, em temperaturas de 40 a 100 °C e após digestão *in vitro*. Em outro estudo, esse peptídeo purificado de hidrolisado proteico de *Chlorella vulgaris* apresentou inibição de uma variedade de radicais livres, incluindo radical hidroxil, superóxido e radical peroxil, que de acordo com os autores, permaneceu após digestão *in vitro* (SHEIH; WU; FANG, 2009).

Peptídeos com atividade inibidora de ECA foram encontrados em proteínas hidrolisadas de e *Chlorella ellipsoidea* (KO et al., 2012) e *Spirulina platensis* (PAN et al., 2015). Nesses estudos, houve diminuição da pressão arterial de ratos alimentados com 10 mg kg $^{-1}$ desses peptídeos. Peptídeos com atividade inibidora de ECA também foram produzidos da hidrólise enzimática de proteínas de *Nannochloropsis oculata* (SAMARAKOON et al., 2013). Os peptídeos purificados deste estudo não apresentaram citotoxicidade em células endoteliais humanas, e os autores sugeriram que esses peptídeos apresentam potencial aplicação no desenvolvimento de nutracêuticos e suplementos contra hipertensão ou outras doenças cardiovasculares.

Vo, Ryu e Kim (2013) purificaram peptídeos obtidos através de hidrólise da biomassa de *Spirulina maxima* com enzimas digestivas tripsina, quimotripsina e tirosina. Os peptídeos obtidos apresentaram ação anti-inflamatória e não apresentaram citotoxicidade em células endoteliais e mastócitos. Sheih et al. (2010) foram os primeiros pesquisadores a estudar a ação anticancerígena de peptídeos de microalgas e segundo esses autores, o efeito dos peptídeos da microalga *Chlorella vulgaris* na inibição e parada do ciclo de células cancerígenas é maior do que o de peptídeos de soja, pescado, leite e carne bovina.

Peptídeos com atividade antioxidante de *Chlorella ellipsoidea* foram purificados, tendo sua atividade antioxidante avaliada *in vitro* (sequestro de radicais peróxido e hidroxila) e *in vivo* através da utilização de células danificadas pela indução de radicais livres (KO; KIM; JEON, 2012). Lisboa, Pereira e Costa (2016) estudaram a hidrólise enzimática da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 para obtenção de peptídeos antioxidantes. Nesse estudo, foi realizado um planejamento composto central para avaliar a melhor concentração de substrato e tempo de reação para obtenção do maior grau de hidrólise das proteínas.

3.5 ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

A fim de aumentar a estabilidade de compostos bioativos, tais como peptídeos, técnicas de encapsulamento vêm sendo empregadas. Ao aplicar esses compostos em produtos alimentícios, sua bioatividade pode ser afetada pelo processamento, incluindo mudança de pH, tratamento térmico, alta pressão, processos de separação por membrana, e por interações com outros componentes da matriz alimentícia (KETNAWA et al., 2017).

Encapsulamento é um processo em que a substância ativa é envolvida em um material de parede, produzindo partículas na escala nanométrica (nanoencapsulação), micrométrica (microencapsulação) ou escala milimétrica (BURGAIN et al., 2011). A substância encapsulada (composto ativo), pode ser chamada de núcleo, preenchimento, fase ativa, interna ou fase de carga útil. A substância que encapsula o agente ativo é chamada de revestimento, membrana, casca, cápsula, carreador, material de parede, fase ou matriz externa (FANG; BHANDARI, 2010).

De acordo com o modo de proteção do núcleo, as partículas formadas pelo encapsulamento são classificadas em sistemas reservatórios (cápsulas) e sistemas matriciais (esferas). A diferença entre estes dois sistemas se encontra na localização do núcleo. Em cápsulas o núcleo se encontra envolto e circundado por um filme definido e contínuo do material de parede e em esferas o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz sólida.

O encapsulamento de ativos tem sido muito utilizado com a finalidade de se aumentar a estabilidade, eficácia, além de reduzir efeitos colaterais no caso de medicamentos (EZHILARASI et al., 2013). Dentre os principais métodos de encapsulamento destacam-se os por emulsão e por secagem.

Os métodos baseados na emulsão podem ser divididos em: remoção de solvente; revestimento multicamada; e polimerização (KAKRAN; ANTIPINA, 2014). Estas técnicas são

mais utilizadas para encapsular compostos bioativos lipofílicos, como β-caroteno e ácidos graxos essenciais (HOLKEM et al., 2015).

As técnicas de secagem para produção de encapsulados podem ser realizadas por sublimação (liofilização) e atomização (*spray drying* ou nebulização) (EZHILARASI et al., 2013). Essas técnicas, principalmente as de secagem por atomização, são comumente aplicadas na preparação de ingredientes alimentícios e no encapsulamento de nutracêuticos devido a vantagens proeminentes na disponibilidade de equipamentos, alta estabilidade, pequena massa e volume do produto formado, consequentemente reduzido espaço de armazenamento e custos com transporte (FANG; BHANDARI, 2012).

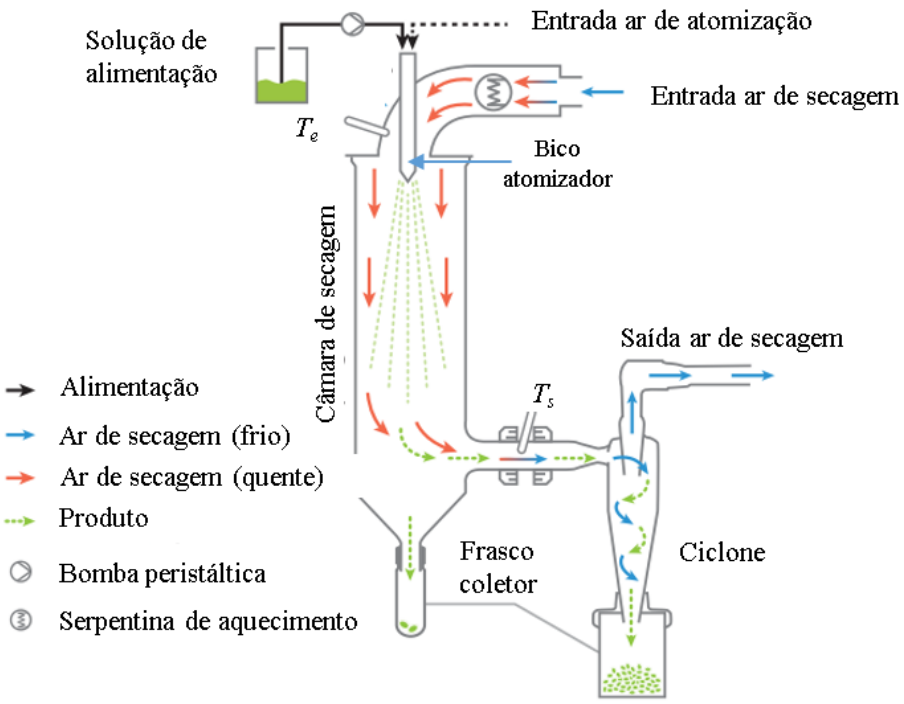
Para ambos os métodos, a nanotecnologia vem sendo estudada, para obtenção de nanocápsulas ou nanoesferas. Ao reduzir o tamanho de partícula, a nanotecnologia pode contribuir nas propriedades de compostos bioativos, tais como liberação controlada, solubilidade, maior tempo de residência no trato gastrointestinal e maior eficiência na absorção pelas células (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006), além de protegê-los das interações com outros ingredientes (DONSÌ et al., 2011).

3.5.1 Spray drying

Spray drying é uma técnica que vem sendo utilizada para produzir micro e nanopartículas com compostos bioativos encapsulados (SOSNIK; SEREMETA, 2015). Por esta técnica, os materiais ativos podem ser encapsulados através da dispersão em uma solução de polímero carreador, que é atomizada em pequenas gotas. O solvente é evaporado utilizando um fluido de aquecimento e as partículas sólidas resultantes são recolhidas como um pó seco (FANG; BHANDARI, 2012).

A alimentação é realizada por uma bomba peristáltica, que leva a solução contendo o material de parede e o composto ativo até o bico atomizador. O bico atomizador produz pequenas gotículas que são direcionadas para a câmara de secagem. Simultaneamente, o ar de secagem é direcionado para a câmara de secagem paralelamente ao fluxo das gotículas atomizadas. Dentro desta câmara, as gotículas atomizadas são secas em poucos segundos devido ao contato com o ar aquecido e caem no fundo da câmara. As partículas geradas são direcionadas para o ciclone, que é conectado a um exaustor. O ar de secagem é encaminhado a um filtro a fim de separar partículas muito finas e, em seguida, removido do *spray dryer* pelo exaustor (Figura 1) (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

Figura 1 – Esquema de funcionamento de *Spray dryer*.



Fonte: adaptado de (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

Soluções aquosas podem ser utilizadas no processo, no entanto, a temperatura para eliminar a água do polímero de revestimento deve ser considerada pois temperaturas relativamente elevadas podem afetar a estabilidade do composto ativo (PÉREZ-MASIÁ et al., 2015). Compostos bioativos como antocianinas (FLORES; SINGH; KONG, 2014), vitaminas (PÉREZ-MASIÁ et al., 2015), probióticos (MACIEL et al., 2014), peptídeos (AKBARBAGLU et al., 2019) e enzimas (AMARA et al., 2016) vem sendo encapsulados através de secagem por atomização, a fim de serem empregados em alimentos.

Hidrolisados proteicos de caseína foram encapsulados em *spray dryer* com maltodextrina a fim de mascarar o sabor amargo dos hidrolisados e diminuir sua higroscopicidade para aplicação em barras proteicas. A análise sensorial do produto elaborado indicou diminuição de sabor amargo em relação ao produto adicionado de hidrolisado proteico de caseína livre (ROCHA et al., 2009). Nos estudos de Sarabandi et al. (2018), hidrolisados proteicos de mesma origem mantiveram a atividade antioxidante, avaliada por diferentes métodos, após o encapsulamento por *spray drying*.

Quadro 1 – Parâmetros e principais resultados de estudos de encapsulamento de compostos ativos por atomização.

Composto ativo	Material de parede	Condições de secagem	Resultado	Referência
Hidrolisado proteico de farinha de linhaça	Maltodextrina (1:1; 2:1; 3:1 m m^{-1} material de parede:composto ativo)	ø do atomizador: 0,7 mm; alimentação: 5 mL min^{-1}; vazão ar comprimido: 0,54 m^3 h^{-1}; temperatura entrada: 130 °C	-Rendimento: 46,5 % (3:1); -Tamanho: aumentou com aumento da proporção material de parede:composto ativo	Akbarbaglu et al. (2019)
Hidrolisado proteico de caseína	Matodextrina (90:10 material de parede: composto ativo)	Alimentação: 3,6 L h^{-1}; vazão ar comprimido: 50 L min^{-1}; temperatura 140 °C entrada e 110°C saída; sólidos totais: 30 %	Tamanho: 0,1 – 100 µm	Rocha et al. (2009)
Hidrolisado proteico de caseína	Matodextrina (60:40 material de parede: composto ativo)	ø do atomizador: 0,5 mm; alimentação 5 mL min^{-1}; vazão ar comprimido: 0,54 m^3 h^{-1}; temperatura: 130°C na entrada e 70°C na saída; sólidos totais: 10 %	-Manutenção da atividade antioxidante após encapsulamento	Sarabandi et al. (2018)
Hidrolisado proteico de soro de leite (30% em relação ao material de parede)	Gelatina	ø do atomizador: 7 µm; temperatura de entrada 90°C; fluxo ar de secagem 150 L min^{-1}; sólidos totais: 10 %	Tamanho: 0,6 µm	Gómez-Mascaraque et al. (2016a)
Ácido fólico (1,5 % $m.m^{-1}$)	Soro de leite concentrado e amido resistente	ø do atomizador: 7 µm; fluxo de ar: 140 L h^{-1}; Temperatura entrada 90 °C; sólidos totais: 0,4 %	-Eficiência de encapsulamento: aproximadamente 50 % com amido resistente e 80 % com soro de leite; -Tamanho: 0,5 – 4,5 µm	Pérez-Masiá et al. (2015)
Hidrolisado proteico de caseína (20 % m m^{-1} em relação aos sólidos totais)	Isolado proteico de soja e gelatina tipo B (20 % m v^{-1})	ø do atomizador: 0,5 mm; alimentação 3,6 L h^{-1}; vazão ar comprimido: 50 L min^{-1}; temperatura: 140°C na entrada e 70°C na saída; sólidos totais: 20 %	Tamanho: 10 – 17 µm	Favaro-Trindade et al. (2010)

ø:diâmetro.

Akbarbaglu et al. (2019) investigaram a influência da encapsulação por *spray drying* de hidrolisados proteicos de farinha de linhaça utilizando três diferentes enzimas e proporções de material de parede, nas propriedades físicas, na retenção da atividade antioxidante, estrutura química e morfologia das partículas geradas. A encapsulação foi eficiente para reter a atividade antioxidante dos hidrolisados, especialmente quando utilizada a proporção 3:1 (material de parede: hidrolisado proteico). Mais detalhes desses estudos estão descritos no Quadro 1.

O maior desafio durante o encapsulamento por *spray drying* é a obtenção de alto rendimento em produto com elevada eficiência de encapsulação. Uma inovação ao encapsulamento através de secagem por atomização foi o desenvolvimento do secador por *nanospray* (*nanospray dryer*), que opera com alguns princípios diferentes do *spray dryer* convencional (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

3.5.2 Nanospray drying

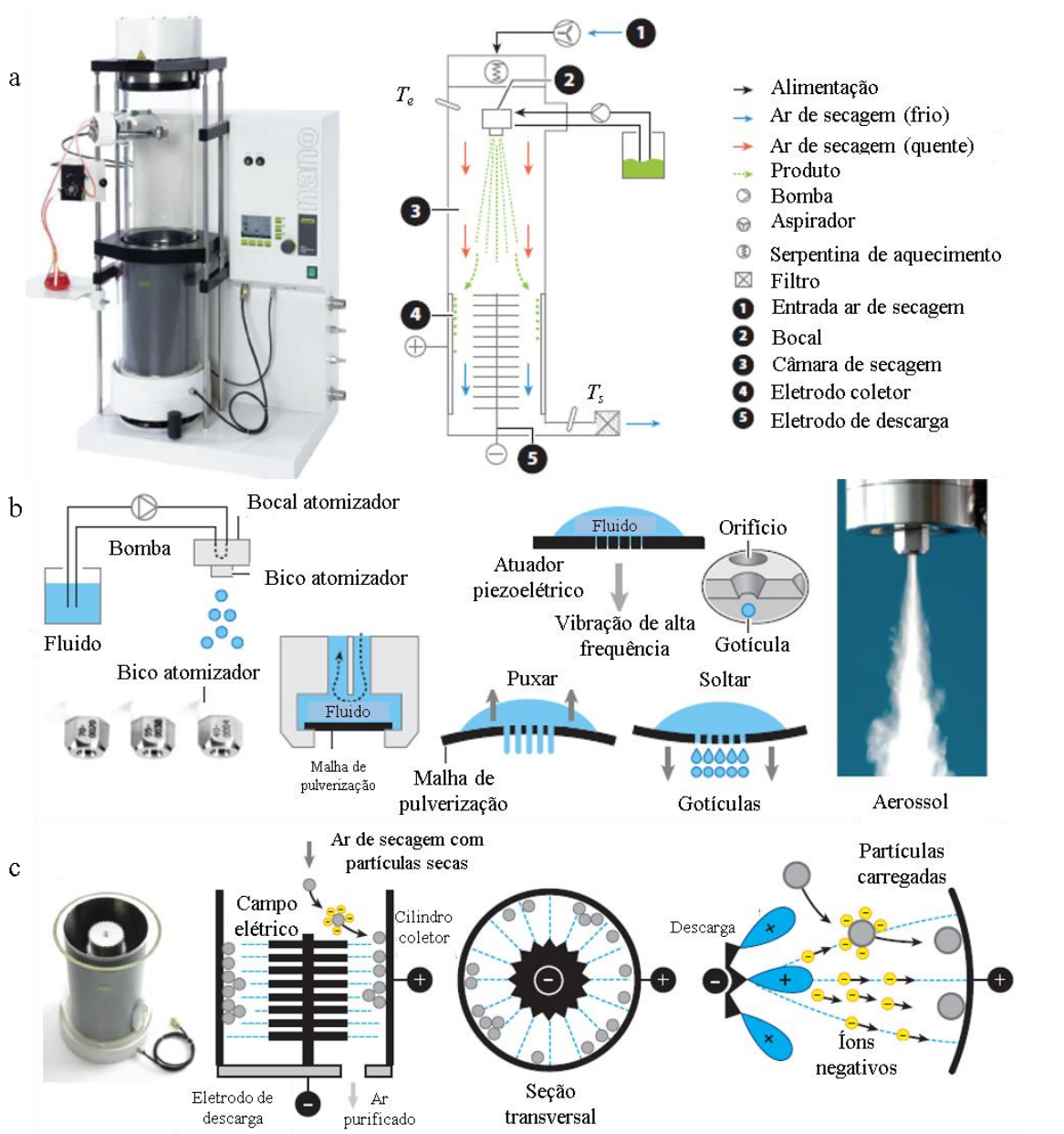
A companhia sueca Büchi introduziu o primeiro *nanospray dryer* (Büchi, B-90, Suíça), baseado em um novo conceito de secagem por atomização que envolve a produção de partículas em escala submicrométrica a partir de uma solução, nanoemulsão ou nano-suspensão. Sua inovação tecnológica está no fluxo laminar de ar de secagem, na tecnologia de pulverização de malha vibratória para formar gotículas finas e no coletor eletrostático altamente eficiente para coletar nanopartículas (ARPAGAUS et al., 2017).

Uma bomba peristáltica com velocidade variável circula o fluido uniformemente do reservatório para o atomizador, que passa para a malha de pulverização no bocal do atomizador e volta para o reservatório. Este modo de circulação permite uma atomização eficiente e contínua. A malha de pulverização vibra a uma frequência ultrassônica de cerca de 60 kHz pela ação do atuador piezoelétrico presente no bocal do atomizador. A vibração rápida faz com que cada orifício atue como uma microbomba que suga o fluido através dos orifícios para formar gotículas de tamanho idêntico. Milhões de gotículas de tamanho preciso com distribuição estreita de tamanhos são produzidas a cada segundo. O tamanho da gota depende do tamanho do poro da malha e das propriedades físico-químicas do fluido, como viscosidade e tensão superficial (ARPAGAUS et al., 2017; BÜRKI et al., 2011).

As gotículas de aerossol geradas são lançadas da parte superior do *nanospray dryer* na mesma direção descendente do fluxo laminar de ar de secagem. A configuração vertical do equipamento guia as partículas em direção ao coletor eletrostático, minimizando a adesão das

partículas às paredes laterais da câmara de secagem, resultando em alta eficiência de coleta (ARPAGAUS et al., 2017).

Figura 2 – Esquema de funcionamento do *Nanospray dryer* B-90.



(a) Esquema de princípios técnicos do nanospray dryer; (b) Geração de gotículas por tecnologia de malha vibratória (c) Princípios técnicos do coletor eletrostático de partículas. Fonte: adaptado de (ARPAGAUS et al., 2017).

O mecanismo de coleta das gotículas geradas no *nanospray dryer* é baseado na carga eletrostática, que ao contrário do *spray dryer* convencional, independe da massa das partículas (LEE et al., 2011). Um campo elétrico de aproximadamente 15 kV é formado entre

o eletrodo de descarga (eletrodo central) e o eletrodo cilíndrico coletor. À medida que a diferença de potencial elétrico aumenta, o ar próximo às pontas dos eletrodos centrais começa a se ionizar. Os íons se aderem às partículas suspensas no ar de secagem, conferindo-lhes uma polaridade negativa. As partículas sofrem uma deflexão em direção ao eletrodo coletor com carga positiva, onde elas se aderem e formam uma camada de partículas. Ao entrar em contato com o eletrodo coletor, a carga das partículas é dissipada e o ar de secagem sai do coletor de forma purificada (Figura 2) (MIZUNO, 2000).

Muitos estudos têm usado essa tecnologia para encapsular fármacos, porém a aplicação dessa tecnologia em alimentos é pouco explorada (ASSADPOUR; JAFARI, 2019). Em função das características de secagem, o encapsulamento por *nanospray drying* é uma tecnologia adequada para produtos sensíveis ao calor, pois apresenta baixo risco de degradação ou perda de atividade (ARPAGAUS et al., 2017) e devido a isso, existem algumas pesquisas quanto ao encapsulamento de óleos essenciais (REDDY; ISHWARYA; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2019), vitaminas (PÉREZ-MASIÁ et al., 2015) e hidrolisados proteicos (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2016a) objetivando a aplicação em alimentos.

A secagem por atomização em *nanospray dryer* foi utilizada para encapsular hidrolisado proteico de soro de leite com quitosana e gelatina como material de parede. Os hidrolisados proteicos livres e encapsulados foram adicionados em leite para produção de iogurte. O encapsulamento do hidrolisado proteico foi capaz de proteger os peptídeos após digestão gastrointestinal simulada e após fermentação ácido lática (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2016a).

Diversos fatores podem estar envolvidos no encapsulamento de hidrolisados proteicos e peptídeos de fontes alimentícias, porém existem poucos estudos quanto ao encapsulamento desses compostos (MOHAN et al., 2015), especialmente de microalgas. Portanto, o estudo de diferentes técnicas de encapsulação, buscando a estabilidade e a biodisponibilidade de peptídeos derivados de microalgas torna-se um desafio de pesquisa para aplicação em alimentos.

3.6 MATERIAIS DE REVESTIMENTO

A estabilidade e biodisponibilidade do produto formado depende diretamente da escolha do material de revestimento. Este deve possuir algumas características como: boas propriedades reológicas em elevada concentração; ser de fácil manipulação; ter capacidade de

dispersar ou emulsionar o composto ativo e estabilizar a emulsão produzida; não ser reativo quimicamente com o núcleo ativo a ser encapsulado durante o processamento; ter capacidade de envolver e manter o composto ativo dentro de sua estrutura durante o processamento ou armazenamento; ter capacidade de desprender completamente os solventes ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulamento sob condições de secagem ou outros processos de dessolvatação; ter habilidade de fornecer proteção máxima para o composto ativo contra as condições ambientais (oxigênio, luz, calor, umidade) (DESAI; PARK, 2005).

Os materiais que são estudados e utilizados podem ser divididos em polímeros sintéticos e polímeros naturais, como carboidratos, proteínas e lipídeos, porém carboidratos e proteínas são mais usualmente utilizados para encapsular substâncias mediante secagem por atomização (MOHAN et al., 2015). Entre os polímeros sintéticos, os homo e copolímeros de lactato e glicolato, podem ser usados no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos, com a vantagem de serem biodegradáveis (ESFANJANI; JAFARI, 2016). Porém, apresentam a desvantagem de serem de fontes não naturais, o que tem levado alguns pesquisadores a utilizá-los em blendas com polímeros naturais, melhorando suas propriedades (SIONKOWSKA, 2011).

Entre os carboidratos, os polissacarídeos mais utilizados para encapsulação são amido (LI et al., 2016), quitosana (TYLINGO; MANIA; SZWACKI, 2016), alginatos (SÁEZ et al., 2015), celulose (GALLARDO et al., 2013) e dextrinas (RAJABI et al., 2015). De forma geral, os hidrocoloides (polímeros de carboidratos) podem ser processados em soluções aquosas ao mesmo tempo que evitam a ruptura de partículas quando submetidas a determinadas condições (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2014).

Proteínas vêm sendo utilizadas para encapsulamento de compostos ativos, entre elas estão proteínas do soro de leite (ESFANJANI et al., 2015; FLORES; SINGH; KONG, 2014), proteínas de soja (NESTERENKO et al., 2014), albumina (SHAHGHOLIAN; RAJABZADEH, 2016), gelatina (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2016b), zeína de milho (XUE et al., 2013) e caseinatos (WANG et al., 2017). A principal razão em que proteínas são utilizadas como revestimento de biocompostos se deve à habilidade de formar géis, desta forma, conseguem interagir e proteger uma ampla gama de compostos ativos através de seus grupos funcionais (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006).

Entre as proteínas estudadas para o encapsulamento de substâncias ativas, a gelatina é um polímero biodegradável capaz de formar hidrogel, obtido de fontes naturais, comercialmente disponível a baixo custo, que pode ser utilizado em alimentos (SCHRIEBER;

GAREIS, 2007). A gelatina vem sendo empregada para aumentar a estabilidade de substâncias ativas (RAJABI et al., 2015).

3.6.1 Gelatina como material de revestimento

Gelatina é produzida a partir da hidrólise parcial ácida ou alcalina de colágeno de peles e tecidos ósseos de animais. Gelatinas obtidas por hidrólise ácida são conhecidas como gelatina do tipo A, enquanto que gelatinas obtidas por hidrólise alcalina são denominadas de gelatina do tipo B (ALI et al., 2019).

A gelatina é um dos biopolímeros mais versáteis utilizado para as mais diversas aplicações em alimentos, fármacos, cosméticos, entre outros (HAUG; DRAGET, 2011). Devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, e diversos grupos ativos disponíveis para interagir com moléculas alvo, a gelatina vem sendo amplamente estudada como carreadores de medicamentos, nutrientes e genes nas últimas décadas (ELZOGHBY, 2013).

Nesse contexto, a gelatina tem sido estudada como material de parede para liberar de forma controlada e aumentar a estabilidade de compostos ativos. Gelatina do tipo A foi utilizada nos estudos de Gómez-Mascaraque, Lagarón e López-Rubio (2015) para encapsular compostos fenólicos de chá verde. Neste estudo, foi possível manter a atividade antioxidante do composto fenólico quando encapsulado, o que não foi possível na sua forma livre. Os autores atribuíram esse resultado à interação molecular entre o composto ativo e a gelatina.

Carotenoides extraídos de tomate foram encapsulados por processo eletrodinâmico utilizando gelatina do tipo B como material de parede (HORUZ; BELIBAĞLI, 2018). Com isso, foi possível aumentar a estabilidade da atividade antioxidante desses compostos, além de torná-los solúveis em soluções aquosas, o que possibilita sua incorporação em matrizes alimentícias de caráter aquoso, conferindo atividade antioxidante a essas.

Agentes antimicrobianos também podem ser encapsulados com gelatina. Silva et al. (2018) encapsularam ciprofloxacino com gelatina por *spray drying* a fim de minimizar efeitos colaterais da administração desse medicamento e aumentar sua biodisponibilidade. Com esse processo foi possível obter partículas entre 2 e 3 µm, capazes de liberar o composto ativo em 6 h. A secagem por atomização utilizando gelatina como material de parede se tornou uma alternativa a outros métodos de encapsulamento desses compostos.

3.7 ADIÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM SOBREMESA À BASE DE GELATINA

No Brasil, não existe legislação específica para sobremesas do tipo gelatina em pó. No entanto, a RDC n° 273 de 2005 define como "Misturas para o Preparo de Alimentos" os produtos obtidos pela mistura de ingredientes, destinados ao preparo de alimentos pelo consumidor com a adição de outro(s) ingrediente(s), podendo requerer aquecimento ou cozimento (BRASIL, 2005). Os pós para sobremesa de gelatina são constituídos de gelatina em pó, açúcar, aromatizantes, podendo ter adição de aditivos aprovados pela Resolução nº 388, de 05 de agosto de 1999 (BRASIL, 1999c).

O mercado mundial de gelatina movimenta certa de 2 bilhões de dólares por ano (LIMA et al. 2008). No Brasil, o mercado de gelatinas apresenta vantagens competitivas associadas à produção animal e aos recursos naturais disponíveis, o que faz com que o País movimente anualmente 25 mil toneladas do produto (PALAZZO, 2008).

Além do interesse em consumir alimentos que proporcionem saúde, a falta de tempo associada com o estilo de vida moderno dificulta a incorporação de produtos frescos na dieta humana. Portanto, há uma demanda crescente de produtos em pó prontos para consumo, fáceis de preparar e ingerir, e ao mesmo tempo com alto valor nutricional e funcional (ARRIBAS et al., 2019). Sobremesas a base de gelatina estão entre as sobremesas de elevada aceitação por crianças e adolescentes e além disso, são alimentos amplamente consumidos e de fácil preparo (BARBOSA et al., 2013), o que torna interessante o estudo e desenvolvimento desses alimentos adicionados de compostos bioativos.

Compostos bioativos extraídos de erva-mate e fibras solúveis foram adicionadas em sobremesa de gelatina sabor maçã-verde para aumentar suas propriedades funcionais (BERTÉ et al., 2011). Xia et al. (2018) estudaram as propriedades reológicas, mecânicas e térmicas de géis de gelatina adicionadas de fibras solúveis de feijão, e concluíram que estas possuem potencial aplicação em alimentos. Devido ao elevado consumo de sobremesas de gelatina por crianças e adolescentes, Komaiko e McClements (2015) estudaram a adição de nanopartículas carreadoras de compostos bioativos em sobremesa comercial de gelatina sabor morango e sabor limão, Mani-López et al. (2017) incorporaram probióticos encapsulados em sobremesa de gelatina comercial sabor manga.

Portanto, devido ao elevado consumo desses alimentos, pesquisas quanto à incorporação de hidrolisados proteicos de *Spirulina* como compostos bioativos de caráter antioxidante em sobremesas a base de gelatina são promissoras para promoção de saúde.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi divido em 3 artigos. O primeiro artigo, “Estabilidade bioativa de hidrolisados proteicos de fonte microalgal sob diferentes condições de processamento e armazenamento de alimentos” foi publicado na revista Journal of Food Science and Technology, uma revista classificada como A2 na área de Ciência de Alimentos, e foi citado no restante do texto como Pereira et al. (2019). O segundo artigo intitulado “Atividade antioxidante e propriedades físico-químicas de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados por *Spray drying* e *Nanospray drying*” foi submetido para a revista LWT – Food Science and Technology (A1) e está sob revisão. O terceiro artigo foi intitulado “Hidrolisado proteico de *Spirulina* encapsulado por *nanospray drying:* estabilidade e aplicação em gelatina sabor limão”.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 10, p. 4543–4551, 2019.

ARTIGO 1

ESTABILIDADE BIOATIVA DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE FONTE MICROALGAL SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE ALIMENTOS

RESUMO

A estabilidade de hidrolisados proteicos antioxidantes de *Spirulina* sp. LEB 18 foi avaliada em condições de processamento de alimentos e após digestão *in vitro*. Para isso, foram obtidos hidrolisados proteicos com graus de hidrólise de 50,6 e 60 %, nos tempos de reação de 90 e 120 min com Protemax 580 L, respectivamente. Os resultados indicaram que a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos foi mantida após aplicação de tratamento térmico (−18°C, 63 °C e 100 °C). Além disso, houve aumento, de aproximadamente 25 %, da capacidade de inibir radical DPPH ao expô-los em meio acidificado (pH 4 e pH 6). De modo geral, os hidrolisados proteicos apresentaram-se biodisponíveis após digestão com pepsina e pancreatina. Este estudo contribui para a aplicação de peptídeos bioativos de microalgas em alimentos funcionais, uma vez que a atividade biológica destes foi mantida frente a condições de processamento de alimentos e de digestão gastrointestinal.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; hidrólise enzimática; *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

A incorporação de compostos bioativos em formulações alimentícias, a fim de desenvolver alimentos funcionais e nutracêuticos tem chamado atenção dos pesquisadores. Carotenoides, ácidos graxos, ficocianina e biopeptídeos são exemplos de compostos bioativos que proporcionam benefícios à saúde (EUSSEN et al., 2011; HOLDT; KRAAN, 2011; LI-CHAN, 2015). Eles podem ser extraídos de fontes naturais, porém, para aplicá-los em alimentos, é necessário que sejam estáveis ao processamento e biodisponíveis no organismo (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

Entre os compostos bioativos de fontes naturais, peptídeos com atividade biológica, especialmente atividade antioxidante, vêm sendo estudados, a fim de conferirem inibição de radicais livres no organismo e para substituírem conservantes alimentares sintéticos (FARVIN et al., 2016; WANG et al., 2014). Eles podem ser obtidos da hidrólise enzimática de proteínas alimentícias de fontes vegetais, como arroz (YAN et al., 2015) e amendoim (JI et al., 2014), e de fontes animais como caseína (SHAZLY et al., 2017), colágeno de salmão (WU et al., 2018), clara de ovo (LIU et al., 2015), entre outros.

Proteínas de fontes microalgais são alternativas para obtenção destes compostos, pois microalgas são micro-organismos autotróficos que não competem com solos destinados à produção de alimentos, apresentam altas taxas de crescimento celular, com requerimentos de baixo custo (CHRONAKIS; MADSEN, 2011). Existem estudos de identificação e separação de peptídeos antioxidantes obtidos da hidrólise enzimática de proteínas de microalgas tais como *Chlorella vulgaris* (SHEIH et al., 2010; SHEIH; WU; FANG, 2009) e *Chlorella ellipsoidea* (KO; KIM; JEON, 2012).

Spirulina é uma microalga que possui elevado teor de proteínas em sua biomassa (50 a 70 %), é fonte de vitaminas, minerais, ácidos graxos, apresentando considerável potencial para extração de biocompostos com valor agregado (BELAY; HOUSTON, 2002; MORAIS et al., 2009). É possível encontrar na literatura estudos que avaliam as melhores condições de obtenção de hidrolisados proteicos com elevados graus de hidrólise de proteínas de *Spirulina* (LISBOA et al., 2014), que investigam a atividade antioxidante (LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016), anti-hipertensiva (PAN et al., 2015) e anti-aterosclerótica (VO; KIM, 2013) dos peptídeos gerados da hidrólise. Porém, não existem estudos sobre a influência dos métodos de processamento e armazenamento de alimentos bioatividade desses peptídeos de *Spirulina*.

O objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 contendo peptídeos com elevada atividade antioxidante e verificar a estabilidade de sua atividade biológica frente a condições de processamento de alimentos e após digestão *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A biomassa microalgal para realização deste estudo foi obtida e caracterizada como descrito previamente por Pereira, Lisboa e Costa (2018). *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008) foi cultivada com meio Zarrouk (1966) em fotobiorreatores abertos do tipo *raceway* em condições *outdoor*. A biomassa foi seca em estufa com circulação de ar, moída em moinho de bolas, peneirada e armazenada à −18 °C.

2.2 HIDRÓLISE E CINÉTICA ENZIMÁTICA

As proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram hidrolisadas com a enzima Protemax 580L de *Bacillus licheniformis*, gentilmente cedida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). As reações enzimáticas foram realizadas em biorreator do tipo frasco agitado à 180 rpm, com 4 % m v^{-1} de substrato e 5 U mL^{-1} de enzima, com 100 mL de volume reacional, em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,2 mol L^{-1}, pH 9,5, a 60 °C (LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016). Alíquotas de 1 mL de hidrolisado foram retiradas nos tempos de reação 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 min para avaliação da atividade antioxidante e da massa molecular dos peptídeos gerados da hidrólise enzimática após inativação térmica da enzima a 85 °C por 5 min. Nos mesmos tempos de reação, 1 mL de hidrolisado proteico foi retirado e adicionado de 9 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6,25 %, deixando-se a suspensão em repouso por 10 min para determinação do grau de hidrólise. Os experimentos foram realizados em duplicata e as análises em triplicata.

2.2.1 Grau de hidrólise

As proteínas solúveis em TCA foram determinadas por método de Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina. O grau de hidrólise foi calculado conforme Hoyle e Merritt (1994) de acordo com a equação (1), em que PS_0 corresponde a proteína solúvel (mg

mL^{-1}) antes da adição da enzima, PS_t corresponde a proteína solúvel no tempo de reação (mg mL^{-1}) e P_{total} é a quantidade de proteína total da amostra (mg mL^{-1}) determinada por micro-Kjeldahl (AOAC, 2000).

$$GH\ (\%) = \frac{(PS_t - PS_0)}{P_{total}} x100 \quad (1)$$

2.2.2 Massa molecular dos peptídeos

Gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) 18 % foi preparado de acordo com protocolo Tricina-SDS-PAGE de Schägger (2006) com modificações de Jiang et al. (2016) para sistema de eletroforese em minigel vertical para determinar a massa molecular aproximada dos polipeptídeos obtidos pela hidrólise. Padrão de polipeptídeos de massa molecular de 1,4 a 26,6 kDa (Bio-Rad) foi diluído (1:20) em tampão de amostra tris-tricina, submetido à 95 °C por 5 min e resfriado previamente à incorporação no gel, de acordo com recomendações do fabricante. A voltagem foi ajustada à 60 V durante o início da corrida até as amostras penetrarem no gel de separação. Em seguida, a voltagem foi ajustada em 140 V até o final da corrida. Os fragmentos de polipeptídeos foram fixados em solução de fixação (ácido acético 10 %; álcool metílico 40 %) por 30 min, e então colocados em solução corante (coomassie blue 0,025 %; ácido acético 10 %) por 1 h. A descoloração do gel foi realizada com ácido acético 10 %.

2.2.3 Atividade antioxidante

2.2.3.1 Capacidade de inibição do radical DPPH

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi avaliada de acordo com método de Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) adaptado por Maadane et al. (2015). As amostras foram preparadas na concentração de 2,5 mg mL^{-1} em água destilada e colocadas durante 15 min em banho ultrassônico. Os extratos foram então centrifugados por 5 min a 660 x *g*. Ao sobrenadante foi adicionado DPPH 0,06 mmol L^{-1} em álcool metílico. Após homogeneização em vórtex, deixou-se a mistura em repouso à temperatura ambiente por 60 min. A atividade antioxidante foi avaliada pela leitura da absorbância (abs) do radical remanescente da reação do DPPH com os extratos das amostras, em espectrofotômetro (Shimadzu, A109348, Japão) a 515 nm, descontada da abs do branco

(amostra e álcool metílico), em relação a abs do controle (água destilada e DPPH), conforme equação (2).

$$\text{Capacidade de inibição do DPPH (\%)} = [1-(abs_{amostra}-abs_{branco}/abs_{controle})]x100 \quad (2)$$

2.2.3.2 Capacidade de inibição do radical ABTS

Os mesmos extratos utilizados para avaliação da inibição do radical DPPH foram utilizados. Os extratos foram adicionados do radical ABTS (2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) em agitador de tubos (vórtex). Após repouso de 6 min, a leitura da abs em espectrofotômetro a 734 nm foi realizada (RE et al., 1999). O cálculo da atividade antioxidante foi realizado de acordo com a equação (3), em que a abs do branco refere-se a leitura da abs da mistura de amostra e álcool etílico e a abs do controle refere-se a mistura de água destilada e solução de ABTS.

$$\text{Capacidade de inibição do ABTS (\%)} = [1-(abs_{amostra}-abs_{branco}/abs_{controle})]x100 \quad (3)$$

2.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os efeitos de tratamento térmico, pH, concentração de NaCl e da digestão gastrointestinal na estabilidade dos hidrolisados proteicos antioxidantes de *Spirulina* foram avaliados. Todas os ensaios foram realizados em duplicata e as análises foram realizadas em triplicata. Para avaliar a estabilidade dos hidrolisados quanto ao tratamento térmico, pH e efeito da concentração salina, a atividade antioxidante foi determinada pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH e captura do radical livre ABTS, como descrito nos itens 2.2.3.1 e 2.2.3.2. Para avaliação do efeito da digestão gastrointestinal na biodisponibilidade dos hidrolisados, a atividade antioxidante foi avaliada pelos mesmos métodos e também pelo método de poder redutor (OYAIZU, 1986).

2.3.1 Efeito do pH

A interação dos hidrolisados proteicos antioxidantes em sistemas alimentícios ácidos, tais como sucos de frutas, foi simulada em pH 4, e em matrizes alimentares de baixa

acidez, como alimentos à base de vegetais e produtos lácteos, foi simulada em pH 6, de acordo com Bernaerts et al. (2017). Os hidrolisados proteicos foram ressuspendidos em tampão pH 4 e pH 6 na concentração de 2,5 mg mL^{-1} e essas suspensões foram mantidas em repouso à temperatura ambiente (25 °C) por 1 h. Amostras sem tratamento foram preparadas com água destilada (JANG; LICEAGA; YOON, 2016).

2.3.2 Efeito da temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura na estabilidade da atividade antioxidante, as suspensões de hidrolisados contendo peptídeos bioativos (2,5 mg mL^{-1}) foram submetidas a diferentes tratamentos a fim de simular condições de processamento e armazenamento de alimentos. Os tratamentos foram realizados à −18, 4 e 25 °C por 24 h para simular condições de armazenamento sob congelamento, refrigeração e em temperatura ambiente, respectivamente. Tratamentos à 63° C por 30 min e 100 °C por 5 min foram realizados para simular condições de pasteurização e cocção, respectivamente. A atividade antioxidante das amostras sem tratamento térmico foi determinada imediatamente após o preparo da suspensão de hidrolisado proteico (JANG; LICEAGA; YOON, 2016).

2.3.3 Efeito da concentração salina

O efeito da presença de cloreto de sódio na estabilidade dos peptídeos foi analisada de acordo com método proposto por Zhu et al., (2014). Suspensões de hidrolisados (2,5 mg mL^{-1}) de *Spirulina* foram adicionadas de 2, 4, 6 e 8 % (m m^{-1}) de NaCl. As soluções foram mantidas a 100 °C por 15 min e resfriadas em banho de gelo para determinação da atividade antioxidante remanescente. Água destilada foi utilizada para realização do ensaio controle positivo (0 % NaCl m m^{-1}).

2.3.4 Efeito da digestão *in vitro*

Esta avaliação foi realizada de acordo com Zhu et al. (2008). Para verificar a digestibilidade dos peptídeos, as suspensões de amostras (3 % m v^{-1}) tiveram o pH ajustado a 2,0 com HCl 1 mol L^{-1}, foram adicionadas de pepsina (4 % m m^{-1} de proteína) e incubadas a 37 °C por 1 h. O pH da suspensão foi então ajustado a 5,3 com $NaHCO_3$ 0,9 mol L^{-1} para adição subsequente de pancreatina (4% m m^{-1} de proteína). Previamente à incubação por 2 h a 37 °C,

o pH foi ajustado a 7,5 com NaOH 1 mol L^{-1}. Após, as amostras foram submetidas a 100 °C por 10 min, para inativação das enzimas, e então centrifugadas a 11000 *g* por 15 min. O mesmo ensaio foi realizado sem a adição das enzimas como controle positivo.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95 % e a diferença de médias foi avaliada por teste de *Tukey*. As médias obtidas nos ensaios de estabilidade às enzimas digestivas foram avaliadas por teste t de *Student*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 HIDRÓLISE E CINÉTICA ENZIMÁTICA

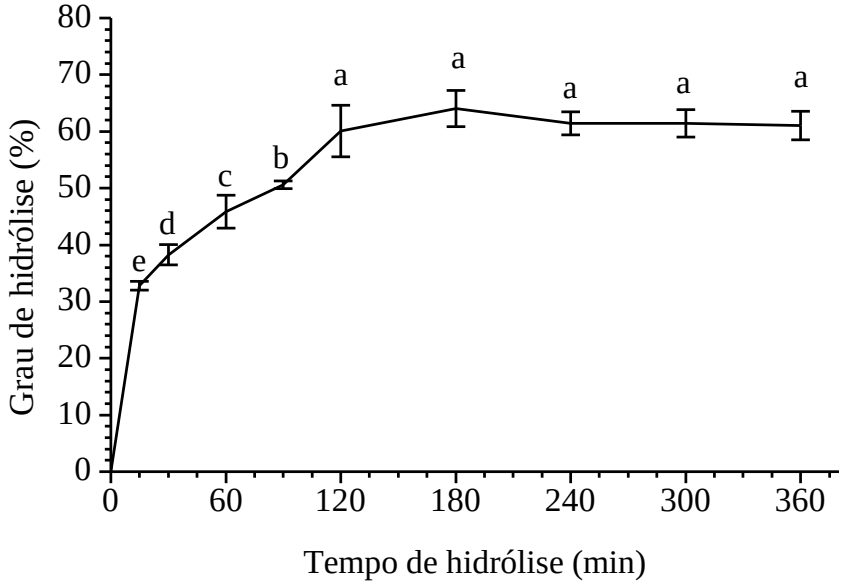
O grau de hidrólise (GH) é um parâmetro importante para a obtenção de peptídeos bioativos, que geralmente são obtidos em GH superiores a 50 % (KRISTINSSON; RASCO, 2000). Entretanto, Adjonu et al. (2013) obtiveram peptídeos bioativos em GH inferiores a esse valor (11,8 a 14,1 %), gerados da hidrólise de proteínas de soro de leite, com diferentes enzimas. Diante disso, os hidrolisados proteicos obtidos no presente estudo, em todos os tempos de reação, possuem potencial para obtenção de peptídeos bioativos, uma vez que GH variou de 32,8 % a aproximadamente 61,0 %, permanecendo constante a partir de 120 min de reação (Figura 1).

Os hidrolisados proteicos com maior capacidade de inibir o radical DPPH foram obtidos em 90 min. Quanto a inibição do radical ABTS, os hidrolisados proteicos com maior atividade antioxidante foram obtidos entre 90 e 360 min (Tabela 1). Esses resultados indicam que peptídeos antioxidantes foram produzidos durante a hidrólise. Observa-se que a maior atividade antioxidante foi verificada anteriormente a obtenção do maior grau de hidrólise e para ambos os métodos foi obtida em 90 min de reação, apesar dos métodos apresentarem mecanismos diferentes.

A habilidade de sequestrar o radical livre DPPH decresceu após 90 min de reação (Tabela 1). Tempos de hidrólise excessivos podem ter causado efeito reverso na bioatividade ao alterar estruturas específicas das cadeias laterais de aminoácidos capazes de doar hidrogênio

que cessam as reações em cadeia de inibição do radical, resultando em estruturas que não possuem a habilidade de sequestrá-lo (KETNAWA et al., 2017; YOU et al., 2010).

Figura 1 - Cinética da hidrólise enzimática de proteínas de *Spirulina* sp. LEB 18.



Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p>0,05).

A capacidade de inibir o radical ABTS aumentou do tempo 0 até 90 min de reação. Ao final da hidrólise, a atividade antioxidante não apresentou diferença significativa em relação a máxima atividade atingida (Tabela 1). Nos estudos de You et al. (2010) a hidrólise enzimática de proteínas de pescado gerou peptídeos hidrofílicos mais propensos a aprisionar o radical ABTS que é solúvel em água. O aumento da capacidade de inibir ABTS a partir de 90 min em relação ao início da hidrólise enzimática das proteínas de *Spirulina* sp. LEB 18 pode ser decorrente da geração de peptídeos hidrofílicos durante a hidrólise.

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 não hidrolisada (tempo 0 min de reação) apresentou proteínas com massa molecular entre 6,5 e 14,4 kDa, 17 kDa e acima de 26,6 kDa (Figura 2). Fragmentos com aproximadamente 250, 50 e 37 kDa foram observados em gel de poliacrilamida tris-glicina para esta microalga nos estudos de Pereira, Lisboa e Costa (2018). A partir de 15 min de reação, fragmentos de 17 kDa não foram observados, o que indica a quebra em fragmentos menores devido à ação da enzima. Fragmentos entre 3,5 e 1,5 kDa ficaram mais evidentes a partir de 120 min de reação.

Levando em consideração que a maior atividade antioxidante foi obtida em 90 min de reação e o maior GH foi obtido em 120 min, reações de hidrólise de 90 e 120 min foram

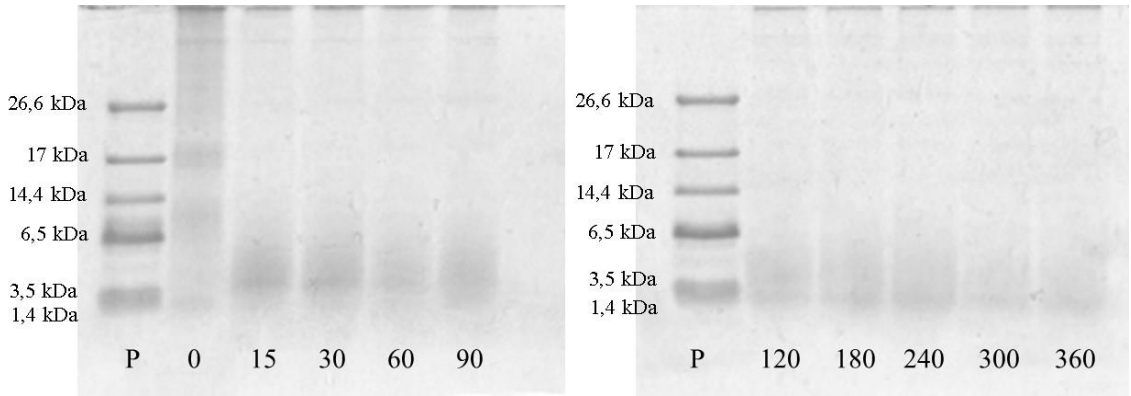
realizadas para dar continuidade ao estudo de estabilidade, e os hidrolisados obtidos foram denominados de H90 e H120, respectivamente.

Tabela 1 – Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 em diferentes tempos de reação.

Tempo de hidrólise (min)	Inibição do DPPH (%)	Inibição do ABTS (%)
0	$11,6^{d} \pm 0,8$	$16,9^{e} \pm 1,4$
15	$13,5^{bcd} \pm 2,3$	$33,8^{d} \pm 1,6$
30	$14,2^{bcd} \pm 0,9$	$35,7^{cd} \pm 1,8$
60	$14,7^{bc} \pm 0,4$	$37,4^{bcd} \pm 2,0$
90	$18,3^{a} \pm 0,5$	$42,2^{a} \pm 1,9$
120	$15,1^{bc} \pm 0,9$	$36,0^{cd} \pm 1,3$
180	$14,9^{bc} \pm 0,9$	$40,0^{abc} \pm 2,2$
240	$15,9^{b} \pm 0,5$	$37,2^{abcd} \pm 2,5$
300	$13,2^{bcd} \pm 0,7$	$41,5^{ab} \pm 2,7$
360	$12,7^{cd} \pm 1,8$	$41,7^{ab} \pm 2,9$

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p>0,05) de acordo com teste de Tukey.

Figura 2 - Perfil eletroforético dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 obtidos da cinética enzimática.



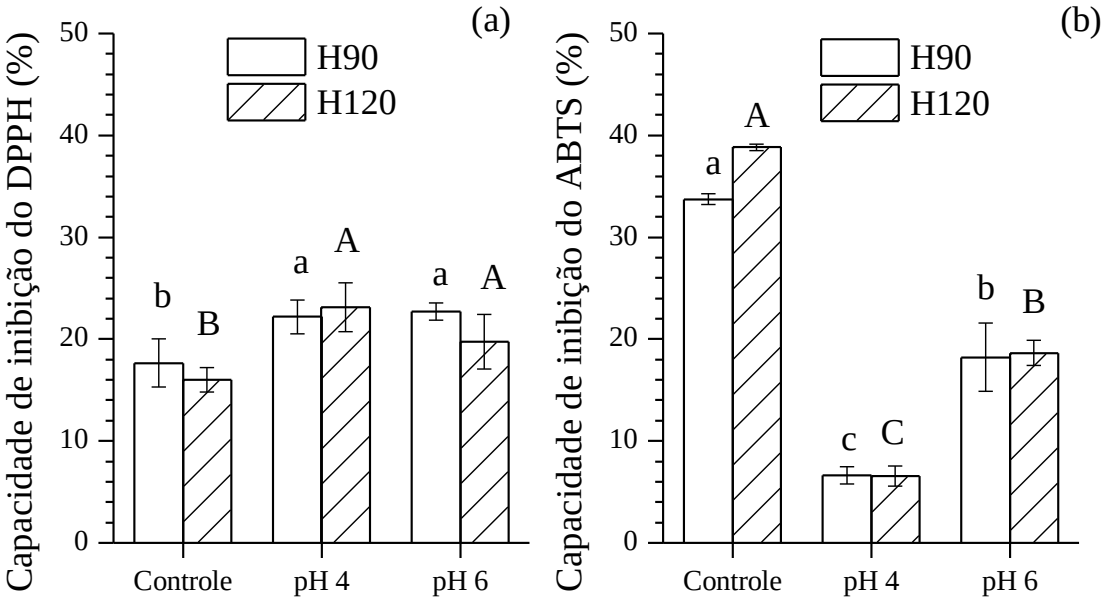
(P=padrão de proteínas; 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 = tempo de hidrólise em min).

3.2 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.2.1 Efeito do pH na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18

Comportamentos opostos foram observados quanto a ação do pH na atividade antioxidante avaliada pelos métodos de DPPH e ABTS (Figura 3). Os hidrolisados sem tratamento apresentaram menor atividade frente ao radical DPPH e maior atividade antioxidante frente ao radical ABTS em relação aos hidrolisados submetidos a pH 4 e pH 6. Os resultados mostram que o pH ácido influenciou ambos os mecanismos de ação antioxidante.

Figura 3 - Estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 frente ao pH.



Letras iguais minúsculas indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para a amostra H90; letras iguais maiúsculas indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para a amostra H120.

Houve aumento de aproximadamente 28 % da capacidade de inibir o radical DPPH para o H90 em pH 6 e de aproximadamente 26 % para o H120 em pH 4, em comparação às amostras controle, que foram capazes de inibir o radical em 17,7 ± 2,4 e 16,0 ± 1,2 %, respectivamente (Figura 3a). Os meios ácido e de baixa acidez podem ter influenciado a disponibilização de hidroxilas das moléculas de peptídeos, facilitando a doação de átomos de hidrogênio, reduzindo a molécula estável do radical DPPH à hidrazina. Segundo Brand-Williams, Uvelier e Berset (1995), a capacidade de sequestrar o radical DPPH depende da conformação estrutural da molécula antioxidante e do número de hidroxilas disponíveis.

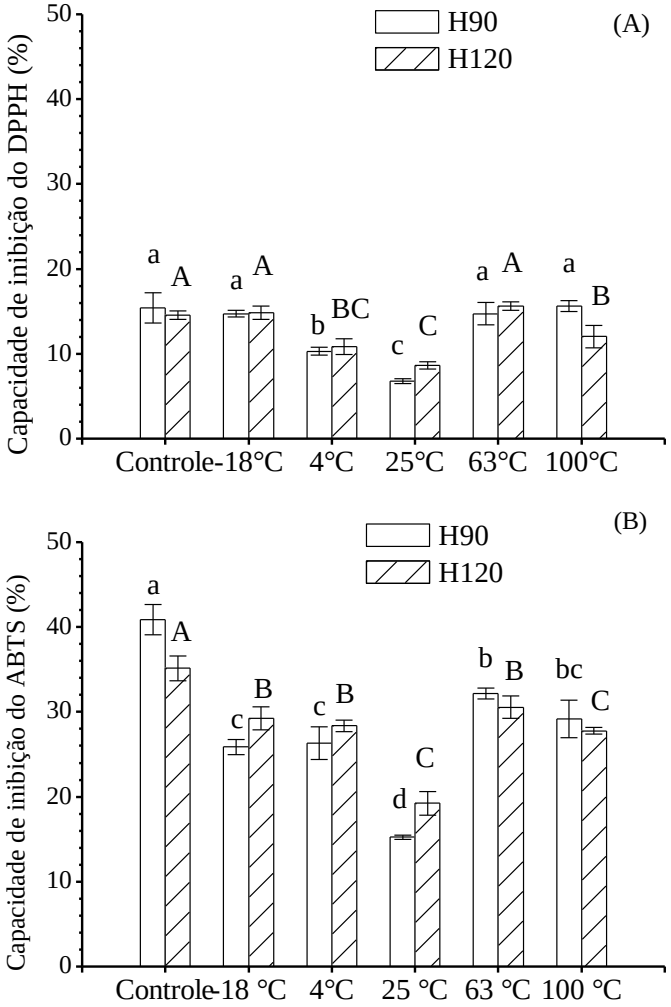
A capacidade de inibir o radical ABTS foi menor em pH 4 do que em pH 6 (6,6 e 18,2 % para H90, respectivamente, e 6,5 e 18,6 % para H120) (Figura 3b). A diminuição do pH pode ter tornado as moléculas menos solúveis, dificultando a reação entre os peptídeos e o

radical. O pH em que as proteínas da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 são menos solúveis (ponto isoelétrico) corresponde a 4,2 (PEREIRA; LISBOA; COSTA, 2018).

3.2.2 Efeito da temperatura na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18

As temperaturas em que os hidrolisados foram submetidos foram escolhidas baseadas em tratamentos relevantes à indústria de alimentos para conservação e armazenamento de alimentos. Em temperatura ambiente, os hidrolisados apresentaram menor atividade antioxidante para ambos os métodos avaliados e ambos os tempos de hidrólise (Figura 4).

Figura 4 - Estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 frente ao tratamento térmico.



Letras iguais minúsculas indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para a amostra H90; letras iguais maiúsculas indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para a amostra H120.

A inibição do radical DPPH não apresentou diferença significativa à temperatura de congelamento (−18 °C), pasteurização (63 °C) e cocção (100 °C), para os hidrolisados obtidos em 90 min de reação (Figura 4a). Isso pode indicar que os peptídeos de *Spirulina* sp. LEB 18 podem ser armazenados sob congelamento sem que ocorram perdas da atividade antioxidante. Além disso, alimentos que necessitem de tratamento térmico podem ser adicionados desses compostos para obtenção de produtos funcionais, uma vez que o aumento da temperatura não influenciou a capacidade de doação de íons hidrogênio para estabilização do radical DPPH.

O hidrolisado H120 apresentou-se estável quanto à inibição do radical DPPH apenas em temperatura de congelamento e pasteurização (Figura 4a). Os peptídeos gerados da hidrólise em 120 min de reação podem ter sido degradados em elevada temperatura, resultando em menor capacidade de inibição à 100 °C do que à 63 °C.

A capacidade de sequestrar o radical ABTS foi afetada pelo tratamento térmico, uma vez que a atividade antioxidante das amostras que tiveram tratamento térmico diferiu estatisticamente das amostras controle. Para ambos os hidrolisados H90 e H120, a atividade antioxidante foi maior para as amostras sem tratamento (Figura 4b). Entre os tratamentos avaliados, as temperaturas de refrigeração, congelamento e pasteurização foram as que menos afetaram a atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos em 120 min.

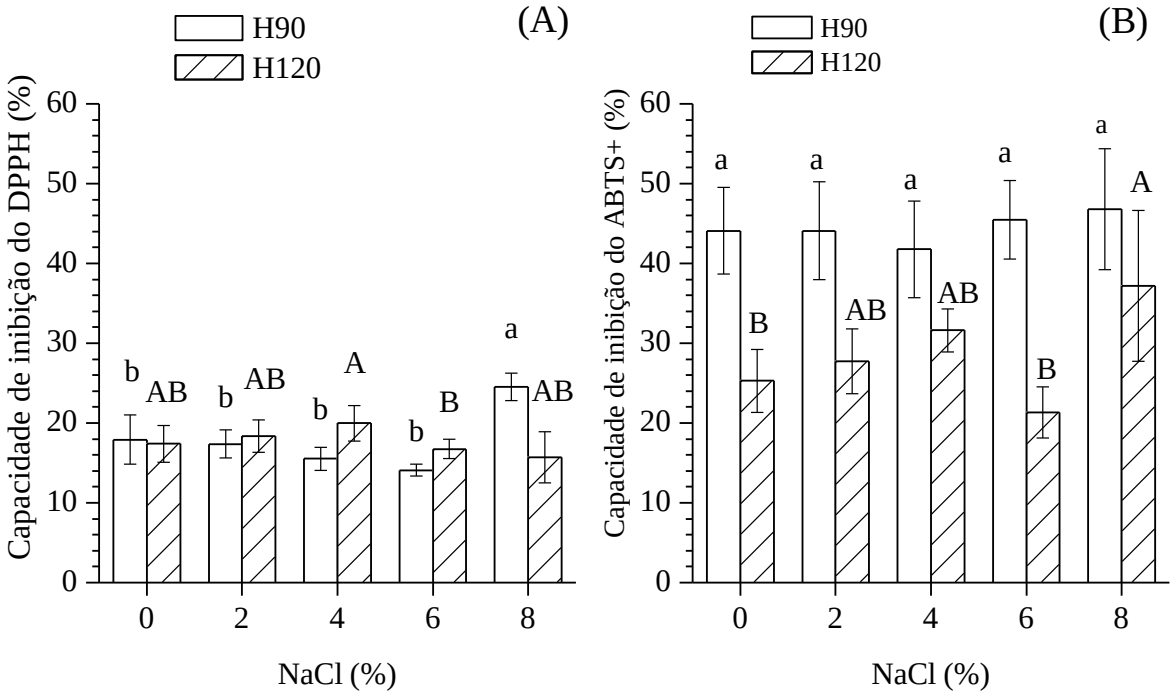
A estrutura das proteínas é um dos principais fatores que influenciam a atividade antioxidante (ZHU et al., 2014). Peptídeos não formam estrutura terciária ou quaternária devido à baixa massa molecular e cadeias curtas de aminoácidos, porém podem formar estruturas secundárias. Temperaturas altas, como a de cocção, podem ter afetado a estrutura secundária dos peptídeos, o que pode ter sido responsável pela diminuição da atividade antioxidante frente ao ABTS nessas condições. Asaduzzaman e Chun (2015) justificaram a perda da capacidade de sequestro do radical ABTS pela agregação de peptídeos antioxidantes, causado pelo tempo de exposição à alta temperatura.

Embora o armazenamento à temperatura ambiente e a cocção tenham diminuído majoritariamente a capacidade de inibir o radical ABTS do hidrolisado H120, ainda assim 55 e 79 % da atividade antioxidante foi mantida, respectivamente. Para o hidrolisado H90, 71 % da atividade antioxidante foi mantida mesmo em elevada temperatura (Figura 4b).

3.2.3 Efeito da concentração salina na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18

A atividade antioxidante em diferentes concentrações de NaCl foi avaliada a fim de verificar se a salinidade de matrizes alimentícias pode interferir na estabilidade da atividade biológica dos peptídeos. Para os peptídeos obtidos de H90, não houve diferença significativa para capacidade de inibir o radical DPPH entre as amostras controle (17,9 ± 3,1 %) e com incremento da concentração de NaCl até 6 % (m m^{-1}) (14,1 ± 0,7 %). Em suspensão com 8 % (m m^{-1}) de NaCl houve aumento de aproximadamente 37 % da atividade antioxidante inibidora do radical DPPH (24,5 ± 1,7 %) (Figura 5a). O aumento da concentração de NaCl pode ter facilitado a exposição de grupos funcionais que são capazes de liberar íons hidrogênio, resultando em aumento da captura do radical DPPH. O mesmo pode ser explicado para os peptídeos gerados de H120 quanto à inibição do ABTS, porém facilitando a doação de elétrons para estabilização do radical (Figura 5b).

Figura 5 - Estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 frente a concentração de cloreto de sódio.



Letras iguais minúsculas indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para a amostra H90; letras iguais maiúsculas indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para a amostra H120.

Os peptídeos gerados de H90 mantiveram a capacidade de inibir o radical ABTS constante (aproximadamente 45 %) em todas as concentrações de NaCl testadas. Os resultados obtidos indicam que a interação entre os peptídeos e matrizes alimentícias constituídas de NaCl é promissora quanto à manutenção da atividade antioxidante. Além disso, a estabilidade da

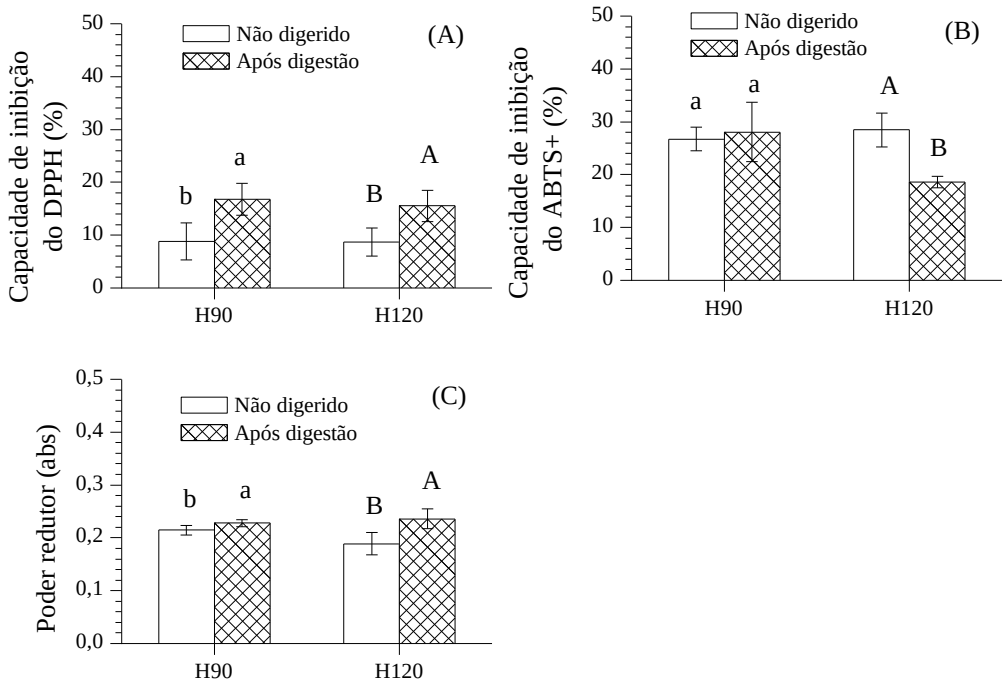
atividade antioxidante difere entre as amostras H90 e H120 dependendo das condições aplicadas, o que indica que o estudo cinético da hidrólise enzimática é importante a fim de escolher as condições em que os peptídeos são mais estáveis para a aplicação desejada.

3.2.4 Efeito da digestão *in vitro* na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18

Um dos grandes desafios da incorporação de peptídeos bioativos em alimentos é a biodisponibilidade destes após a administração oral. As condições gastrointestinais, como pH estomacal e enzimas digestivas podem influenciar a estrutura e a bioatividade dos peptídeos (SEGURA-CAMPOS et al., 2011). Houve incremento significativo ($p<0,05$) da atividade antioxidante (DPPH e poder redutor) dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18, em ambos os tempos de reação, após a digestão com pepsina e pancreatina (Figura 6a e Figura 6c). De acordo com Sontakke et al. (2016) e Vermeirssen, Camp e Verstraete (2004), peptídeos que contém prolina em sua composição são geralmente mais resistentes à degradação por enzimas digestivas, são melhores absorvidos e atingem concentrações plasmáticas elevadas após administração oral. Isso pode indicar que peptídeos obtidos neste estudo apresentam prolina em sua composição de aminoácidos, o que pode ter gerado aumento da atividade biológica após digestão.

Diferente comportamento foi observado quanto à inibição do radical ABTS, em que para H90 não houve perda ou incremento da atividade antioxidante, que se manteve em torno de 27 %, e para o H120 houve diminuição da atividade antioxidante após a ação das enzimas (de 28,4 ± 3,2 % para 18,6 ± 1,1 %). A perda de resíduos de aminoácidos como resultado da proteólise no trato gastrointestinal pode levar à redução, aumento ou perda completa de atividade biológica (GARCÍA-MORA et al., 2017). A hidrólise extensiva das proteínas em 120 min de reação, embora tenha atingido maior grau de hidrólise que em 90 min (Figura 1), pode ter gerado peptídeos que se apresentaram menos resistentes à proteólise gastrointestinal, ocorrendo diminuição da capacidade de inibir o radical ABTS. Apesar da diminuição da capacidade de inibir o radical para a amostra H120, aproximadamente 65 % da atividade antioxidante foi mantida após a digestão simulada. A bioatividade do hidrolisado proteico H90 apresentou-se estável frente ao radical ABTS antes e após a ação das enzimas digestivas.

Figura 6 - Estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 frente à ação de enzimas digestivas.



Letras iguais minúsculas indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para a amostra H90 (teste t de *Student*); letras iguais maiúsculas indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para a amostra H120 (teste t de *Student*).

4 CONCLUSÃO

Os hidrolisados proteicos contendo peptídeos antioxidantes de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentaram estabilidade na maioria das condições de processamento e armazenamento de alimentos avaliadas. Peptídeos com atividade antioxidante obtidos em 90 min da reação enzimática (H90) podem ser incorporados em sistemas alimentícios que necessitam de tratamento térmico e podem ser armazenados sob temperatura de congelamento sem prejuízos na atividade antioxidante. A simulação em matrizes alimentícias ácidas ou de baixa acidez foi favorável quanto ao mecanismo de inibição do radical DPPH. A atividade antioxidante do hidrolisado H90 não foi prejudicada pela ação das enzimas digestivas, porém o H120 apresentou menor capacidade de inibir o ABTS após a ação das enzimas. Portanto, a incorporação de peptídeos gerados da hidrólise de proteínas de fontes microalgais, como deste estudo, especialmente os obtidos em 90 min de reação é promissora para a aplicação em alimentos.

5 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P.; AGBOOLA, S. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3–4, p. 1435–1443, 2013.

AOAC. **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists international**. 17. ed. Washington: D. C., 2000.

ASADUZZAMAN, A. K. M.; CHUN, B. S. Recovery of functional materials with thermally stable antioxidative properties in squid muscle hydrolyzates by subcritical water. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 793–802, 2015.

BELAY, A.; HOUSTON, M. The potential application of *Spirulina* (*Arthospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27–48, 2002.

BERNAERTS, T. M. M; PANOZZO, A.; DOUMEN, V.; FOUBERT, I.; GHEYSEN, L.; GOIRIS, K.; MOLDENAERDS, P.; HENDRICKX, M. E.; LOEY, A. M. V. Microalgal biomass as a (multi) functional ingredient in food products: rheological properties of microalgal suspensions as affected by mechanical and thermal processing. **Algal research**, v. 25, p. 452-463, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CHRONAKIS, I. S.; MADSEN, M. Algal proteins. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). Handbook of Food Protein. [s.l.] **Woodhead Publishing Series in Food Sciences, Technology and Nutrition**, 2011. p. 353–394.

EUSSEN, S. R. B. M.; VERHAGEN, H.; KLUNGEL, O. H.; GARSSEN, J.; VAN LOVEREN, H.; VAN KRANEN, H. J.; ROMPELBERG, C. J. M. Functional foods and dietary supplements: Products at the interface between pharma and nutrition. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 52–59, 2011.

FARVIN, K. H. S.; ANDERSEN, L. L.; OTTE, J.; NIELSEN, H. H.; JESSEN, F.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates:

Fractionation and characterisation of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 204, p. 409–419, 2016.

GARCÍA-MORA, P.; MARTÍN-MARTÍNEZ, M.; ANGELES BONACHE, M.; GONZÁLEZ-MÚNIZ, R.; PEÑAS, E.; FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C. Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 221, p. 464–472, 2017.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. D. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 543–597, 2011.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 76–79, 1994.

JANG, H. L.; LICEAGA, A. M.; YOON, K. Y. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 433–442, 2016.

JI, N.; SUN, C.; ZHAO, Y.; XIONG, L.; SUN, Q. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 161, n. 10, p. 148–154, 2014.

JIANG, S.; LIU, S.; ZHAO, C.; WU, C. Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDa with Minigel Electrophoresis System. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 11, p. 640–649, 2016.

KETNAWA, S.; BENJAKUL, S.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; RAWDKUEN, S. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. **Food Chemistry**, v. 215, p. 383–390, 2017.

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, n. 7, p. 2294–2302, 2012.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 131–139, 2000.

LI-CHAN, E. C. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 28–37, 2015.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; COSTA, J. A. V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 3, p. 79–86, 2016.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P.; COSTA, J. A. V. Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 5, p. 29–38, 2014.

LIU, J.; JIN, Y.; LIN, S.; JONES, G. S.; CHEN, F. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 175, p. 258–266, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSEROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.

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, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. D. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthospira* strain. **Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1–2, p. 144–150, 2008.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

PAN, H.; SHE, X.; WU, H.; MA, J.; REN, D.; LU, J. Long-term regulation of the local renin-angiotensin system in the myocardium of spontaneously hypertensive rats by feeding bioactive peptides derived from *Spirulina platensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7765–7774, 2015.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties**. Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 47, p. 187–194, 2018.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

SCHÄGGER, H. Tricine–SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D.; HERNANDEZ-ESCALANTE, V. M. Bioavailability of bioactive peptides. **Food Reviews International**, v. 27, n. 3, p. 213–226, 2011.

SHAZLY, A. B.; HE, Z.; EL-AZIZ, M. A.; ZENG, M.; ZHANG, S.; QIN, F.; CHEN, J. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 232, p. 753–762, 2017.

SHEIH, I. C.; FANG, T. J.; WU, T. K.; LIN, P. H. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1202–1207, 2010.

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, n. 13, p. 3419–3425, 2009.

SONTAKKE, S. B.; JUNG, J. H.; PIAO, Z.; CHUNG, H. J. Orally Available Collagen Tripeptide: Enzymatic Stability, Intestinal Permeability, and Absorption of Gly-Pro-Hyp and Pro-Hyp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 38, p. 7127–7133, 2016.

VERMEIRSSEN, V.; CAMP, J. VAN; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 357, 2004.

VO, T. S.; KIM, S. K. Down-regulation of histamine-induced endothelial cell activation as potential anti-atherosclerotic activity of peptides from *Spirulina maxima*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 2, p. 198–207, 2013.

WANG, X. J.; ZHENG, X. Q.; KOPPARAPU, N. K.; CONG, W. S.; DENG, Y. P.; SUN, X. J.; LIU, X. L. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate. **Process Biochemistry**, 2014.

WU, R. B.; WU, C. L.; LIU, D.; YANG, X. H.; HUANG, J. F.; ZHANG, J.; LIAO, B.; HE, H. L. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. **Food Chemistry**, v. 248, p. 346–352, 2018.

YAN, Q.-J.; HUANG, L.-H.; SUN, Q.; JIANG, Z.-Q.; WU, X. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. **Food chemistry**, v. 179, p. 290–5, 2015.

YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, J. M.; REN, J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 810–816, 2010.

ZARROUK, C. **Contribuition à I étude d une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina máxima***. Paris: Université Des Paris, 1966.

ZHU, C. Z.; ZHANG, W. G.; KANG, Z. L.; ZHOU, G. H.; XU, X. L. Stability of an antioxidant peptide extracted from **Jinhua ham**. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 783–789, 2014.

ZHU, L.; JIE, C.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 2008.

ARTIGO 2

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE *Spirulina* ENCAPSULADOS POR *SPRAY DRYING* E *NANOSPRAY DRYING*

RESUMO

Neste estudo, hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18, obtidos em 90 (H90) e 120 min de reação (H120) foram encapsulados com gelatina como material de parede por atomização em *spray dryer* e *nanospray dryer* a fim de preservar a atividade antioxidante desses. O processo de encapsulamento foi capaz de aumentar a atividade antioxidante de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de ambos hidrolisados estudados. O processo de encapsulamento em *nanospray dryer* apresentou maior rendimento para ambos os hidrolisados (82,8 e 78,0 %, respectivamente) do que em *spray dryer* (55,6 e 54,3 %, respectivamente). A maior eficiência de encapsulamento foi obtida para H120 (87,3 ± 1,2 %) nanoencapsulado, bem como menor tamanho de partícula (1,17 µm). As análises termogravimétricas e de calorimetria exploratória diferencial indicaram que o encapsulamento dos hidrolisados proteicos aumentou a termoestabilidade destes. O encapsulamento em *spray dryer* e *nanospray dryer* de hidrolisados proteicos de *Spirulina* é promissor para a indústria de alimentos funcionais, uma vez que foi possível aumentar a inibição do radical DPPH bem como torná-los termicamente estáveis.

Palavras-chave: Alimentos funcionais; microalgas; secagem por atomização.

1 INTRODUÇÃO

O interesse por alimentos funcionais tem aumentado nos últimos anos. A alimentação não está apenas voltada para manutenção da vida, fornecimento de energia ou promoção do crescimento, mas também para prevenir doenças e melhorar a saúde física e mental (YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018). Compostos bioativos podem ser adicionados em alimentos a fim de torná-los alimentos funcionais. Fibras dietéticas (CHU et al., 2019), oligossacarídeos (RAYO-MENDEZ; GÓMEZ; TADINI, 2019), aminoácidos (WANG et al., 2019), peptídeos (REZVANI et al., 2019), proteínas (LIU et al., 2019), glicosídeos (SOARES et al., 2019), vitaminas (JAFARI; VAKILI; DEHNAD, 2019) e ácidos graxos poli-insaturados (NIEUWENHOVE et al., 2019) são exemplos de compostos bioativos que vêm sendo estudados com esse propósito.

Hidrolisados proteicos consistem em uma mistura de aminoácidos livres e peptídeos que são obtidos pela quebra das ligações peptídicas de uma proteína (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Muitos estudos abordam a utilização de hidrolisados proteicos em alimentos por conferirem atividade antioxidante (GARCÍA et al., 2019). A incorporação de compostos antioxidantes em alimentos para desenvolver alimentos funcionais se torna importante pois esses são capazes de diminuir e/ou inibir doenças cardíacas, câncer e outras doenças crônicas causadas pelo estresse oxidativo (WILLCOX; ASH; CATIGNANI, 2004).

Microalgas são micro-organismos, que produzem compostos antioxidantes como ficocianina, ácidos graxos poli-insaturados (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015), e proteínas que quando hidrolisadas geram peptídeos antioxidantes (LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016), entre outros. A utilização de proteínas de fontes microalgais para obtenção de hidrolisados proteicos como alternativa ao uso de fontes de origem vegetal ou animal é um processo sustentável pois microalgas são micro-organismos autotróficos que não competem com solos destinados à produção de alimentos, apresentam altas taxas de crescimento celular, com requerimentos de baixo custo (CHRONAKIS; MADSEN, 2011).

Ao aplicar peptídeos bioativos em produtos alimentícios, sua bioatividade pode ser afetada pelo processamento, incluindo mudança de pH, tratamento térmico, interações com outros componentes da matriz alimentícia, alta pressão e processos de separação por membrana (KETNAWA et al., 2017). A encapsulação é uma solução tecnológica para otimizar a preservação de ingredientes ativos durante seu processamento e armazenamento (YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018). A encapsulação é um processo que visa revestir

substâncias (composto ativo) dentro de uma ou mais classes de materiais de parede para produzir partículas em escala micrométrica (microencapsulação), nanométrica (naoencapsulação) ou milimétrica (LAKKIS, 2007). Entre as técnicas existentes de encapsulação, a secagem por atomização é a mais usualmente utilizada na indústria de alimentos (NEDOVIC et al., 2011).

O encapsulamento por atomização consiste na dispersão em uma solução de um polímero carreador, que é atomizada em pequenas gotas, o solvente é evaporado utilizando um fluido de aquecimento e as partículas sólidas resultantes são recolhidas como um pó seco (FANG; BHANDARI, 2012). A fim de obter alto rendimento em produto com elevada eficiência de encapsulação, e partículas de menor tamanho, a secagem por atomização pode ser realizada em *nanospray dryer*, um equipamento em que gotículas são produzidas por um atuador piezoelétrico, a secagem é realizada em fluxo laminar, e as nanopartículas são coletadas em um coletor eletrostático (ARPAGAUS et al., 2017).

A escolha do material de revestimento para o processo de encapsulamento é muito importante. Os materiais de parede utilizados para encapsulação devem ser de fontes naturais, biodegradáveis e seguros para aplicação em alimentos (KWAK, 2014). Polímeros de carboidratos e proteínas podem ser utilizados como material de parede para encapsular hidrolisados proteicos por técnicas de secagem por atomização (MOHAN et al., 2015). Entre esses, biopolímeros que formam hidrogeis destacam-se pois podem ser processados em soluções aquosas, evitando a ruptura das micropartículas nessas condições (GÓMEZ-MASCARAQUE; LAGARÓN; LÓPEZ-RUBIO, 2015).

A gelatina é um polímero biodegradável capaz de formar hidrogel, obtido de fontes naturais, comercialmente disponível a baixo custo, que pode ser utilizado em alimentos (SCHRIEBER; GAREIS, 2007) e que vem sendo empregado para aumentar a estabilidade de substâncias ativas (RAJABI et al., 2015). Diante disso, o objetivo do trabalho foi encapsular hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 com gelatina por *spray drying* e *nanospray drying* a fim de preservar sua atividade antioxidante e avaliar suas propriedades físico-químicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Enzima Protemax 580L de *Bacillus licheniformis* foi gentilmente cedida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). Gelatina alimentícia de origem bovina tipo B (240 bloom) foi

gentilmente cedida pela empresa Gelita (São Paulo, SP, Brasil) e utilizada como material de parede para o encapsulamento dos hidrolisados proteicos mediante secagem por atomização em *spray dryer* e *nanospray dryer*.

2.2.OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS

Os hidrolisados proteicos para realização deste estudo foram obtidos de biomassa microalgal de *Spirulina* sp. LEB 18, obtida e caracterizada como descrito por Pereira, Lisboa e Costa (2018). As proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram hidrolisadas com a enzima Protemax 580L de *Bacillus licheniformis*. As reações enzimáticas foram realizadas em reator do tipo frasco agitado, com 4 % (m v^{-1}) de substrato e 5 U mL^{-1} de enzima, com 100 mL de volume reacional. Os tempos de reação de 90 (H90) e 120 min (H120) foram determinados de acordo com estudo cinético realizado por Pereira et al. (2019), em que o maior grau de hidrólise foi obtido em 120 min de reação e maior atividade antioxidante foi obtida em 90 min de reação. Ao final de cada reação, a enzima foi inativada termicamente à 85 °C por 10 min e os hidrolisados proteicos foram ultracongelados à −80 °C (Indrel, IULT 90-D, Brasil) e liofilizados durante 48 h (Liotop, L108, Brasil).

2.3. ENCAPSULAMENTO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

Para o encapsulamento dos hidrolisados proteicos, soluções foram preparadas com 1 % (m v^{-1}) de sólidos totais em ácido acético 2 % (v v^{-1}). A proporção de composto ativo foi 30 % (m m^{-1}) em relação aos sólidos totais. Soluções contendo apenas os hidrolisados proteicos H90 e H120 foram atomizadas para posterior análise térmica e morfológica.

2.3.1. *Spray drying*

O encapsulamento dos hidrolisados com gelatina em *spray dryer* (Labmaq, MSD 0.5, Brasil) foi realizado de acordo com Rocha et al. (2009), com modificações. A solução preparada de acordo com o item 2.3 foi alimentada no equipamento à vazão de 0,15 L h^{-1} e passou por bico atomizador de 0,7 mm de diâmetro. O menor diâmetro do bico atomizador disponível foi escolhido para formar menores gotículas. A temperatura do ar na saída foi 110 °C, a vazão do ar comprimido foi 40 L min^{-1} e a vazão do ar de secagem foi 1,65 m^3 min^{-1}.

2.3.2. *Nanospray drying*

Os hidrolisados proteicos foram encapsulados por atomização, em *nanospray dryer* (Büchi, B-90, Suíça) com gelatina de acordo com Gómez-Mascaraque et al. (2016), com modificações. A solução foi preparada como descrito na seção 2.3. O diâmetro dos poros da membrana em que a solução foi atomizada através de atuador piezoelétrico foi 7 µm. A temperatura de ar de secagem foi 110 °C na entrada, mantendo-se em 40 ± 2 °C na saída. A pressão de operação foi mantida em 30 mBar, com vazão de ar de secagem de 0,0025 m^3 min^{-1}, e as partículas depositadas no cilindro coletor, devido à voltagem aplicada de 15 kV, foram coletadas.

2.4. RENDIMENTO

O rendimento da obtenção das partículas foi determinado de acordo com a Equação (1), em que $m_{inicial}$ corresponde à massa de sólidos (g) antes da secagem e m_{final} corresponde à massa (g) obtida após secagem.

$$R(\%)=\frac{m_{final}}{m_{inicial}}x100 \quad (1)$$

2.5. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Suspensões de hidrolisados proteicos encapsulados a 10 mg mL^{-1} foram preparadas com água destilada, centrifugadas (660 x *g* por 10 min) e o conteúdo de proteína solúvel livre (CPL) no sobrenadante foi determinado pelo método proposto por Lowry et al. (1951). O teor de proteínas solúveis determinado em solução contendo apenas o material de parede foi descontado do CPL das amostras encapsuladas a fim de evitar que as proteínas de gelatina, que porventura tenham sido solubilizadas, tenham sido quantificadas como hidrolisado proteico não encapsulado. A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a Equação (2), em que CTP significa conteúdo de proteína total do sobrenadante obtido apenas com os hidrolisados proteicos sem encapsulamento de acordo com Rao et al. (2016).

$$EE(\%)=\frac{(CTP-CPL)}{CTP}x100 \quad (2)$$

2.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Soluções de hidrolisados proteicos (2,5 mg mL^{-1}) e hidrolisados proteicos encapsulados (10 mg mL^{-1}) foram preparadas para determinação da atividade antioxidante. Para facilitar a dissolução da gelatina e subsequente liberação dos hidrolisados das cápsulas utilizou-se ácido acético 20 % (v v^{-1}) para dissolver as amostras de hidrolisados encapsulados, de acordo com Gómez-Mascaraque; Lagarón; López-Rubio (2015). As suspensões foram homogeneizadas por 5 min em agitador vórtex, centrifugadas (660 x *g* por 15 min), e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade antioxidante pelos métodos de capacidade de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) adaptado por Maadane et al. (2015) e inibição do radical ABTS (2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) de acordo com Re et al. (1999). A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a Equação (3).

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = [1-(abs_{amostra}-abs_{branco}/abs_{controle})]x100 \quad (3)$$

2.7.CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

2.7.1. Potencial zeta

O potencial zeta dos hidrolisados proteicos encapsulados foi determinado em Nanozetasizer (Malvern Instruments, Zen 3690, Reino Unido). Suspensões de partículas foram preparadas em água milli-Q a 0,001 % (m v^{-1}) e foram submetidas à banho ultrassônico por 15 min previamente à análise.

2.7.2. Análise termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica (TGA) foi realizada em analisador termogravimétrico (TGA-50, Shimadzu, Japão). As amostras (aproximadamente 10 mg) foram aquecidas de 25 a 550 °C à taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} em atmosfera de nitrogênio a fluxo constante de 50 mL min^{-1}. A derivada primeira das curvas de TGA foi realizada para observar a perda de massa em função da temperatura (dm dT^{-1}), obtendo-se a DTG (termogravimetria derivada).

2.7.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas para avaliar o comportamento térmico das amostras de acordo com Webber et al. (2018). Aproximadamente 3 mg das amostras de gelatina, hidrolisados proteicos e hidrolisados proteicos encapsulados foram aquecidas de 25 a 210 °C à taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1}, sob atmosfera de nitrogênio, a fluxo constante de 50 mL min^{-1}, em calorímetro exploratório diferencial (DSC-60, Shimadzu, Japão). As temperaturas de transição e entalpias de fusão foram determinadas a partir das curvas de DSC utilizando software TA-60 (Thermal Analysis Instruments TA-60, MD, EUA).

2.7.4. Morfologia e distribuição de tamanho

A morfologia das partículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em *stubs* e recobertas com ouro sob vácuo. Microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM- 6610LV, EUA) foi operado sob energia de elétrons incidente de 15 kV para obtenção das imagens. O diâmetro das partículas foi mensurado através do software ImageJ. A distribuição de tamanho foi obtida com o mínimo de 200 medidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ENCAPSULAMENTO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

O método de encapsulamento influenciou o rendimento das partículas obtidas. Em *spray dryer* o rendimento foi aproximadamente 50 %, enquanto em *nanospray dryer* foi 80 %. O contato entre as gotas atomizadas e ar quente, com subsequente secagem, é dada em uma câmara cilíndrica de configuração vertical em *nanospray dryer*. A configuração vertical direciona as partículas diretamente ao coletor localizado na base da câmara, minimizando a perda das partículas na parede da câmara de secagem (ANANDHARAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2019). Além disso, o coletor de partículas com eletrodos altamente carregados eleva a recuperação de partículas secas mesmo para pequenas quantidades de amostras, pois a elevada tensão gera um campo eletrostático que acelera a deposição de partículas carregadas negativamente (LEE et al., 2011).

Alguns modelos de *spray dryers* industriais possuem dispositivos de vibração automática localizados na câmara de secagem, o que evita que as partículas fiquem aderidas nas paredes da câmara e consequentemente aumentam o rendimento do processo (JIANGSU TAYACN DRYING TECHNOLOGY, 2013). Ambos equipamentos utilizados neste estudo foram de escala laboratorial. Logo, o rendimento obtido no *spray dryer* pode ser aumentado utilizando configurações industriais.

Tabela 1 - Rendimento e eficiência de encapsulamento de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulados por *Spray drying* e *Nanospray drying*.

Ensaio	H90ES	H120ES	H90EN	H120EN
Rendimento (%)	55,6	54,3	82,8	78,0
Eficiência de Encapsulamento (%)	$81{,}0^{b} \pm 1{,}2$	$83{,}7^{b} \pm 0{,}9$	$83{,}1^{b} \pm 0{,}4$	$87{,}3^{a} \pm 1{,}2$

Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p > 0{,}05$) (teste t de *Tukey*); H90ES: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H90EN: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*.

A eficiência de encapsulamento (EE) determina a fração de proteína bioativa que é mantida/perdida durante o processamento, o que acarreta em consequências econômicas importantes (MCCLEMENTS, 2018) e indica a manutenção e estabilização de compostos ativos (SARABANDI et al., 2019). A EE de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 foi superior a 80 % em todos os tratamentos avaliados. O encapsulamento por *spray drying* proporcionou EE significativamente iguais para as amostras H90 e H120 (Tabela 1). Pode-se inferir que as diferenças entre as amostras H90 e H120 não causaram efeito na eficiência de encapsulamento por *spray drying*. Isso pode ser devido às mesmas condições de secagem aplicadas, incluindo as mesmas proporções de material de parede e composto ativo. Condições iguais entre as amostras também foram aplicadas na secagem por atomização em *nanospray dryer*, porém, maior eficiência de encapsulamento foi obtida para o hidrolisado H120. De acordo com (SARABANDI et al., 2019), maior EE pode ser atribuída à melhor acomodação de peptídeos menores na estrutura das partículas. Logo, o tamanho reduzido do H120 em comparação com H90 (resultados obtidos por Pereira et al. (2019) - Artigo 1) dos peptídeos pode ter influenciado na maior eficiência de encapsulação.

3.2.ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O encapsulamento mediante secagem por atomização gerou efeito significativo na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18. Observa-se que a capacidade de inibir o radical DPPH aumentou e a capacidade de inibir o radical ABTS diminuiu com o encapsulamento (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina sp.* LEB 18 livres e encapsulados com gelatina por *Spray drying* e *Nanospray drying*.

Atividade antioxidante	Inibição do DPPH (%)	Inibição do ABTS (%)
H90	$18,3^{d} \pm 0,5$	$42,2^{a} \pm 1,9$
H120	$15,1^{d} \pm 0,9$	$36,0^{a} \pm 1,3$
H90ES	$40,9^{b} \pm 7,4$	$19,0^{b} \pm 7,4$
H120ES	$44,3^{a} \pm 1,8$	$22,1^{b} \pm 6,9$
H90EN	$37,1^{c} \pm 2,1$	$16,5^{b} \pm 6,6$
H120EN	$45,3^{a} \pm 0,8$	$19,1^{b} \pm 4,1$

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p>0,05) de acordo com teste de Tukey. H90: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação; H120: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação; H90ES: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H90EN: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*.

O processo de encapsulamento pode ter feito com que elétrons anteriormente disponíveis pelos hidrolisados proteicos interagissem com o material de parede, gelatina, diminuindo a capacidade de estabilizar o radical ABTS pela doação de elétrons. Asaduzzaman e Chun (2013) justificaram a perda da capacidade de sequestro do radical ABTS pela agregação de peptídeos antioxidantes, causado pela exposição à alta temperatura. Logo, a temperatura do processo de secagem por atomização também pode ter contribuído para a diminuição da capacidade antioxidante.

Pedrozo et al. (2020) também encontraram menor capacidade antioxidante do radical ABTS dos compostos encapsulados por atomização do que dos compostos livres. Porém, esses autores afirmaram que o efeito cumulativo da liberação contínua de bioativos,

juntamente com as vantagens farmacocinéticas das nanopartículas, proporcionam maior desempenho antioxidante dos compostos bioativos encapsulados do que os compostos livres quando administradas *in vivo*.

Por outro lado, a exposição de grupos funcionais capazes de doar íons hidrogênio pode ter ocorrido durante o processo de encapsulamento para aumentar a capacidade antioxidante de inibição do radical DPPH. Logo, o encapsulamento por atomização foi capaz de proteger essa propriedade bioativa, para ambos hidrolisados estudados.

Entre as condições de encapsulamento estudadas, o hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação obteve a maior capacidade de inibir o DPPH tanto encapsulado em *nanospray dryer* quanto no *spray dryer* convencional. Para a amostra H90, o processo de encapsulamento em *spray dryer* foi menos prejudicial comparado ao processo em *nanospray dryer*.

3.3.CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

3.3.1. Potencial zeta

O potencial zeta é um parâmetro que fornece informações sobre o potencial eletrostático das partículas em uma solução que permite avaliar a estabilidade a longo prazo. Valores positivos ou negativos indicam repulsão entre as partículas para prevenir agregação (CHAY; TAN; SAARI, 2015). Valores próximos a 20 mV em módulo podem proporcionar estabilidade suficiente das partículas (HONARY; ZAHIR, 2013; QUAGLIA et al., 2009).

Tabela 3 - Potencial zeta de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulados por *Spray drying* e *Nanospray drying*.

Amostra	Potencial zeta (mV)
H90ES	$-5{,}7^{a} \pm 0{,}4$
H120ES	$-10{,}3^{b} \pm 0{,}7$
H90EN	$-10{,}9^{b} \pm 1{,}6$
H120EN	$-16{,}5^{c} \pm 0{,}6$

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0{,}05$) (teste t de *Tukey*); H90ES: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H90EN: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*.

Pode-se observar que o método de encapsulamento e o grau de hidrólise das amostras influenciaram no potencial zeta das partículas (Tabela 3). Entre as amostras encapsuladas em *spray dryer*, a amostra H120ES obteve maior potencial zeta em módulo do que a amostra H90ES. O mesmo foi observado para os hidrolisados encapsulados em *nanospray dryer*, sendo que o nanoencapsulamento do H120 proporcionou a maior estabilidade das partículas, comparado a todos os ensaios avaliados, indicada pelo maior potencial zeta em módulo (-16,5 mV), mais próximo de 20 mV.

Peptídeos de linhaça hidrolisados com tripsina e encapsulados em nanolipossomas seguido de secagem por atomização apresentaram potencial zeta de -15,23 mV (SARABANDI et al., 2019). Os autores concluíram que as microcápsulas produzidas apresentaram elevada estabilidade. Logo, pode-se afirmar que no presente estudo o H120 encapsulado em *nanospray dryer* apresentou-se eletrostaticamente estável.

O potencial zeta pode estar relacionado à atividade antioxidante quanto à inibição do DPPH das amostras. O potencial zeta negativo indica exposição de grupos carboxílicos na superfície das partículas, ou de outros grupamentos carregados negativamente nas cadeias laterais dos aminoácidos. Os átomos de oxigênio do grupo carboxil tendem a puxar os elétrons em sua direção, aumentando a tendência do grupo amino em fornecer um próton (COX; LEHNINGER; NELSON, 2006) o que estabiliza o radical DPPH. Logo, a maior eletronegatividade do H120EN pode favorecer a maior inibição do radical DPPH.

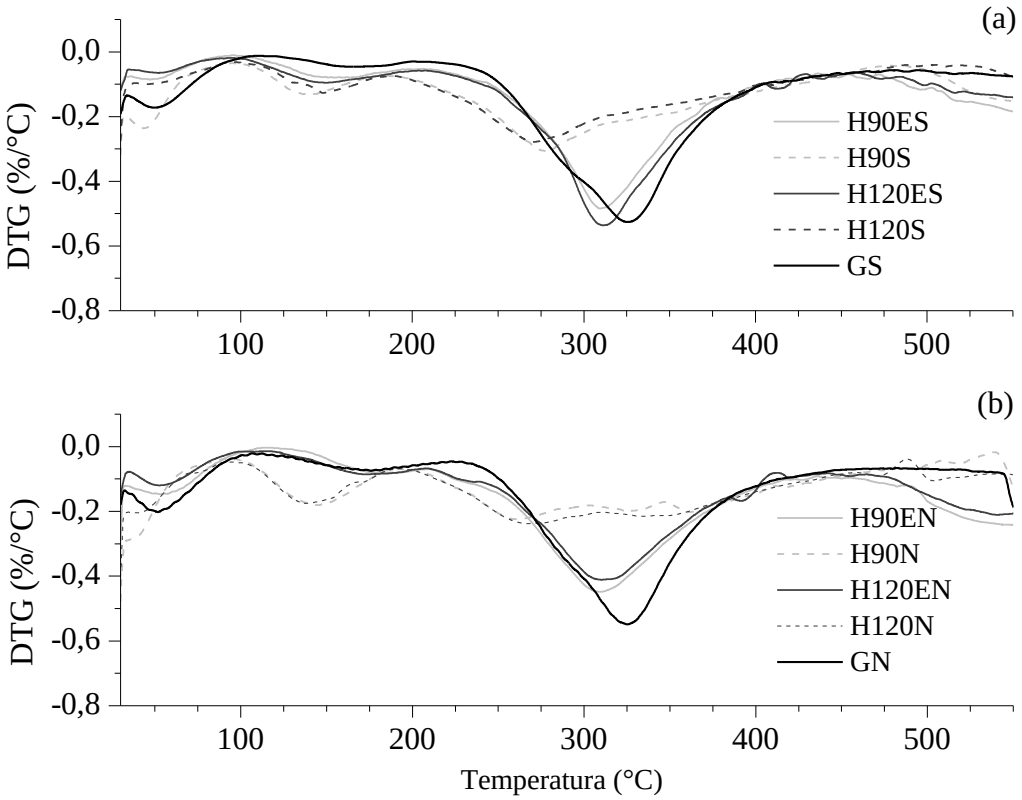
3.3.2. Análise termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica dos hidrolisados não encapsulados, do material de parede e dos hidrolisados encapsulados em *spray dryer* e *nanospray dryer* foi conduzida a fim de avaliar possíveis mudanças na termoestabilidade dos hidrolisados com o encapsulamento. A degradação dos hidrolisados proteicos encapsulados por ambos os métodos ocorreu em temperatura um pouco abaixo da temperatura de degradação da gelatina, porém em temperatura superior a degradação dos hidrolisados não encapsulados (Figura 1). Este comportamento também foi observado por Alehosseini et al. (2018) ao encapsular curcumina com gelatina por processo eletrodinâmico, e concluíram que as interações entre o composto e a gelatina favoreceram a termoestabilidade do material encapsulado.

Observa-se que a degradação térmica dos materiais atomizados em *spray dryer* apresentou-se semelhante aos atomizados em *nanospray dryer*. Isso pode ser devido a

composição dos materiais que foram analisados, que embora com diferentes eficiências de encapsulamento, foram elaborados com as mesmas proporções de composto ativo e material de parede.

Figura 1 - Curvas termogravimétricas derivadas (DTG) de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados com gelatina em *Spray dryer* (a) e *Nanospray dryer* (b)



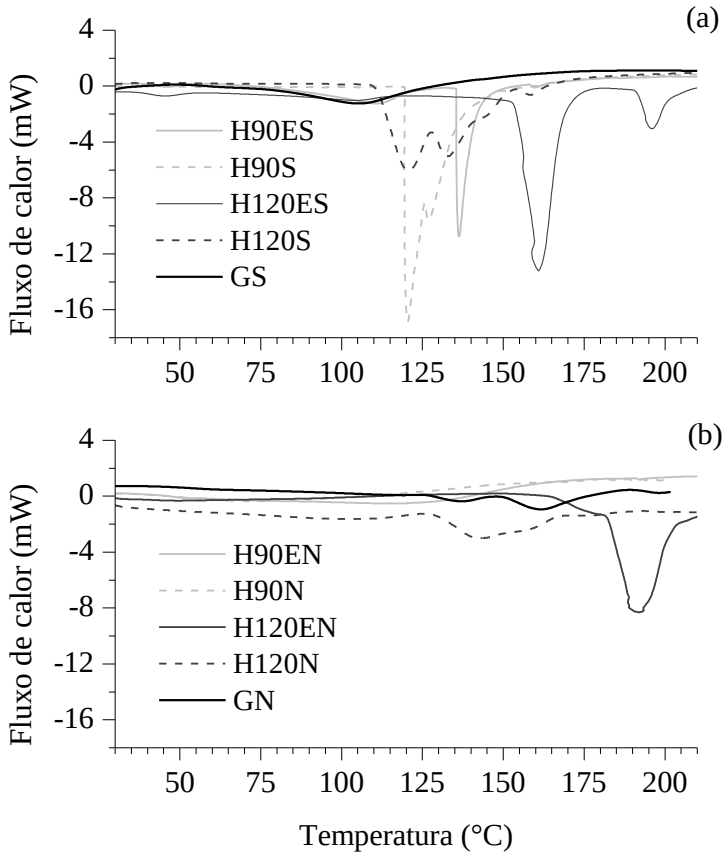
H90ES: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H90S: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação atomizado em *spray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer;* H120S: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação atomizado em *spray dryer*; GS: gelatina atomizada em *spray dryer*; H90EN: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H90N: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação atomizado em *nanospray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H120N: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação atomizado em *nanospray dryer;* GN: gelatina atomizada em *nanospray dryer.*

3.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A fusão dos hidrolisados proteicos submetidos à secagem em *spray dryer* ocorreu em mais de uma etapa (Figura 2a), enquanto que o material de parede apresentou apenas um pico endotérmico (105 °C). Para o H90 atomizado em *spray dryer* sem encapsulação (H90S),

as temperaturas de fusão foram 119,7 °C e 126,8 °C, enquanto para o H120 atomizado em *spray dryer* sem encapsulação (H120S) foram 120,7°C e 132, 8 °C. Observa-se que os picos endotérmicos dos hidrolisados proteicos encapsulados ocorreram em temperaturas superiores às temperaturas de fusão dos hidrolisados proteicos livres. Isso indica estabilização térmica e encapsulamento dos mesmos. Para o H90 encapsulado em *spray dryer* (H90ES) a fusão ocorreu em 136,3 °C e a fusão do H120ES ocorreu em 160,8°C e 195,9 °C.

Figura 2 - Calorimetria exploratória diferencial de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados com gelatina em *Spray dryer* (a) e *Nanospray dryer* (b)



H90ES: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H90S: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação atomizado em *spray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer;* H120S: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação atomizado em *spray dryer*; GS: gelatina atomizada em *spray dryer*; H90EN: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H90N: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação atomizado em *nanospray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H120N: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação atomizado em *nanospray dryer;* GN: gelatina atomizada em *nanospray dryer*.

O comportamento térmico dos hidrolisados proteicos livres submetidos ao *nanospray dryer* foi diferente em comparação ao *spray dryer*. A fusão dos hidrolisados proteicos ocorreu em uma única etapa, em 74,4 °C para o H90N e em 142,9 °C para o H120N (Figura 2b). O comportamento térmico dos materiais encapsulados foi semelhante ao obtido em *spray dryer*, uma vez que os hidrolisados encapsulados apresentaram temperaturas de fusão superiores aos hidrolisados proteicos livres. Além disso, o encapsulamento em *nanospray dryer* resultou em picos endotérmicos em temperaturas mais elevadas. O H90EN apresentou dois picos de fusão, o primeiro ocorreu em 114,4 °C e o segundo em 215,7 °C. A fusão do H120 encapsulado em *nanospray dryer* (H120EN) ocorreu em 196,3 °C.

Os resultados apresentados indicam que os métodos de secagem por atomização foram eficientes para encapsular ambas as amostras de hidrolisados proteicos, pois de acordo com Nogueira, Prestes e Burkert (2017) quando o material encapsulado não apresenta eventos endotérmicos na temperatura em que o composto ativo apresenta, há proteção do composto ativo pelo encapsulamento. Entre os materiais encapsulados, o H120EN além de apresentar maior temperatura de fusão, apresentou maior entalpia de fusão (205,68 J g^{-1}) (Apêndice Tabela A1) o que indica maior estabilidade da amostra, pois maior energia é requerida para mudar a conformação das proteínas (FRYDENBERG et al., 2016).

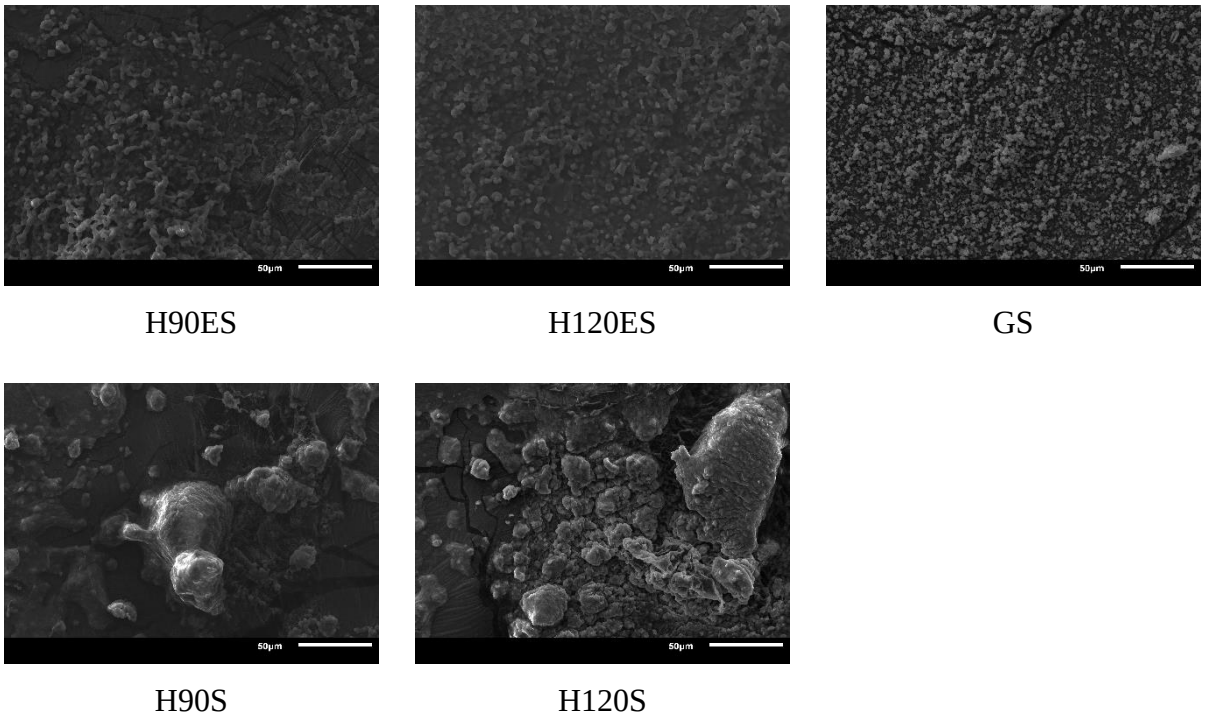
3.3.4. Morfologia e distribuição de tamanho

As micrografias mostram que a gelatina apresenta forma esférica de menor tamanho e maior dispersibilidade do que os hidrolisados proteicos (Figura 3c e Figura 4c). A morfologia dos hidrolisados proteicos livres é não uniforme e de tamanho amplo. Já os materiais encapsulados apresentaram maior tamanho do que a gelatina, porém com morfologia mais uniforme do que os hidrolisados livres, tanto em *spray dryer* quando em *nanospray dryer* o que indica o encapsulamento dos hidrolisados na estrutura da gelatina.

Observou-se aglomeração das partículas encapsuladas para ambos os tratamentos. Esse resultado era esperado devido ao baixo potencial zeta (Tabela 3). Esse comportamento foi observado com maior intensidade para os hidrolisados encapsulados em *spray dryer* (menor potencial zeta), que apresentaram uma espécie de rede entre as partículas (Figura 3a e 3b), do que para os hidrolisados encapsulados em *nanospray dryer* (Figura 4a e 4b). Formas arredondadas e com partículas unidas umas às outras também foram encontradas por Gómez-Mascaraque et al. (2016) ao encapsular hidrolisados proteicos de soro de leite com gelatina, o que pode indicar uma característica da gelatina quando utilizada como material de revestimento

para encapsular hidrolisados proteicos mediante secagem por atomização. Yang et al. (2015) justificaram a aglomeração de microcápsulas de gelatina pela alta proporção de material de parede em relação ao composto ativo e pela alta viscosidade da gelatina, que faz com que as partículas tenham maior adesão. No presente estudo, a proporção de gelatina em relação ao composto ativo foi a mesma para todos os tratamentos, o que indica que a secagem por atomização em *nanospray dryer* causa menor aglomeração das partículas do que em *spray dryer*.

Figura 3 - Micrografias (MEV) de hidrolisados proteicos de *Spirulina* livres e encapsulados por *Spray drying*. Ampliação de 500 x.

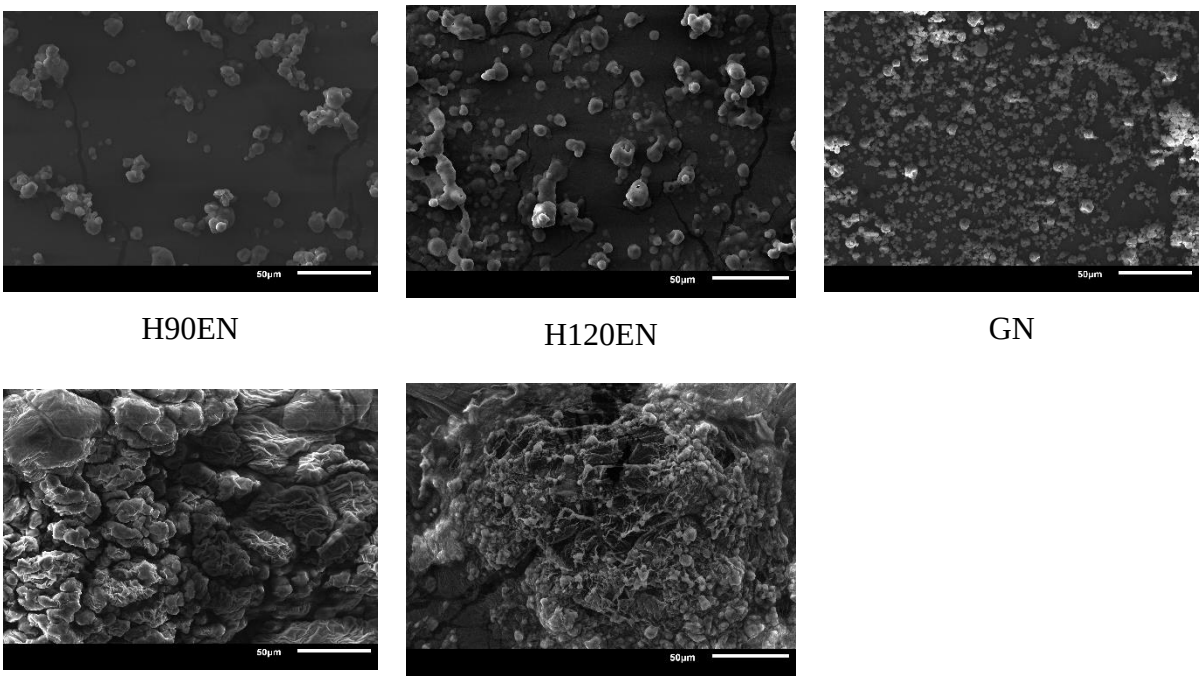


H90ES; hidrolisado obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer*; GS: gelatina atomizada em *spray dryer*; H90S: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação atomizado em *spray dryer*; H120S: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação atomizado em *spray dryer*.

O menor tamanho, em média, de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado com gelatina foi obtido para a amostra H120 em *nanospray dryer* (1,17 ± 1,48 µm). Esse resultado pode estar relacionado com o potencial zeta dessa amostra. De acordo com Tachaprutinun et al. (2009), partículas pequenas se dispersam melhor em solução aquosa e por

isso apresentam maiores valores absolutos de potencial zeta do que partículas maiores. Partículas de até aproximadamente 12 µm foram obtidas pelo encapsulamento em *nanospray dryer*, enquanto que partículas de até 32 µm foram obtidas em *spray dryer* (Figura 5).

Figura 4 - Micrografias (MEV) de hidrolisados proteicos de *Spirulina* livres e encapsulados por *Nanospray drying*. Ampliação de 500 x.



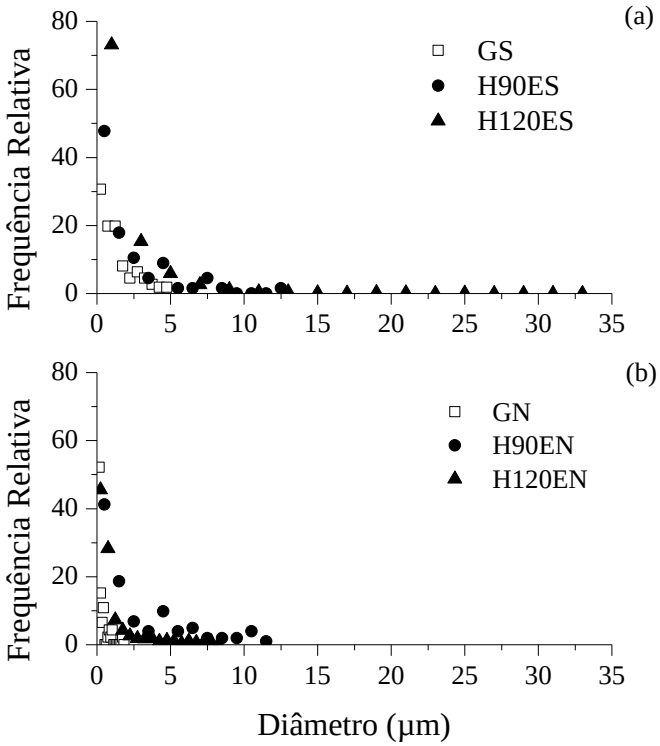
H90EN H120EN GN

H90N H120N

H90EN; hidrolisado obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; GN: gelatina atomizada em *nanospray dryer*; H90N: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação atomizado em *nanospray dryer*; H120N: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação atomizado em *nanospray dryer*.

O menor tamanho das partículas obtidas em *nanospray dryer* também pode estar relacionado a maior inibição do radical DPPH para essas amostras. Nanopartículas proporcionam aumento da área superficial disponível para interação com os compostos químicos/biológicos (NAIR et al., 2010), bem como com DPPH (SHABESTARIAN et al., 2017), o que pode ter proporcionado aumento da atividade antioxidante frente a este radical para o H120EN que apresentou o menor tamanho.

Figura 5 - Distribuição de diâmetro de partículas de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados com gelatina por *Spray drying* (a) e *Nanospray drying* (b).



GS: gelatina atomizada em *spray dryer*; H90ES; hidrolisado obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer*; GN: gelatina atomizada em *nanospray dryer*; H90EN; hidrolisado obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*.

Partículas de menor tamanho eram esperadas de se obter por *nanospray drying* devido ao menor tamanho e atuação piezoelétrica do bico atomizador. O atuador é acionado a uma frequência ultrassônica, que faz com que uma membrana fina de aço inoxidável perfurada vibre, ejetando milhões de gotículas de tamanho preciso a cada segundo, com distribuição de tamanho de gotículas pequenas (FATHI; MARTÍN; MCCLEMENTS, 2014). Apesar do valor médio de tamanho de partículas ser superior a 1 µm, nanopartículas foram obtidas pela encapsulação em *nanospray dryer* do H120 com frequência de 74 %, enquanto que para o H90 41 % das partículas apresentaram-se em escala nanométrica (menor que 1 µm) (Figura 5). O tamanho reduzido das partículas influencia suas propriedades físico-químicas, como propriedades térmicas, mecânicas, eletrostáticas e químicas, e biológicas como propriedades bioativas, resultando em novas aplicações como em alimentos funcionais (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; DURÁN; MARCATO, 2013).

4. CONCLUSÃO

O encapsulamento por atomização foi capaz de proteger a atividade antioxidante (DPPH) dos hidrolisados estudados. O processo em *nanospray dryer* proporcionou o maior rendimento e eficiência de encapsulamento do que o *spray dryer*, sendo que o encapsulamento do hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação foi mais eficiente em comparação ao hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação. O encapsulamento em *spray dryer* e *nanospray dryer* gerou micropartículas e nanopartículas mais estáveis termicamente do que os hidrolisados proteicos não encapsulados. Entre os tratamentos avaliados, o material gerado pelo nanoencapsulamento de hidrolisados proteicos obtidos em 120 min de reação foi o que apresentou maior estabilidade eletrostática e térmica. De acordo com os resultados encontrados, a técnica de secagem por atomização foi eficiente para preservar a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18, assim esses têm potencial para aplicação em alimentos funcionais.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) e do Centro de Microscopia Eletrônica da zona Sul, da Universidade Federal do Rio Grande (CEME-SUL/FURG). "

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEHOSSEINI, A.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MARTÍNEZ-SANZ, M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrospun curcumin-loaded protein nanofiber mats as active/bioactive coatings for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 758–771, 2019.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; ISHWARYA, S. P. **Essentials and Applications of Food Engineering**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2019: CRC Press, 2019.

ASADUZZAMAN, A. K. M.; CHUN, B. S. Recovery of functional materials with thermally stable antioxidative properties in squid muscle hydrolysates by subcritical water. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 793–802, 2015.

BHUSHANI, A. J.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 21–33, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CHAY, S. Y.; TAN, W. K.; SAARI, N. Preparation and characterisation of nanoliposomes containing winged bean seeds bioactive peptides. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 5, p. 488–495, 2015.

CHRONAKIS, I. S.; MADSEN, M. **Algal proteins**. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). Handbook of Food Protein. [s.l.] Woodhead Publishing Series in Food Sciences, Technology and Nutrition, 2011. p. 353–394.

CHU, J.; ZHAO, H.; LU, Z.; LU, F.; BIE, X.; ZHANG, C. Improved physicochemical and functional properties of dietary fiber from millet bran fermented by *Bacillus natto*. **Food Chemistry**, v. 294, p. 79–86, 2019.

COX, M. M.; LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. Princípios de bioquímica. **São Paulo**, 2006.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; AGUILAR-HERNANDEZ, I.; CARDENAS-CHAVEZ, D. L.; ORNELAS-SOTO, N.; ROMERO-OGAWA, M. A.; PARRA-SALDIVAR, R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 190–209, 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: editora Artmed, 2010.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 1127–1134, 2013.

FATHI, M.; MARTÍN, Á.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 18–39, 2014.

FRYDENBERG, R. P.; HAMMERSHØJ, M.; ANDERSEN, U.; GREVE, M. T.; WIKING, L. Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. **Food Chemistry**, v. 192, p. 415–423, 2016.

GARCÍA, J.; MÉNDEZ, D.; ÁLVAREZ, M.; SANMARTIN, B.; VAZQUEZ SOBRADO, R.; REGUEIRO, L.; ATANASSOVA, M. Design of novel functional food products enriched with bioactive extracts from holothurians for meeting the nutritional needs of the elderly. **LWT - Food Science and Technology**, v. 109, n. 16, p. 55–62, 2019.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LAGARÓN, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrosprayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 42–52, 2015.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MIRALLES, B.; RECIO, I.; LÓPEZ-RUBIO, A. Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 290–300, 2016.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.

JAFARI, S. M.; VAKILI, S.; DEHNAD, D. Production of a functional yogurt powder fortified with nanoliposomal vitamin D through Spray Drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 7, p. 1220–1231, 2019.

JIANGSU TAYACN DRYING TECHNOLOGY, 2013. **ZLPG Series Herbal Extract Spray Dryer**. Disponível em: < https://xrhwtg.com/product/110.html>. Acesso em: 07, maio de 2020.

KETNAWA, S.; BENJAKUL, S.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; RAWDKUEN, S. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. **Food Chemistry**, v. 215, p. 383–390, 2017.

KWAK, H.-S. Overview of Nano- and Microencapsulation for Foods. In: **Nano- and Microencapsulation for Foods**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 1–14.

LAKKIS, J. M. **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2007.

LEE, S. H.; HENG, D.; NG, W. K.; CHAN, H. K.; TAN, R. B. H. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 192–200, 2011.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; COSTA, J. A. V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 3, p. 79–86, 2016.

LIU, X.; LIU, J.; ZHANG, W.; HAN, S.; ZHANG, T.; LIU, B. Electron beam irradiation-induced structural changes increase the antioxidant activities of egg white protein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, p. 846–852, 2019.

LOWRY, O. H.; ROSEROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2018.

MOHAN, A.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; HE, Q. S.; BAZINET, L.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 97, p. 79270–79278, 2015.

NAIR, H. B.; SUNG, B.; YADAV, V. R.; KANNAPPAN, R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1833–1843, 2010.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806–1815, 2011.

NIEUWENHOVE, C. P. V.; MOYANO, A.; CASTRO-GÓMEZ, P.; FONTECHA, J.; SÁEZ, G.; ZÁRATE, G.; PIZARRO, P. L. Comparative study of pomegranate and jacaranda seeds as functional components for the conjugated linolenic acid enrichment of yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, p. 401–407, 2019.

NOGUEIRA, M. B.; PRESTES, C. F.; BURKERT, J. F. DE M. Microencapsulation by lyophilization of carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* with soy protein as the encapsulating agent. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 1–4, 2017.

PEDROZO, R. C.; ANTÔNIO, E.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Bovine serum albumin–based nanoparticles containing the flavonoid rutin produced by nano spray drying. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 1–8, 2020.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 47, p. 187–194, 2018.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions. **Journal of Food Science and Technology**, 2019.

QUAGLIA, F.; OSTACOLO, L.; MAZZAGLIA, A.; VILLARI, V.; ZACCARIA, D.; SCIORTINO, M. T. The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 30, n. 3, p. 374–382, 2009.

RAJABI, H.; GHORBANI, M.; JAFARI, S. M.; SADEGHI MAHOONAK, A.; RAJABZADEH, G. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 327–337, 2015.

RAO, P. S.; BAJAJ, R. K.; MANN, B.; ARORA, S.; TOMAR, S. K. Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin–gum arabic blend. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 3834–3843, 2016.

RAYO-MENDEZ, L. M.; GÓMEZ, A. V.; TADINI, C. C. Extraction of soluble sugars from banana puree to obtain a matrix rich in non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 294, p. 539–546, out. 2019.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

REZVANI, M.; HESARI, J.; PEIGHAMBARDOUST, S. H.; MANCONI, M.; HAMISHEHKAR, H.; ESCRIBANO-FERRER, E. Potential application of nanovesicles (niosomes and liposomes) for fortification of functional beverages with Isoleucine-Proline-Proline: A comparative study with central composite design approach. **Food Chemistry**, v. 293, p. 368–377, 2019.

ROCHA, G. A.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microcapsules of a Casein Hydrolysate: Production, Characterization, and Application in Protein Bars. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 4, p. 407–413, 2009.

SARABANDI, K.; JAFARI, S. M.; MOHAMMADI, M.; AKBARBAGLU, Z.; PEZESHKI, A.; KHAKBAZ HESHMATI, M. Production of reconstitutable nanoliposomes loaded with flaxseed protein hydrolysates: Stability and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 442–450, 2019.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

SHABESTARIAN, H.; HOMAYOUNI-TABRIZI, M.; SOLTANI, M.; NAMVAR, F.; AZIZI, S.; MOHAMAD, R.; SHABESTARIAN, H. Green synthesis of gold nanoparticles using sumac aqueous extract and their antioxidant activity. **Materials Research**, v. 20, n. 1, p. 264–270, 2017.

SOARES, J. C.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; MASSARIOLI, A. P.; DA SILVA, C. F.; NANI, B. D.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S. M. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178–188, 2019.

TACHAPRUTINUN, A.; UDOMSUP, T.; LUADTHONG, C.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, n. 1–2, p. 119–124, 2009.

WANG, Y.; ZHAO, J.; LIU, C.; LI, W. Influence of γ-aminobutyric acid on gelling properties of heat-induced whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 287–293, 2019.

WEBBER, V.; DE SIQUEIRA FERREIRA, D.; BARRETO, P. L. M.; ANGELI, V. W.; VANDERLINDE, R. Preparation and characterization of microparticles of β-cyclodextrin/glutathione and chitosan/glutathione obtained by spray-drying. **Food Research International,** v. 105, p. 432-439, 2018.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 275–295, 2004.

YANG, X.; GAO, N.; HU, L.; LI, J.; SUN, Y. Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 161, p. 87–93, 2015.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 167–179, 2018.

ARTIGO 3

HIDROLISADO PROTEICO DE *Spirulina* ENCAPSULADO POR *NANOSPRAY DRYING:* ESTABILIDADE E APLICAÇÃO EM GELATINA SABOR LIMÃO

RESUMO

A estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulados por *nanospray drying*, utilizando gelatina como material de parede, foi avaliada em condições de processamento de alimentos e após digestão *in vitro*. A aplicação desses em sobremesa do tipo gelatina sabor limão foi avaliada quanto aos parâmetros de cor, textura e atividade antioxidante. Os resultados indicaram que o encapsulamento do hidrolisado proteico manteve a atividade antioxidante em baixo pH, em diferentes tratamentos térmicos e com a adição de cloreto de sódio. Além disso, houve aumento da capacidade antioxidante do hidrolisado proteico encapsulado após digestão gastrointestinal simulada. A cor e a textura da sobremesa de gelatina foram mantidas com a adição do hidrolisado proteico encapsulado e a atividade antioxidante desses alimentos foi aumentada. Este estudo indica que a adição de hidrolisados proteicos microalgais é capaz de proporcionar bioatividade à alimentos. Além disso, estes compostos após processados, armazenados e digeridos, ainda conferem sua atividade.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; composto bioativo; cor; perfil de textura.

1 INTRODUÇÃO

Compostos bioativos despertam a atenção de pesquisadores devido às propriedades funcionais que podem proporcionar, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-carcinogênica e antimicrobiana (GIACONIA et al., 2020). Um composto bioativo, também chamado de composto funcional, é qualquer componente presente no alimento que proporciona algum efeito benéfico ao organismo quando consumido (GRAJEK; OLEJNIK; SIP, 2005). Algumas das motivações que impulsionam as pesquisas por compostos bioativos incluem o interesse dos consumidores na prevenção de problemas de saúde, no aumento do custo dos cuidados com a saúde, no aumento da expectativa de vida e no desejo por melhorar a qualidade de vida (BIGLIARDI; GALATI, 2013; BOGUE; COLLINS; TROY, 2016). De acordo com relatório da Grand View Research (2016), o aumento da preocupação com a saúde pelo consumidor impulsionará o crescimento no mercado global de ingredientes bioativos para aproximadamente 52 bilhões de dólares até 2024.

A inclusão de compostos antioxidantes na dieta é uma maneira de promover saúde pois esses compostos são capazes de aumentar o equilíbrio de antioxidantes e pró-oxidantes no corpo humano. Peptídeos antioxidantes de fontes alimentícias são considerados compostos seguros e que promovem saúde. Eles tornam-se mais atrativos do que outros antioxidantes não peptídicos pois podem conferir outras propriedades como atividade anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, antibacteriana e imunomodulatória (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

Em comparação com antioxidantes de fontes não naturais, os peptídeos possuem menor massa molecular, são mais facilmente absorvidos pelo organismo e são menos prováveis de apresentarem reações imune adversas (LIU et al., 2010). Peptídeos microalgais com amplo espectro de propriedades ativas, como antioxidantes (LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016), anti-hipertensivos (HEO et al., 2017; SHEIH; FANG; WU, 2009), anti-inflamatórios (VO; RYU; KIM, 2013) e antitumorais (KANG; KIM, 2013) têm sido relatados na literatura. No entanto, condições de processamento, armazenamento de alimentos e do trato gastrointestinal podem promover alteração da sua bioatividade (AO; LI, 2013; GIROUX; ROBITAILLE; BRITTEN, 2016; ZHU et al., 2014). Neste contexto, técnicas de encapsulamento são estudadas para aumentar a estabilidade de compostos ativos, como peptídeos de fontes alimentícias, para promover saúde humana (MOHAN et al., 2015).

Gelatina é um polímero capaz de formar hidrogel, obtido de fontes naturais, comercialmente disponível a baixo custo e amplamente utilizado para conferir textura em

alimentos como em iogurtes, sobremesas e produtos cárneos (RAJABI et al., 2015; SCHRIEBER; GAREIS, 2007; WANG et a., 2012). Devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, e diversos grupos ativos disponíveis para interagir com moléculas alvo, a gelatina vem sendo amplamente estudada como carreadores de compostos ativos nas últimas décadas (ELZOGHBY, 2013). Nesse contexto, além de ser utilizada para conferir textura, a gelatina tem sido estudada como material de parede para liberar de forma controlada e aumentar a estabilidade desses compostos (GÓMEZ-MASCARAQUE; LAGARÓN E; LÓPEZ-RUBIO, 2015; HORUZ; BELIBAĞLI, 2018; SILVA et al., 2018).

Sobremesas a base de gelatina são constituídas de 1 a 3 % de gelatina, açúcares e/ou edulcorantes, aromatizantes e podem conter aditivos regulados por legislação específica (BERTÉ et al., 2011; McGEE, 2004). Elas são amplamente consumidas por crianças e adultos, são de fácil preparo e estão entre as sobremesas de maior aceitação por crianças e adolescentes (BARBOSA et al., 2013; KOMAIKO; McCLEMENTS el al., 2015). Devido a isso, são candidatos adequados à fortificação com agentes bioativos promotores de saúde (KOMAIKO; McCLEMENTS el al., 2015).

Logo, esse estudo objetivou a avaliação da estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado com gelatina frente à diferentes pH, tratamentos térmicos, concentrações de cloreto de sódio e após digestão gastrointestinal simulada. Além disso, adicionar o hidrolisado proteico encapsulado e não encapsulado em sobremesa comercial a base de gelatina, avaliando a atividade antioxidante conferida a este alimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Enzima Protemax 580L de *Bacillus licheniformis* foi gentilmente cedida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). Gelatina alimentícia de origem bovina tipo B (240 bloom) foi gentilmente cedida pela empresa Gelita (São Paulo, SP, Brasil) e utilizada como material de parede para o encapsulamento do hidrolisado proteico em *nanospray dryer*. Mistura em pó comercial para sobremesa de gelatina sabor limão (Fleishmann, AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, Brasil) foi adquirida do comércio local e utilizada para adicionar hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18.

2.2 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO

O hidrolisado proteico para realização deste estudo foi obtido de biomassa microalgal de *Spirulina* sp. LEB 18, obtida e caracterizada como descrito previamente por Pereira, Lisboa e Costa (2018). As proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram hidrolisadas com a enzima Protemax 580L de *Bacillus licheniformis*. As reações enzimáticas foram realizadas de acordo com Pereira et al. (2019), em biorreator do tipo frasco agitado, utilizando as condições em que estes autores obtiveram maior grau de hidrólise: 4 % m v^{-1} de substrato e 5 U mL^{-1} de enzima, 100 mL de volume reacional e 120 min de reação (este hidrolisado foi denominado H120).

2.3 ENCAPSULAMENTO DO HIDROLISADO PROTEICO

O hidrolisado proteico foi encapsulado por atomização, em *nanospray dryer* (Büchi, B-90, Suíça), com gelatina, de acordo com Gómez-Mascaraque et al. (2016). A solução foi preparada com 1 % (m v^{-1}) de sólidos totais em ácido acético 2 % (v v^{-1}). A proporção de hidrolisado proteico foi 30 % (m m^{-1}) em relação aos sólidos totais. O diâmetro dos poros da membrana em que a solução foi atomizada em atuador piezoelétrico foi 7 µm. A temperatura do ar de secagem na entrada foi 110 °C, mantendo-se em 40 ± 2 °C na saída. A pressão de operação foi mantida em 30 mBar, com vazão de ar de secagem de 150 L h^{-1}, e as partículas depositadas no cilindro coletor de partículas, devido à voltagem aplicada de 15 kV, foram coletadas.

2.4 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO HIDROLISADO PROTEICO ENCAPSULADO

Soluções de hidrolisados proteicos encapsulados (10 mg mL^{-1}) foram preparadas em ácido acético 20 % (v v^{-1}) de acordo com Gómez-Mascaraque, Lagarón e López-Rubio (2015). As amostras foram submetidas a diferentes ensaios para avaliação do efeito do tratamento térmico, pH, concentração de NaCl na atividade antioxidante do hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18. Solução de hidrolisado proteico encapsulado à 3 % m v^{-1} em água destilada foi preparada para avaliação da estabilidade frente à digestão *in vitro*. Após os tratamentos, as suspensões foram homogeneizadas por 5 min em agitador vórtex, centrifugadas (660 x *g* por 15 min) e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade antioxidante.

2.4.1 Efeito do pH, tratamento térmico, concentração de NaCl e digestão *in vitro* na atividade antioxidante do hidrolisado proteico encapsulado

O efeito do pH foi avaliado segundo Jang; Liceaga e Yoon (2016), com modificações. Os ensaios foram realizados em tampão pH 4, pH 6 e em água destilada (ensaio controle), diluindo-se a suspensão de hidrolisado proteico encapsulado (10 mg mL^{-1}) em uma proporção 1:1 (v v^{-1}) com solução tampão em pH correspondente. As soluções foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por 1 h.

O efeito do tratamento térmico foi avaliado conforme Jang, Liceaga e Yoon (2016). A suspensão de hidrolisado proteico encapsulado foi submetida a −18, 4 e 25 °C por 24 h, 63 °C por 30 min e 100 °C por 5 min. A atividade antioxidante do ensaio sem tratamento térmico foi determinada no sobrenadante imediatamente após o preparo da suspensão do hidrolisado proteico.

O efeito da presença de cloreto de sódio (2, 4, 6 e 8 % m m^{-1}) foi avaliado de acordo com método proposto por Zhu et al. (2014). As soluções foram mantidas a 100 °C por 15 min e resfriadas em banho de gelo para determinação da atividade antioxidante remanescente. Água destilada foi utilizada para realização do ensaio sem tratamento (0 % NaCl m m^{-1}).

A estabilidade frente a ação de enzimas digestivas, pepsina e pancreatina, foi avaliada conforme Zhu et al. (2008), utilizando 3 % m v^{-1} de hidrolisado proteico encapsulado. O ensaio controle foi realizado sem a adição de enzimas digestivas.

2.4.2 Determinação da atividade antioxidante do hidrolisado proteico encapsulado

A atividade antioxidante foi avaliada por 3 métodos distintos. A capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada de acordo com Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) adaptado por Maadane et al. (2015). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante descrito no item 2.4 foram adicionadas de 250 µL de DPPH 60 µmol L^{-1} e deixadas em repouso ao abrigo de luz por 60 min. Após, a absorbância foi medida em 515 nm em leitora de microplacas (Celer Biotecnologia S.A, Polaris MA616, Brasil), descontada da abs do branco (amostra e álcool metílico), em relação a abs do controle (ácido acético 20 % e DPPH), conforme equação (1).

Capacidade de inibição (%)= $[1-(abs_{amostra}-abs_{branco}/abs_{controle})]x100$ (1)

A inibição do radical 2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi determinada de acordo com Re et al. (1999) adaptada por Sadat et al. (2011). Solução estoque de ABTS 7 mmol L^{-1} em água destilada foi preparada. O radical ABTS foi preparado misturando-se 1 mL dessa solução com 17,6 µL de persulfato de potássio 140 µmol L^{-1} e deixado em repouso em temperatura ambiente por 16 h. Em seguida, essa solução foi adicionada de álcool etílico até alcançar absorbância de 0,700 ± 0,005 em 734 nm. Alíquotas de 2 µL de amostra foram misturadas com 198 µL do radical ABTS e a absorbância foi medida a 734 nm após 6 min de reação em leitora de microplacas (Celer Biotecnologia S.A, Polaris MA616, Brasil). (RE et al., 1999). O cálculo da atividade antioxidante foi realizado de acordo com a equação (1), em que a abs do branco se refere a leitura da abs da mistura de amostra e álcool etílico e a abs do controle refere-se a mistura de ácido acético e solução de ABTS.

O poder redutor foi determinado de acordo com Oyaizu (1986) adaptado por Yen, Chen (1995). Alíquotas do sobrenadante foram diluídas (1:1 v v^{-1}) com tampão fosfato de sódio pH 6,6 e 70 µL dessa solução foram adicionadas de 35 µL de ferricianeto de potássio 1 % (m v^{-1}), acondicionados em banho-maria a 50 °C durante 20 min. Ácido tricloroacético (TCA) 10 % m v^{-1} (33 µL) foi adicionado. Em seguida, água destilada (135 µL) e 27 µL de cloreto férrico 0,1 % m v^{-1} foram adicionados. Após 10 min em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 700 nm em leitora de microplacas (Celer Biotecnologia S.A, Polaris MA616, Brasil). A capacidade das amostras de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} foi verificada através do aumento da absorbância.

2.5 APLICAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO EM SOBREMESA DE GELATINA SABOR LIMÃO

Sobremesa de gelatina comercial sabor limão foi adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado (HE) em concentrações de 2,5; 5 e 7,5 % (m m^{-1}). Logo, a concentração de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 nessas formulações foi 0,75; 1,5 e 2,25 % (m m^{-1}), respectivamente. Essas concentrações foram selecionadas de modo a não ultrapassarem a dose diária recomendada de 1,6 g de *Spirulina* por porção (BRASIL, 1999a). Formulações contendo hidrolisado proteico livre (HL) foram elaboradas e sobremesa comercial a base de gelatina sabor limão sem adição de hidrolisado proteico foi utilizada como controle

(Tabela 1). As quantidades de sobremesa comercial de gelatina sabor limão, hidrolisado proteico livre e hidrolisado proteico encapsulado indicadas na Tabela 1 foram pesadas, misturadas e adicionadas de 100 mL de água mineral. As suspensões foram aquecidas à 40 °C por 5 min sob agitação e refrigeradas (4 °C) até geleificação.

2.6 CARACTERIZAÇÃO DA SOBREMESA DE GELATINA SABOR LIMÃO ADICIONADA DE HIDROLISADO PROTEICO DE *SPIRULINA* sp. LEB 18

2.6.1 Atividade Antioxidante da sobremesa de gelatina sabor limão

Tabela 1 - Formulação de gelatina sabor limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 (100 mL de água).

Formulação	Sobremesa de gelatina comercial sabor limão (g)	Hidrolisado proteico (g)	Hidrolisado proteico encapsulado (g)
Controle	6,000	-	-
2,5H	5,955	0,045	-
2,5HE	5,850	-	0,150
5H	5,910	0,090	-
5HE	5,700	-	0,300
7,5H	5,865	0,135	-
7,5HE	5,550	-	0,450

2,5H: gelatina adicionada de 2,5 % de hidrolisado proteico livre; 2,5HE: gelatina adicionada de 2,5 % de hidrolisado proteico encapsulado; 5H: gelatina adicionada de 5 % de hidrolisado proteico livre; 5HE: gelatina adicionada de 5 % de hidrolisado proteico encapsulado; 7,5H: gelatina adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico livre; 7,5HE: gelatina adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico encapsulado.

Para avaliar a atividade antioxidante, as amostras de sobremesa de gelatina foram ultracongeladas à −80 °C (Indrel, IULT 90-D, Brasil) e liofilizadas por 48 h (Liotop, L108, Brasil). Soluções contendo 100 mg mL^{-1} de amostra foram preparadas em água destilada. Após, 0,6 mL dessa solução foram acrescentados de 0,4 mL de ácido acético 20 % v v^{-1} (concentração final de 60 mg mL^{-1}) e avaliadas quanto a capacidade de inibição do

radical DPPH, ABTS e quanto ao poder redutor, conforme descrito no item 2.4.2. Para avaliação do poder redutor, a solução foi diluída 10 vezes com tampão fosfato de sódio pH 6,6.

2.6.2 Cor da sobremesa de gelatina sabor limão

A cor das sobremesas de gelatina sabor limão foi determinada em colorímetro (Minolta, CR-400, Japão) utilizando o sistema de escala de cor da Comissão Internacional de Iluminação para determinar os parâmetros de cor *L**, *a** e *b**, com iluminante padrão D65 e ângulo de observação de 2º. Os valores de *L** representam a luminosidade e os valores de *a** e *b**, as coordenadas de cromaticidade, em que *a** varia de verde para vermelho (-*a**: verde, +*a**: vermelho) e *b** varia de azul para amarelo (-*b**:azul, +*b**:amarelo) (CIE, 1986). Para converter a média dos de L*, a* e b* em cor, para fim de demonstração, foi utilizado o *software* livre Nix Color Sensor.

2.6.3 Perfil de textura da sobremesa de gelatina sabor limão

As amostras de sobremesa de gelatina sabor limão foram colocadas em recipientes de acrílico de 3,2 cm de diâmetro até completar 30 mm de altura e analisadas em texturômetro (TA-XT plus, Stable Micro Systems, Inglaterra) com célula de carga de 50 kg. O perfil de textura foi avaliado utilizando probe cilíndrico de teflon (0,5) em temperatura ambiente. A velocidade do teste foi 0,5 mm s^{-1}, do pré-teste foi 2 mm s^{-1}e pós-teste de 3 mm s^{-1}, de acordo com Xia et al. (2018).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

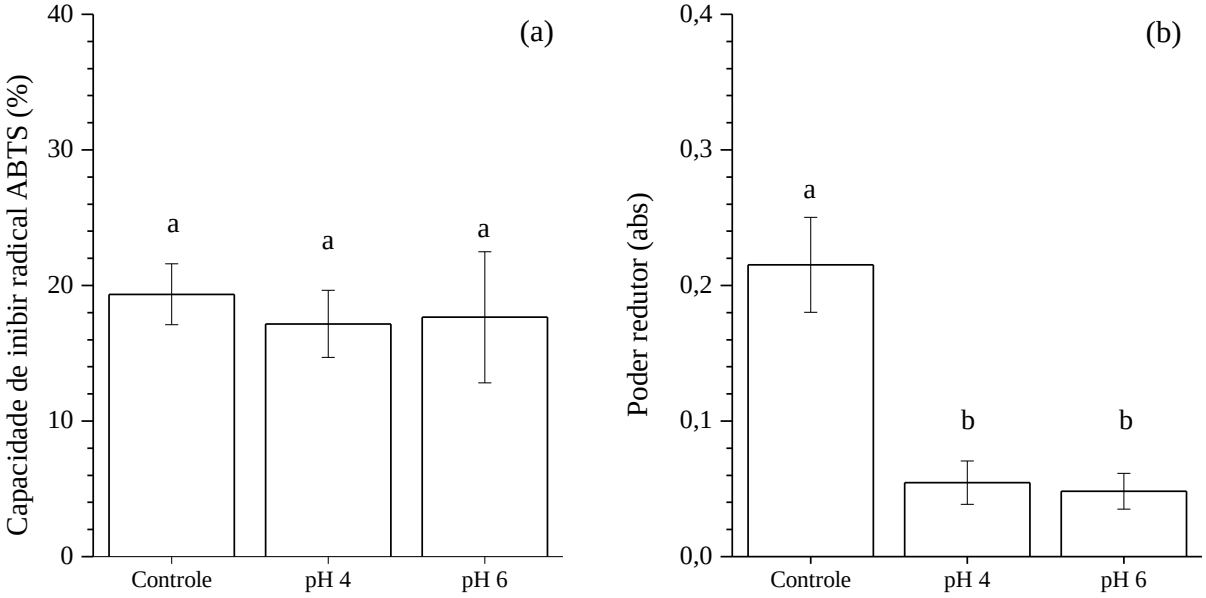
3.1 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO PROTEICO ENCAPSULADO

3.1.1 Efeito do pH na atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado

O encapsulamento foi capaz de proteger a capacidade de inibir o radical ABTS do hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação (H120) ao submetê-lo em pH ácido e de baixa acidez. Após os tratamentos, a atividade antioxidante permaneceu em aproximadamente 20 %, não diferindo significativamente da amostra sem tratamento (Figura 1a). Esse resultado é

promissor para a aplicação em sistemas alimentícios ácidos, como em sobremesas gelatinosas que possuem pH em torno de 4 (PALAZZO, 2008), pois mesmo em baixo pH, o hidrolisado proteico de *Spirulina* pode inibir processos oxidativos com a mesma eficácia. Hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 livres apresentaram redução da capacidade de inibição do radical ABTS em meio ácido (pH 4) e de baixa acidez (pH 6) (PEREIRA et al., 2019).

Figura 1 - Estabilidade de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado por *Nanospray drying* em relação ao pH.



Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p> 0,05). (a) Capacidade de inibir radical ABTS; (b) Poder redutor.

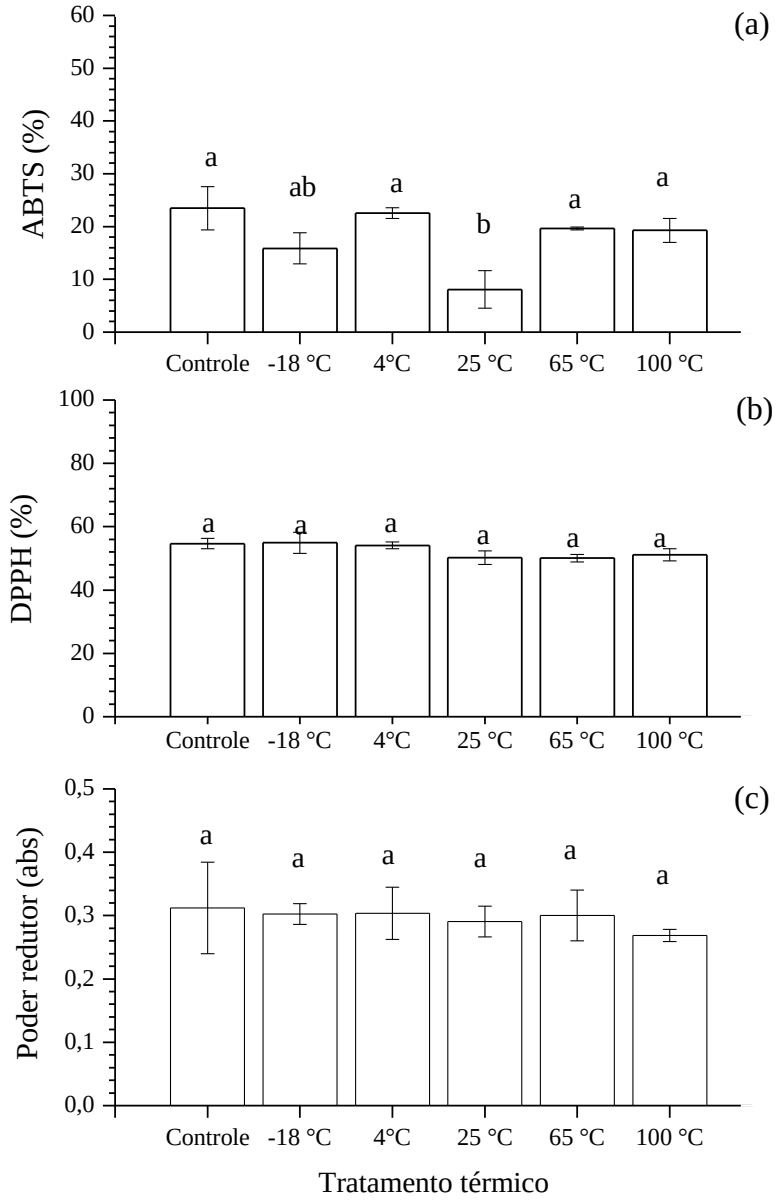
No entanto o poder redutor do hidrolisado proteico encapsulado diminuiu com a diminuição do pH (Figura 1b). Esse resultado indica que o pH pode ter afetado o mecanismo de reação, causando impedimento da doação de elétrons do hidrolisado proteico para reduzir íons Fe^{3+} a Fe^{2+}. A inibição do radical DPPH em diferentes pH não foi possível de ser determinada pois houve precipitação da solução.

3.1.2 Efeito da temperatura na atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado

A capacidade de inibição do radical ABTS do hidrolisado proteico encapsulado foi mantida em todos os tratamentos térmicos aplicados, exceto em temperatura ambiente (Figura

2a). Em estudos realizados por Pereira et al. (2019), hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 não encapsulados apresentaram menor capacidade de inibição do radical ABTS em todos os tratamentos térmicos em relação ao controle, o que indica que o encapsulamento evitou a perda da atividade antioxidante frente ao radical ABTS para os tratamentos, exceto em temperatura ambiente. O tempo de exposição do hidrolisado encapsulado à temperatura ambiente pode ter favorecido a perda da capacidade de inibir o ABTS em relação aos tratamentos em temperatura superior à 25 °C.

Figura 2 - Estabilidade de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado por *Nanospray drying* em relação ao tratamento térmico.



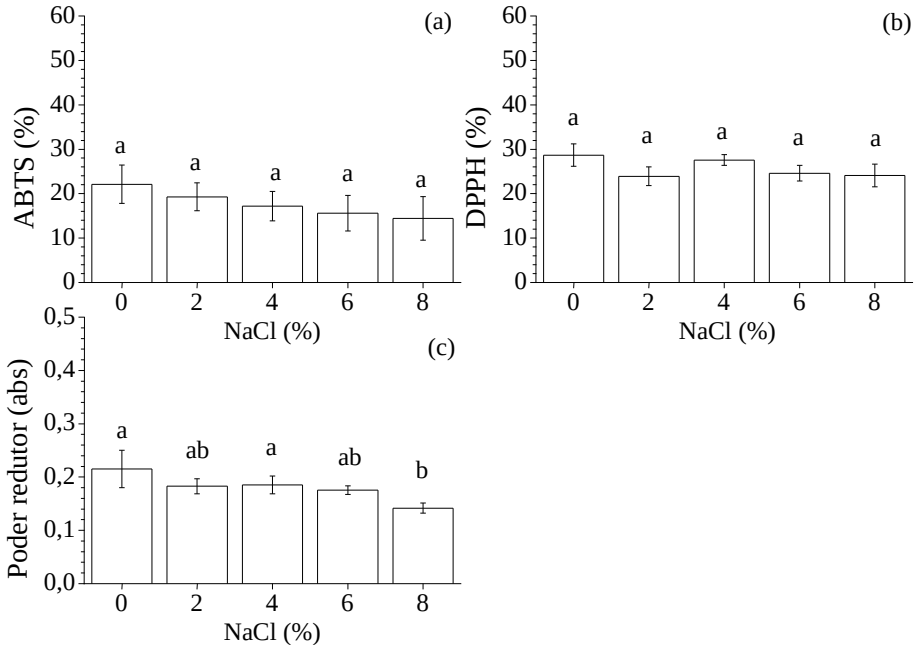
Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p> 0,05). (a) Inibição do ABTS; (b) Inibição do DPPH; (c) Poder redutor.

Além disso, pode-se observar que a capacidade de inibição do radical DPPH e o poder redutor do hidrolisado encapsulado em todos os tratamentos aplicados não diferiu significativamente em relação ao tratamento controle (Figura 2b e 2c). Pereira et al. (2019) verificaram que hidrolisados proteicos de *Spirulina* livres perderam atividade de inibição do DPPH quando submetidos à refrigeração, temperatura ambiente e cocção. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o encapsulamento do hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 proporcionou estabilidade da atividade antioxidante de inibição do DPPH.

3.1.3 Efeito da concentração salina na atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado

Em todas as concentrações de NaCl testadas, a captura dos radicais ABTS e DPPH manteve-se estável pois a atividade antioxidante desses ensaios não diferiu significativamente do ensaio controle (Figura 3a e 3b). Com relação ao poder redutor, o hidrolisado proteico encapsulado foi capaz de reduzir Fe^{3+} igualmente ao controle em concentrações de NaCl de até 6 % m m^{-1}. No entanto, o incremento de 8 % m m^{-1} de NaCl reduziu significativamente o poder redutor, em relação ao controle.

Figura 3 - Estabilidade de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado por *Nanospray drying* em relação a concentração de cloreto de sódio.



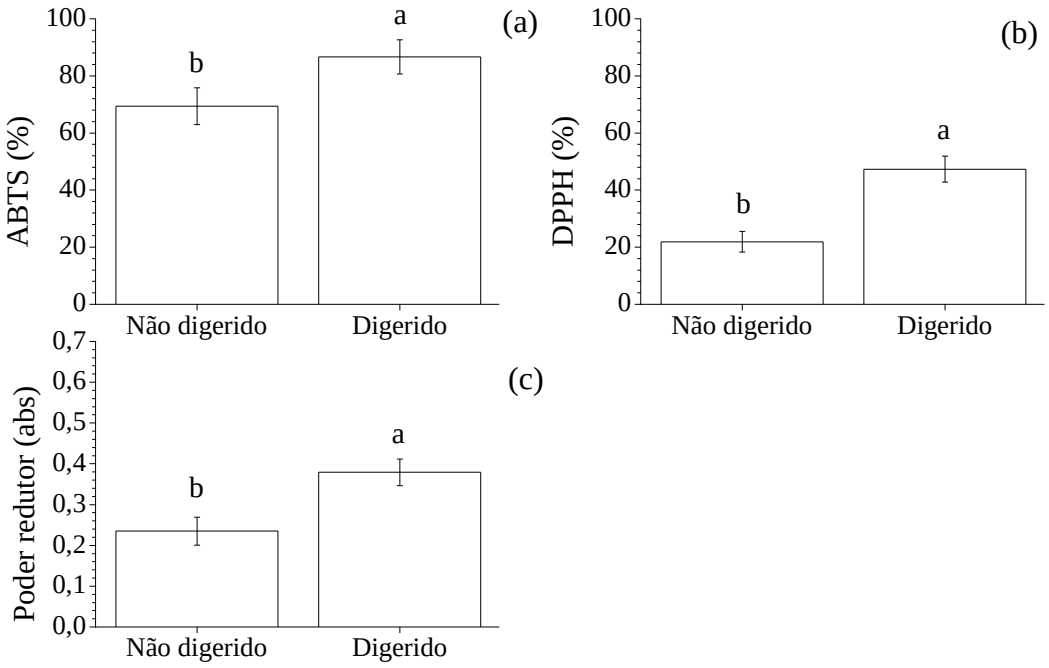
Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p> 0,05). (a) Inibição do ABTS; (b) Inibição do DPPH; (c) Poder redutor.

Segundo Liu et al. (2017), o aumento da concentração de NaCl pode causar diminuição da atividade antioxidante devido a diminuição da solubilidade pelo efeito *salting out* dos peptídeos. Entretanto, a inibição dos radicais ABTS e DPPH foi mantida com o encapsulamento, exceto para o poder redutor, no tratamento com 8 % (m m^{-1}) de NaCl. Logo, esses resultados indicam que a incorporação de peptídeos antioxidantes de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulados em alimentos que contenham NaCl em sua composição pode ser realizada sem prejuízos a sua atividade biológica.

3.1.4 Efeito da digestão *in vitro* na atividade antioxidante de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado

Pode-se observar (Figura 4) que a atividade antioxidante, avaliada pelos métodos de captura do radical ABTS, DPPH e poder redutor, do hidrolisado proteico encapsulado aumentou após a digestão gastrointestinal, em aproximadamente 25, 115 e 61 %, respectivamente. A digestão simulada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 livre, obtido em 120 min de reação no estudo realizado por Pereira et al. (2019), foi capaz de aumentar a inibição do DPPH e do poder redutor, porém houve decréscimo da inibição do radical ABTS.

Figura 4 - Estabilidade de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado por *Nanospray drying* em relação a ação de enzimas digestivas.



Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p> 0,05). (a) Inibição do ABTS; (b) Inibição do DPPH; (c) Poder redutor.

O estudo da estabilidade de peptídeos antioxidantes em condições gastrointestinais simuladas é muito importante pois doenças do trato gastrointestinal estão particularmente relacionadas às espécies reativas de oxigênio, por ser um local naturalmente oxidante (LIU et al., 2017). O aumento da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos após digestão pode ser atribuído a formação de novos peptídeos pela ação das enzimas proteolíticas (SHI et al., 2019). Ao encapsular hidrolisados proteicos, a ação dessas enzimas pode ser reduzida em compostos encapsulados (CIAN et al., 2019), tal efeito não foi observado nesse trabalho. O encapsulamento foi capaz de manter a atividade antioxidante intrínseca do H120 e além disso, ao encontrar condições do trato gastrointestinal, o hidrolisado proteico teve sua atividade antioxidante aumentada.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA SOBREMESA DE GELATINA SABOR LIMÃO ADICIONADA DE HIDROLISADO PROTEICO DE *SPIRULINA* sp. LEB 18

3.2.1 Atividade antioxidante da sobremesa de gelatina sabor limão

Pode-se observar que a capacidade de inibir o radical DPPH das amostras adicionadas do hidrolisado proteico foi aproximadamente 3 vezes superior à atividade antioxidante da amostra controle (gelatina comercial) (Tabela 2). O incremento da concentração de hidrolisado proteico adicionado e o encapsulamento não influenciaram na capacidade de inibir o radical DPPH, pois não houve diferença significativa entre as amostras.

A atividade antioxidante frente ao radical ABTS da amostra 2,5H foi significativamente igual à da amostra 7,5HE. Isso indica que a capacidade de inibir o radical ABTS proporcionada pelo hidrolisado proteico à gelatina não possui efeito dose dependente. Mesmo na forma livre, o hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 conferiu atividade antioxidante à sobremesa de gelatina sabor limão na concentração de 2,5 %, não diferindo significativamente da atividade antioxidante da sobremesa de gelatina adicionada de hidrolisado encapsulado.

Para todos os métodos avaliados houve aumento da atividade antioxidante em relação ao controle. Logo, a adição de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulado e não encapsulado em sobremesa a base de gelatina tornou esse alimento promissor para o mercado de alimentos adicionados de compostos que proporcionam benefícios à saúde.

Tabela 2 - Atividade antioxidante de gelatina de limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18.

Formulação	DPPH (%)	ABTS (%)	Poder redutor (abs)
Controle	$11,5^{b} \pm 1,2$	$6,3^{d} \pm 1,1$	$0,152^{b} \pm 0,038$
2,5H	$35,7^{a} \pm 2,7$	$26,8^{a} \pm 3,2$	$0,245^{ab} \pm 0,033$
2,5HE	$38,5^{a} \pm 3,3$	$19,1^{bc} \pm 4,3$	$0,290^{a} \pm 0,076$
5H	$37,2^{a} \pm 0,9$	$22,8^{abc} \pm 5,5$	$0,298^{a} \pm 0,057$
5HE	$36,7^{a} \pm 3,1$	$17,5^{c} \pm 3,5$	$0,320^{a} \pm 0,007$
7,5H	$35,2^{a} \pm 3,8$	$26,0^{ab} \pm 2,2$	$0,338^{a} \pm 0,038$
7,5HE	$34,6^{a} \pm 3,2$	$20,0^{abc} \pm 2,9$	$0,352^{a} \pm 0,011$

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p>0,05). 2,5H: gelatina adicionada de 2,5 % de hidrolisado proteico livre; 2,5HE: gelatina adicionada de 2,5 % de hidrolisado proteico encapsulado; 5H: gelatina adicionada de 5 % de hidrolisado proteico livre; 5HE: gelatina adicionada de 5 % de hidrolisado proteico encapsulado; 7,5H: gelatina adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico livre; 7,5HE: gelatina adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico encapsulado.

3.2.2 Cor da sobremesa de gelatina sabor limão

As amostras adicionadas de hidrolisado proteico livre e encapsulado apresentaram coloração mais escura do que a amostra controle. Isso pode ser observado na Tabela 3, em que o parâmetro de luminosidade (*L**) diminuiu significativamente para as amostras contendo a maior concentração de hidrolisado proteico encapsulado (7,5HE) e não encapsulado (7,5H). A adição de até 5 % de hidrolisado, encapsulado ou não, não provocou diferença significativa no parâmetro de luminosidade *L**. Elevadas concentrações de biomassa de *Spirulina* também causaram diminuição de luminosidade de massas alimentícias nos estudos de Özyurt et al. (2015). Embora a luminosidade das amostras 7,5H e 7,5HE tenha sido menor do que a da amostra controle, não foi observada diferença significativa em relação as amostras que tiveram adição de hidrolisado proteico livre e encapsulado nas demais concentrações.

Os valores negativos de *a** e positivos de *b** indicam que as amostras tendem a tonalidade verde. Pode-se observar que a amostra 7,5H apresentou o menor valor de *a** *em* módulo indicando a maior diferença desse parâmetro em relação ao controle. Em comparação com a amostra adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico, porém encapsulado (amostra

7,5HE), pode-se dizer que o encapsulamento evitou que a adição de hidrolisado proteico interferisse na coloração da amostra controle, pois a amostra 7,5HE apresentou valor de *a** mais próximo ao controle do que a amostra 7,5H. Quanto maior o valor em módulo dos parâmetros *a** e *b** maior será a saturação da cor, que significa maior pureza da cor (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013). Logo, a amostra 7,5HE apresentou maior saturação da cor verde, do que a amostra 7,5H. Em relação a amostra controle, a amostra adicionada de 2,5% de hidrolisado proteico encapsulado não apresentou diferença significativa do valor *a**.

Tabela 3 - Parâmetros de cor de gelatina com e sem adição de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 encapsulados *em Nanospray dryer*.

Formulação	*L**	*a**	*b**	Cor
Controle	$54,91^{a} \pm 1,41$	$-31,19^{a} \pm 3,79$	$38,11^{a} \pm 3,50$	
2,5H	$50,74^{ab} \pm 3,63$	$-26,49^{bc} \pm 1,28$	$37,98^{a} \pm 1,62$	
2,5HE	$48,75^{ab} \pm 3,73$	$-29,46^{ab} \pm 1,74$	$38,54^{a} \pm 2,52$	
5H	$48,24^{ab} \pm 3,27$	$-19,63^{d} \pm 1,89$	$33,89^{a} \pm 3,39$	
5HE	$50,13^{ab} \pm 3,95$	$-24,03^{c} \pm 1,61$	$37,11^{a} \pm 2,15$	
7,5H	$37,61^{b} \pm 3,01$	$-14,53^{e} \pm 1,56$	$26,76^{b} \pm 3,53$	
7,5HE	$48,24^{b} \pm 4,02$	$-19,13^{d} \pm 1,88$	$33,98^{a} \pm 3,50$	

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p>0,05). 2,5H: gelatina adicionada de 2,5 % de hidrolisado proteico livre; 2,5HE: gelatina adicionada de 2,5 % de hidrolisado proteico encapsulado; 5H: gelatina adicionada de 5 % de hidrolisado proteico livre; 5HE: gelatina adicionada de 5 % de hidrolisado proteico encapsulado; 7,5H: gelatina adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico livre; 7,5HE: gelatina adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico encapsulado.

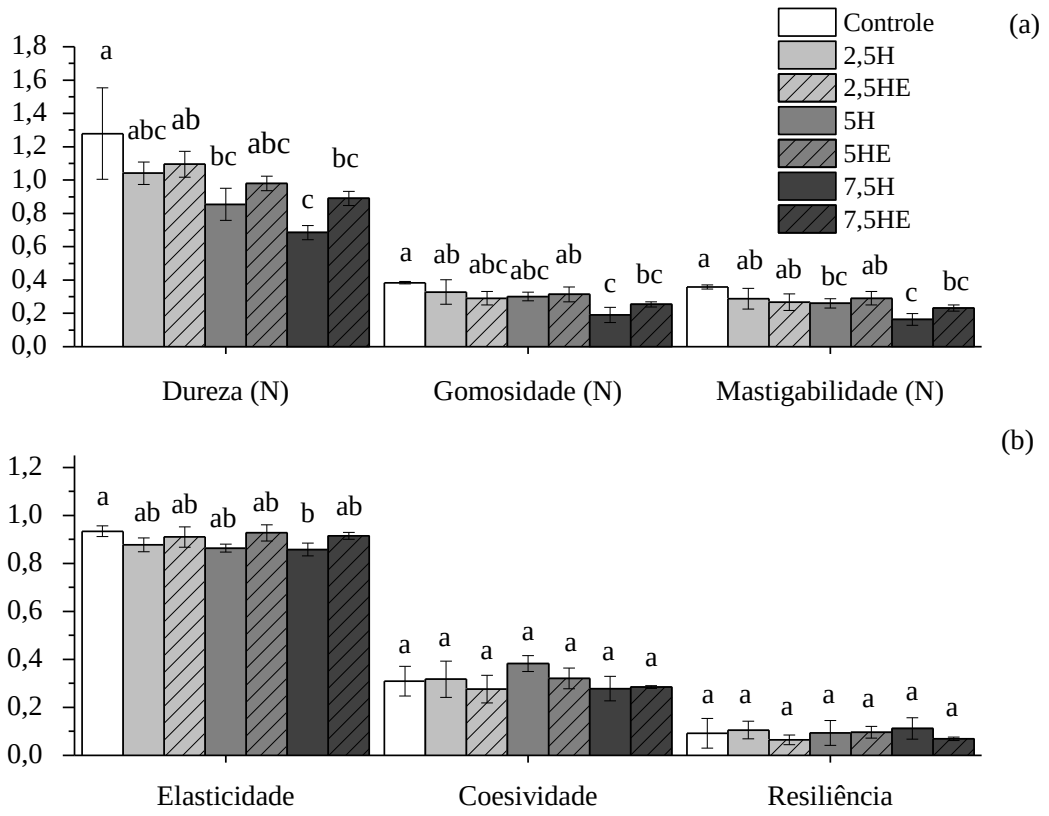
Com exceção da amostra 7,5H, o parâmetro de cor b* das demais amostras não diferiu significativamente em comparação com a amostra controle. O aumento da quantidade adicionada de hidrolisado proteico de Spirulina sp. LEB 18 pode ter causado a diminuição do valor de b*, o que significa que a gelatina apresentou maior intensidade de cor azul do que as demais amostras. Esse fator pode indicar a presença do hidrolisado proteico na amostra, o que não é desejável pois descaracteriza a coloração original da gelatina sabor limão. Isso não foi

observado nas amostras de gelatina adicionadas de hidrolisado proteico encapsulado em *nanospray dryer*.

3.2.3 Perfil de textura da sobremesa de gelatina sabor limão

O perfil de textura de amostras de gelatina foi avaliado para verificar se a adição de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 interfere nas características mecânicas do alimento e consequentemente nas características sensoriais. Observa-se que as propriedades de dureza, gomosidade e mastigabilidade não foram comprometidas com a incorporação de hidrolisado proteico encapsulado, nas concentrações de 2,5 % e 5 % comparados à amostra controle (Figura 5a).

Figura 5 - Perfil de textura de gelatina de limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18.



2,5H: gelatina adicionada de 2,5 % de hidrolisado proteico livre; 2,5HE: gelatina adicionada de 2,5 % de hidrolisado proteico encapsulado; 5H: gelatina adicionada de 5 % de hidrolisado proteico livre; 5HE: gelatina adicionada de 5 % de hidrolisado proteico encapsulado; 7,5H: gelatina adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico livre; 7,5HE: gelatina adicionada de 7,5 % de hidrolisado proteico encapsulado.

Além disso, a amostra 7,5H apresentou menor dureza, gomosidade e mastigabilidade do que a amostra 7,5HE. Isso indica que nessa concentração de hidrolisado proteico adicionada, o encapsulamento influenciou na textura, causando menor redução dessas propriedades comparado à amostra não encapsulada.

Para o parâmetro de elasticidade (Figura 5b), o encapsulamento do hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 foi capaz de manter a propriedade de elasticidade igual à amostra controle, mesmo na maior concentração de hidrolisado proteico adicionada. As propriedades de coesividade e resiliência das gelatinas de limão para todas as concentrações de hidrolisado proteico encapsulado e não encapsulado adicionadas foram significativamente iguais às propriedades da gelatina comercial.

4 CONCLUSÃO

O encapsulamento de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 aumentou a estabilidade da atividade antioxidante frente a condições de armazenamento e processamento de alimentos. Em condições simuladas do trato gastrointestinal, o hidrolisado proteico microalgal teve sua atividade antioxidante aumentada para todos os métodos de avaliação determinados. O encapsulamento do hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 em *nanospray dryer* evitou que a coloração da sobremesa comercial a base de gelatina fosse alterada com a adição deste, o que é promissor para a aceitação desse produto. Essas sobremesas adicionadas de hidrolisado proteico encapsulado tiveram sua atividade antioxidante aumentada, sem alterações relevantes nas propriedades de cor e textura. Alimentos adicionados de hidrolisados proteicos de microalgas são promissores para promoção de saúde aos consumidores. Os resultados deste estudo indicaram a estabilidade da bioatividade do hidrolisado proteico encapsulado frente ao armazenamento, processamento de alimentos e após sua digestão.

5 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AO, J.; LI, B. Stability and antioxidative activities of casein peptide fractions during simulated gastrointestinal digestion in vitro: Charge properties of peptides affect digestive stability. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 334–341, 2013.

BARBOSA, M. I. M. J.; SANTOS, R. B.; CHARÃO, K. DOS S.; SOUTO, R. M.; JÚNIOR, J. L. B. Desenvolvimento e análise sensorial de gelatina elaborada com frutas liofilizadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 129–136, 2013.

BERTÉ, K. A. S.; IZIDORO, D. R.; DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 354–360, 2011.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 118–129, 2013.

BOGUE, J.; COLLINS, O.; TROY, A. J. **Market analysis and concept development of functional foods**. In: Developing new functional food and nutraceutical products. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 2p. 29–45.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Resolução n° 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da União**, n° 82, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 mai. Seção 1, pg 11, 1999a.

CIAN, R. E.; CAMPOS-SOLDINI, A.; CHEL-GUERRERO, L.; DRAGO, S. R.; BETANCUR-ANCONA, D. Bioactive *Phaseolus lunatus* peptides release from maltodextrin/gum arabic microcapsules obtained by spray drying after simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 2002–2009, 2019.

CIE. **Colorimetry**. 2. ed. Wien, Austria: Commission International de l'Éclairage, 1986.

GIROUX, H. J.; ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M. Controlled release of casein-derived peptides in the gastrointestinal environment by encapsulation in water-in-oil-in-water double emulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 225–232, 2016.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LAGARÓN, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrosprayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 42–52, 2015.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MIRALLES, B.; RECIO, I.; LÓPEZ-RUBIO, A. Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 290–300, 2016.

GRAND VIEW RESEARCH. **Bioactive Ingredient Market Size to Reach $51.71 Billion By 2024**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-bioactive-ingredients-market>. Acesso em: 25 abr. 2020.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 665–671, 2005.

HEO, S.-Y.; KO, S.-C.; KIM, C.; OH, G.-W.; RYU, B.; QIAN, Z.; KIM, G.; PARK, W.; CHOI, I.-W.; PHAN, T.; HEO, S.-J.; KANG, D.-H.; YI, M.; JUNG, W.-K. A heptameric peptide purified from *Spirulina* sp. gastrointestinal hydrolysate inhibits angiotensin I-converting enzyme- and angiotensin II-induced vascular dysfunction in human endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, p. 1072–1082, 2017.

HORUZ, T I.; BELIBAĞLI, K. B. Nanoencapsulation by electrospinning to improve stability and water solubility of carotenoids extracted from tomato peels. **Food Chemistry**, v. 268, p. 86–93, 2018.

JANG, H. L.; LICEAGA, A. M.; YOON, K. Y. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 433–442, 2016.

KANG, K.-H.; KIM, S.-K. Beneficial effect of peptides from microalgae on anticancer. **Current protein & peptide science**, v. 14, n. 3, p. 212–7, 2013.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade nanoemulsion filled hydrogels formed by spontaneous emulsification and gelation: Optical properties, rheology, and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 67–75, 2015.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; COSTA, J. A. V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 3, p. 79–86, 2016.

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, n. 2, p. 403–410, 2010.

LIU, Y.; WAN, S.; LIU, J.; ZOU, Y.; LIAO, S. Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkmoth. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, 2017.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.

McGEE, H. **On food and cooking: the science and lore of the kitchen**. New York: Scribner, 2004.

MOHAN, A.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; HE, Q. S.; BAZINET, L.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 97, p. 79270–79278, 2015.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

ÖZYURT, G.; USLU, L.; YUVKA, I.; GÖKDOGAN, S.; ACTI, G.; AK, B.; ISIK, O. Evaluation of the cooking quality characteristics of pasta enriched with *Spirulina platensis*. **Journal of Food Quality**, v. 38, p. 268–272, 2015.

PALAZZO, A. B. **Análise tempo-intensidade, perfil descritivo e estudo de consumidor de gelatinas tradicionais e diet sabor framboesa.** 2008. 91 f. (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 1, p. 36–60, 2013.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 47, p. 187–194, 2018.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 10, p. 4543–4551, 2019.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

SADAT, L.; CAKIR-KIEFER, C.; N'NEGUE, M. A.; GAILLARD, J. L.; GIRARDET, J. M.; MICLO, L. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α-lactalbumin. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 214–221, 2011.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–254, 2011.

SHEIH, I. C.; FANG, T. J.; WU, T. K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 279–284, 2009.

SHI, C.; LI, T.; HUANG, J.; KHAN, I. A.; HUANG, M.; ZHOU, G. Effect of processing conditions and simulated gastrointestinal digestion on the activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from duck meat hydrolysate. **CyTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 393–399, 2019.

SILVA, D. M.; VYAS, H. K. N.; SANDERSON-SMITH, M. L.; SENCADAS, V. Development and optimization of ciprofloxacin-loaded gelatin microparticles by single-step spray-drying technique. **Powder Technology**, v. 330, p. 201–209, 2018.

VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1336–1346, 2013.

WANG, Y.; BAMDAD, F.; SONG, Y.; CHEN, L. Hydrogel particles and other novel protein-based methods for food ingredient and nutraceutical delivery systems. In: **Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals**. [s.l.] Elsevier Masson SAS., 2012. p. 412–450.

XIA, Q.; GU, M.; LIU, J.; NIU, Y.; YU, L. Novel composite gels of gelatin and soluble dietary fiber from black bean coats with interpenetrating polymer networks. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 72–78, 2018.

YEN, G.-C.; CHEN, H.-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 43, p. 27–32, 1995.

ZHU, C. Z.; ZHANG, W. G.; KANG, Z. L.; ZHOU, G. H.; XU, X. L. Stability of an antioxidant peptide extracted from *Jinhua ham*. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 783–789, 2014.

ZHU, L.; JIE, C.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 2008.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

Os hidrolisados proteicos obtidos da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 possuem potencial para proporcionar atividade biológica aos alimentos pois mesmo após passarem por condições de processamento e armazenamento de alimentos conferem atividade antioxidante, tanto na sua forma livre quanto encapsulada. A escolha da sua forma livre ou encapsulada para adição em alimentos dependerá da aplicação desejada em função de sua estabilidade.

O processo de encapsulamento em *spray dryer* e *nanospray dryer* protegeu a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de *Spirulina*. Em relação às propriedades físico químicas, térmicas e morfológicas, o encapsulamento do hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação em *nanospray dryer* apresentou melhores resultados do que o encapsulamento em *spray dryer*. Além disso, proporcionou a estabilidade da atividade antioxidante deste hidrolisado em diferentes pH, tratamentos térmicos, concentrações de cloreto de sódio e após a ação de enzimas digestivas. Portanto, o encapsulamento mediante secagem por atomização de hidrolisados proteicos de *Spirulina* em *nanospray dryer* é promissor para a indústria alimentícia.

A incorporação do hidrolisado proteico de *Spirulina* encapsulado em sobremesa de gelatina sabor limão conferiu atividade antioxidante a este alimento, protegendo suas características de coloração e textura. Com esses resultados de características sensoriais aliados à estabilidade da atividade antioxidante que esses compostos ativos possuem, é possível concluir que o desenvolvimento de alimentos adicionados de hidrolisados proteicos de microalgas é favorável ao mercado de produtos alimentícios que proporcionem benefícios à saúde.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEL, M.; YEGANEH, S.; DADAR, M.; SAKAI, M.; DAWOOD, M. A. O. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 436–444, 2016.

ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P.; AGBOOLA, S. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3–4, p. 1435–1443, 2013.

AIHARA, K.; OSAKA, M.; YOSHIDA, M. Oral administration of the milk casein-derived tripeptide Val-Pro-Pro attenuates high-fat diet-induced adipose tissue inflammation in mice. **The British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 4, p. 513–9, 2014.

AKBARBAGLU, Z.; MAHDI JAFARI, S.; SARABANDI, K.; MOHAMMADI, M.; KHAKBAZ HESHMATI, M.; PEZESHKI, A. Influence of spray drying encapsulation on the retention of antioxidant properties and microstructure of flaxseed protein hydrolysates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, p. 421–429, 2019.

ALEHOSSEINI, A.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MARTÍNEZ-SANZ, M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrospun curcumin-loaded protein nanofiber mats as active/bioactive coatings for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 758–771, 2019.

ALI, O. M.; HASHEM, Y.; BEKHIT, A. A.; KHATTAB, S. N.; ELKHODAIRY, K. A.; FREAG, M. S.; TELEB, M.; ELZOGHBY, A. O. Nanostructures of gelatin for encapsulation of food ingredients. In: **Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 189–216.

ALMEIDA, C. C.; MONTEIRO, M. L. G.; COSTA-LIMA, B. R. C. DA; ALVARES, T. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 7–11, 2015.

AMARA, C. BEN; EGHBAL, N.; DEGRAEVE, P.; GHARSALLAOUI, A. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 50–57, 2016.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; ISHWARYA, S. P. **Essentials and Applications of Food Engineering**. 1. ed. Boca Raton : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2019.: CRC Press, 2019.

AO, J.; LI, B. Stability and antioxidative activities of casein peptide fractions during simulated gastrointestinal digestion in vitro: Charge properties of peptides affect digestive stability. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 334–341, 2013.

AOAC. **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists international**. 17. ed. Washington: D. C., 2000.

ARPAGAUS, C.; JOHN, P.; COLLENBERG, A.; RÜTTI, D. Nanocapsules formation by nano spray drying. *In*: JAFARI Said. **Nanoencapsulation Technologies for the Food and**

Nutraceutical Industries. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 346–401.

ARRIBAS, C.; CABELLOS, B.; CUADRADO, C.; GUILLAMÓN, E.; PEDROSA, M. M. Extrusion effect on proximate composition, starch and dietary fibre of ready-to-eat products based on rice fortified with carob fruit and bean. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, p. 387–393, 2019.

ASADUZZAMAN, A. K. M.; CHUN, B. S. Recovery of functional materials with thermally stable antioxidative properties in squid muscle hydrolyzates by subcritical water. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 793–802, 2015.

ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 103–131, 2019.

BARBOSA, M. I. M. J.; SANTOS, R. B.; CHARÃO, K. DOS S.; SOUTO, R. M.; JÚNIOR, J. L. B. Desenvolvimento e análise sensorial de gelatina elaborada com frutas liofilizadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 129–136, 2013.

BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; FRADINHO, P.; FRAGOSO, S.; BURSIC, I.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. **Algal Research**, v. 26, p. 161–171, 2017.

BEHESHTIPOUR, H.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; KHOSRAVI-DARANI, K. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 2, p. 144–154, 2013.

BELAY, A.; HOUSTON, M. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27–48, 2002.

BERNAERTS, T. M. M; PANOZZO, A.; DOUMEN, V.; FOUBERT, I.; GHEYSEN, L.; GOIRIS, K.; MOLDENAERDS, P.; HENDRICKX, M. E.; LOEY, A. M. V. Microalgal biomass as a (multi) functional ingredient in food products: rheological properties of microalgal suspensions as affected by mechanical and thermal processing. **Algal research**, v. 25, p. 452-463, 2017.

BERTÉ, K. A. S.; IZIDORO, D. R.; DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 2, p. 354–360, 2011.

BHUSHANI, A. J.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 21–33, 2014.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 118–129, 2013.

BIZZOTO, C. S.; CAPOBIONGO, M.; BIASUTTI, A. R.; SILVA, V. D. M.; JUNQUEIRA,

R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase e uso do carvão ativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 308–316, 2006.

BOGUE, J.; COLLINS, O.; TROY, A. J. Market analysis and concept development of functional foods. In: **Developing New Functional Food and Nutraceutical Products**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 2p. 29–45.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Resolução n° 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da União**, n° 82, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 mai. Seção 1, pg 11, 1999a.

BRASIL. Resolução n° 18, de 30 de abril de 1999 - Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, n°82, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 mai. Seção 1, pg 12, 1999b.

BRASIL. Resolução nº 388, de 5 de agosto de 1999. Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 19 - sobremesas. **Diário Oficial da União,** n°151, Agência Nacional de Viglância Sanitária, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 ago. Seção 1, pg 77, 1999c.

BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde**. Diário Oficial da União**, n°6, Agência Nacional de Viglância Sanitária, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jan. Seção 1, pg 191, 2002.

BRASIL. Resolução RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para misturas para o preparo de alimentos e alimentos prontos para o consumo**. Diário Oficial da União**, n°184, Agência Nacional de Viglância Sanitária, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. Seção 1, pg 375, 2005.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011.

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, n. 1–2, p. 248–256, 2011.

CARVALHO, L. F.; MOREIRA, J. B.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Acceptance of novel foods for physical activity practitioners formulated with *Spirulina*. **IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 2, n. 4, p. 7–11, 2016.

CARVALHO, L. F.; MOREIRA, J. B.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Novel food supplements formulated with *Spirulina* to meet athletes' needs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 1–11, 2017.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 2, p. 317–328, 2014.

CHAY, S. Y.; TAN, W. K.; SAARI, N. Preparation and characterisation of nanoliposomes containing winged bean seeds bioactive peptides. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 5, p. 488–495, 2015.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural-analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 574–578, mar. 1995.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. **Food protein-based materials as nutraceutical delivery systemsTrends in Food Science and Technology**, 2006.

CHRONAKIS, I. S.; MADSEN, M. Algal proteins. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Handbook of Food Protein**. [s.l.] Woodhead Publishing Series in Food Sciences, Technology and Nutrition, 2011. p. 353–394.

CHU, J.; ZHAO, H.; LU, Z.; LU, F.; BIE, X.; ZHANG, C. Improved physicochemical and functional properties of dietary fiber from millet bran fermented by *Bacillus natto*. **Food Chemistry**, v. 294, p. 79–86, 2019.

CIAN, R. E.; CAMPOS-SOLDINI, A.; CHEL-GUERRERO, L.; DRAGO, S. R.; BETANCUR-ANCONA, D. Bioactive Phaseolus lunatus peptides release from maltodextrin/gum arabic microcapsules obtained by spray drying after simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 2002–2009, 2019.

CIE. **Colorimetry**. 2. ed. Wien, Austria: Commission International de l'Éclairage, 1986.

COCA, M.; BARROCAL, V. M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306–312, 2015.

COX, M. M.; LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. Princípios de bioquímica. **São Paulo**, 2006.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; AGUILAR-HERNANDEZ, I.; CARDENAS-CHAVEZ, D. L.; ORNELAS-SOTO, N.; ROMERO-OGAWA, M. A.; PARRA-SALDIVAR, R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 190–209, 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: editora Artmed, 2010.

DE QUADROS, C. D. C.; LIMA, K. O.; BUENO, C. H. L.; FOGAÇA, F. H. DOS S.; DA ROCHA, M.; PRENTICE, C. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of

protein hydrolysates and peptide fractions derived from *Colossoma macropomum* and their effect on ground beef lipid oxidation. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 28, n. 6, p. 677–688, 2019.

DÉCOMBAZ, J. Protéines et acides aminés dans la récupération post-effort. **Science and Sports**, v. 19, n. 5, p. 228–233, 2004.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 2, p. 179–192, 2005.

DILLON, J. C.; PHUN, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional Value of the Alga *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Diets**, v. 77, p. 32–46, 1995.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1908–1914, 2011.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 1127–1134, 2013.

EL-TANTAWY, W. H. Antioxidant effects of *Spirulina* supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 0–4, 2015.

ELZOGHBY, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1075–1091, 2013.

ESFANJANI, A. F.; JAFARI, S. M. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 532–543, 2016.

ESFANJANI, A. F.; JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; MOHAMMADI, A. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 149–155, 2015.

EUSSEN, S. R. B. M.; VERHAGEN, H.; KLUNGEL, O. H.; GARSSEN, J.; VAN LOVEREN, H.; VAN KRANEN, H. J.; ROMPELBERG, C. J. M. Functional foods and dietary supplements: Products at the interface between pharma and nutrition. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 52–59, 2011.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for Food Bioactive components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628–647, 2013.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FANG, Z.; BHANDARI, B. **Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation**. Oxford: Elsevier Masson SAS., 2012. v. 239

FARVIN, K. H. S.; ANDERSEN, L. L.; OTTE, J.; NIELSEN, H. H.; JESSEN, F.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 204, p. 409–419, 2016.

FATHI, M.; MARTÍN, Á.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 18–39, 2014.

FIGUEIRA, F. D. S.; CRIZEL, T. DE M.; SILVA, C. R.; SALAS-MELLADO, M. DE LAS M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 4, p. 308–316, 2011.

FLORES, F. P.; SINGH, R. K.; KONG, F. Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. **Journal of Food Engineering**, v. 137, p. 1–6, 2014.

FOX, R. D. ***Spirulina*: Production & Potential**. France: Edsud, 1996.

FRADINHO, P.; NICCOLAI, A.; SOARES, R.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. Effect of Arthrospira platensis (*Spirulina*) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. **Algal Research**, v. 45, 2020.

FRADIQUE, ḾONICA; BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; RAYMUNDO, A. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1656–1664, 2010.

FREITAS, B. C. B.; SANTOS, T. D.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Novel foods: A meal replacement shake and a high-calorie food supplemented with *Spirulina* biomass. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 1, p. 59–65, 2019.

FRYDENBERG, R. P.; HAMMERSHØJ, M.; ANDERSEN, U.; GREVE, M. T.; WIKING, L. Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. **Food Chemistry**, v. 192, p. 415–423, 2016.

GALLARDO, G.; GUIDA, L.; MARTINEZ, V.; LÓPEZ, M. C.; BERNHARDT, D.; BLASCO, R.; PEDROZA-ISLAS, R.; HERMIDA, L. G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 473–482, 2013.

GARCÍA-MORA, P.; MARTÍN-MARTÍNEZ, M.; ANGELES BONACHE, M.; GONZÁLEZ-MÚNIZ, R.; PEÑAS, E.; FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C. Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 221, p. 464–472, 2017.

GARCÍA, J.; MÉNDEZ, D.; ÁLVAREZ, M.; SANMARTIN, B.; VAZQUEZ SOBRADO, R.; REGUEIRO, L.; ATANASSOVA, M. Design of novel functional food products enriched

with bioactive extracts from holothurians for meeting the nutritional needs of the elderly. **LWT - Food Science and Technology**, v. 109, n. 16, p. 55–62, 2019.

GIACONIA, M. A.; RAMOS, S. DOS P.; PEREIRA, C. F.; LEMES, A. C.; DE ROSSO, V. V.; CAVALCANTE BRAGA, A. R. Overcoming restrictions of bioactive compounds biological effects in food using nanometer-sized structures. **Food Hydrocolloids**, v. In press, p. 105939, 2020.

GIROUX, H. J.; ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M. Controlled release of casein-derived peptides in the gastrointestinal environment by encapsulation in water-in-oil-in-water double emulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 225–232, 2016.

GRAND VIEW RESEARCH. **Bioactive Ingredient Market Size to Reach $51.71 Billion By 2024**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-bioactive-ingredients-market>. Acesso em: 25 abr. 2020.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 665–671, 2005.

GOLDBERG, I. **Functional Foods : Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals**. [s.l.] Springer US, 1994.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LAGARÓN, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrosprayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 42–52, 2015.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MÉNDEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, M.; VÁZQUEZ, B.; SAN ROMÁN, J. Oxidized dextrins as alternative crosslinking agents for polysaccharides: Application to hydrogels of agarose–chitosan. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 798–811, 2014.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MIRALLES, B.; RECIO, I.; LÓPEZ-RUBIO, A. Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 290–300, 2016a.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MIRALLES, B.; RECIO, I.; LÓPEZ-RUBIO, A. Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 290–300, 2016b.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; RAYMUNDO, A.; BANDARRA, N. *Spirulina maxima* and *Diacronema vlkianum* microalgae in vegetable gelled desserts. **Nutrition & Food Science**, v. 38, n. 5, p. 492–501, 2008.

HAUG, I. J.; DRAGET, K. I. Gelatin. **Handbook of Food Proteins**, p. 92–115, 2011.

HEO, S. Y.; KO, S. C.; KIM, C.; OH, G. W.; RYU, B.; QIAN, Z.; KIM, G.; PARK, W.; CHOI, I. W.; PHAN, T.; HEO, S. J.; KANG, D. H.; YI, M.; JUNG, W. K. A heptameric peptide purified from *Spirulina* sp. gastrointestinal hydrolysate inhibits angiotensin I-converting enzyme- and angiotensin II-induced vascular dysfunction in human endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, p. 1072–1082, 2017.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. D. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 543–597, 2011.

HOLKEM, A. T.; CODEVILLA, C. F.; BONA, C. DE; MENEZES, C. R. DE. Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 87–96, 2015.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 76–79, 1994.

HORUZ, T. Í; BELIBAĞLI, K. B. Nanoencapsulation by electrospinning to improve stability and water solubility of carotenoids extracted from tomato peels. **Food Chemistry**, v. 268, p. 86–93, 2018.

JAFARI, S. M.; VAKILI, S.; DEHNAD, D. Production of a functional yogurt powder fortified with nanoliposomal vitamin D through Spray Drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 7, p. 1220–1231, 2019.

JAMDAR, S. N.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M. D.; JUAN, F.; YARDI, V.; SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 178–184, 2010.

JANG, H. L.; LICEAGA, A. M.; YOON, K. Y. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 433–442, 2016.

JI, N.; SUN, C.; ZHAO, Y.; XIONG, L.; SUN, Q. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 161, n. 10, p. 148–154, 2014.

JIANG, S.; LIU, S.; ZHAO, C.; WU, C. Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDa with Minigel Electrophoresis System. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 11, p. 640–649, 2016.

JIANGSU TAYACN DRYING TECHNOLOGY, 2013. **ZLPG Series Herbal Extract Spray Dryer**. Disponível em: < https://xrhwtg.com/product/110.html>. Acesso em: 07, maio de 2020.

KAKRAN, M.; ANTIPINA, M. N. Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 18, p. 47–55, 2014.

KANG, K.-H.; KIM, S.-K. Beneficial effect of peptides from microalgae on anticancer. **Current protein & peptide science**, v. 14, n. 3, p. 212–7, 2013.

KETNAWA, S.; BENJAKUL, S.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; RAWDKUEN, S. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. **Food Chemistry**, v. 215, p. 383–390, 2017.

KO, S. C.; KANG, N.; KIM, E.-A.; KANG, M. C.; LEE, S. H.; KANG, S. M.; LEE, J. B.; JEON, B. T.; KIM, S. K.; PARK, S. J.; PARK, P. J.; JUNG, W. K.; KIM, D.; JEON, Y. J. A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2005–2011, 2012.

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, n. 7, p. 2294–2302, 2012.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade nanoemulsion filled hydrogels formed by spontaneous emulsification and gelation: Optical properties, rheology, and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 67–75, 2015.

KONG, B.; PENG, X.; XIONG, Y. L.; ZHAO, X. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 540–547, 2012.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 131–139, 2000.

KWAK, H.-S. Overview of Nano- and Microencapsulation for Foods. In: **Nano- and Microencapsulation for Foods**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 1–14.

LAFARGA, T.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; CASTELLARI, M.; VILLARÓ, S.; BOBO, G.; AGUILÓ-AGUAYO, I. Effect of microalgae incorporation on the physicochemical, nutritional, and sensorial properties of an innovative broccoli soup. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, p. 167–174, 2019a.

LAFARGA, T.; MAYRE, E.; ECHEVERRIA, G.; VIÑAS, I.; VILLARÓ, S.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; CASTELLARI, M.; AGUILÓ-AGUAYO, I. Potential of the microalgae *Nannochloropsis* and *Tetraselmis* for being used as innovative ingredients in baked goods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 115, p. 108439, 2019b.

LAKKIS, J. M. **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2007.

LEE, S. H.; HENG, D.; NG, W. K.; CHAN, H. K.; TAN, R. B. H. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 192–200, 2011.

LI-CHAN, E. C. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 28–37, 2015.

LI, H.; THUY HO, V. T.; TURNER, M. S.; DHITAL, S. Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* in porous maize starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 542–549, 2016.

LI, Z.; WANG, B.; CHI, C.; GONG, Y.; LUO, H.; DING, G. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 283–293, 2013.

LILLEFOSSE, H. H.; TASTESEN, H. S.; DU, Z.-Y.; DITLEV, D. B.; THORSEN, F. A; MADSEN, L.; KRISTIANSEN, K.; LIASET, B. Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 9, p. 1367–75, 2013.

LIMA, K. O.; DA COSTA DE QUADROS, C.; ROCHA, M. DA; JOCELINO GOMES DE LACERDA, J. T.; JULIANO, M. A.; DIAS, M.; MENDES, M. A.; PRENTICE, C. Bioactivity and bioaccessibility of protein hydrolyzates from industrial byproducts of Stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, p. 408–413, 2019.

LIMA, E. R; OLIVEIRA, R. A.; AMBROSIO-UGRI, M. C. B.; BARROS, S. T. D.; JÚNIOR, C. B. Recuperação da solução de soda cáustica usada no tratamento do couro bovino na produção de gelatina. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 98-106, 2008.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; COSTA, J. A. V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp . LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 3, p. 79–86, 2016.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P.; COSTA, J. A. V. Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 5, p. 29–38, 2014.

LIU, J.; JIN, Y.; LIN, S.; JONES, G. S.; CHEN, F. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 175, p. 258–266, 2015.

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, n. 2, p. 403–410, 2010.

LIU, X.; LIU, J.; ZHANG, W.; HAN, S.; ZHANG, T.; LIU, B. Electron beam irradiation-induced structural changes increase the antioxidant activities of egg white protein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, p. 846–852, 2019.

LIU, Y.; WAN, S.; LIU, J.; ZOU, Y.; LIAO, S. Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkmoth. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G. DE; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 270–276, 2018.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.

MACHADO, F. R. S.; TREVISOL, T. C.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Technological process for cell disruption, extraction and encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 108–114, 2016.

MACIEL, G. M.; CHAVES, K. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 4, p. 1991–8, 2014.

MANI-LÓPEZ, E.; JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Viability of Lactobacillus fermentum microencapsulated in flavoured alginate beads and added to a gelatine dessert. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 447–453, 2017.

MARCO, E. R.; STEFFOLANI, M. E.; MARTÍNEZ, C. S.; LEÓN, A. E. Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 102–108, 2014.

MARSANASCO, M.; PIOTRKOWSKI, B.; CALABRÓ, V.; DEL VALLE ALONSO, S.; CHIARAMONI, N. S. Bioactive constituents in liposomes incorporated in orange juice as new functional food: thermal stability, rheological and organoleptic properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7828–7838, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. **Advances in colloid and interface science**, v. 253, p. 1-22, 2018.

McGEE, H. **On food and cooking: the science and lore of the kitchen**. New York: Scribner, 2004.

MINIC, S. L.; STANIC-VUCINIC, D.; MIHAILOVIC, J.; KRSTIC, M.; NIKOLIC, M. R.; CIRKOVIC VELICKOVIC, T. Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycocyanin, a blue-colored biliprotein of microalga *Spirulina*. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 132–139, 2016.

MIZUNO, A. Electrostatic precipitation. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 7, n. 5, p. 615–624, 2000.

MOBLEY, C.; FOX, C. D.; FERGUSON, B. S.; PASCOE, C. A.; HEALY, J. C.; MCADAM, J. S.; LOCKWOOD, C. M.; ROBERTS, M. D. Effects of protein type and composition on postprandial markers of skeletal muscle anabolism, adipose tissue lipolysis, and hypothalamic gene expression. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 14, 2015.

MOHAN, A.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; HE, Q. S.; BAZINET, L.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 97, p. 79270–79278, 2015.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de cholocate enriquecidos com *Spirulina platensis*: Características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 323–328, 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, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. D. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1–2, p. 144–150, 2008.

NAIR, H. B.; SUNG, B.; YADAV, V. R.; KANNAPPAN, R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1833–1843, 2010.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806–1815, 2011.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Comparative study of encapsulation of vitamins with native and modified soy protein. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 172–179, 2014.

NIEUWENHOVE, C. P. V; MOYANO, A.; CASTRO-GÓMEZ, P.; FONTECHA, J.; SÁEZ, G.; ZÁRATE, G.; PIZARRO, P. L. Comparative study of pomegranate and jacaranda seeds as functional components for the conjugated linolenic acid enrichment of yogurt. **LWT - Food Science and Technology-Food Science and Technology**, v. 111, p. 401–407, 2019.

NOGUEIRA, M. B.; PRESTES, C. F.; BURKERT, J. F. DE M. Microencapsulation by lyophilization of carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* with soy protein as the encapsulating agent. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 1–4, 2017.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

ÖZYURT, G.; USLU, L.; YUVKA, I.; GÖKDOGAN, S.; ACTI, G.; AK, B.; ISIK, O. Evaluation of the cooking quality characteristics of pasta enriched with *Spirulina platensis*. **Journal of Food Quality**, v. 38, p. 268–272, 2015.

PALAZZO, A. B. **Análise tempo-intensidade, perfil descritivo e estudo de consumidor de gelatinas tradicionais e diet sabor framboesa.** 2008. 91 f. (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

PAN, H.; SHE, X.; WU, H.; MA, J.; REN, D.; LU, J. Long-term regulation of the local renin-

angiotensin system in the myocardium of spontaneously hypertensive rats by feeding bioactive peptides derived from *Spirulina platensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7765–7774, 2015.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 1, p. 36–60, 2013.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 156–164, 2007.

PENNINGS, B.; KOOPMAN, R.; BEELEN, M.; SENDEN, J. M. G.; SARIS, W. H. M.; LOON, L. J. C. VAN. Exercising before protein intake allows for greater use of dietary protein – derived amino acids for de novo muscle protein synthesis in both young and elderly men 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, p. 322–331, 2011.

PENTERICH, V. R. A.; MATTÉ, M. H.; YANG, A. C.; CASTRO, F. F. M.; KALIL, J.; PINTO, M. E. M. S. Development of an infant formula with chicken hydrolysate for children from 0 to 12 months with adverse reaction to milk. **Supplement**, 2010.

PEDROZO, R. C.; ANTÔNIO, E.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Bovine serum albumin–based nanoparticles containing the flavonoid rutin produced by nano spray drying. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 1–8, 2020.

PEREIRA, A. M. **Obtenção de concentrado, isolado e hidrolisado protéico a partir de biomassa de *Spirulina***. 2016. 150 f. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 47, p. 187–194, 2018.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 10, p. 4543–4551, 2019.

PÉREZ-MASIÁ, R.; LÓPEZ-NICOLÁS, R.; PERIAGO, M. J.; ROS, G.; LAGARON, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. **Food Chemistry**, v. 168, p. 124–133, 2015.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 9, p. 347–356, 2000.

QUAGLIA, F.; OSTACOLO, L.; MAZZAGLIA, A.; VILLARI, V.; ZACCARIA, D.; SCIORTINO, M. T. The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 30, n. 3, p. 374–382, 2009.

RADMER, R. J.; PARKER, B. C. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 93–98, 1994.

RAJABI, H.; GHORBANI, M.; JAFARI, S. M.; SADEGHI MAHOONAK, A.; RAJABZADEH, G. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 327–337, 2015.

RAO, P. S.; BAJAJ, R. K.; MANN, B.; ARORA, S.; TOMAR, S. K. Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin–gum arabic blend. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 3834–3843, 2016.

RAYO-MENDEZ, L. M.; GÓMEZ, A. V.; TADINI, C. C. Extraction of soluble sugars from banana puree to obtain a matrix rich in non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 294, p. 539–546, 2019.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

REDDY, M. N. P.; ISHWARYA, S. P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation of roasted coffee bean oil in whey protein wall system through nanospray drying. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 3, p. 1–8, 2019.

REZVANI, M.; HESARI, J.; PEIGHAMBARDOUST, S. H.; MANCONI, M.; HAMISHEHKAR, H.; ESCRIBANO-FERRER, E. Potential application of nanovesicles (niosomes and liposomes) for fortification of functional beverages with Isoleucine-Proline-Proline: A comparative study with central composite design approach. **Food Chemistry**, v. 293, p. 368–377, 2019.

ROCHA, G. A.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microcapsules of a Casein Hydrolysate: Production, Characterization, and Application in Protein Bars. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 4, p. 407–413, 2009.

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, n. 3, p. 468–474, 2005.

SADAT, L.; CAKIR-KIEFER, C.; N'NEGUE, M. A.; GAILLARD, J. L.; GIRARDET, J. M.; MICLO, L. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α-lactalbumin. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 214–221, 2011.

SÁEZ, M. I.; BARROS, A. M.; VIZCAÍNO, A. J.; LÓPEZ, G.; ALARCÓN, F. J.; MARTÍNEZ, T. F. Effect of alginate and chitosan encapsulation on the fate of BSA protein delivered orally to gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 114–124, 2015.

SAMARAKOON, K. W.; JEON, Y.-J. J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 948–960, 2012.

SAMARAKOON, K. W.; O-NAM, K.; KO, J. Y.; LEE, J. H.; KANG, M. C.; KIM, D.; LEE, J. B.; LEE, J. S.; JEON, Y. J. Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae *(Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 5, p. 1595–1606, 2013.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–254, 2011.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2047–2052, 2004.

SANTOS, R. R.; ARAÚJO, O. DE Q. F.; DE MEDEIROS, J. L.; CHALOUB, R. M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38–48, 2016a.

SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B. DE; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 37, n. B, p. 216–220, 2016b.

SARABANDI, K.; JAFARI, S. M.; MOHAMMADI, M.; AKBARBAGLU, Z.; PEZESHKI, A.; KHAKBAZ HESHMATI, M. Production of reconstitutable nanoliposomes loaded with flaxseed protein hydrolysates: Stability and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 442–450, 2019.

SARABANDI, K.; SADEGHI MAHOONAK, A.; HAMISHEKAR, H.; GHORBANI, M.; JAFARI, S. M. Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties. **Journal of Food Engineering**, v. 237, p. 86–95, 2018.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

SCHÄGGER, H. Tricine–SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D.; HERNANDEZ-ESCALANTE, V. M. Bioavailability of bioactive peptides. **Food Reviews International**, v. 27, n. 3, p. 213–226, 2011.

SHABESTARIAN, H.; HOMAYOUNI-TABRIZI, M.; SOLTANI, M.; NAMVAR, F.; AZIZI, S.; MOHAMAD, R.; SHABESTARIAN, H. Green synthesis of gold nanoparticles using sumac aqueous extract and their antioxidant activity. **Materials Research**, v. 20, n. 1, p. 264–270, 2017.

SHAHGHOLIAN, N.; RAJABZADEH, G. Fabrication and characterization of curcumin-loaded albumin/gum arabic coacervate. **Food Hydrocolloids**, v. 59, p. 17–25, 2016.

SHAZLY, A. B.; HE, Z.; EL-AZIZ, M. A.; ZENG, M.; ZHANG, S.; QIN, F.; CHEN, J. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 232, p. 753–762, 2017.

SHEIH, I. C.; FANG, T. J.; WU, T. K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**,

v. 115, n. 1, p. 279–284, 2009.

SHEIH, I. C.; FANG, T. J.; WU, T. K.; LIN, P. H. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1202–1207, 2010.

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, n. 13, p. 3419–3425, 2009.

SHI, C.; LI, T.; HUANG, J.; KHAN, I. A.; HUANG, M.; ZHOU, G. Effect of processing conditions and simulated gastrointestinal digestion on the activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from duck meat hydrolysate. **CyTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 393–399, 2019.

SIKIRU, A. B.; ARANGASAMY, A.; ALEMEDE, I. C.; GUVVALA, P. R.; EGENA, S. S. A.; IPPALA, J. R.; BHATTA, R. *Chlorella vulgaris* supplementation effects on performances, oxidative stress and antioxidant genes expression in liver and ovaries of New Zealand White rabbits. **Heliyon**, v. 5, n. 9, 2019.

SILVA, D. M.; VYAS, H. K. N.; SANDERSON-SMITH, M. L.; SENCADAS, V. Development and optimization of ciprofloxacin-loaded gelatin microparticles by single-step spray-drying technique. **Powder Technology**, v. 330, p. 201–209, 2018.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 9, p. 1254–1276, 2011.

SOARES, J. C.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; MASSARIOLI, A. P.; DA SILVA, C. F.; NANI, B. D.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S. M. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178–188, 2019.

SONTAKKE, S. B.; JUNG, J.; PIAO, Z.; CHUNG, H. J. Orally Available Collagen Tripeptide: Enzymatic Stability, Intestinal Permeability, and Absorption of Gly-Pro-Hyp and Pro-Hyp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 38, p. 7127–7133, 2016.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p. 40–54, 2015.

TACHAPRUTINUN, A.; UDOMSUP, T.; LUADTHONG, C.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, n. 1–2, p. 119–124, 2009.

TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K.; YEGANEH, S. The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 396–399, p. 14–19, 2013.

TYLINGO, R.; MANIA, S.; SZWACKI, J. A novel method for drop in drop edible oils encapsulation with chitosan using a coaxial technique. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 64–72, 2016.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

VERMEIRSSEN, V.; CAMP, J. VAN; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 03, p. 357, 2004.

VO, T. S.; KIM, S. K. Down-regulation of histamine-induced endothelial cell activation as potential anti-atherosclerotic activity of peptides from *Spirulina maxima*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 2, p. 198–207, 2013.

VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1336–1346, 2013.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (*Arthropsira*): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

WANG, B.; CHENG, F.; GAO, S.; GE, W.; ZHANG, M. Double enzymatic hydrolysis preparation of heme from goose blood and microencapsulation to promote its stability and absorption. **Food Chemistry**, v. 217, p. 699–704, 2017.

WANG, X. J.; ZHENG, X. Q.; KOPPARAPU, N. K.; CONG, W. S.; DENG, Y. P.; SUN, X. J.; LIU, X. L. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate. **Process Biochemistry**, 2014.

WANG, Y.; BAMDAD, F.; SONG, Y.; CHEN, L. Hydrogel particles and other novel protein-based methods for food ingredient and nutraceutical delivery systems. In: **Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals**. [s.l.] Elsevier Masson SAS., 2012. p. 412–450.

WANG, Y.; ZHAO, J.; LIU, C.; LI, W. Influence of γ-aminobutyric acid on gelling properties of heat-induced whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 287–293, 2019.

WEBBER, V.; DE SIQUEIRA FERREIRA, D.; BARRETO, P. L. M.; WEISS-ANGELI, V.; VANDERLINDE, R. Preparation and characterization of microparticles of β-cyclodextrin/glutathione and chitosan/glutathione obtained by spray-drying. **Food Research International**, v. 105, p. 432–439, 2018.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 275–295, jul. 2004.

WOOD, A.; TOERIEN, D. F. The algae-recent developments in cultivation and utilization. **Development in Food Protein**, p. 79–123, 1991.

WU, R. B.; WU, C. L.; LIU, D.; YANG, X. H.; HUANG, J. F.; ZHANG, J.; LIAO, B.; HE, H. L. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. **Food Chemistry**, v. 248, p. 346–352, 2018.

XIA, Q.; GU, M.; LIU, J.; NIU, Y.; YU, L. Novel composite gels of gelatin and soluble dietary fiber from black bean coats with interpenetrating polymer networks. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 72–78, 2018.

XIE, N.; LIU, S.; WANG, C.; LI, B. Stability of casein antioxidant peptide fractions during in vitro digestion/Caco-2 cell model: characteristics of the resistant peptides. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 4, p. 577–586, 2014.

XUE, F.; LI, C.; LIU, Y.; ZHU, X.; PAN, S.; WANG, L. Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 3, p. 439–445, 2013.

YADA, R. Y. **Proteins in Food processing**. Washington: Cambridge England, 2004.

YAMAGUCHI, S. K. F.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; DE SOUZA, C. K.; BERTOLI, S. L.; CARVALHO, L. F. Evaluation of adding *Spirulina* to freeze-dried yogurts before fermentation and after freeze-drying. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 89–94, 2019.

YAN, Q.-J.; HUANG, L.-H.; SUN, Q.; JIANG, Z.-Q.; WU, X. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. **Food chemistry**, v. 179, p. 290–5, 2015.

YANG, X.; GAO, N.; HU, L.; LI, J.; SUN, Y. Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 161, p. 87–93, 2015.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 167–179, 2018.

YEN, G.-C.; CHEN, H.-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 43, p. 27–32, 1995.

YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, J. M.; REN, J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 810–816, 2010.

ZAMANI, H.; RASTEGARI, B.; VARAMINI, M. Antioxidant and anti-cancer activity of *Dunaliella salina* extract and oral drug delivery potential via nano-based formulations of gum Arabic coated magnetite nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, p. 101278, 2019.

ZARROUK, C. **Contribuition à I étude d une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina máxima***. Paris: Université Des Paris, 1966.

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Comparison of water gel desserts from fish skin and pork gelatins using instrumental measurements. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 4, p. 196–201, 2007.

ZHU, C. Z.; ZHANG, W. G.; KANG, Z. L.; ZHOU, G. H.; XU, X. L. Stability of an

antioxidant peptide extracted from Jinhua ham. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 783–789, 2014.

ZHU, L.; JIE, C.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 200

APÊNDICES

Tabela A1 - Temperaturas de degradação e entalpias de fusão de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados em *Spray dryer* e *Nanospray dryer*.

Amostra	Temperatura de degradação (° C)	Entalpia de fusão ($J\ g^{-1}$)	Entalpia de fusão ($J\ g^{-1}$)
GS	324,9	90,69	-
H90S	277,3	43,97	9,97
H90ES	311,3	116,18	-
H120S	272,3	137,77	38,88
H120ES	311,5	178,94	23,19
H90N	261,6	68,16	-
H90EN	307,5	40,5	12,18
H120N	271,6	47,87	-
H120EN	311,4	205,68	-
GN	324,1	10,89	16,2

GS: gelatina atomizada em *spray dryer*; H90S: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação atomizado em *spray dryer*; H90ES: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H120S: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação atomizado em *spray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H90N: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação atomizado em *nanospray dryer*; H90EN: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer;* H120N: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação atomizado em *nanospray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; GN: gelatina atomizada em *nanospray dryer*.

Tabela A2 - Tamanho de hidrolisados proteicos de *Spirulina* encapsulados em *Spray dryer* e *Nanospray dryer*.

Tamanho/Amostra	GS	GN	H90ES	H90EN	H120ES	H120EN
Média ± DP (µm)	1,34±1,08	0,35±0,34	2,17±2,41	2,80±3,00	5,25±1,60	1,17±1,48
Mínimo (µm)	0,37	0,12	0,36	0,36	0,38	0,36
Máximo (µm)	4,86	1,79	12,43	11,09	31,98	7,96

DP: Desvio padrão; GS: gelatina atomizada em *spray dryer*; GN: gelatina atomizada em *nanospray dryer*; H90ES: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H90EN: hidrolisado proteico obtido em 90 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*; H120ES: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *spray dryer*; H120EN: hidrolisado proteico obtido em 120 min de reação encapsulado em *nanospray dryer*.