

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DE  
SUBPRODUTO DO ALGODÃO PARA APLICAÇÃO EM  
FILMES ATIVOS E BIODEGRADÁVEIS

Autor: Josemar Gonçalves de Oliveira Filho  
Orientador: Dr. Fábio Henrique Dyszy

Rio Verde - GO  
Fevereiro – 2018

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DE  
SUBPRODUTO DO ALGODÃO PARA APLICAÇÃO EM  
FILMES ATIVOS E BIODEGRADÁVEIS

Autor: Josemar Gonçalves de Oliveira Filho  
Orientador: Dr. Fábio Henrique Dyszy

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

Rio Verde - GO  
Fevereiro – 2018

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

OOOL48o Oliveira Filho, Josemar Gonçalves de  
OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DE  
SUBPRODUTO DO ALGODÃO PARA APLICAÇÃO EM FILMES  
ATIVOS E BIODEGRADÁVEIS / Josemar Gonçalves de  
Oliveira Filho; orientador Fábio Henrique Dyszy; co-  
orientadora Mariana Buranelo Egea. -- Rio Verde,  
2018.  
88 p.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica)  
Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, 2018.

1. Torta de algodão. 2. peptídeos biologicamente  
ativos. 3. proteases. I. Dyszy, Fábio Henrique,  
orient. II. Egea, Mariana Buranelo, co-orient. III.  
Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR  
DE SUBPRODUTO DO ALGODÃO PARA APLICAÇÃO  
EM FILMES ATIVOS E BIODEGRADÁVEIS**

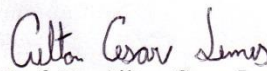
Autor: Josemar Gonçalves de Oliveira Filho  
Orientador: Fábio Henrique Dyszy

*TITULAÇÃO:* Mestre em Agroquímica – Área de concentração  
Agroquímica.

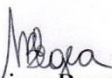
APROVADA em 19 de fevereiro de 2018.



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Katiuchia Pereira Takeuchi  
*Avaliadora externa*  
UFMT



Prof. Dr. Ailton Cesar Lemes  
*Avaliador externo*  
IF Goiano/Morrinhos



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea  
*Avaliadora interna*  
IF Goiano/RV



Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

Considero a elaboração de uma dissertação um produto coletivo, embora sua redação, responsabilidade e estresse sejam predominantemente individuais. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse ao bom termo. A todas elas registro minha gratidão. Hoje eu sei que a aprendizagem é muito importante... e aprender o que ainda não sei é uma tarefa árdua e incessante. Ah! E como existem coisas a serem aprendidas! E, por isso serei sempre aprendiz. Sempre achei esta a pior parte da dissertação para escrever, talvez porque a vida não se coloca em análise de regressão e não é pelo valor de  $p$  que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória. Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Meus agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy, que sempre me recebeu em sua sala de bom humor, respondendo todas as minhas indagações, por ser muitas vezes possuidor da bola de cristal e me entender quando a confusão tomava conta das minhas palavras, ter a ajuda de um profissional do seu gabarito foi um grande privilégio.

À minha coorientadora externa, Prof. Dr.<sup>a</sup> Edilsa Rosa da Silva, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pelas oportunidades oferecidas e principalmente pelo convívio ao longo de todos estes anos de trabalho. Parceria e acima de tudo... uma amizade verdadeira, leal e duradoura.

À minha coorientadora interna, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea, pelo carinho, atenção e pela amizade. Saliento o apoio incondicional prestado, a forma interessada, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. Agradeço também por me ajudar a tomar decisões, mostrar que só precisamos de oportunidades e

força de vontade. Sou imensamente grato por toda dedicação a mim, não há como retribuir tudo o que fez.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cassia Cristina Alves Fernandes, por me acolher em seu laboratório, por todo carinho, cuidado, ensinamentos e auxílio ao longo do mestrado.

À minha eterna orientadora e hoje grande amiga, Heloísa Alves de Sousa Falcão, obrigado por nunca medir esforços para me ajudar e por todo o carinho que tens por mim.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, Anna Carolina (obrigado por toda a amizade, carinho, ranços, auxílio nas análises e pela bela amizade que construímos), Simonny (obrigada por me mostrar que todo bem que fazemos ao próximo, por si só, já é a maior das recompensas), Vanessa, Tainara, Daiane, Aline Wendel, Isabella (Isa Ambiental), Giovanni, Joema, Flávia Marcela, Silvania, Vinícius (Vini), Mailon, Valéria, Maísa, Antônio, Laura, Fellype, Weber, Adiel, Helen, Gustavo, Larissa, Thayanara e Adrielly (muito obrigado pelo auxílio nas análises de atividade antioxidante).

Aos alunos de IC, que me auxiliaram durante o mestrado, Emanuela do Carmo (Manu) e Juliana Rodrigues, muito obrigado por todo auxílio durante as análises e por todo aprendizado, foi uma experiência muito rica trabalhar com vocês.

A toda minha família e meus amigos, pela paciência e apoio.

À empresa San Lorenzo Agroindustrial, pela doação da torta de algodão.

À empresa LNF Latino América, pela doação das enzimas utilizadas no trabalho.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, por proporcionarem a oportunidade de me especializar.

À FAPEG e a CAPES, pelo incentivo financeiro concedido como bolsa de mestrado, que foi fundamental para a realização desse estudo.

A todos que por mim passaram, levando um pouco de mim e deixando um pouco de si, contribuindo de alguma forma para a conclusão deste.

Gratidão!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer).

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Josemar Gonçalves de Oliveira Filho nasceu em Formosa, Estado de Goiás, no dia 22 de agosto de 1994. Ao concluir os estudos secundários, em 2012, foi admitido no Instituto Federal de Brasília, Campus Planaltina, no curso de nível técnico em Agroindústria. No mesmo ano, continuou seus estudos na mesma instituição no curso superior de Agroecologia. No primeiro ano da faculdade, foi convidado para participar em projetos de Iniciação Científica, os quais despertaram seu interesse e motivação pela pesquisa científica. A partir do segundo ano de faculdade, atuou como monitor de ensino das disciplinas citologia e microbiologia e participou de projetos de extensão, atividades que despertaram seu interesse para a docência. Ao longo do percurso acadêmico foi agraciado com 10 premiações concedidas a seus projetos de pesquisa em eventos regionais e nacionais. Como consequência dessas premiações, foi convidado a realizar estágio no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo-USP de Ribeirão Preto, onde permaneceu pelo período de três meses.

No primeiro semestre de 2016, foi admitido no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, a nível de mestrado, pelo Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde. Participou de atividades dos Laboratórios de Química de Produtos Naturais e Biocompostos e Bioprocessos, executando seu projeto de mestrado envolvendo a produção de peptídeos bioativos e filmes biodegradáveis e ativos sob a orientação do professor Dr. Fábio Henrique Dyszy.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1. Subproduto da extração de óleo de algodão: torta do algodão.....	18
1.2. Hidrólise enzimática de proteínas .....	19
1.3. Peptídeos antimicrobianos .....	20
1.4. Peptídeos antioxidantes .....	21
1.5. Filmes biodegradáveis e ativos .....	23
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO I – Influência do pré-tratamento térmico, especificidade enzimática e tempo de hidrólise sobre as atividades antioxidantes e antimicrobianas de hidrolisados de proteínas da torta de algodão.....</b>	<b>30</b>
1. Introdução.....	31
2. Materiais e métodos .....	32
2.1. Materiais e reagentes.....	32
2.2. Composição química.....	32
2.3. Extração de proteínas da torta de algodão.....	33
2.4. Pré-tretamento térmico e proteólise .....	33
2.5. Determinação do grau de hidrólise das proteínas .....	33
2.6. Atividade antioxidante .....	34
2.6.1. Atividade de eliminação de DPPH.....	34
2.6.2. Ensaio de potencial de redução férrica (FRAP) .....	34
2.7. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	35
2.8. Análise estatística.....	35
3. Resultados e discussão.....	36
3.1. Composição química e produção de extração de proteínas .....	36
3.2. Grau de hidrólise .....	36
3.3. Atividade antioxidante avaliada pela eliminação do radical DPPH.....	39
3.4. Atividade antioxidante avaliada pelo teste de FRAP.....	42
3.5. Ensaio de atividade antifúngica .....	45
3.6. Ensaio de atividade antibacteriana .....	47
4. Conclusões.....	50
5. Referências .....	50



<b>CAPÍTULO II – Produção e caracterização de filmes de alginato adicionados de hidrolisado proteico da torta de algodão para aplicação como embalagem ativa para alimentos .....</b>	<b>59</b>
1. Introdução.....	60
2. Material e métodos.....	61
2.1. Materiais.....	61
2.2. Extração de proteínas da torta de algodão.....	62
2.3. Preparação dos hidrolisados de proteína de torta de algodão (HPA).....	62
2.4. Produção dos filmes .....	62
2.5. Espessura e teor de umidade dos filmes.....	63
2.6. Biodegradabilidade: degradação por enterro em solo.....	63
2.7. Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) .....	64
2.8. Solubilidade em água .....	64
2.9. Propriedade de barreira lipídica .....	65
2.10. Propriedades ópticas.....	65
2.11. Teor de compostos fenólicos totais .....	66
2.12. Atividade antioxidante .....	66
2.12.1. Ensaio de eliminação de radicais DPPH .....	66
2.12.2. Ensaio de eliminação radical ABTS.....	67
2.12.3. Teste de poder antioxidante de redução férrica (FRAP) .....	67
2.13. Atividade antimicrobiana .....	67
2.14. Teste de liberação dos peptídeos em simuladores para alimentos .....	68
2.15. Análise estatística.....	68
3. Resultados e discussão .....	68
3.1. Espessura e umidade .....	69
3.2. Biodegradabilidade .....	70
3.3. Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) .....	70
3.4. Solubilidade em água .....	71
3.5. Propriedade como barreira lipídica .....	71
3.6. Propriedades ópticas.....	72
3.7. Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante dos filmes .....	75
3.8. Atividade antimicrobiana dos filmes .....	77
3.9. Estudos de liberação de peptídeos em simuladores de alimentos .....	79
4. Conclusão.....	81

5. Referências.....	81
<b>3. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE TABELA

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição proximal da torta de algodão.....	36
Tabela 2. Atividade de eliminação (%) do radical DPPH por extratos de proteína da torta de algodão hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo.....	40
Tabela 3. Poder redutor (mg ET/mg amostra) dos extratos de proteína da torta de algodão hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo.....	43
Tabela 4. Taxa de inibição (%) do crescimento de <i>C. gloeosporioides</i> por extratos de proteína da torta de algodão hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo.....	46
Tabela 5. Taxa de inibição (%) do crescimento de <i>S. aureus</i> por extratos de proteína da torta de algodão hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo.....	48

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Propriedades físicas de filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). .....	69
Tabela 2. Parâmetros de cor e fotografias dos filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). .....	72
Tabela 3. Atividade antimicrobiana (inibição em mm) de filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). .....	78

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. GH (%) dos extratos de proteína da torta de algodão TT e TC hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo (100 minutos). ..... 37

### CAPÍTULO II

Figura 1. Filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%)..... 69

Figura 2. Taxa de transmissão de luz (%) de filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). ..... 74

Figura 3. A) Conteúdo de fenóis totais em filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). B) Atividade de eliminação de radicais DPPH• de filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). C) Atividade de eliminação de radicais ABTS<sup>•+</sup> de filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). D) Poder redutor de ferro (FRAP) de filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%)..... 76

Figura 4. Liberação de peptídeos (%) de filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0,15%, 0,30% e 0,60%) em simuladores de alimentos aquosos (A) e gordurosos (B). ..... 79

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACIONES E UNIDADES

<b>DPPH</b>	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>FRAP</b>	Ferric reducing antioxidant power
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
<b>PAMs</b>	Peptídeos antimicrobianos
<b>TROLOX</b>	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tripiridil-S-triazina
<b>TT</b>	Tratamento térmico
<b>TC</b>	Tratamento controle
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>BHA</b>	hidroxianisol butilado
<b>BHT</b>	hidroxitolueno butilado
<b>PG</b>	galato de propilo
<b>TBHQ</b>	terc-butilhidroquinona
<b>HPA</b>	Hidrolisado de proteínas de algodão
<b>TTVA</b>	Taxa de transmissão de vapor d'água
<b>PVA</b>	Permeabilidade ao vapor d'água

## RESUMO

OLIVEIRA FILHO, JOSEMAR GONÇALVES DE. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2018. Obtenção de peptídeos bioativos a partir de subproduto do algodão para aplicação em filmes ativos e biodegradáveis. DSc. Orientador: DSc. Fábio Henrique Dyszy. Coorientadores: DSc. Mariana Buranelo Egea, DSc. Edilsa Rosa da Silva.

A presente dissertação foi dividida em dois capítulos: no primeiro foi verificada a influência do pré-tratamento térmico, especificidade enzimática e tempo de hidrólise sobre as atividades antioxidantes e antimicrobianas de hidrolisados de proteínas da torta de algodão. Inicialmente, caracterizou-se o subproduto, extraiu e se quantificou as proteínas da torta de algodão. Estas proteínas foram então submetidas a hidrólise por enzimas comerciais (Alcalase®, Neutrase® e Flavourzyme®) na presença e ausência de pré-tratamento térmico. Os hidrolisados obtidos foram investigados quanto a sua ação antioxidante através de medidas com DPPH e FRAP e também a ação antimicrobiana contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os testes DPPH e FRAP mostraram que os hidrolisados de proteínas tinham maior atividade antioxidante do que as proteínas não hidrolisadas. Além disso, o tratamento térmico aumentou a liberação de peptídeos com esta propriedade e que a enzima Alcalase® mostrou capacidade de produzir peptídeos com maior atividade antioxidante. Em relação ao teste de inibição de crescimento para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Staphylococcus aureus* foi verificado que os hidrolisados submetidos ao tratamento térmico apresentaram capacidade de inibição de crescimento, exceto para *Escherichia coli*. O segundo capítulo apresenta a produção e caracterização de filmes de alginato adicionados de hidrolisado proteico da torta de algodão para aplicação como embalagem ativa para alimentos. O efeito da incorporação do hidrolisado de proteína da torta de algodão (HPA) nas propriedades físicas, de barreira, ópticas, antioxidantes e antimicrobianas de filmes de alginato foi investigado. Também avaliou-se a liberação dos peptídeos em dois diferentes simuladores de alimentos. Os resultados indicaram que

a adição de HPA provocou aumento ( $p < 0,05$ ) na espessura e permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e não afetou o teor de umidade, a biodegradabilidade, a solubilidade e propriedade de barreira a óleo dos filmes. Os filmes com HPA apresentaram excelentes propriedades de barreira à luz UV e a cor da superfície tornou-se ( $p < 0,05$ ) mais escura, avermelhada e amarelada com o aumento do conteúdo de HPA. O conteúdo fenólico total e atividade antioxidante aumentaram com o aumento da concentração de HPA adicionado aos filmes ( $p < 0,05$ ) em todos os ensaios antioxidantes (DPPH, FRAP e ABTS). Os filmes incorporados com HPA também apresentaram efeito inibitório contra a bactéria *S. aureus* e os fungos *C. gloesporioides* e *R. oligosporus*, mas não contra a bactéria *E. coli*. Nos testes de migração, em meio aquoso, todos os filmes ativos liberaram quantidade de peptídeos acima de 60% na primeira meia hora de ensaio. A combinação de filmes de alginato incorporados com HPA e etanol (que representam alimentos gordurosos) proporcionou liberação controlada e gradual do composto ativo. Este estudo mostrou que é possível obter peptídeos bioativos com propriedades antioxidante e antimicrobiana por escolha adequada de enzimas proteolíticas e pré-tratamento térmico de proteínas extraídas da torta de algodão e que o filme de alginato adicionado de HPA apresenta potencial como material de embalagem ativa para a preservação de alimentos gordurosos.

**PALASVRAS-CHAVE:** Torta de algodão, peptídeos biologicamente ativos, proteases.

## ABSTRACT

OLIVEIRA FILHO, JOSEMAR GONÇALVES DE. Goiano Federal Institute - Rio Verde Campus - GO, February de 2018. Obtaining bioactive peptides from cottonseed meal for application in active and biodegradable films. DSc. Advisor: Dsc. Fábio Henrique Dyszy. Co-advisor: Dsc. Mariana Buranelo Egea and DSc. Edilsa Rosa da Silva.

The present dissertation was divided into two chapters: first, an influence of the thermal pretreatment, enzymatic specificity and hydrolysis time on the antioxidant and antimicrobial activities of protein hydrolysates from cottonseed meal was verified. Initially, the byproduct was characterized and then the protein was extracted and quantified. After that proteins were subjected to hydrolysis by commercial enzymes (Alcalase®, Neutrase® and Flavourzyme®) in the presence and absence of heat treatment. The obtained hydrolysates were investigated for their antioxidant action through measurements with DPPH and FRAP and also an antimicrobial action against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The DPPH and FRAP tests showed that protein hydrolysates had higher antioxidant activity than the non-hydrolyzed proteins. In addition, the heat treatment increased the release of peptides with this property and the enzyme Alcalase® showed ability to produce peptides with greater antioxidant activity. Regarding the growth inhibition test for *Colletotrichum gloeosporioides* and *Staphylococcus aureus*, it was verified that the hydrolysates submitted to the heat treatment presented growth inhibition capacity, except for *Escherichia coli*. The second chapter presents a production and characterization of alginate films added with protein hydrolyzate from the cottonseed meal for application as an active food packaging. The effect of the incorporation of cottonseed protein hydrolysate (HPA) on the physical, barrier, optical, antioxidant and antimicrobial properties of alginate films was investigated. Also, a release of peptides was also evaluated in two different food simulants. The results indicated that the addition of HPA increased ( $p < 0.05$ ) in the thickness and permeability to water vapor



(PVA) and did not affect the moisture content, biodegradability, solubility and oil barrier property of the films. HPA films showed excellent UV light barrier properties and darker, reddish and yellowish production surface color ( $p < 0.05$ ) with increased HPA content. Total phenolic content and antioxidant activity increased with increasing HPA concentration added to the films ( $p < 0.05$ ) in all antioxidant assays (DPPH, FRAP and ABTS). HPA-incorporated films also had an inhibitory effect against *S. aureus* bacteria and fungi *C. gloesporioides* and *R. oligosporus*, but not for *E. coli* bacteria. In the migration tests, in the environment, all the active films released peptides in excess of 60% in the first half-hour of the assay. A combination of alginate films incorporated with HPA and ethanol (representing fatty foods) provided a controlled and gradual pouncing of the active compound. This study showed that it is possible to obtain bioactive peptides with antioxidant and antimicrobial properties by suitable choice of proteolytic enzymes and thermal pretreatment of proteins extracted from cottonseed meal and that alginate film added with HPA presents potential as active packaging material for preservation of fatty foods.

**KEY WORDS:** Cottonseed meal, biologically active peptides, proteases, alcalase.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as áreas de cultivo de culturas oleaginosas como algodão, girassol e soja, têm aumentado significativamente nos últimos anos, visando atender a demanda do mercado de óleo comestível e, mais recentemente, como uma alternativa para a produção de biodiesel. A região Centro-Oeste é a maior produtora de algodão do país. Atualmente são plantados 939,1 mil hectares de algodão, com produção média de 1159,3 mil toneladas (Conab, 2017).

Como resultado do processamento industrial dessa oleaginosa para extração de óleo, são originados subprodutos com elevados teores proteicos, que embora sejam utilizados, predominantemente, na alimentação animal, ou como fertilizante, a geração desses subprodutos ainda é elevada para a demanda (Paim et al., 2010).

A torta de algodão é um subproduto obtido após a extração do óleo das sementes de algodão através do método mecânico. Análises de sua composição proteica indicaram que seu teor de proteína bruta oscila entre 25,9 a 47,6% (Cottonseed Feed Products Guide, 1998; Valadares-Filho et al., 2006; Brito et al., 2007).

Subprodutos industriais com alto valor proteico, como a torta de algodão, estão tornando-se cada vez mais atrativos para a obtenção de peptídeos bioativos, e contribui para a utilização e aumento no valor do fluxo de subprodutos (Harnedy & Fitzgerald, 2012).

A produção de hidrolisados de proteínas pode ser uma abordagem interessante para agregar valor à torta de algodão. Diversos hidrolisados de proteínas obtidos por hidrólise enzimática já foram relatados por exibirem bioatividade, tais como atividades antioxidantes, antimicrobianas, imunomoduladoras, dentre outras, que são frequentemente associadas à presença de peptídeos bioativos. Os péptidos bioativos foram definidos como fragmentos específicos de proteínas que têm um impacto positivo nas funções ou condições do corpo e podem influenciar a saúde (Shahidi & Zhong, 2008). Os peptídeos bioativos são inativos enquanto criptografados na

sequência nativa da proteína, mas podem ser liberados por (a) hidrólise por enzimas digestivas, (b) micro-organismos proteolíticos e/ou (c) ação de proteases vegetais, animais ou microbianas (Brandelli et al., 2017).

Entretanto, a forma mais utilizada para obtenção de peptídeos bioativos *in vitro* é através da hidrólise enzimática de moléculas de proteína (Opheim et al., 2015). Neste bioprocesso os fatores que mais afetam as propriedades bioativas dos peptídeos gerados são a fonte inicial de proteína, as condições operacionais empregadas no processamento de isolados proteicos, o tipo de protease e o grau de hidrólise (Agyei et al., 2016).

Atualmente já foram identificados peptídeos bioativos a partir de hidrolisados de inúmeras proteínas de origem alimentar, especialmente derivadas do leite. No entanto, proteínas que exibem essas atividades biológicas podem também ser encontradas em ovos, na carne e em peixes, bem como em diferentes fontes vegetais de proteínas, como soja, trigo, entre outras (Agyei, Apostolopoulos & Danquah, 2011).

Uma oportunidade inovadora para explorar o potencial dos peptídeos bioativos é o desenvolvimento de filmes ativos e biodegradáveis para alimentos a fim de garantir a segurança e qualidade desses produtos (Perez-Espitia et al., 2012). Os biopolímeros têm sido amplamente investigados nas últimas duas décadas, podendo ser uma solução viável para a eliminação de resíduos de materiais de embalagem plásticos de alimentos. Além disso, os filmes biopoliméricos são excelentes veículos para incorporar grande variedade de aditivos, como antioxidantes, agentes antimicrobianos e nutrientes, e esses materiais biodegradáveis podem melhorar a qualidade dos alimentos e prolongar a vida útil, minimizando a deterioração (Abdollahi et al., 2012).

### **1.1. Subproduto da extração de óleo de algodão: torta do algodão**

No Brasil, o plano de agroenergia aponta a necessidade de substituir o uso do óleo diesel pelo biodiesel de forma gradativa. Com isso, houve aumento na área plantada com culturas oleaginosas, principalmente o algodão, o dendê e a mamona, implicando na geração 300 milhões de toneladas/ano de resíduos, coprodutos e subprodutos que representam fonte alternativa de biomassa e de nutrientes na alimentação animal (Rosa et al., 2011).

O óleo do algodão é uma matéria-prima de baixo custo, utilizado para a produção de biodiesel, uma vez que as sementes do algodão utilizadas para a produção

são consideradas subprodutos da indústria têxtil. Para obtenção da torta de algodão primeiro se faz a retirada da fibra das sementes. A seguir, extrai-se o óleo das sementes, utilizando apenas a prensagem, sem utilização de solvente químico, e o que resta como resíduo deste processo é chamado de torta de algodão, que é usada principalmente como fertilizante ou ração animal (Panagiotopoulos et al., 2013; Paim et al., 2010).

Neste sentido, há interesse crescente no desenvolvimento de processos que permitem o uso total de resíduos e sua valorização comercial. Processos que não resultem em impacto ambiental negativo tem atualmente se destacado, uma vez que visam à utilização de resíduos agrícolas para substituir recursos não renováveis e os resíduos gerados pelas agroindústrias são fonte rica em proteínas e os tornou uma alternativa para a obtenção de compostos com bioatividade, principalmente de hidrolisados de proteína (Lemes et al., 2016).

## **1.2. Hidrólise de proteínas**

Entre os processos utilizados para agregar valor aos produtos e resíduos com elevado teor de proteínas, a hidrólise pode ser considerada como uma técnica promissora. Este método consiste na clivagem de moléculas de proteína em peptídeos de vários tamanhos e composições de aminoácidos diferentes, podendo ser realizada por ácidos, bases ou enzimas. No entanto, o uso de enzimas permite um controle melhor e mais eficiente sobre o processo de hidrólise de proteínas (Kristinsson & Rasco, 2000; Tonon et al., 2016).

Durante a hidrólise, as proteínas geralmente tornam-se mais solúveis, devido à clivagem das ligações peptídicas entre os aminoácidos, gerando peptídeos com tamanho molecular menor e com mais grupos amino e carboxilo ionizáveis, que provavelmente contribuem para a solubilidade. Além disso, durante a hidrólise enzimática propriedades físico-químicas como pI,  $pK_a$  e momento hidrofóbico também são afetadas (Agyei et al., 2016).

O processo de hidrólise enzimática é realizado por enzimas em determinadas temperaturas em intervalo de tempo definido. Muitos fatores influenciam as propriedades e os constituintes do hidrolisado final, como por exemplo, composição e variação de matérias-primas, especificidade, tempo de reação, atividade e concentração de enzimas endógenas, pH e temperatura (Opheim et al., 2015). O tipo de enzima utilizada na hidrólise enzimática de proteínas é muito importante porque dita os padrões

de clivagem das ligações peptídicas (Shahidi & Zhong, 2008). Muitas proteases de origem animal, vegetal e microbiana podem ser usadas para a geração de peptídeos bioativos a partir de proteínas (Najafian & Babji, 2012).

A fim de aumentar a eficiência da hidrólise, além de fazer a escolha correta da enzima, também é possível aumentar a eficiência da própria enzima ou aumentar a sua sensibilidade ao substrato por desnaturação do substrato (Tavano, 2013). A desnaturação implica no desdobramento da molécula de proteína e a exposição dos locais de ligação. As mudanças nas condições, como temperatura, pressão, pH, sal ou concentração de solvente podem provocar a desnaturação de proteínas, mas a desestabilização de proteínas nativas por altas temperaturas é a ferramenta favorita para desnaturar moléculas de proteína (Franks, Hatley & Friedman, 1988; Tedford et al., 1998).

Segundo Tavano (2013), o tratamento térmico pode alterar a acessibilidade do substrato para hidrólise, melhorando a velocidade de proteólise e também pode alterar o perfil de hidrolisados.

### **1.3. Peptídeos antimicrobianos**

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são geralmente definidos como peptídeos com peso molecular menor do que 10 kDa, de caráter básico pela presença de aminoácidos carregados positivamente, tais como lisina e arginina, juntamente com uma porção substancial dos resíduos hidrofóbicos. As propriedades estruturais e físico-químicas dos PAMs desempenham papel essencial na determinação da sua especificidade para as células alvo (Pushpanathan et al., 2013).

Curiosamente, muitos PAMs mostram bioatividades adicionais tais como atividades antioxidantes, imunomoduladoras e atividade de cicatrização de feridas. Estas propriedades dos PAMs os tornam as melhores alternativas para antibióticos convencionais que têm registrado muita resistência entre bactérias patogênicas (Daliri et al., 2017).

Os PAMs podem agir contra ampla variedade de micro-organismos patogênicos, tais como bactérias, fungos e vírus (Treffers et al., 2005). O mecanismo de ação dos PAMs geralmente envolve mudanças nas membranas biológicas. Inicialmente, ocorre atração eletrostática entre as moléculas de peptídeos, geralmente carregadas positivamente, e os lipídeos aniônicos encontrados na superfície da membrana plasmática microbiana. Em

seguida, devido à estrutura anfipática destes peptídeos, a interação entre os peptídeos e a superfície da membrana ocorre, com posterior degradação estrutural da membrana plasmática através da formação de canais de íons ou por produção de poros transmembranares. Este processo provoca desequilíbrio de conteúdos celulares, desregulando desse modo o processo de replicação, transcrição e tradução da sequência de DNA através da ligação a alvos intracelulares específicos, evitando a multiplicação e o crescimento das células microbianas (Naghmouchi et al., 2007; Zhao et al., 2012).

A maioria dos PAMs que geram benefícios à saúde são sintetizados pelas células do próprio organismo e outros são produzidos a partir da hidrólise de proteínas alimentares *in vitro* por proteases de diferentes origens (animais, plantas e microrganismos) ou *in vivo* por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal (Biziulevičius et al., 2006, Franco, 2011).

A hidrólise das proteínas *Scorpaena notata* com uma protease neutra de *Trichoderma harzianum* liberou peptídeos com atividades antibacterianas notáveis. O peptídeo FPIGMGHGSRPA foi isolado do hidrolisado e verificou-se que ele foi capaz de inibir *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Salmonella* sp. e *E. coli* (Tang et al., 2017). Em outro estudo, o peptídeo CgPep33 isolado a partir do hidrolisados de ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) apresentou elevada atividade inibitória contra *Botrytis cinerea*, agente etiológico do mofo cinzento em morangos. Os resultados sugerem que esse peptídeo deve fornecer uma alternativa aos fungicidas para o controle de doenças pós-colheita (Liu et al., 2007).

#### **1.4. Peptídeos antioxidantes**

A oxidação de lipídios mediada por radicais livres, o estresse oxidativo e os antioxidantes são amplamente discutidos em muitas áreas de pesquisa atuais. A geração descontrolada de radicais livres que atacam lipídios da membrana, proteínas e moléculas de DNA acredita-se que esteja envolvida em muitos transtornos de saúde como diabetes mellitus, câncer, doenças neurodegenerativas e inflamatórias. Além disso, a deterioração de alguns alimentos foi identificada como causada pela oxidação de lipídios e pela formação de produtos secundários de peroxidação lipídica (Sila & Bougatef, 2016).

Os antioxidantes são utilizados para atrasar, controlar ou inibir a oxidação e a deterioração da qualidade dos alimentos (Shahidi, 2015). Os antioxidantes sintéticos tais

como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) foram utilizados como antioxidantes primários para estabilizar os radicais livres e controlar a oxidação e o desenvolvimento de sabor desagradável. No entanto, um interesse mais recente se concentrou no estudo de antioxidantes naturais pela toxicidade e aos efeitos cancerígenos de alguns antioxidantes sintéticos (Shahidi, 2015, Wang, Zhao & Wang, 2013). Portanto, nos últimos anos, há grande interesse em encontrar novos compostos antioxidantes seguros e de fontes naturais para seu uso em alimentos e fármacos para substituir os antioxidantes sintéticos (Sila & Bougatef, 2016).

Nas últimas décadas, vários estudos relataram que os hidrolisados de proteínas de diferentes fontes alimentares, além de suas propriedades nutricionais, exibiram várias funções biológicas, incluindo antioxidantes (Vaštag et al., 2011; Saidi et al., 2011; Zarei et al., 2012; Vieira et al., 2017).

A digestão enzimática é o método mais eficiente e confiável para produzir peptídeos com atividade antioxidante. Uma ampla variedade de peptídeos antioxidantes e misturas de peptídeos foram obtidas a partir da hidrólise enzimática de proteínas de soja, milho, batata, amendoim, leite, soro de leite, ovo e proteínas de carne. A ação antioxidante dos hidrolisados proteicos depende da fonte das proteínas, do pré-tratamento do substrato proteico, do tipo de proteases utilizadas e das condições de hidrólise aplicadas. As enzimas puras e brutas podem ser usadas para obtenção de peptídeos antioxidantes. No entanto, para reduzir o custo de produção, preferem-se as misturas de enzimas brutas (Zarei et al., 2012).

Segundo Liu e colaboradores (2016), a maioria dos peptídeos antioxidantes possui entre 4 e 16 aminoácidos, com massa molecular de cerca de 400-2000 Da. A massa molecular afeta as rotas usadas para alcançar os locais alvo e a capacidade de sofrer digestão adicional por enzimas gastrointestinais que poderiam aumentar a capacidade antioxidante *in vivo* (Li et al., 2004).

O tipo de aminoácido desempenha um papel importante na determinação da atividade antioxidante dos peptídeos. A este respeito, os aminoácidos aromáticos como Tyr, His, Trp e Phe podem doar prótons contribuindo para as propriedades de eliminação de radicais. Por outro lado, os aminoácidos hidrofóbicos foram descritos como relevantes por aumentar a presença de peptídeos na interface água-lipídio e, em seguida, acessar os radicais livres de eliminação da fase lipídica. Finalmente, os

aminoácidos carregados utilizam grupos carbonilo e amino da cadeia lateral como quelantes de íons metálicos (Toldrá et al., 2017).

### **1.5. Filmes biodegradáveis e ativos**

As contaminações associadas à embalagem de alimentos e as preocupações crescentes atuais relacionadas ao impacto ambiental negativo dos materiais de embalagem derivados do petróleo geraram um interesse significativo da indústria em materiais de fontes naturais e biodegradáveis (Medina-Jaramillo et al., 2017).

Os filmes biodegradáveis são camadas finas de materiais biológicos, que uma vez formados podem ser colocados sobre ou entre os componentes de alimentos. Os materiais mais comuns para a formulação de filmes biodegradáveis são polissacarídeos, proteínas e lipídios, e a combinação destes permite produzir misturas com características melhoradas (Fabra et al., 2009).

A demanda atual dos consumidores por produtos alimentícios com maior vida de prateleira torna necessário o desenvolvimento de materiais de embalagem que também sejam funcionais, como embalagens com compostos ativos que podem melhorar a qualidade dos produtos, contribuindo ainda mais para o valor nutricional do alimento. Neste sentido, vários pesquisadores investigaram o uso de antioxidantes (Shojaee-Aliabadi et al., 2013; Siripatrawan & Harte, 2010), ou agentes antimicrobianos em matrizes poliméricas (Pires et al., 2008; Sivarooban et al., 2008; Santiago-Silva et al., 2009), obtendo a chamada "embalagem ativa".

Embalagens ativas são atualmente uma das tecnologias mais dinâmicas usadas para preservar a qualidade dos alimentos através da liberação de agentes ativos por uma embalagem. A liberação de agentes ativos pode ser controlada por um longo período de tempo para manter ou aumentar a qualidade e vida de prateleira de produtos, sem a necessidade de adição direta de quaisquer substâncias ao alimento (Ahmed et al., 2017).

Estudos recentes têm relatado a incorporação de peptídeos como ingredientes ativos diretamente em materiais biopoliméricos, especialmente as bacteriocinas, com a nisina, que são peptídeos antimicrobianos produzidos por algumas bactérias (Perez Espitia et al., 2012). Polímeros como acetato de celulose, alginato, quitosana e proteína de soja, entre outros, tem sido amplamente utilizados para desenvolver filmes com incorporação direta destes antimicrobianos (Marcos et al., 2008; Pires et al., 2008; Sivarooban et al., 2008; Santiago-Silva et al., 2009).



## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343-350.
- Agyei, D., & Danquah, M. K. (2012). Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology*, 23(2), 62-69.
- Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and bioproducts processing*, 98, 244-256.
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125-1137.
- Biziulevičius, G. A., Kislukhina, O. V., Kazlauskaitė, J., & Žukaitė, V. (2005). Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a 'cause and effect' theory of bifunctionality. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46(1), 131-138.
- Brandelli, A., Daroit, D. J., & Corrêa, A. P. F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149-161.
- Brito, R. M. D., Sampaio, A. A. M., Fernandes, A. R. M., Henrique, W., Cattelan, J. W., & Routman, K. D. S. (2007). Degradabilidade in situ e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas balanceadas para diferentes ganhos de peso e potenciais de fermentação microbiana. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 1639-1650.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2017. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_09\\_13\\_16\\_17\\_58\\_apreencao\\_do\\_decimo\\_segundo\\_levantamento\\_da\\_safra\\_de\\_graos\\_20162017\\_do\\_estado\\_da\\_bahia.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_13_16_17_58_apreencao_do_decimo_segundo_levantamento_da_safra_de_graos_20162017_do_estado_da_bahia.pdf)> Acesso em: 21 dez 2017.
- COTTONSEED FEED PRODUCTS GUIDE. Disponível em: <http://www.cottonseed.com/feedprod.htm>. Acessado em: 15 de abr de 2017.
- Cui, C., Zhou, X., Zhao, M., & Yang, B. (2009). Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. *Innovative food science & emerging technologies*, 10(1), 37-41.
- Daliri, E. B. M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), 32.
- Dei Piu, L., Tassoni, A., Serrazanetti, D. I., Ferri, M., Babini, E., Tagliazucchi, D., & Gianotti, A. (2014). Exploitation of starch industry liquid by-product to produce

bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. *Food chemistry*, 155, 199-206.F. Shahidi, Y. Zhong

Paim, T. P., Louvandini, H., McMANUS, C. M., & Abdalla, A. L. (2010). Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, 13(1/2/3), 24-37.

Santos, A. C. P., de Fátima Ferreira Soares, N., de Andrade, N. J., da Silva, L. H. M., Camilloto, G. P., & Bernardes, P. C. (2008). Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packaging Technology and Science*, 21(7), 375-383.

Esteve C. Marina M. L. García M. C. (2015). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chemistry*, 167: 272–280.

Fabra, M. J., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10(6), 1500-1507.

Fan, S., Hu, Y., Li, C., & Liu, Y. (2014). Optimization of preparation of antioxidative peptides from pumpkin seeds using response surface method. *PloS one*, 9(3), e92335.

Franco, O. L. (2011). Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. *FEBS letters*, 585(7), 995-1000.

Franks, F., Hatley, R. H. M., & Friedman, H. L. (1988). The thermodynamics of protein stability: cold destabilization as a general phenomenon. *Biophysical chemistry*, 31(3), 307-315.

García, M. C., Endermann, J., Gonzalez-Garcia, E., & Marina, M. L. (2015). HPLC-Q-TOF-MS identification of antioxidant and antihypertensive peptides recovered from cherry (*Prunus cerasus* L.) subproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(5), 1514-1520.

Gonzalez-Garcia, E., Marina, M. L., & García, M. C. (2014). Plum (*Prunus domestica* L.) by-product as a new and cheap source of bioactive peptides: Extraction method and peptides characterization. *Journal of Functional Foods*, 11, 428-437.

Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 6-24.

Kamali Alamdari, E., & Ehsani, M. R. (2017). Antimicrobial peptides derived from milk: A review. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), 49-56.

Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 950.

Liu, Z., Zeng, M., Dong, S., Xu, J., Song, H., & Zhao, Y. (2007). Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvested strawberries. *Postharvest biology and technology*, 46(1), 95-98.

Marcos, B., Aymerich, T., Monfort, J. M., & Garriga, M. (2008). High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiology*, 25(1), 177-182.

Medina-Jaramillo, C., Ochoa-Yepes, O., Bernal, C., & Famá, L. (2017). Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. *Carbohydrate polymers*, 176, 187-194.

Naghmouchi, K., Drider, D., & Fliss, I. (2007). Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin, on liposomes and *Listeria*. *Journal of applied microbiology*, 102(6), 1508-1517.

Najafian, L., & Babji, A. S. (2012). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33(1), 178-185.

Opheim, M., Šližytė, R., Sterten, H., Provan, F., Larssen, E., & Kjos, N. P. (2015). Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials—Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates. *Process Biochemistry*, 50(8), 1247-1257.

Panagiotopoulos, I. A., Pasiás, S., Bakker, R. R., de Vrije, T., Papayannakos, N., Claassen, P. A. M., & Koukios, E. G. (2013). Biodiesel and biohydrogen production from cotton-seed cake in a biorefinery concept. *Bioresource technology*, 136, 78-86.

Perez Espitia, P. J., de Fátima Ferreira Soares, N., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., Souza Cruz, R., Medeiros, A., & Antonio, E. (2012). Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 187-204.

Pimenta A. M. C. De Lima M. E. (2005). Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *Journal of Peptide Science*, 11: 670–676.

Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2013). Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *International journal of peptides*, 2013.

Rosa, M. F., Souza Filho, M. S. M., Figueiredo, M. C. B., Morais, J. P. S., Santaella, S. T., & Leitão, R. C. (2011). Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais—II SIGERA, 15.

Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. P., & Amar, R. B. (2014). Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. *Food research international*, 65, 329-336.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.

Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M., ... & Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-

antimicrobial  $\kappa$ -carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International journal of biological macromolecules*, 52, 116-124.

Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of functional foods*, 21, 10-26.

Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775.

Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.

Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., & Qi, X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food chemistry*, 168, 115-123.

Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., & Qi, X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food chemistry*, 168, 115-123.

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.

Tedford, L. A., Kelly, S. M., Price, N. C., & Schaschke, C. J. (1998). Combined effects of thermal and pressure processing on food protein structure. *Food and bioproducts processing*, 76(2), 80-86.

Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2017). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>

Tonon, R. V., dos Santos, B. A., Couto, C. C., Mellinger-Silva, C., Brígida, A. I. S., & Cabral, L. M. (2016). Coupling of ultrafiltration and enzymatic hydrolysis aiming at valorizing shrimp wastewater. *Food chemistry*, 198, 20-27.

Treffers, C., Chen, L., Anderson, R. C., & Yu, P. L. (2005). Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils. *International journal of antimicrobial agents*, 26(2), 165-169.

Valadares Filho, S. C., Machado, P. A. S., Furtado, T., Chizzotti, M. L., & Amaral, H. F. (2015). Tabelas brasileiras de composição de alimentos para ruminantes. Viçosa, MG, Brazil: Editora UFV.

Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124(4), 1316-1321.

Vieira, E. F., & Ferreira, I. M. (2017). Antioxidant and antihypertensive hydrolysates obtained from by-products of cannery sardine and brewing industries. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 662-673.

Zarei M. Ebrahimpour A. Abdul Hamid A. Anwar F. Saari N. (2012). Production of defatted palm kernel cake protein hydrolysate as a valuable source of natural antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences* , 13: 8097–8111.

Zhao, J., Guo, L., Zeng, H., Yang, X., Yuan, J., Shi, H., ... & Qiu, D. (2012). Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* strain A60. *Peptides*, 33(2), 206-211.

### 3. OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo Geral

Obter peptídeos com propriedades bioativas através da hidrólise enzimática *in vitro* das proteínas da torta de algodão e avaliar o potencial dos peptídeos produzidos no desenvolvimento de filmes biodegradáveis e ativos.

#### 2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a extração das proteínas presentes na torta do algodão;
- Avaliar a influência do pré-tratamento térmico das proteínas isoladas da torta de algodão no processo de hidrólise, pelas enzimas comerciais Alcalase®, Neutrase® e Flavourzyme®;
- Avaliar o grau de hidrólise das proteínas da torta do algodão;
- Verificar o potencial antioxidante e antimicrobiano *in vitro* dos hidrolisados proteicos;
- Avaliar a viabilidade tecnológica da incorporação dos hidrolisados proteicos em um filme biopolimérico de alginato de sódio;
- Caracterizar os filmes produzidos quanto às propriedades físicas, ópticas, de barreira, antioxidantes e antimicrobianas;
- Avaliar a liberação dos peptídeos em simuladores de alimentos aquosos e gordurosos.

## **CAPÍTULO I – Influência do pré-tratamento térmico, especificidade enzimática e tempo de hidrólise sobre as atividades antioxidantes e antimicrobianas de hidrolisados de proteínas da torta de algodão**

*(Normas de acordo com a revista Food Chemistry)*

### **RESUMO**

A torta de algodão é um subproduto resultante do processo de extração de óleo de sementes de algodão. Vários estudos demonstraram que peptídeos bioativos provenientes de fontes alimentares são obtidos por hidrólise enzimática e que o pré-tratamento térmico pode aumentar a proteólise. A atividade antioxidante e antimicrobiana dos hidrolisados de proteínas tratados termicamente e não tratados produzidos a partir das proteínas da torta de algodão foi testada *in vitro*. Os hidrolisados proteicos apresentaram maior atividade antioxidante do que as proteínas não hidrolisadas. Além disso, o tratamento térmico aumentou a liberação de peptídeos com esta propriedade e que a enzima Alcalase® mostrou capacidade de produzir peptídeos com maior atividade antioxidante. O teste de taxa de inibição de crescimento para *Colletotrichum gloeosporioides* e *Staphylococcus aureus* mostrou que os hidrolisados pré-tratados com calor puderam inibir seu crescimento, mas não para *Escherichia coli*. Este estudo mostrou que é possível obter peptídeos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana por escolha adequada de enzimas proteolíticas e pré-tratamento térmico de proteínas extraídas da torta de algodão.

**Palavras-chave:** hidrólise; pré-tratamento térmico; subprodutos de semente de algodão; peptídeo; alcalase.

## 1. Introdução

O algodão é uma das culturas não alimentares mais importantes do mundo. A semente de algodão está disponível em muitos países temperados e tropicais e é uma das fontes oleaginosas mais ricas, processadas principalmente para extrair o óleo que é usado como gordura comestível e na produção de biodiesel (Zhou et al., 2015).

A torta de algodão é o principal subproduto resultante do processo de extração de óleo de semente de algodão. As frações proteicas (22-56% de proteína bruta) deste subproduto foram consideradas uma fonte promissora e atrativa para produção de peptídeos bioativos. Atualmente, no entanto, é usado principalmente como fertilizante ou alimento para animais em vários países (Dowd & Wakelyn, 2010). Com base neste cenário, a elevada geração desse subproduto e a dificuldade de eliminação para reduzir o impacto ambiental, tornou-se grande preocupação nos últimos anos (Pant et al., 2016).

As proteínas alimentares, além de apresentarem propriedades nutricionais, tecnológicas e funcionais, podem originar peptídeos bioativos, que mostram certas propriedades específicas (Chalamaiah, Yu e Wu, 2017). Vários estudos demonstraram que os peptídeos bioativos de fontes alimentares são obtidos pela hidrólise enzimática, uma vez que as sequências ativas são criptografadas na estrutura primária nativa das proteínas (Ramada et al., 2017). Uma vez liberados, os peptídeos podem exercer atividades antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas, imunomoduladoras e outras (Ortiz-Martinez et al., 2014). A estrutura primária dos peptídeos, o grau de hidrólise e massa molecular são determinantes para sua atividade bioativa (Saidi et al., 2014). Desta forma, a especificidade de proteases é muito importante nas propriedades dos hidrolisados de proteínas, uma vez que a mesma cadeia proteica pode produzir peptídeos muito diferentes usando diferentes proteases e, portanto, é essencial levar em consideração a escolha da protease de acordo com a fonte da proteína usada na produção de hidrolisados (Tavano, 2013).

Para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, o pré-tratamento térmico das proteínas antes da hidrólise foi sugerido com um método favorável para aumentar a taxa de hidrólise de proteínas. O pré-tratamento térmico resulta em alterações conformacionais que podem expor sítios de clivagem para enzimas proteolíticas (Tavano, 2013; Adjonu et al., 2013).

Devido às propriedades biotecnológicas e terapêuticas dos peptídeos bioativos, a estratégia de usar a hidrólise enzimática para gerar essas biomoléculas de resíduos



agroindustriais ou subprodutos ricos em proteína é uma abordagem promissora a ser explorada pela indústria alimentar e farmacêutica. Os resíduos e subprodutos com alto teor de proteína atualmente disponíveis são fontes potenciais e de baixo custo para a produção desses peptídeos (Lemes et al., 2016).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo produzir peptídeos a partir do extrato proteico da torta de algodão e avaliar seu potencial antioxidante e antimicrobiano estudando o efeito do pré-tratamento térmico, tempo de hidrólise e especificidade enzimática.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material e reagentes**

A torta de algodão foi doada pela empresa San Lorenzo - Agroindustrial (Trindade, GO, Brasil). Enzimas proteolíticas comerciais Alcalase® 2.4L, Neutrase® 0.8L e Flavorzyme® 500L foram doadas pela empresa LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, RS, Brasil). As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* O157: H7 foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília, Campus Planaltina. A estirpe do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* CCT 5177 foi adquirida da Fundação Andre Tosello (Campinas, SP, Brasil). 2,2-Difenil-picrilidrazilo (DPPH), 2-desoxirribose, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ), o reagente de fenol de Folin & Ciocalteu e o caldo de soja trípico foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros solventes e produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

### **2.2. Composição proximal**

A composição proximal foi analisada em relação aos teores de umidade (método 44-31), cinza (método 46-13), proteína (método 46-13) e lipídios (método 30-26) de acordo com AOAC (2000). O conteúdo de carboidratos foi determinado pela diferença depois de subtrair o teor de umidade, proteína, gordura e cinzas da matéria total. O valor energético foi calculado com base na composição proximal, utilizando os fatores de conversão Atwater de 4kcal/g de proteína, 4kcal/g de carboidrato e 9kcal/g de lipídio.

### **2.3. Extração de proteínas da torta de algodão**

A torta de algodão foi moída em moinho tipo ciclone (Star FT51, Fortinox, Brasil) para produzir farinha com um tamanho de partícula equivalente a 40 mesh. Esta amostra foi armazenada a 4 °C até o processamento. A extração proteica foi realizada miturando a farinha com tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 9,0) a uma relação 1:20 (p:v). A mistura foi mantida a 35 °C durante 60 minutos em agitador orbital (150 rpm). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5 000 x g durante 10 minutos a 25 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante armazenado a - 20 °C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

### **2.4. Pré-tratamento térmico e hidrólise proteica**

O pré-tratamento térmico (TT) foi realizado por aquecimento dos extratos proteicos obtidos como descrito no item 2.3 a 95 °C durante 60 minutos. Um ensaio controle (TC) foi realizado sem pré-tratamento nos extratos de proteínas.

A hidrólise proteica foi conduzida em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) para Flavourzyme® (60 °C) e Neutrase® (40 °C) e tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) para Alcalase® (55°C °C). O tempo de hidrólise foi fixado em 100 minutos para todas as enzimas, e a relação enzima:substrato foi de 1:17 (p:p). As reações foram interrompidas aquecendo as amostras a 80 °C durante 20 minutos e depois colocadas imediatamente em um banho de gelo. Quando necessário, o pH foi ajustado para 7,0 com HCl 0,05 M. No final da reação, as amostras foram centrifugadas a 5 000 x g durante 10 minutos a 25 °C, e o sobrenadante foi utilizado para posterior análise.

### **2.5. Determinação do grau de hidrólise das proteínas**

O grau de hidrólise (GH) foi determinado usando um método modificado de Peričin et al. (2009). Uma mistura 1: 1 (v:v) de hidrolisado e ácido tricloroacético 0,44 M (TCA) foi incubada durante 30 minutos e depois centrifugada a 7 000 x g durante 15 minutos a 25 °C. A concentração de proteína do sobrenadante, contendo os peptídeos solúveis em TCA, foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951),

utilizando BSA como padrão. Os resultados são expressos em porcentagem e foram calculados como a proporção da quantidade de peptídeos solúveis em TCA em relação à quantidade de peptídeos solúveis presentes no hidrolisado isento de TCA multiplicados por 100.

## 2.6. Atividade antioxidante

### 2.6.1. Atividade de eliminação de DPPH

As atividades de eliminação dos hidrolisados de proteínas contra os radicais DPPH foram determinadas de acordo com o método descrito por Nguyen et al. (2017) adaptado a um leitor de microplacas. Um volume de 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra (concentração de proteína de 3 mg/mL) foi misturado com 100  $\mu\text{L}$  de solução de DPPH  $2 \times 10^{-4}$  M. A mistura foi incubada à temperatura ambiente na ausência de luz durante 30 min e a redução dos radicais DPPH foi quantificada utilizando um espectrofotômetro UV-Visible (VersaMax Tunable™ - Molecular Devices - Sunnyvale, CA, EUA) com  $\lambda = 550$  nm. O controle foi conduzido da mesma maneira, exceto que foi utilizada água destilada em vez de amostra. Uma menor absorvância da mistura reacional indica atividade de eliminação de radicais DPPH mais elevada.

A atividade de eliminação do radical DPPH foi obtida usando a equação 1:

$$\text{Eliminação do radical DPPH (\%)} = \frac{\text{Absorbância}_{\text{controle}} - \text{Absorbância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorbância}_{\text{controle}}} * 100 \quad \text{Eq. 1}$$

### 2.6.2. Ensaio de potencial de redução férrica (FRAP)

O potencial de redução férrica dos peptídeos foi testado seguindo o método descrito por Benzie e Strain (1999), adaptado a um leitor de microplacas. O reagente FRAP foi preparado misturando 10 volumes de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), 1 volume de TPTZ 0,01 M (2,4,6-tripiridil-S-triazina) dissolvido em HCl 0,01 M e 1 volume de  $\text{FeCl}_3$  0,02 M. Em seguida, misturaram 150  $\mu\text{L}$  de reagente de FRAP com 5  $\mu\text{L}$  de proteína hidrolisada (3 mg/mL de concentração de proteína), em uma placa de 96 poços de fundo transparente. A absorvância a 595 nm foi lida após 6 minutos de reação à temperatura ambiente, utilizando um leitor de microplacas. Os dados foram calculados

por meio de uma curva de calibração obtida com Trolox (0,5 - 6 mg/mL), nas mesmas condições de ensaio e expressos como mg de TE/mg de amostra.

## 2.7. Atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana foi avaliada como descrito por López-García et al. (2000), com modificações. Para o crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, a mistura do ensaio contendo  $10^4$  conídios/mL<sup>-1</sup> (concentração final), 180 µL de caldo batata dextrose (CBD) contendo 0,003% de clorafenicol e 20 µL dos hidrolisados (concentração de 3,00 mg/mL) por poço foi incubada em um volume final de 200 µL a 28 °C por 72 horas. Para o crescimento bacteriano, o ensaio foi realizado como descrito anteriormente, com os inóculos de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* de  $10^5$  UFC por mL, em caldo triptona soja (CTS) e a incubação realizada a 37 °C por 24 horas. No final do experimento, utilizou-se um espectrofotômetro de microplacas (VersaMax Tunable™ - Molecular Devices - Sunnyvale, CA, EUA) para medir a absorbância em  $\lambda = 492$  nm para *Colletotrichum gloeosporioides* e  $\lambda = 630$  nm para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A taxa de inibição foi calculada utilizando a equação 2.

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = \frac{\text{Absorbância}_{\text{controle}} - \text{Absorbância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorbância}_{\text{controle}}} * 100 \quad \text{Eq. 2}$$

## 2.8. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para avaliar o efeito do tempo de hidrólise e das diferentes enzimas testadas e pela aplicação do teste t ( $p < 0,05$ ) para avaliar o efeito do pré-tratamento térmico.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Composição proximal e rendimento da extração de proteínas

A Tabela 1 apresenta a composição química em peso seco da torta de algodão. O teor de proteína foi de 29,18 g.100g<sup>-1</sup> do peso seco da torta de algodão, e os lipídios, umidade, cinzas e carboidratos são responsáveis por 6,20 g.100g<sup>-1</sup>, 7,05 g.100g<sup>-1</sup>, 5,52 g.100g<sup>-1</sup> e 52,23 g.100g<sup>-1</sup> do peso seco do subproduto, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com reportes da literatura (Jagadi et al., 1987; Batterham et al., 1990; NRC, 1998; He et al., 2015), indicando que a torta de algodão é uma fonte rica de proteínas que pode ser usada na produção de moléculas de maior valor agregado.

**Tabela 1.** Composição proximal da torta de algodão

Composição proximal	(g.100g <sup>-1</sup> )
Umidade	7,05±0,01
Lipídeos	6,2±0,02
Cinza	5,52±0,02
Proteína	29,18±0,30
Carboidratos	52,23
Valor energético (kcal)	381,44

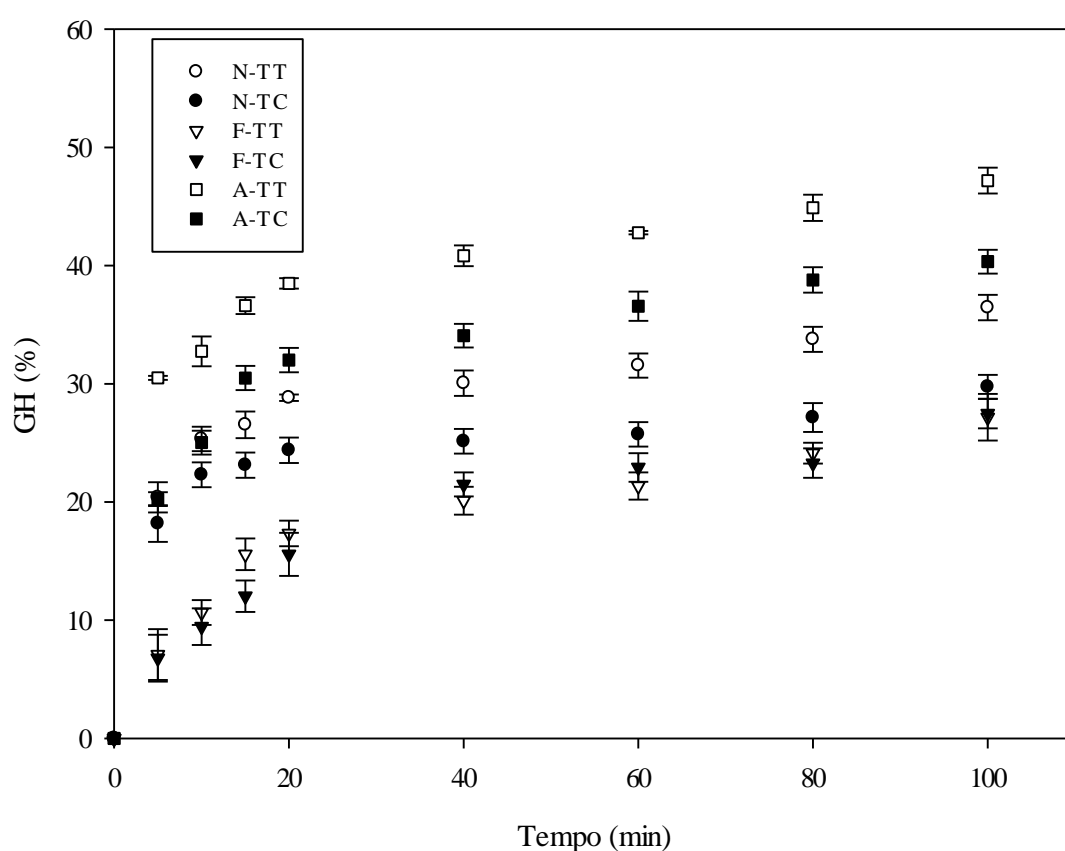
A extração das proteínas apresentou rendimento de 48,36%, um pouco menor que o relatado na literatura (Zhang, 2009), que foi de 65%. Este resultado pode ser explicado pelo pH mais alcalino utilizado pelo autor. Em nosso trabalho, pHs mais alcalinos resultaram em maior precipitação proteica, e diminuiu o rendimento de extração das proteínas solúveis em água.

#### 3.2. Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) é definido como a proporção de ligações peptídicas clivadas pela enzima proteolítica. Dependendo do grau de hidrólise, o peso molecular e a estrutura primária dos peptídeos podem variar, afetando sua atividade biológica (Amiza, Kong, & Faazaz, 2012; Balti et al., 2011; Liu et al., 2014).

A Figura 1 mostra que o GH aumenta com o tempo de incubação com as enzimas proteolíticas comerciais Alcalase®, Neutrase® e Flavourzyme®. É possível verificar,

para todos os hidrolisados, que houve aumento rápido do grau de hidrólise entre 0 a 20 minutos de incubação, a partir deste momento há aumento marginal deste parâmetro, atingindo valores máximos na faixa de 27,17% - 47,19%. Como indicado acima, o aumento do GH está diretamente relacionado ao aumento do número de ligações peptídicas clivadas. Esta alta taxa inicial é indicativa de clivagem máxima de ligações peptídicas, enquanto a diminuição do GH à medida que a reação progride pode ser atribuída à formação de produtos de reação que se tornam concorrentes do substrato, diminuindo a concentração de ligações peptídicas disponíveis para hidrólise, provocando inibição e desnaturação enzimática (Shahidi, Han; & Synowiecki, 1995; Ketnawa et al, 2017).



**Figura 1.** GH (%) dos extratos de proteína da torta de algodão TT e TC hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo (100 minutos).

O pré-tratamento térmico (TT) mostrou influência significativa ( $p < 0,05$ ) no GH após 5 minutos de reação para a enzima Alcalase® quando comparado ao tratamento controle (TC) (30,51% e 20,22% para TT e TC, respectivamente) e após 20 minutos para Neutrase® (28,83% e 24,37% para TT e TC, respectivamente). TT aumentou o GH

das proteínas da torta de algodão quando as três enzimas foram analisadas. Um aumento de 6,84%; 6,71% e 0,32% foi observado para Alcalase®, Neutrase® e Flavourzyme®, respectivamente. Estes dados mostram que aquecer as amostras a 95 °C por 60 minutos levou à desnaturação proteica, permitindo que as enzimas proteolíticas Alcalase® e Neutrase® acessassem os sítios de clivagem inacessíveis devido à estrutura nativa das proteínas (Adjonu et al., 2013). No entanto, é interessante notar que o TT não aumentou significativamente o GH utilizando a enzima Flavourzyme®, mostrando que provavelmente não há exposição dos locais de clivagem desta enzima após o pré-tratamento térmico.

O grau de hidrólise é influenciado pela clivagem e especificidades da enzima utilizada, fonte do substrato, relação enzima: substrato, bem como tempo de hidrólise (García-Moreno et al., 2014, Ketnawa et al., 2017). Alcalase® e Neutrase® são preparações enzimáticas, que predominantemente contêm endopeptidases que clivam as ligações peptídicas dentro da cadeia polipeptídica, liberando peptídeos de tamanho pequeno e médio. Enquanto isso, a Flavourzyme® é uma mistura de enzimas com atividades de endo e exopeptidase, que tem ampla especificidade e produzem peptídeos de tamanho pequeno e aminoácidos livres (Xia et al., 2012; Kalyankar et al., 2013; Betancur-Ancona et al., 2014; Chen et al., 2017).

Os resultados apresentados na figura 1 permitem definir a seguinte ordem decrescente de grau de hidrólise do extrato proteico da torta de algodão: Alcalase® TT > Alcalase® TC > Neutrase® TT > Neutrase® TC > Flavourzyme® TT > Flavourzyme® TC. Estes resultados estão de acordo com a literatura, cujos dados mostram maior proteólise catalisada por Alcalase® quando comparada às atividades enzimáticas de Neutrase® e Flavourzyme® (Kristinsson & Rasco, 2000; Vaštag et al., 2011; Shamloo et al., 2012; Thamnarathip et al., 2016; Vieira et al., 2017).

A atividade de exopeptidase de Flavourzyme® (Kimatu et al., 2017) pode influenciar a quantificação do GH, uma vez que o método de Lowry baseia-se na complexação de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com ligações peptídicas e também na oxidação de aminoácidos aromáticos (Lowry et al., 1951). Com a liberação de aminoácidos livres, não há disponibilidade de ligações peptídicas a serem quantificadas, podendo resultar em uma falsa medida do GH, quando na verdade os aminoácidos livres estão sendo liberados e não são detectados pelo método utilizado.

O GH observado foi maior do que os descritos por O'Keeffe et al. (2014), para os hidrolisados do concentrado de proteínas do soro de leite, que atingiram graus de

hidrólise da ordem de 20,5% para Alcalase®, 12,5% para Neutrase® e 11,4% para Flavourzyme®. Thamnarathip et al. (2016), que trabalharam com hidrolisados de farelo de arroz, obtiveram GH da ordem de 12,5 a 18,7% para Alcalase®, 5,3 - 8,3% para Neutrase® e 4,7-7,4% para Flavourzyme®. As diferenças entre esses valores podem ser explicadas pelas diferentes fontes de proteína, os procedimentos utilizados para extrair e preparar as proteínas, diferentes condições de hidrólise, diferentes proporções de enzima: substrato, a disponibilidade de locais de clivagem para as enzimas e o tempo de reação, bem como os diferentes métodos para avaliar a porcentagem de GH (Morais et al., 2013). Por estas razões, existem poucos estudos que comparam o GH de extratos de proteínas (Kristinsson & Rasco, 2000).

### **3.3. Atividade antioxidante avaliada pela eliminação do radical DPPH**

A Tabela 2 apresenta os resultados da capacidade de eliminação dos radicais livres DPPH pelos hidrolisados obtidos a partir da torta de algodão.

Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade de eliminação de DPPH, independente do hidrolisado e tempo de hidrólise utilizado, quando comparado à proteína não hidrolisada (Tabela 2). Esses resultados mostram que a proteína nativa apresenta, mesmo menor, atividade antioxidante, mas devido ao grande tamanho não é capaz de eliminar o radical tão eficientemente, em comparação com os hidrolisados (Ghribi et al., 2015). Além disso, sabe-se que a atividade antioxidante é por causa dos aminoácidos apolares (Rajapakse et al., 2005), que podem estar indisponíveis em toda a proteína, mas expostos quando a mesma proteína é hidrolisada pelas proteases.

A atividade de eliminação de DPPH (Tabela 2) pelos hidrolisados obtidos com (TT) ou sem pré-tratamento térmico (TC) seguiu um padrão semelhante ao observado quando se analisou o GH (Figura 1), quando valores maiores de GH foram obtidos, observou-se aumento na atividade antioxidante. Este fenômeno já foi relatado para outras fontes de proteína (You et al., 2009; Liu et al., 2010; Vastag et al., 2011).

Os dados mostraram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) de TT na eliminação de DPPH após 20 minutos para Neutrase® (51.40% e 55.04% e para TC e TT, respectivamente) após 5 minutos para Flavourzyme® (47,15% e 51,14% para TC e TT, respectivamente) e Alcalase® (58,93% e 64,75% para TC e TT, respectivamente). Esse comportamento coincidiu com o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em GH para o pré-tratamento térmico usando Neutrase® e Alcalase®, enquanto não foi observado para Flavourzyme®. TT



aumentou a atividade de eliminação no final da reação (100 min) em 7,41% (Neutrase®); 6,84% (Alcalase®); e 0,88% (Flavourzyme®).

**Tabela 2.** Atividade de eliminação (%) do radical DPPH por extratos de proteína da torta de algodão hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo.

Tempo (min)	Neutrase®		Flavourzyme®		Alcalase®	
	TC	TT	TC	TT	TC	TT
0	32,47 <sup>eA</sup>	30,28 <sup>eA</sup>	30,28 <sup>dA</sup>	32,16 <sup>eA</sup>	31,27 <sup>dA</sup>	30,28 <sup>eA</sup>
5	43,61 <sup>dB</sup>	43,29 <sup>dB</sup>	47,15 <sup>cB</sup>	51,14 <sup>dB</sup>	58,93 <sup>cA*</sup>	64,75 <sup>dA*</sup>
10	51,45 <sup>cB</sup>	47,80 <sup>dB</sup>	50,88 <sup>bcB</sup>	50,84 <sup>dB</sup>	68,34 <sup>bA*</sup>	75,20 <sup>cA*</sup>
15	52,20 <sup>cB</sup>	48,26 <sup>dB</sup>	51,34 <sup>bcB</sup>	52,10 <sup>dB</sup>	72,67 <sup>bA*</sup>	83,93 <sup>bA*</sup>
20	51,40 <sup>cC*</sup>	55,04 <sup>cB*</sup>	58,49 <sup>abB</sup>	54,68 <sup>cdB</sup>	82,77 <sup>aA*</sup>	93,52 <sup>abA*</sup>
40	56,27 <sup>bcC*</sup>	61,87 <sup>bB*</sup>	62,36 <sup>aB</sup>	57,11 <sup>bcC</sup>	84,38 <sup>aA*</sup>	94,69 <sup>abA*</sup>
60	61,18 <sup>cB*</sup>	66,39 <sup>bB*</sup>	61,18 <sup>aB</sup>	60,10 <sup>abC</sup>	87,46 <sup>aA*</sup>	99,62 <sup>aA*</sup>
80	66,73 <sup>abB*</sup>	75,69 <sup>abB*</sup>	58,85 <sup>abC</sup>	62,77 <sup>aC</sup>	86,55 <sup>aA*</sup>	96,02 <sup>abA*</sup>
100	70,69 <sup>abB*</sup>	78,10 <sup>abB*</sup>	62,06 <sup>aC</sup>	62,94 <sup>aC</sup>	88,60 <sup>aA*</sup>	95,44 <sup>abA*</sup>

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tempo de hidrólise na eliminação de DPPH.

<sup>ABC</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tipo de enzima na eliminação de DPPH para proteínas TC.

<sup>ABC</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tipo de enzima na eliminação de DPPH para proteínas TT.

\* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ , Teste t) na eliminação de DPPH entre uma amostra de TC e TT.

Os resultados também indicaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando os diferentes tipos de enzimas foram avaliados. Todos os hidrolisados produzidos pela enzima Alcalase® (TT e TC) apresentaram maior atividade de eliminação de DPPH ( $p < 0,05$ ) ao longo de tempo de reação (100 min). Os hidrolisados produzidos por Neutrase® (TT) apresentaram maior atividade de eliminação ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos hidrolisados obtidos usando Flavourzyme® (TT) após 40 minutos de reação. Os hidrolisados das proteínas TC apresentaram diferenças significativas ( $p$

<0,05) após os 20 minutos de reação, em que se pode observar que a atividade dos hidrolisados de Flavourzyme® foi superior ao de Neutrase® até aos 40 minutos de reação. Após 60 minutos de reação, a atividade de eliminação dos hidrolisados obtidos com o uso de Neutrase® foi superior à obtida pela enzima Flavourzyme®.

Os resultados mostraram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do TT na eliminação do radical DPPH após 20 minutos para Neutrase® (51,40% e 55,04% e para TC e TT, respectivamente), após 5 minutos para Flavourzyme® (47,15% e 51,14% para TC e TT, respectivamente) e 5 minutos para Alcalase® (58,93% e 64,75% para TC e TT, respectivamente). Esse comportamento coincidiu com o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do GH para Neutrase® e Alcalase®, enquanto não foi observado para Flavourzyme®. TT aumentou a atividade de eliminação no final da reação (100 min) em 7,41% (Neutrase®); 6,84% (Alcalase®); e 0,88% (Flavourzyme®).

A atividade de eliminação do radical DPPH pelos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise por Alcalase®, Neutrase® e Flavourzyme® foi no final da reação (100 min) de 95,44%, 78,10% e 62,94% para hidrolisados TT e 88,60%, 70,69% e 62,06% para os hidrolisados TC, respectivamente. A especificidade de cada enzima desempenhou um papel importante na liberação de peptídeos antioxidantes e/ou na exposição de aminoácidos antioxidantes e posterior medição de sua atividade. A utilização de diferentes proteases resulta na libertação de diferentes peptídeos com diferentes sequências de aminoácidos (Ruan et al., 2013; Thamnarathip et al., 2016). De acordo com Lapsongphon e Yongsawatdigul (2013), diferentes enzimas utilizadas na hidrólise afetam o tamanho e a estrutura primária dos peptídeos que, por sua vez, influenciam diretamente a atividade antioxidante.

Foi relatado que os altos níveis de eliminação de radicais livres de DPPH por hidrolisados de proteínas estão associados a grande quantidade de aminoácidos ou peptídeos hidrofóbicos (Rajapakse et al., 2005). De acordo com Markland & Smith (1971), Alcalase® hidrolisa proteínas com alta especificidade, liberando peptídeos com aminoácidos apolares como Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val e Met. Isso pode ser explicado pelo fato dos hidrolisados de Alcalase® apresentarem maior capacidade para eliminar o radical livre DPPH quando comparados aos hidrolisados das outras.

Os hidrolisados obtidos mostraram atividade de eliminação de DPPH comparável a relatada para hidrolisados de glutelina de cevada (56-61%) (Xia et al., 2012) e alfava (80%) (Xie et al., 2008).

Observou-se que os hidrolisados das proteínas da torta de algodão continham peptídeos e/ou aminoácidos capazes de estabilizar o radical DPPH. Esta capacidade dependia da especificidade das enzimas utilizadas e do peso molecular e da estrutura primária dos peptídeos obtidos (Girgih et al., 2011; Jin et al., 2016; Kimatu et al., 2017).

### **3.4. Atividade antioxidante avaliada pelo teste de FRAP**

O teste de FRAP mede a capacidade de um composto para reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  (íon férrico) em  $\text{Fe}^{2+}$  (íon ferroso), indicando assim o potencial antioxidante de um composto. Os resultados obtidos pelo ensaio FRAP são apresentados na Tabela 3.

Os dados mostram que todos os hidrolisados apresentaram potência redutora significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à proteína não hidrolisada (Tabela 3). Conforme observado nos resultados com DPPH, o alto peso molecular das proteínas não hidrolisadas (Ghribi et al., 2015) e a indisponibilidade dos aminoácidos apolares (Rajapakse et al., 2005) podem explicar esses dados.

Os resultados para a atividade antioxidante variaram com o tempo de hidrólise, mas não foi possível estabelecer correlação entre o tempo de hidrólise e a atividade antioxidante. Os valores mais altos de potência redutora para cada enzima foram evidenciados aos 10 min para tratamentos com Neutrase®, 0,28 mg ET /mg amostra para TC e 0,33 mg ET/mg amostra para TT, em 10 e 15 min para os tratamentos com Flavourzyme®, 0,35 mg ET/mg de amostra para TC e 0,36 mg de ET /mg de amostra, respectivamente, e em 20 min para tratamentos com Alcalase®, 0,43 mg ET/mg de amostra para TC e 0,58 mg ET/mg de amostra para TT.

A atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas não aumenta necessariamente com o GH. Conforme relatado por outros autores, a atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas não depende apenas do tamanho molecular dos peptídeos, mas também da presença de sequências peptídicas e sua composição em aminoácidos (Wieniaphan, Chitsomboon e Yongsawadigul, 2012; Vieira et al., 2017). Além disso, diferentes mecanismos de transferência de elétrons podem estar envolvidos e diferentes técnicas podem resultar em diferentes medidas de atividade antioxidante (Huang, Ou, & Prior, 2005).

**Tabela 3.** Poder redutor (mg ET/mg amostra) dos extratos de proteína da torta de algodão hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo.

Tempo (min)	Neutrase®		Flavourzyme®		Alcalase®	
	TC	TT	TC	TT	TC	TT
0	0,11 <sup>cA</sup>	0,12 <sup>cA</sup>	0,13 <sup>dA</sup>	0,13 <sup>eA</sup>	0,11 <sup>dA</sup>	0,12 <sup>dA</sup>
5	0,25 <sup>bB</sup>	0,26 <sup>bB</sup>	0,29 <sup>cB</sup>	0,32 <sup>bcdB</sup>	0,38 <sup>abA*</sup>	0,42 <sup>bcA*</sup>
10	0,28 <sup>abB</sup>	0,33 <sup>aA</sup>	0,35 <sup>abcA*</sup>	0,27 <sup>dC*</sup>	0,32 <sup>cA*</sup>	0,39 <sup>bcA*</sup>
15	0,33 <sup>aB</sup>	0,34 <sup>aB</sup>	0,29 <sup>cC</sup>	0,36 <sup>abcB</sup>	0,37 <sup>bcA*</sup>	0,48 <sup>bcA*</sup>
20	0,28 <sup>abC*</sup>	0,34 <sup>aB*</sup>	0,38 <sup>abB*</sup>	0,30 <sup>cdC*</sup>	0,43 <sup>aA*</sup>	0,58 <sup>aA*</sup>
40	0,30 <sup>abB*</sup>	0,27 <sup>bB*</sup>	0,35 <sup>abcAB</sup>	0,37 <sup>abA</sup>	0,31 <sup>cA*</sup>	0,38 <sup>bcA*</sup>
60	0,25 <sup>bB*</sup>	0,36 <sup>aB*</sup>	0,31 <sup>bcA</sup>	0,30 <sup>cdC</sup>	0,36 <sup>bcA*</sup>	0,48 <sup>ba*</sup>
80	0,31 <sup>abB*</sup>	0,34 <sup>aB*</sup>	0,36 <sup>abcA</sup>	0,34 <sup>bcdB</sup>	0,36 <sup>bcA*</sup>	0,40 <sup>bcA*</sup>
100	0,28 <sup>abC*</sup>	0,34 <sup>aB*</sup>	0,43 <sup>aA</sup>	0,44 <sup>aA</sup>	0,38 <sup>abcB*</sup>	0,47 <sup>bcA*</sup>

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tempo de hidrólise na redução de FRAP.

<sup>ABC</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tipo de enzima na redução de FRAP para proteínas TC.

<sup>ABC</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tipo de enzima na redução de FRAP para proteínas TC.

\* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ , Teste t) na redução de FRAP entre uma amostra de TC e TT.

Os resultados mostraram um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do TT no poder de redução. Para os tratamentos de Neutrase®, após 20 minutos de reação, foram detectados 0,34 mg de ET/mg de amostra e 0,28 mg ET/mg de amostra para TT e TC, respectivamente. Para tratamentos com Alcalase®, após 5 minutos de reação, foram detectados 0,42 mg de ET/mg de amostra e 0,35 mg ET/mg de amostra para TT e TC, respectivamente. E, finalmente, para o Flavourzyme®, em 10 min, foram detectadas 0,27 mg ET/mg de amostra e 0,35 mg ET /mg de amostra para TT e TC, respectivamente.

No final da reação (100 min), TT aumentou a atividade antioxidante final das proteínas hidrolisadas da torta de algodão em 0,09 mg ET /mg de amostra para

Alcalase®, 0,06 mg ET/mg de amostra para Neutrase® e 0,01 mg ET /mg de amostra para Flavourzyme®. Os resultados também indicaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os diferentes tipos de enzimas na capacidade de redução de hidrolisado. Os resultados variaram com o tempo de hidrólise (Tabela 3) e os hidrolisados produzidos pela Alcalase® (TC e TT) apresentaram as atividades mais altas, embora em certos momentos os hidrolisados produzidos por Neutrase® e Flavourzyme® não diferiram dos produzidos pela Alcalase®.

Os resultados do poder redutor dos hidrolisados no final da reação (100 min) diferiram significativamente entre todas as enzimas na hidrólise de proteínas TC e os maiores valores foram observados para Flavourzyme® (0,43 mg ET/mg amostra) seguido por Alcalase® (0,38 mg ET/mg de amostra) e Neutrase® (0,28 mg ET/mg de amostra). Para as proteínas TT, não houve diferença significativa entre os hidrolisados produzidos por Alcalase® (amostra de 0,47 mg ET/mg) e Flavourzyme® (amostra de 0,44 mg ET/mg). O tratamento com Neutrase® apresentou os valores mais baixos (amostra de 0,34 mg ET/mg).

Najafian e Babji (2015), estudaram a atividade antioxidante do hidrolisado de proteínas miofibrilares de peixe (*Pangasius sutchi*) usando preparações enzimáticas de Papaina, Alcalase® e Flavourzyme®. Os hidrolisados obtidos a partir de 60 min de hidrólise utilizando papaína mostraram a maior atividade antioxidante por meio do teste TBARS, redução de potência e atividade quelante. Os hidrolisados obtidos a partir da incubação com Alcalase® apresentaram maior atividade contra o radical DPPH, enquanto os obtidos com a hidrólise com Flavourzyme® apresentaram maior atividade contra o radical ABTS. Além disso, as diferentes atividades de redução desses hidrolisados podem ser atribuídas a diferentes grupos de cadeia lateral de aminoácidos com áreas densas de elétrons tornando-se expostos à medida que a hidrólise progride, além de peptídeos liberados e aminoácidos livres, atuando como fonte extra de elétrons e prótons para manter um alto potencial redox (Xiao et al., 2014, Borawska et al., 2016).

Os resultados do teste de atividade antioxidante pelo método FRAP não se correlacionaram bem com os da atividade de eliminação de DPPH, um comportamento também observado na literatura (Uluko et al. 2015, Huang, Ou & Prior, 2005 e Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Conforme mencionado acima, isso pode ser atribuído aos diferentes mecanismos de transferência de elétrons observados em cada um dos ensaios, resultando em dados diferentes.

### 3.5. Ensaio de atividade antifúngica

Os resultados da taxa de inibição do crescimento do fungo de *C. gloeosporioides* pelos hidrolisados das proteínas da torta de algodão são mostrados na Tabela 4. A taxa de inibição do crescimento variou de 12,68% a 73,89%. Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na taxa de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* nos primeiros 5 minutos de reação em comparação com a proteína não hidrolisada (Tabela 4), que aumentou de 17,58% para 34,20%.

O efeito do tempo de hidrólise na taxa de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* foi significativo ( $p < 0,05$ ) para os hidrolisados de Neutrase® TC até os 80 min (42,15%) e TT a 100 min de reação (50,68%). Os resultados para Flavourzyme® e Alcalase® (TC e TT) variaram amplamente juntamente com o tempo de hidrólise (Tabela 3) e não foi possível estabelecer correlação entre o tempo de hidrólise e a atividade antifúngica. No entanto, a maior taxa de inibição do crescimento do fungo *C. gloeosporioides* foi demonstrada pelo hidrolisado de Flavourzyme® TC a 10 min (36,78%) e TT a 15 min (42,32%) e para os hidrolisados de Alcalase® TC a 40 min (49,97%) e TT a 60 min (70,78%). O aumento da atividade antifúngica quando há aumento no GH sugere que este processo é desencadeado pela liberação de peptídeos previamente inativos codificados nas proteínas da torta de algodão.

Os resultados indicaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do pré-tratamento térmico na taxa de inibição do crescimento do fungo após 20 minutos para hidrolisados de Neutrase® (45,64% e 36,13% para TT e TC, respectivamente), após 5 minutos para os hidrolisados de Alcalase® (48,98% e 36,14% para TT e TC, respectivamente) e para os hidrolisados da enzima Flavourzyme®, o mesmo efeito foi observado em 40 (45,37% e 30,06% para TT e TC, respectivamente) e 100 min (52,69% e 45,69% para TT e CT, respectivamente). Exceto pelo tratamento com a enzima Flavourzyme®, esse comportamento coincidiu com o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do GH, da eliminação de radicais livres DPPH e do poder de redução observado no teste de FRAP para Neutrase® e para Alcalase® aos 5 min de reação. O pré-tratamento térmico das proteínas obtidas a partir da torta de algodão aumentou a taxa de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* em 21,2% (Alcalase®), 11,24% (Flavourzyme®) e 5,55% (Neutrase®).

**Tabela 4.** Taxa de inibição (%) do crescimento de *C. gloeosporioides* por extratos de proteína da torta de algodão hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo.

Tempo (min)	Neutrase®		Flavourzyme®		Alcalase®	
	TC	TT	TC	TT	TC	TT
0	15,01 <sup>eA</sup>	14,70 <sup>eA</sup>	12,43 <sup>eA</sup>	13,99 <sup>eA</sup>	12,68 <sup>eA</sup>	14,70 <sup>eA</sup>
5	33,06 <sup>dA</sup>	32,28 <sup>dB</sup>	31,56 <sup>cdA</sup>	36,03 <sup>dB</sup>	36,14 <sup>dA*</sup>	48,98 <sup>dA*</sup>
10	35,94 <sup>cdB</sup>	38,44 <sup>cC</sup>	36,78 <sup>abcdB</sup>	37,74 <sup>bcdB</sup>	46,38 <sup>cA*</sup>	54,62 <sup>cA*</sup>
15	35,90 <sup>cdB</sup>	39,70 <sup>cB</sup>	38,17 <sup>abcB</sup>	42,32 <sup>abcdB</sup>	46,52 <sup>bcA*</sup>	55,37 <sup>cA*</sup>
20	36,13 <sup>cdB*</sup>	45,64 <sup>bB*</sup>	32,37 <sup>bcdB</sup>	37,65 <sup>cdC</sup>	48,58 <sup>bcA*</sup>	55,26 <sup>cA*</sup>
40	37,97 <sup>bcB*</sup>	52,15 <sup>bA*</sup>	30,06 <sup>dC*</sup>	45,37 <sup>abB*</sup>	49,97 <sup>acA*</sup>	54,53 <sup>cA*</sup>
60	38,85 <sup>bcB*</sup>	46,22 <sup>bB*</sup>	42,23 <sup>aB</sup>	44,87 <sup>abcB</sup>	48,61 <sup>bcA*</sup>	70,78 <sup>aA*</sup>
80	42,15 <sup>abB*</sup>	46,32 <sup>bB*</sup>	39,36 <sup>abB</sup>	37,65 <sup>cdC</sup>	49,03 <sup>bcA*</sup>	63,00 <sup>bA*</sup>
100	45,13 <sup>abB*</sup>	50,68 <sup>aB*</sup>	34,45 <sup>bcdC*</sup>	45,69 <sup>aC*</sup>	52,69 <sup>aA*</sup>	73,89 <sup>aA*</sup>

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tempo de hidrólise na taxa de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides*.

<sup>ABC</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tipo de enzima na taxa de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* para proteínas TC.

<sup>ABC</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tipo de enzima na taxa de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* para proteínas TT.

\*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ . Teste t) na taxa de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* entre uma amostra de TC e TT.

Também foram observadas variações significativas ( $p < 0,05$ ) para os diferentes tipos de enzimas (Tabela 4). Os dados variaram com o tempo de hidrólise, no entanto, os hidrolisados produzidos por Alcalase® (TC e TT) ao longo do tempo de reação mostraram os valores maiores valores. Enquanto isso, em alguns tempos de reação, os hidrolisados TC (10, 15, 40 e 60 min) e os hidrolisados TT (5, 15 e 60 min), produzidos a partir das enzimas Flavourzyme® e Neutrase® não diferiram estatisticamente.

Nos 100 minutos de hidrólise, os hidrolisados produzidos por Alcalase® (TT e TC) apresentaram a maior taxa de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides* (73,89% e 52,69%, respectivamente), seguido por Neutrase® (50,68% e 45,13% para TT e TC, respectivamente) e Flavourzyme® (TC e TT) (45,69% e 34,45% para TT e TC, respectivamente).

Poucos estudos investigam a atividade antifúngica de peptídeos hidrolisados de proteínas alimentares. Em um estudo realizado por Corrêa et al. (2011), demonstrou que o caseinato de ovino hidrolisado por 3 horas foi capaz de inibir o crescimento de fungos *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium expansum*. O fungo filamentoso *C. gloeosporioides*, inibido pelos hidrolisados estudados neste estudo, é um dos mais importantes agentes fitopatogênicos que causam doenças nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Este fungo causa doenças pré e pós-colheita em flores, frutos, hastes e folhas de várias espécies de frutas, como abacate, manga, mamão, maracujá, goiaba e melão (Sarkar, 2016, Lakshmi, Reddy & Prasad, 2011). O gênero foi recentemente escolhido como o oitavo grupo mais importante de fungos fitopatogênico mais importante do mundo, com base na importância científica e econômica percebida (Dean et al., 2012). Desta forma, os resultados representam uma aplicação potencial como agentes fungicidas adicionais dos peptídeos antimicrobianos gerados a partir de proteínas alimentares.

### **3.6. Ensaio de atividade antibacteriana**

A Tabela 4 mostra os resultados da taxa de inibição do crescimento de *S. aureus* pelos hidrolisados de proteína da torta algodão. Os resultados indicaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na taxa de inibição do crescimento nos primeiros 5 minutos de reação, em comparação com a proteína não hidrolisada, e esse aumento variou de 9,3 a 19,71%. Cheng et al. (2013) observaram atividade antibacteriana significativamente maior em comparação com proteínas não hidrolisadas e atribuíram essa diferença à existência de um certo limiar de hidrofobicidade em que a proteína/peptídeo apresenta o maior efeito antibacteriano. Este limiar é importante para a ação antibacteriana, uma vez que a maior parte dos peptídeos antimicrobianos age diretamente na membrana celular do micro-organismo alvo (Guilhelmelli et al., 2013). A partição do peptídeo na membrana celular (Hattotuwigama & Flower, 2006) está diretamente ligada à ação antimicrobiana do peptídeo (Bagheri, 2015).

O efeito do tempo de hidrólise sobre a taxa de inibição do crescimento de *S. aureus* foi significativo ( $p < 0,05$ ) para o tratamento com Neutrase® até 5 minutos para o hidrolisado TC (15,60%) e 15 minutos para o hidrolisado TT (17,40%). Para o tratamento com Flavourzyme®, TC e TT, observou-se o mesmo efeito até 5 min (14,22 e 14,29%, respectivamente) e para Alcalase®, TC até 100 minutos (28,35%) e TT 60 min (28,98%).



**Tabela 5.** Taxa de inibição (%) do crescimento de *S. aureus* por extratos de proteína da torta de algodão hidrolisados por enzimas comerciais Neutrase®, Flavourzyme® e Alcalase® ao longo do tempo.

Tempo (min)	Neutrase®		Flavourzyme®		Alcalase®	
	TC	TT	TC	TC	TC	TT
0	4,59 <sup>bA</sup>	5,59 <sup>cA</sup>	5,40 <sup>bA</sup>	4,90 <sup>bA</sup>	4,85 <sup>dA</sup>	4,65 <sup>dA</sup>
5	15,60 <sup>aB</sup>	14,89 <sup>bB</sup>	14,22 <sup>aB</sup>	14,29 <sup>aB</sup>	19,69 <sup>cA*</sup>	24,36 <sup>cA*</sup>
10	16,01 <sup>aB</sup>	16,37 <sup>bB</sup>	14,39 <sup>aC</sup>	14,12 <sup>aC</sup>	18,89 <sup>cA*</sup>	25,79 <sup>bcA*</sup>
15	16,44 <sup>aB</sup>	17,40 <sup>abB</sup>	16,35 <sup>aB</sup>	16,32 <sup>aB</sup>	19,07 <sup>cA*</sup>	25,27 <sup>cA*</sup>
20	16,27 <sup>aB*</sup>	19,73 <sup>abB*</sup>	15,59 <sup>aB</sup>	15,92 <sup>aC</sup>	20,42 <sup>cA*</sup>	25,92 <sup>bcA*</sup>
40	17,80 <sup>aB*</sup>	20,64 <sup>aB*</sup>	15,64 <sup>aC</sup>	15,63 <sup>aC</sup>	20,03 <sup>cA*</sup>	27,55 <sup>bcA*</sup>
60	17,62 <sup>aBC*</sup>	20,38 <sup>aB*</sup>	15,98 <sup>aC</sup>	15,57 <sup>aC</sup>	25,07 <sup>bA*</sup>	28,98 <sup>abA*</sup>
80	17,67 <sup>aB*</sup>	20,57 <sup>aB*</sup>	17,17 <sup>aB</sup>	17,89 <sup>aC</sup>	26,70 <sup>abA*</sup>	31,42 <sup>aA*</sup>
100	17,85 <sup>aB*</sup>	22,35 <sup>aB*</sup>	16,68 <sup>aB</sup>	16,66 <sup>aC</sup>	28,35 <sup>aA*</sup>	32,38 <sup>aA*</sup>

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tempo de hidrólise na taxa de inibição do crescimento de *S. aureus*.

<sup>ABC</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tipo de enzima na taxa de inibição do crescimento de *S. aureus* para proteínas TC.

<sup>ABC</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no efeito do tipo de enzima na taxa de inibição do crescimento de *S. aureus* para proteínas TT.

\*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ . Teste t) na taxa de inibição do crescimento de *S. aureus* entre uma amostra de TC e TT.

Os resultados indicaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do TT na atividade antibacteriana após 20 minutos para os hidrolisados produzidos por Neutrase® (19,73% e 16,27% para TT e TC, respectivamente), após 5 minutos de hidrólise com Alcalase® (24,36% e 19,69% para TT e TC, respectivamente) e, para os hidrolisados obtidos com Flavourzyme®, não foi observado efeito do TT. Um comportamento semelhante coincidiu com o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de GH, eliminação de radicais livres DPPH, potência redutora observada no teste de FRAP e atividade

antifúngica. O TT aumentou a taxa de inibição do crescimento de *S. aureus* a 100 min de hidrólise das proteínas da torta de algodão em 4,5% (Neutrase®) e 4% (Alcalase®).

Os dados também indicaram variações significativas ( $p < 0,05$ ) para os diferentes tipos de enzimas. Todos os hidrolisados produzidos por Alcalase® (TC e TT) mostraram a maior taxa de inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* ( $p < 0,05$ ) ao longo da reação de hidrólise (100 min). Para a hidrólise utilizando as enzimas Neutrase® e Flavourzyme®, os resultados variaram ao longo do tempo de hidrólise, no entanto, em uma análise geral, os hidrolisados TT produzidos por Neutrase® apresentaram atividade superior ( $p < 0,05$ ) aos hidrolisados TT obtidos por usando Flavourzyme®.

A taxa de inibição do crescimento nos 100 minutos de hidrólise de das proteínas TT foi 32,38%, 22,35% e 16,66% para Alcalase®, Neutrase® e Flavourzyme®, respectivamente. Para os hidrolisados TC, a taxa de inibição do crescimento ao mesmo tempo foi de 28,35%, 17,85% e 16,68% para Alcalase®, Neutrase® e Flavourzyme®, respectivamente.

A taxa de inibição do crescimento de *E. coli* foi menor quando comparada a *S. aureus*. A taxa de inibição do crescimento variou de 13% a 18% (dados não apresentados) e foi observada para os hidrolisados produzidos pelo tratamento usando Alcalase® TT após 20 min de reação. Todos os outros hidrolisados não apresentaram ação contra esta bactéria.

Estes resultados estão de acordo com vários estudos relatando que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes do que as bactérias Gram-positivas (Lambert et al., 2001, Corrêa et al., 2011; Jemil et al., 2014). Estes resultados podem ser explicados pelo envelope celular de bactérias Gram-negativas, que é estrutural e funcionalmente mais complexo do que a bactéria Gram-positiva, tais diferenças na composição da membrana bacteriana podem ter implicações para o modo de ação e especificidade de compostos antibacterianos (Floris et al., 2003).

Castro e Sato (2016) observaram valor máximo de inibição do crescimento de 44,07% para *S. aureus* ATCC 6538 e 19% para *E. coli* ATCC 11229, na presença da mistura de proteínas de soja e soro de leite bovino hidrolisada. A atividade antibacteriana dos hidrolisados de proteínas depende da sua interação com a parede celular e a membrana da bactéria e essa interação depende das características dos peptídeos, como a estrutura molecular (composição e sequência de aminoácidos),

tamanho do peptídeo, hidrofobicidade e distribuição de carga (Pan et al., 2007, Sila et al., 2014).

#### 4. Conclusões

A influência do pré-tratamento térmico e a especificidade da enzima hidrolisadora sobre as atividades antioxidantes e antimicrobianas de hidrolisados de proteína da torta de algodão foram investigadas. O tratamento térmico mostrou ser capaz de permitir a liberação de mais peptídeos com capacidade antioxidante, conforme demonstrado pelos ensaios DPPH e FRAP. Além disso, o aumento do tempo de incubação de extratos de proteína da torta de algodão com as enzimas comerciais Alcalase®, Flavourzyme® e Neutrase® mostrou-se capaz de também aumentar a liberação dessas moléculas bioativas. Esses tratamentos também mostraram ser capazes de aumentar a atividade antimicrobiana contra o fungo *C. gloeosporioides* e bactéria Gram-positiva *S. aureus*, mas não contra bactéria Gram-negativa *E. coli*. Pode-se concluir que a seleção adequada de um coquetel enzimático, combinado com o tratamento térmico e o tempo de reação do extrato proteico de um subproduto agroindustrial, é capaz de produzir biomoléculas de interesse biotecnológico.

#### 5. Referências

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food chemistry*, 136(3), 1435-1443.
- Amarowicz, R. (2008). Antioxidant activity of protein hydrolysates. *European journal of lipid science and technology*, 110(6), 489-490.
- Amiza, M. A., Kong, Y. L., & Faazaz, A. L. (2012). Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*, 19(1), 199-206.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 17th ed. Virginia, 2000.
- Arrutia, F., Puente, Á., Riera, F. A., Menéndez, C., & González, U. A. (2016). Influence of heat pre-treatment on BSA tryptic hydrolysis and peptide release. *Food chemistry*, 202, 40-48.

- Balti, R., Jridi, M., Sila, A., Souissi, N., Nedjar-Arroume, N., Guillochon, D., & Nasri, M. (2011). Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 943-950.
- Batterham, E. S., Andersen, L. M., Baigent, D. R., Darnell, R. E., & Taverner, M. R. (1990). A comparison of the availability and ileal digestibility of lysine in cottonseed and soya-bean meals for grower/finisher pigs. *British Journal of Nutrition*, 64(3), 663-677.
- Bellaloui, N., & Turley, R. B. (2013). Effects of fuzzless cottonseed phenotype on cottonseed nutrient composition in near isogenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutant lines under well-watered and water stress conditions. *Frontiers in plant science*, 4, 516.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, 299, 15-27.
- Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., & Chel-Guerrero, L. (2014). Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(1), 2-8.
- Borawska, J., Darewicz, M., Vegarud, G. E., & Minkiewicz, P. (2016). Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio* L.) protein ex vivo and in vitro hydrolysates. *Food chemistry*, 194, 770-779.
- Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2016). Simultaneous hydrolysis of proteins from different sources to enhance their antibacterial properties through the synergistic action of bioactive peptides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 209-212.
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: a review. *Food Chemistry*, 245, 205-222.
- Chen, Z., Wang, Y., Liu, W., Wang, J., & Chen, H. (2017). A novel cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of papain and neutrase-production, partial characterization and application. *International journal of biological macromolecules*, 95, 650-657.
- Cheng, X., Tang, X., Wang, Q., & Mao, X. Y. (2013). Antibacterial effect and hydrophobicity of yak  $\kappa$ -casein hydrolysate and its fractions. *International Dairy Journal*, 31(2), 111-116.

- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F. C., Segalin, J., ... & Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(12), 2247-2254.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, M., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, *13*(4), 414-430.
- Dei Piu, L., Tassoni, A., Serrazanetti, D. I., Ferri, M., Babini, E., Tagliazucchi, D., & Gianotti, A. (2014). Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. *Food chemistry*, *155*, 199-206.
- Dowd, M. K., & Wakelyn, P. J. (2010). Cottonseed current and future utilization. *Cotton: technology for the 21st century*. ICAC Press, Washington, DC, 437-460.
- Floris, R., Recio, I., Berkhout, B., & Visser, S. (2003). Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Current pharmaceutical design*, *9*(16), 1257-1275.
- García-Moreno, P. J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N. M., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2014). Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food research international*, *65*, 469-476.
- Ghribi, A. M., Sila, A., Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N., Makhoul, I., Blecker, C., Attia, H., Dhulster, P., Bougateg, A., & Besbes, S. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *Journal of functional foods*, *12*, 516-525.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Li, H., Adebisi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Kinetics of enzyme inhibition and antihypertensive effects of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *88*(11), 1767-1774.
- He, Z., Chapital, D. C., Cheng, H. N., Klasson, K. T., Olanya, O. M., & Uknalis, J. (2014). Application of tung oil to improve adhesion strength and water resistance of cottonseed meal and protein adhesives on maple veneer. *Industrial Crops and Products*, *61*, 398-402.

- He, Z., Shankle, M., Zhang, H., Way, T. R., Tewolde, H., & Uchimiya, M. (2013). Mineral composition of cottonseed is affected by fertilization management practices. *Agronomy Journal*, *105*(2), 341-350.
- He, Z., Zhang, H., & Olk, D. C. (2015). Chemical composition of defatted cottonseed and soy meal products. *PloS one*, *10*(6), e0129933.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(6), 1841-1856.
- Jagadi, M. M., Rundgren, M., & Ogle, R. B. (1987). Chemical characterisation and nutrient evaluation of some Tanzanian plant protein feedstuffs. *ILCA Bulletin*, *28*, 22-26.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B. S. B., Mehiri, M., Hajji, M., & Nasri, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, *49*(6), 963-972.
- Jin, D. X., Liu, X. L., Zheng, X. Q., Wang, X. J., & He, J. F. (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food chemistry*, *204*, 427-436.
- Kalyankar, P., Zhu, Y., O'Keeffe, M., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2013). Substrate specificity of glutamyl endopeptidase (GE): hydrolysis studies with a bovine  $\alpha$ -casein preparation. *Food chemistry*, *136*(2), 501-512.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., & Rawdkuen, S. (2017). Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. *Food chemistry*, *215*, 383-390.
- Kimatu, B. M., Zhao, L., Biao, Y., Ma, G., Yang, W., Pei, F., & Hu, Q. (2017). Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chemistry*, *230*, 58-67.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, *40*(1), 43-81.
- Lakshmi, B. K. M., Reddy, P. N., & Prasad, R. D. (2011). Cross-infection potential of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolates causing anthracnose in subtropical fruit crops. *Tropical Agricultural Research*, *22*(2), 183-193

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, *91*(3), 453-462.
- Lapsongphon, N., & Yongsawatdigul, J. (2013). Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. *Food chemistry*, *141*(2), 992-999.
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International journal of molecular sciences*, *17*(6), 950.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, *118*(2), 403-410.
- Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., & Wang, J. (2014). Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food chemistry*, *151*, 459-465.
- López-García, B., González-Candelas, L., Pérez-Payá, E., & Marcos, J. F. (2000). Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Molecular plant-microbe interactions*, *13*(8), 837-846.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, *193*(1), 265-275.
- Markland, F. S., & Smith, E. L. (1971). 16 Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties. *The enzymes*, *3*, 561-608.
- Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food research international*, *65*, 344-349.
- Morais, H. A., Silvestre, M. P., Silva, V. D., Silva, M. R., Simoes e Silva, A. C., & Silveira, J. N. (2013). Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: effect of the enzyme type and reaction time. *American Journal of Food Technology*, *8*(1), 1-16.
- Nagalakshmi, D., Rao, S. V. R., Panda, A. K., & Sastry, V. R. (2007). Cottonseed meal in poultry diets: a review. *The Journal of Poultry Science*, *44*(2), 119-134.

- Najafian, L., & Babji, A. S. (2015). Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*, *60*(1), 452-461.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. 1988. Committee on Animal Nutrition. Subcommittee of Swine Nutrition. Washington, EUA. *Nutrient requirements of swine*, 9.
- Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y. H. B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A. M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries Science*, *83*(2), 317-331.
- Ortiz-Martinez, M., Winkler, R., & García-Lara, S. (2014). Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal of proteomics*, *111*, 165-183.
- Oseguera-Toledo, M. E., de Mejia, E. G., & Amaya-Llano, S. L. (2015). Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International*, *76*, 839-851.
- Pan, Y., Shiell, B., Wan, J., Coventry, M. J., Michalski, W. P., Lee, A., & Roginski, H. (2007). The molecular characterisation and antimicrobial properties of amidated bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *International dairy journal*, *17*(12), 1450-1459.
- Pant, M., Sharma, S., Dubey, S., Naik, S. N., & Patanjali, P. K. (2016). Utilization of biodiesel by-products for mosquito control. *Journal of bioscience and bioengineering*, *121*(3), 299-302.
- Peričin, D., Radulović-Popović, L., Vaštag, Ž., Mađarev-Popović, S., & Trivić, S. (2009). Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chemistry*, *115*(2), 753-757.
- Przybylski, R., Firdaous, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., & Nedjar, N. (2016). Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food chemistry*, *211*, 306-313.
- Rajakakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., & Kim, S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, *38*(2), 175-182.
- Ramada, M. H. S., Brand, G. D., Abrão, F. Y., Oliveira, M., Cardozo Filho, J. L., Galbieri, R., ... & Bloch, C. (2017). Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Scientific Reports*, *7*(1), 13263.



- Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of functional foods*, 4(1), 39-52.
- Ruan, G., Chen, Z., Wei, M., Liu, Y., Li, H., & Du, F. (2013). The study on microwave assisted enzymatic digestion of ginkgo protein. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 94, 23-28.
- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Hamid, A. A., & Ghazali, H. M. (2015). Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology advances*, 33(1), 80-116.
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. P., & Amar, R. B. (2014). Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. *Food research international*, 65, 329-336.
- Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*, 3(4), 229-254.
- Sarkar, A. K. (2016). Anthracnose diseases of some common medicinally important fruit plants. *J. Med. Plants*, 4(3), 233-236.
- Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food chemistry*, 53(3), 285-293.
- Shamloo, M., Bakar, J., Mat Hashim, D., & Khatib, A. (2012). Biochemical properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *International Food Research Journal*, 19(1).
- Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M., Dhulster, P., Bougatef, A. (2014). Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 183-188.
- Sun, H., Yao, X., Wang, X., Wu, Y., Liu, Y., Tang, J., & Feng, J. (2015). Chemical composition and in vitro antioxidant property of peptides produced from cottonseed meal by solid-state fermentation. *CyTA-Journal of Food*, 13(2), 264-272.
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Thamnarathip, P., Jangchud, K., Nitisinprasert, S., & Vardhanabhuti, B. (2016). Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. *Journal of Cereal Science*, 69, 329-335.

- Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, *18*, 1138-1146.
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, *124*(4), 1316-1321.
- Vieira, E. F., & Ferreira, I. M. (2017). Antioxidant and antihypertensive hydrolysates obtained from by-products of cannery sardine and brewing industries. *International Journal of Food Properties*, *20*(3), 662-673.
- Vieira, E. F., da Silva, D. D., Carmo, H., & Ferreira, I. M. (2017). Protective ability against oxidative stress of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *228*, 602-609.
- Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M., & Chen, L. (2012). Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, *134*(3), 1509-1518.
- Xiao, P., Huang, H., Chen, Y., Chen, J., Li, X., & Shi, H. (2014). Nutritional Evaluation, Characterization and Antioxidant Activity of Radix Isatidis Protein Hydrolysates under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Journal of Food and Nutrition Research*, *2*(11), 831-838.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food chemistry*, *111*(2), 370-376.
- Xu, Y., Li, Y., Bao, T., Zheng, X., Chen, W., & Wang, J. (2017). A recyclable protein resource derived from cauliflower by-products: Potential biological activities of protein hydrolysates. *Food chemistry*, *221*, 114-122.
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative food science & emerging technologies*, *10*(2), 235-240.
- Zhang, B., Cui, Y., Yin, G., Li, X., & Zhou, X. (2009). Alkaline extraction method of cottonseed protein isolate. *Modern Applied Science*, *3*(3), 77.
- Zhou, J. Z., Zhang, H., Gao, L., Wang, L., & Qian, H. F. (2015). Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of cottonseed protein gels. *Food and Bioproducts Processing*, *96*, 27-34.

- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in microbiology*, 4, 353.
- Bagheri, M. (2015). Cationic Antimicrobial Peptides (AMPs): Thermodynamic Characterization of Peptide–Lipid Interactions and Biological Efficacy of Surface-Tethered Peptides. *ChemistryOpen*, 4(3), 389-393.
- Hattotuwagama, C. K., & Flower, D. R. (2006). Empirical prediction of peptide octanol-water partition coefficients. *Bioinformatics*, 1(7), 257.

## **CAPÍTULO II – Produção e caracterização de filmes de alginato adicionados de hidrolisado proteico da torta de algodão para aplicação como embalagem ativa para alimentos**

*(Normas de acordo com a revista Food Chemistry)*

### **Resumo**

A utilização de hidrolisados de proteínas provenientes de proteínas subutilizadas obtidos por hidrólise enzimática como ingredientes ativos pode ser uma estratégia promissora no desenvolvimento de embalagens bioativas. Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da incorporação do hidrolisado de proteína da torta de algodão (HPA) nas propriedades: físicas, de barreira, ópticas, antioxidantes e antimicrobianas de filmes de alginato. Também, avaliou-se a liberação dos peptídeos em dois diferentes simuladores de alimentos. Os resultados indicaram que a adição de HPA provocou aumento ( $p < 0,05$ ) na espessura e permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e não afetou o teor de umidade, a biodegradabilidade, a solubilidade e propriedade de barreira a óleo dos filmes. Os filmes com HPA apresentaram excelentes propriedades de barreira à luz UV e a cor da superfície tornou-se ( $p < 0,05$ ) mais escura, avermelhada e amarelada com o aumento do conteúdo de HPA. O conteúdo fenólico total e atividade antioxidante aumentaram com o aumento da concentração de HPA adicionado aos filmes ( $p < 0,05$ ) em todos os ensaios antioxidantes (DPPH, FRAP e ABTS). Os filmes incorporados com HPA também apresentaram efeito inibitório contra *Staphylococcus aureus*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Rhizopus oligosporus*, mas não contra *Escherichia coli*. Nos testes de migração, em meio aquoso, todos os filmes ativos liberaram uma quantidade de peptídeos acima de 60% na primeira meia hora de ensaio. A combinação de filmes de alginato incorporados com HPA e etanol (que representam alimentos gordurosos) proporcionou uma liberação controlada e gradual do composto ativo. O filme alginato que incorpora HPA é um material de embalagem ativa promissor para a preservação de alimentos gordurosos.

**Palavras-chave:** Peptídeos bioativos, hidrólise enzimática, filmes ativos.

## 1. Introdução

As embalagens desempenham um papel importante na contenção e preservação dos produtos alimentícios. Os materiais de embalagem mais utilizados são baseados em polímeros de fontes não renováveis, que estão associados a preocupações com o meio ambiente. Portanto, várias pesquisas realizadas nos últimos anos tratam do desenvolvimento de embalagens para alimentos baseadas em polímeros naturais (Cazón et al., 2018).

Entre os muitos materiais que podem formar filmes comestíveis, o alginato é um composto interessante, pois não é tóxico, é biodegradável, biocompatível e de baixo custo (Vu & Won, 2013), e por isso, tem sido frequentemente explorado no desenvolvimento de filmes biodegradáveis que possuem ampla gama de aplicações para alimentos. O alginato é um polissacarídeo linear extraído de algas marrons. A estrutura química do alginato é composta por proporções variáveis de ácido  $\beta$ -D-manurônio e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico ligados por ligações glicosídicas do tipo 1-4. (Xiao, 2018).

Os interesses científicos atuais estão sendo focados na incorporação de substâncias bioativas no material de embalagem. Uma característica significativa dos biopolímeros, como o alginato, é a capacidade de transportar componentes bioativos para produzir embalagens ativas. O aprisionamento de substâncias bioativas é uma tecnologia emergente, que poderia reduzir a oxidação lipídica e o crescimento microbiano nos alimentos pela liberação lenta de componentes bioativos na superfície do alimento durante o armazenamento (Benbettaïeb, Karbowiak & Debeaufort, 2017).

Muitos pesquisadores se concentraram na bioatividade de peptídeos liberados de diferentes fontes proteicas naturais através de proteólise enzimática. Estes peptídeos são inativos dentro da sequência das moléculas da proteína nativa, mas podem ser liberados após a hidrólise enzimática e apresentar atividade antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladora, entre outras (Ortiz-Martinez et al., 2014).

Os hidrolisados de proteínas, devido as suas características bioativas, vêm sendo estudados como agentes bioativos no desenvolvimento de embalagens ativas. Rostami e colaboradores (2017), observaram que a adição de hidrolisado de proteína de carpa prata em filmes de gelatina de peixe produziu filmes com elevada capacidade antioxidante. Em outro estudo, a adição de hidrolisados de plasma bovino melhorou as propriedades antioxidantes de filmes à base de proteínas de soja e girassol (Salgado et al., 2011).

Grande quantidade de resíduos agroindustriais ricos em proteínas é produzida todos os anos, mas a grande maioria é subutilizada. As proteínas da torta de algodão, principal subproduto resultante do processo de extração de óleo de semente de algodão, foram consideradas uma fonte promissora e atrativa para produção de peptídeos bioativos (Gao, Cao & Li, 2010). Em nosso estudo anterior, as proteínas da torta de algodão foram utilizadas como matéria-prima para produção de hidrolisados de proteínas e liberaram peptídeos com elevado potencial antioxidante e antimicrobiano, que pode ser explorado no desenvolvimento de filmes bioativos.

Não foram encontrados na literatura relatos anteriores sobre a incorporação de hidrolisados de proteína de algodão em filmes de alginato. Desta forma, investigou-se os efeitos da incorporação de hidrolisado de proteínas da torta de algodão (HPA) nas características físicas (umidade, espessura e biodegradabilidade), de barreira (permeabilidade ao vapor de água e barreira lipídica), propriedades ópticas (parâmetros de cor e taxa de transmissão de luz UV/Vis) e a simulação de liberação dos peptídeos dos filmes de alginato. Também se avaliou conteúdo fenólico total atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material**

A torta de algodão foi doada pela empresa San Lorenzo - Agroindustrial (Trindade, GO, Brasil). A enzima proteolítica comercial Alcalase® 2.4L foi doada pela empresa LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, RS, Brasil). As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* O157: H7 foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília, Campus Planaltina. A cepado fungo *Colletotrichum gloeosporioides* CCT 5177 foi adquirida da Fundação Andre Tosello (Campinas, SP, Brasil). A cepa de *Rhizopus microsporus* van Tieghem var. *oligosporus* IOC 3801, foi cedida pela Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos da FIOCRUZ. 2,2-Difenil-picrilidrazilo (DPPH), 2-desoxirribose, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ ), o reagente de fenol de Folin & Ciocalteu e o caldo de soja tríplico foram

adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros solventes e produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

## **2.2. Extração de proteínas da torta de algodão**

A torta de algodão foi moída em moinho tipo ciclone (Star FT51, Fortinox, Brasil) para produzir farinha com tamanho de partícula equivalente a 40 mesh. Esta amostra foi armazenada a 4 °C até o processamento. Obtiveram-se extratos de proteína misturando a farinha com tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 9,0) a relação 1:20 (p:v). Esta mistura foi mantida a 35 °C durante 60 minutos em agitador orbital (150 RPM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5 000 x g durante 10 minutos a 25 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante armazenado a - 20 °C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

## **2.3. Obtenção dos hidrolisados de proteína de torta de algodão (HPA)**

Os extratos proteicos foram tratados termicamente (TT) por aquecimento a 95 °C durante 60 minutos antes do processo de hidrólise para desnaturar as proteínas e facilitar a clivagem pela enzima. A reação proteolítica foi conduzida em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), a 55°C °C para a enzima Alcalase®. O tempo de proteólise foi de 20 minutos, e a relação enzima: substrato foi de 1:17 (p:p). A reação foi interrompida aquecendo as amostras a 80 °C durante 20 minutos e depois colocadas imediatamente em um banho de gelo. Após isso, o pH foi ajustado para 7,0 com HCl 0,05 M. No final da reação, as amostras foram centrifugadas a 5 000 x g durante 10 minutos a 25 °C, e o sobrenadante foi utilizado para elaboração dos filmes.

## **2.4. Produção dos filmes**

Os filmes foram preparados segundo método proposto por Bierhalz, Silva & Kieckbusch (2012) com modificações. Preparou-se uma solução formadora de filme de alginato (1,5 g/100 mL) em água destilada contendo 0,6 g de glicerol/g de alginato. A solução foi agitada mecanicamente a 900 rpm (Tecnal, TE-139, Brasil) a 70 °C por cerca de 1 hora para assegurar a homogeneidade. Após este período, a temperatura do

sistema foi reduzida para 40 °C, e então, foi adicionado o HPA (0%, 0,15%; 0,30% e 0,60% (p/v), o sistema foi agitado durante 10 minutos. A solução (50 mL) foi vertida em placas de poliestireno Cralplast® (90x15 mm) e seca em estufa com circulação de ar (Tecnal, TE 394/2, Brasil) a 40 °C durante aproximadamente 20 h.

Todos os filmes foram acondicionados à temperatura ambiente e 50% de umidade relativa dentro de dessecadores com soluções saturadas de nitrato de magnésio durante 2 dias antes da submissão à caracterização física.

## 2.5. Espessura e teor de umidade dos filmes

Um micrómetro manual (com precisão de 0,01 mm) foi usado para medir a espessura dos filmes. Foram realizadas dez repetições para cada amostra em posição aleatória.

Amostras dos filmes foram cortadas na dimensão de 2cm<sup>2</sup> e pesadas antes e depois de secar em estufa a 105 °C por 24 h. O conteúdo de água foi calculado utilizando a Equação 1:

$$\text{Teor de umidade(\%)} = [m - m_0]/m_0 \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:  $m_0$  foi a massa inicial do filme (g) e  $m$  foi a massa após a secagem (g). O teor de água foi expresso como porcentagem (%).

## 2.6. Biodegradabilidade: degradação por enterro em solo

O teste de degradação dos filmes foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Stoll et al. (2017) com modificações. Um solo orgânico natural contido em caixas plásticas foi utilizado como ambiente de degradação e as amostras do filme foram cortadas em retângulos (2 cm x 3 cm), secas a 60 °C até massa constante ( $m_0$ ) e colocadas em uma malha de plástico, enterradas na profundidade de 5 cm da superfície do solo e a cada dois dias, adicionou-se água ao solo para manter a umidade em aproximadamente 40%. O grau de degradação dos filmes foi determinado após 10 dias como perda de massa ( $m_{10}$ ) pela Equação 2:

$$WL(\%) = [m_{10} - m_0]/m_0 \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$



## 2.7. Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A PVA dos filmes foi medida gravimetricamente de acordo com o método descrito por Casariego, Souza & Cerqueira (2009). Os filmes foram selados em células contendo 3 g de sulfato de cálcio para criar condição de armazenamento de UR 0%. As células foram inicialmente pesadas e colocadas em um dessecador contendo solução saturada de sulfato de potássio (97% de UR a 25 °C), então a quantidade de vapor de água transferida através da película e absorvida pelo dessecante foi determinada a partir do aumento de peso da célula. O ganho de peso da célula de permeação foi determinado a intervalos de 2 horas durante 10 horas. A taxa de transmissão de vapor d'água (TTVA) ( $\text{g/m}^2 \text{ h}$ ) dos filmes (Eq. (3)) foi determinada a partir da inclinação obtida a partir da análise de regressão do ganho de peso de umidade ( $\Delta a$ ) transferida através de uma área de filme ( $A$ ) durante um tempo definido ( $\Delta t$ ). A TTVA dos filmes foi então utilizada para calcular o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (PVA) usando a Eq. (4).

$$TTVA = \frac{\Delta a}{A \Delta t} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$PVA = \frac{TTVA}{\Delta p} x \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que: PVA é o coeficiente de permeabilidade ( $\text{g mm} / \text{m}^2 \text{ h Pa}$ ),  $x$  é a espessura do filme (mm),  $A$  é a área do filme exposto ( $19.625 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ ), e  $\Delta p$  é a pressão parcial do vapor de água gradiente entre a superfície interna ( $p_1$ ) e externa ( $p_2$ ) da película na câmara ( $\Delta p = 3169, \text{ Pa}$  a 25 °C).

## 2.8. Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada de acordo com os procedimentos de Kavosi et al. (2014) com modificações. Para determinar a massa seca inicial, as amostras de filme foram cortadas em tiras quadradas ( $2 \text{ cm}^2$ ) e secas a  $100 \pm 5 \text{ °C}$  durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram imersas em 50 mL de água

destilada durante 24 horas a  $23 \pm 2$  °C. As amostras embebidas foram então secas novamente a  $100 \pm 5$  ° C durante 24 horas para obter a massa seca final. A solubilidade em água dos filmes foi calculada utilizando a Equação 5:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{massa seca inicial} - \text{massa seca final}}{\text{massa seca inicial}} * 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

## 2.9. Propriedade de barreira lipídica

O coeficiente de permeabilidade ao óleo foi utilizado como indicação para propriedade de barreira lipídica dos filmes e foi determinado em tubos de ensaio utilizando óleo de girassol conforme proposto por Tang et al. (2005).

## 2.10. Propriedades ópticas

A cor das amostras de filme foi determinada utilizando colorímetro Color Quest II (HunterLab, Reston, EUA.) Através dos parâmetros de cor CIELab  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (vermelho-verde) e  $b^*$ (amarelo-azul). O cálculo do índice croma ( $C^*$ ) considerou o atributo quantitativo de cor e está representado pela Equação 6 e o cálculo do ângulo hue ( $h^*$ ) em graus, considerando o atributo qualitativo de cor, está representado pela Equação 7.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Eq. (6)}$$

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad \text{Eq. (7)}$$

A diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) foi calculada de acordo com a Equação 8:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2} \quad \text{Eq. (8)}$$

Em que:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  são os valores dos parâmetros de cor do fundo padrão e  $L$ ,  $a$ , e  $b$  são os valores dos parâmetros de cor dos filmes de teste. Todas as medidas foram realizadas em um fundo branco ( $L^* = 99,94$ ,  $a^* = -0,52$  e  $b^* = 1,43$ ) em triplicata.

As propriedades de barreira de filmes contraluz ultravioleta (UV) e visível foram medidas em comprimentos de onda variando entre 250 e 800 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Spectrometer Lambda 750, PerkinElmer, Brasil).

## 2.11. Teor de compostos fenólicos totais

O conteúdo fenólico total foi determinado com base na redução do reagente de Folin Ciocalteu (Ruiz-Navajas, Viuda-Martos, Sendra, Pérez-Alvarez e Fernández-López, 2013). A amostra de filme (25 mg) foi imersa em 3 mL de água destilada para obter o extrato. Adicionou-se um volume de 0,3 mL de extrato de filme a 2,5 mL de reagente de Folin Ciocalteu (10% v/v) seguido por 2 mL de solução de carbonato de sódio a 7,5% (p/v). A mistura foi incubada a 50 °C durante 5 min antes da medição da absorbância a 760 nm. Foram utilizadas soluções de ácido gálico (0-1000 ppm) para obter a curva padrão. O resultado foi expresso como o equivalente de ácido gálico de microgramas por grama de película ( $\mu\text{g}$  de EAG/g de filme).

## 2.12. Atividade antioxidante

### 2.12.1. Ensaio de eliminação de radicais DPPH

A atividade antioxidante dos filmes foi avaliada utilizando o ensaio de eliminação de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo) de acordo com Siripatrawan & Harte (2010) com ligeira modificação. O filme (25 mg) foi imerso em 3 mL de água destilada para obter o extrato. Foi adicionado um volume de 3 mL de extrato de filme a 1 mL de solução metanólica de DPPH 0,1 mM. Após 30 min de incubação no escuro a temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 517 nm. A atividade de eliminação de radicais DPPH foi medida utilizando a Equação 9:

$$\text{Eliminação do radical DPPH (\%)} = \frac{\text{Absorbância}_{\text{controle}} - \text{Absorbância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorbância}_{\text{controle}}} * 100 \quad \text{Eq. (9)}$$

### 2.12.2. Ensaio de eliminação radical ABTS

O teste de eliminação radical ABTS foi feito conforme descrito em Moreno, Atarés & Chiralt (2015). O ABTS foi dissolvido em água para atingir a concentração de 7 mM. Em seguida, 5 mL da solução estoque de ABTS foi misturado com 88 µL da solução de persulfato de potássio, durante 16 horas. A solução foi então diluída com etanol até atingir a absorvância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. Um volume de 40 µL de extrato de filme foi adicionado a 3960 µL da solução diluída. Após 6 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 734 nm. Foram utilizadas soluções de Trolox (0-1000 ppm) para obter a curva padrão. Os resultados foram expressos como equivalente a µM de trolox por grama de filme (µM de ET/g de filme).

### 2.12.3. Teste de poder antioxidante de redução férrica (FRAP)

O teste de FRAP foi realizado como descrito em Tongnuanchan, Benjakul & Prodpran (2012), com modificações. As amostras de filme (25 mg) foram imersas em 3 mL de água destilada para obter o extrato. O reagente FRAP foi preparado misturando 10 volumes de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), 1 volume de TPTZ 0,01 M (2,4,6-tripiridil-S-triazina) dissolvido em HCl 0,01 M e 1 volume de FeCl<sub>3</sub> 0,02 M. A solução de FRAP foi incubada durante 30 min a 37 °C em banho de água. Um volume de 150 µL de extrato de filme foi adicionado a 2850 µL de solução de FRAP e foi submetido à vortex. Em seguida, incubou-se em ambiente escuro à temperatura ambiente durante 30 min. A absorvância foi medida a 593 nm. Foram utilizadas soluções de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) (0-2000 µM) para obter a curva padrão. Os resultados foram expressos como equivalente a µM de sulfato ferroso por grama de filme (µM de ESF/g de filme).

### 2.13. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco em ágar contra duas bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e dois fungos (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizopus oligosporus*). Resumidamente, foram

espalhados 200  $\mu\text{L}$  de cultura bacteriana (ajustada para  $10^4$  células/mL) em placas com meio de Agar Triptona de Soja (TSA) e 200  $\mu\text{L}$  de suspensão de esporos (ajustada para  $10^5$  esporos/mL) em placas com meio Ágar Batata Dextrose (BDA). Após, colocou-se os filmes (10 mm de diâmetro) na superfície do meio e depois incubou-se a 37 °C durante 24 horas para as bactérias e 25 °C durante 72 horas para os fungos. O diâmetro da zona de inibição foi medido com um paquímetro.

#### **2.14. Teste de liberação dos peptídeos em simuladores para alimentos**

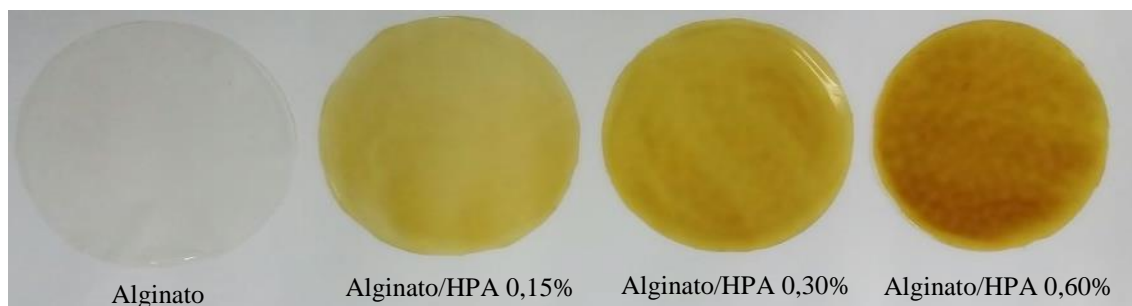
O teste de migração foi realizado de acordo com Piñeros-Hernandez, Medina-Jaramillo, López-Córdoba e Goyanes (2017). As amostras de filme foram cortadas em pedaços de 2  $\text{cm}^2$  e imersas em 5 mL de água (para representar meio aquoso) e 5 mL 95% de etanol (para representar meio gorduroso). As amostras foram agitadas a 125 rpm a 25 °C durante 72 horas. A migração dos peptídeos para os simuladores de alimentos foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

#### **2.15. Análise estatística**

Análise de variância (ANOVA) e comparações parciais de Tukey foram realizadas com um nível de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram relatados como média  $\pm$  desvio padrão.

### **3. Resultados e discussão**

Uma vez que a incorporação de agentes ativos pode influenciar as propriedades dos filmes ativos, os filmes foram submetidos aos procedimentos de caracterização e os resultados comparados aos valores obtidos para o filme livre de hidrolisado (filme de alginato puro) e com resultados reportados pela literatura. Todos os filmes, com e sem a incorporação do HPA, foram considerados homogêneos, flexíveis, sem áreas quebradiças e presença de bolhas como apresentado na Figura 1. A espessura, teor de umidade, a biodegradabilidade e a permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes são apresentados na Tabela 1.



**Figura 1.** Filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%).

**Tabela 1.** Propriedades físicas de filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%).

Filmes	Espessura (mm)	Umidade (%)	Biodegradabilidade (% em 10 dias)	PVA ( $\times 10^{-5}$ g mm/m <sup>2</sup> h Pa)
<b>Alginato</b>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	12,22 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	98,01 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	6,28 $\pm$ 0,24 <sup>d</sup>
<b>Alginato/HPA 0,15%</b>	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	11,97 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	95,75 $\pm$ 2,82 <sup>a</sup>	7,60 $\pm$ 0,32 <sup>c</sup>
<b>Alginato/HPA 0,30%</b>	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	12,14 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	97,61 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>	8,53 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>
<b>Alginato/HPA 0,60%</b>	0,23 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	10,75 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	96,21 $\pm$ 2,96 <sup>a</sup>	10,94 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>

\*Os resultados são expressos como valor médio  $\pm$  desvio padrão. Os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente ( $p > 0,05$ ) diferentes de acordo com o teste de Tukey.

### 3.1. Espessura e umidade

A espessura dos filmes variou de 0,12 a 0,23 mm. A incorporação do HPA aumentou a espessura dos filmes em 10, 50 e 110  $\mu$ m para os filmes com 0,15%, 0,30% e 0,60% de HPA, respectivamente, em comparação ao filme de alginato puro. Esse aumento foi significativo ( $p > 0,05$ ) a partir da concentração de 0,30% e provavelmente ocorreu, pelo aumento do conteúdo de sólidos provocado pela incorporação do HPA. De acordo com Han & Krochta (1999), a espessura do filme é influenciada pelo conteúdo sólido da solução formadora de filme.

O teor de umidade dos filmes variou de 10,75 a 12,22% e não foi afetado ( $p < 0,05$ ) pela incorporação do HPA em nenhuma das concentrações testadas. Comportamento semelhante foi observado por Salgado et al. (2011), em filmes à base de proteínas de soja e girassol adicionados de hidrolisado de plasma bovino. A adição dos hidrolisados aumentou a espessura dos filmes e não afetou o teor de umidade.

### **3.2. Biodegradabilidade**

A análise de biodegradação dos filmes foi realizada para simular condições naturais de degradação e para expor os filmes à ação de uma microbiota mista presente no solo (Stoll et al., 2017). O experimento foi realizado até 10 dias porque, após esse período, a recuperação e a avaliação das amostras tornaram-se difíceis por causa da degradação considerável. A microbiota do solo é rica em diversidade de micro-organismos e o contato com a umidade proveniente do ambiente, agem degradando os filmes (Martucci & Ruseckaite, 2009).

Conforme mostrado na Tabela 1, a incorporação do HPA em filmes de alginato não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) a biodegradabilidade dos filmes e eles perderam de 95,75% a 98,01% do seu peso inicial. Portanto, os resultados sugerem sua susceptibilidade à ação rápida de micro-organismos e ao processo de biodegradação. Resultados similares aos deste estudo foram descritos por Stoll et al. (2017), para filme de fécula de mandioca contendo antocianinas encapsuladas que apresentou a biodegradabilidade de 96,27% em 10 dias.

### **3.3. Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)**

A PVA de filmes é um dos fatores mais importantes em sua adequação para embalagens de alimentos. O filme deve poder evitar, ou pelo menos, diminuir a transferência de umidade entre o ambiente e o alimento (Dashipour et al., 2015). A permeabilidade ao vapor de água dos filmes aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da percentagem de HPA adicionada, como mostrado na Tabela 1. Esse aumento foi de 21,01%, 35,82% e 74,20% para os filmes com 0,15%, 0,30% e 0,60% de HPA, respectivamente, em comparação ao filme de alginato puro. Comportamento semelhante foi observado por Salgado et al. (2011), para filmes de proteína de soja e de girassol incorporados com hidrolisado de plasma bovino. Segundo esses autores, este

efeito pode ser atribuído à natureza hidrofílica dos peptídeos, ao aumento da espessura dos filmes ativados com HPA e, também, há efeito plastificante desses peptídeos. Este último motivo é o usado por Giménez et al. (2009) para explicar o aumento de PVA de filmes de gelatina ativados com peptídeos obtidos por hidrólise enzimática de gelatina, sugerindo que os peptídeos podem levar ao aumento no volume livre do filme, tornando a rede de proteínas menos densa e mais permeável.

### **3.4. Solubilidade em água**

A solubilidade em água foi superior a 98% em todos os tipos de filmes (dados não apresentados) e não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre eles. Portanto, a solubilidade em água não foi modificada pela incorporação de HPA em filmes de alginato de sódio. Esses resultados são similares aos relatados para filmes de alginato contendo extrato de *Satureja hortensis* (Rahmani et al., 2017), filmes de alginato contendo óleo essencial de citrino (Riquelme, Herrera & Matiacevich, 2017), filmes de gelatina da pele de lula adicionado de hidrolisados da gelatina de lulas (Giménez et al., 2009) e filmes proteicos de girassol (Salgado et al., 2012). Esse comportamento se deve a natureza hidrofílica do alginato e dos hidrolisados proteicos. É relatado que os hidrolisados proteicos apresentam maior solubilidade em água que a molécula de proteína, devido à clivagem das ligações peptídicas entre os aminoácidos, que gera peptídeos com tamanho molecular menor e com mais grupos amino e carboxilo ionizáveis (Agyei et al., 2016), fato este que também pode ter contribuído para a alta solubilidade dos filmes. Além disso, com exceção dos lipídios, tanto os polissacarídeos quanto as proteínas são hidrofílicas, e são suscetíveis a variações da umidade (Kowalczyk & Biendl, 2016).

### **3.5. Propriedade como barreira lipídica**

Não houve variação na propriedade de barreira lipídica entre o filme de alginato puro e os filmes incorporados com o HPA (dados não apresentados), e todos os filmes apresentaram excelente propriedade de barreira ao óleo (100%). Os filmes elaborados com proteínas ou alginato geralmente possuem boa propriedade de barreira lipídica e propriedades de barreira fracas a água pela hidrofílicidade inerente. Isso é consistente com relatos anteriores encontrados na literatura (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997; Tang et al., 2005; Rahmani et al., 2017). Esses resultados sugerem que os filmes







apresentam potencial para serem aplicados como embalagem para óleos, gorduras e alimentos gordurosos.

### 3.6. Propriedades ópticas

As propriedades ópticas são cruciais, especialmente na produção de embalagens de alimentos, pois podem afetar a aceitabilidade do produto alimentar pelo consumidor (Zhang et al., 2015). A cor foi medida usando CIELab, a coordenada L\* corresponde à luminosidade, em que o valor de L\* pode ir de 0 para cores escuras a 100 para cores claras, a\* e b\* referem-se às coordenadas de cromaticidade: verde(-)/vermelho(+) e azul(-)/amarelo(+), respectivamente (Adilah et al., 2018).

**Tabela 2.** Parâmetros de cor e fotografias dos filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%).

Filme	Parâmetros de cor						Fotografia
	L*	a*	b*	C*	h*	$\Delta E$	
<b>Alginato</b>	88,60 <sup>a</sup>	-0,89 <sup>d</sup>	5,12 <sup>d</sup>	5,20 <sup>d</sup>	99,9 <sup>a</sup>	7,61 <sup>d</sup>	
<b>Alginato/HPA 0,15%</b>	71,78 <sup>b</sup>	3,01 <sup>c</sup>	50,59 <sup>c</sup>	56,68 <sup>c</sup>	86,6 <sup>b</sup>	54,89 <sup>c</sup>	
<b>Alginato/HPA 0,30%</b>	63,98 <sup>c</sup>	10,20 <sup>b</sup>	61,88 <sup>a</sup>	62,72 <sup>b</sup>	80,6 <sup>c</sup>	69,0 <sup>b</sup>	
<b>Alginato/HPA 0,60%</b>	38,63 <sup>d</sup>	31,15 <sup>a</sup>	56,69 <sup>b</sup>	64,68 <sup>a</sup>	61,2 <sup>d</sup>	75,91 <sup>a</sup>	

\*Os resultados são expressos como valor médio  $\pm$  desvio padrão. Os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente ( $p > 0,05$ ) diferentes de acordo com o teste de Tukey.

Os valores de L\* diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ) com a incorporação de HPA nos filmes como mostrado na Tabela 2. A adição de HPA mostrou redução de 16,82; 24,62 e 49,97 nos valores de L\* para os filmes com 0,15%, 0,30% e 0,60% de HPA, respectivamente, em comparação com o filme de alginato puro. Isso sugere que os filmes ficam mais escuros com a crescente concentração de HPA. Filmes escuros podem ser vantajosos para embalar alimentos que são sensíveis à luz (Yang et al., 2015).

Além disso, a adição de HPA aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) os valores de  $a^*$ , indicando que os filmes ficaram mais avermelhados com o aumento da concentração de HPA. Esse aumento foi de 2,12; 9,31 e 30,26 nos valores de  $a^*$  para os filmes com 0,15%, 0,30% e 0,60% de HPA, respectivamente, em relação ao filme de alginato puro. Ambos os filmes, também, mostraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em valores de  $b^*$  que indicam que os filmes ficam amarelados com a adição de HPA. No entanto, esse aumento foi maior em filmes elaborados com 0,30% de HPA que em filmes com 0,60% de HPA. O aumento significativo das cores vermelhas e amarelas nos filmes com HPA em comparação com os filmes de alginato (sem HPA) foram provavelmente pela significativa cor amarela-avermelhada do HPA. Isto é suportado por Weng & Zheng (2015), que sugeriu que o filme baseado em isolados de proteína de soja é amarelo pela coloração inerente do extrato proteico de soja. Filmes avermelhados e amarelados também foram produzidas com maior concentração de óleo de linhaça incorporada em filmes de proteína de soja, como estudado por Hopkins et al. (2015).

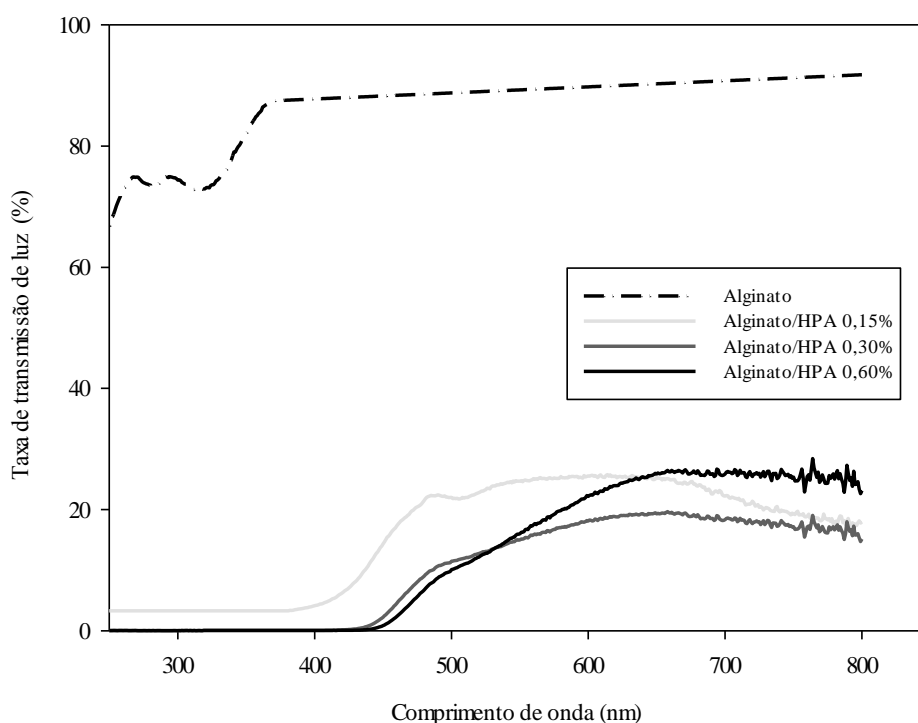
Os valores de  $C^*$  aumentaram ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de HPA adicionada, quanto maior o valor de Croma maior a intensidade da cor dos filmes avaliados, indicando que os filmes apresentam cores mais vividas com o aumento da concentração de HPA. Os valores de ângulo hue segundo a sequência CIELAB hue (McGUIRE, 1992), define a cor vermelha como  $0^\circ$ h, amarelo como  $90^\circ$ h, verde como  $180^\circ$ h e azul como  $270^\circ$ h. Os valores de  $h^*$  variaram de 99,9 a 61,2 e diminuíram ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de HPA adicionada, resultando em filmes com variação de cor entre amarelo e amarelo laranja. Além disso, a diferença total de cor ( $\Delta E$ ) dos filmes aumentou notavelmente em comparação com os filmes controle, o que está de acordo com os parâmetros de cor dos filmes. Conforme mostrado na Tabela 2, a cor da superfície dos filmes tornou-se mais profunda com o aumento da concentração de HPA, pela coloração das substâncias presentes no HPA.

Propriedades de barreira à luz ultravioleta são desejáveis em materiais de embalagem, uma vez que a exposição de produtos alimentícios fotossensíveis a luz UV pode provocar problemas de qualidade tais como oxidação, perdas de nutrientes e sabores desagradáveis (Han, Yu & Wang, 2018). A taxa de transmissão de luz UV-Vis de filmes de alginato puro e adicionados de HPA é mostrada na Figura 2.

A adição de HPA em filmes de alginato melhorou as propriedades de barreira dos filmes contra a luz UV. As taxas de transmissão de luz na faixa de 250-400 nm foram próximas de zero para os filmes com HPA, enquanto o filme de alginato puro

mostrou valor superior a 70%, como pode ser observado na Figura 2. Os resultados para propriedade de barreira à luz UV dos filmes com HPA podem ser atribuídos à absorção da radiação UV pelos aminoácidos aromáticos presentes no HPA (Zheng, Yu & Pilla, 2017). Estes resultados sugerem que os filmes incorporados com HPA poderiam efetivamente impedir a oxidação lipídica induzida por luz UV em sistemas alimentares.

A incorporação de HPA nos filmes de alginato, também resultou em diminuição da taxa de transmissão de luz visível na faixa de 400-800 nm em comparação com o filme de alginato puro. Estes resultados se assemelham aos observados por Harper et al., (2013), em filmes compostos de alginato com gelatina, isolado de proteína de soja e isolado de proteína de soro de leite aquecida e não aquecida. Os filmes compostos com soro do leite aquecido e proteína de soja apresentaram menor taxa de transmissão de luz visível em comparação com filmes de alginato puro, essa diminuição da transparência (ou seja, o aumento da dispersão da luz) foi atribuída ao possível aumento da agregação de proteínas nesses filmes.



**Figura 2.** Taxa de transmissão de luz (%) de filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%).

Baixas taxas de transmissão de luz são qualidade vantajosa para embalagem de alimentos, uma vez que a presença de luz tem efeito mais pronunciado sobre a deterioração da qualidade de produtos lipídicos, como azeite, que as temperaturas elevadas (Stoll et al., 2017).

### **3.7. Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante dos filmes**

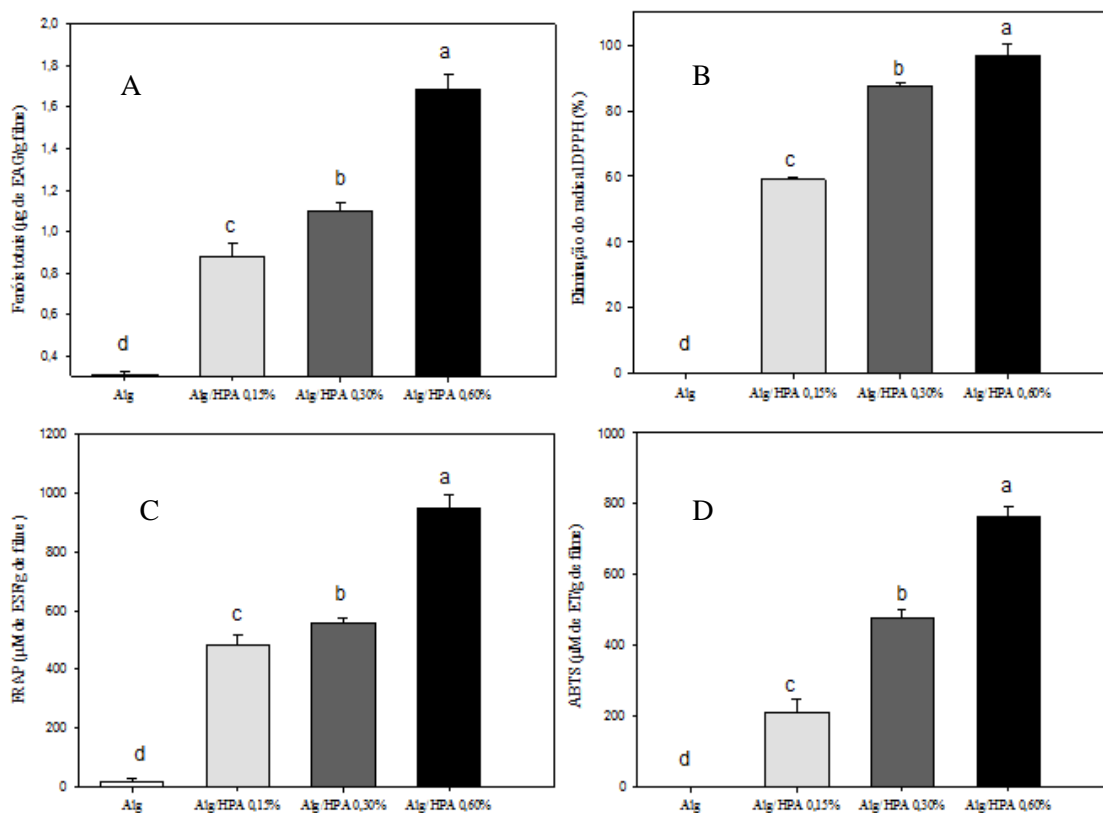
Os hidrolisados de proteína têm sido reconhecidos pelas suas boas propriedades antioxidantes (Sarmadi & Ismai, 2010). O ensaio de eliminação de radicais DPPH<sup>•</sup>, o ensaio de eliminação de radicais ABTS<sup>•+</sup> e o ensaio de FRAP foram realizados para determinar a atividade antioxidante dos filmes e os resultados são apresentados na Figura 3.

O conteúdo de compostos fenólicos totais dos filmes de alginato incorporados com HPA aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de HPA adicionado como mostrado na Figura 3A. Os valores variaram de 0,30 a 1,68  $\mu\text{g}$  de EAG/g filme. A presença de compostos fenólicos nos filmes pode ser pelo teor residual de compostos fenólicos presentes na torta de algodão, resultante do processo de extração proteica e a presença deles também pode contribuir para a atividade antioxidante dos filmes.

A capacidade de eliminação de radicais DPPH<sup>•</sup> pelos filmes de alginato incorporados com HPA aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de HPA como mostrado na Figura 3B. O filme adicionado de HPA mostrou até 96,91% de atividade de eliminação de radicais DPPH<sup>•</sup> a 0,60% de HPA, como mostrado na Figura 3B. Esse resultado é 9,31% e 37,58% maior que os filmes adicionados de 0,30% e 0,15% de HPA ( $p < 0,05$ ), respectivamente.

O radical catiônico ABTS<sup>•+</sup> (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), de cor esverdeada, quando em um meio contendo antioxidantes, sofre decréscimo na absorvância, e permite avaliar a capacidade antioxidante (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2013). A capacidade de eliminação do radical ABTS<sup>•+</sup> pelos filmes de alginato incorporados com HPA aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de HPA como mostrado na Figura 3C. Os filmes adicionados de HPA mostraram até 761,4  $\mu\text{M}$  de ET/g de filme de atividade de eliminação de radicais ABTS<sup>•+</sup> a 0,60% de HPA, como mostrado na Figura 3C. Esse resultado 39% maior do

que o filme com 0,30% de HPA e 72% maior que o filme com 0,15% (Figura 2C), mostrando que com o aumento do HPA, houve aumento de atividade antioxidante.



**Figura 3.** A) Conteúdo de fenóis totais em filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). B) Atividade de eliminação de radicais DPPH• de filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). C) Atividade de eliminação de radicais ABTS<sup>•+</sup> de filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). D) Poder redutor de ferro (FRAP) de filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%). Os resultados são expressos como valor médio  $\pm$  desvio padrão. Os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente

O teste de FRAP baseia-se na capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo de tripiridiltriazina férrico (Fe (III) -TPTZ) no complexo ferroso azul Fe (II) -TPTZ. O teste de FRAP mostrou que os filmes incorporados com HPA conseguiram reduzir significativamente o íon férrico para íons ferroso ( $p < 0,05$ ) mesmo em baixa concentração (filme com HPA a 0,15%) como mostrado na Figura 3D. O poder redutor dos filmes aumentou significativamente ( $p > 0,05$ ) com o aumento da concentração de HPA e os maiores valores foram observados para o filme com 0,60% de HPA

incorporado, que mostrou atividade antioxidante de 951, 13  $\mu\text{M}$  de ESF/g de filme, 41% maior do que o filme com 0,30% de HPA e 47,75% maior que o filme com 0,15% (Figura 3D).

De maneira geral, a capacidade antioxidante dos filmes de alginato foi significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ) quando adicionado do HPA às formulações e esse aumento foi crescente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da porcentagem adicionada e pôde ser observado em todos os ensaios de atividade antioxidante (DPPH $^{\bullet}$ , ABTS $^{+\bullet}$  e FRAP). O potencial antioxidante dos filmes enriquecidos vem da bioatividade das substâncias incorporadas, que provaram seu efeito antioxidante como doadores de elétrons e agentes quelantes. Em estudo semelhante, Giménez et al. (2009) demonstraram que a incorporação de porcentagens crescentes de hidrolisado de gelatina em filmes de gelatina da pele de lula deu origem a uma atividade antioxidante crescente dos filmes, conforme medido pela capacidade de redução férrica e pela capacidade de eliminação (teste ABTS $^{+\bullet}$ ). Em outro estudo, Salgado e colaboradores (2011), também demonstraram que a incorporação de percentuais crescentes de hidrolisado de plasma bovino em filmes de proteína de soja e proteína de girassol, promoveu aumento crescente da atividade antioxidante dos filmes, conforme mensurado pela capacidade de eliminação do radical ABTS $^{+\bullet}$ .

### 3.8. Atividade antimicrobiana dos filmes

O efeito antimicrobiano dos filmes contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e os fungos *C. gloesporioides* e *R. oligosporus* foram avaliados pelo método de difusão em ágar e os resultados são apresentados na Tabela 3.

O filme contendo apenas alginato não mostrou efeito inibitório contra nenhum dos micro-organismos estudados. Estes resultados estão em concordância com o que havia sido relatado por Riquelme, Herrera & Matiacevich (2017). Os filmes incorporados com o HPA apresentaram inibição significativa ( $p < 0,05$ ) para *S. aureus* a partir da concentração de 0,30%. Os halos de inibição observados contra essa bactéria Gram-positiva foram de 11 e 20 mm com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as concentrações 0,30% e 0,60% de HPA, respectivamente. Não foi observado efeito inibitório dos filmes contendo HPA contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* em nenhuma das concentrações adicionadas aos filmes. De maneira geral, os filmes foram eficazes contra bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e não apresentaram efeito contra às bactérias

Gram-negativa (*E. coli*). Estes resultados podem ser explicados pelo envelope celular de bactérias Gram-negativas, que é estrutural e funcionalmente mais complexo do que a bactéria Gram-positiva, tais diferenças na composição da membrana bacteriana podem ter implicações para o modo de ação e especificidade de compostos antibacterianos (Otoni et al., 2014).

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana (inibição em mm) de filmes de alginato contendo diferentes concentrações de HPA (0%, 0,15%, 0,30% e 0,60%).

Filme	Área de inibição (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. gloesporioides</i>	<i>R. oligosporus</i>
<b>Alginato</b>	-	-	-	-
<b>Alginato/HPA 0,15%</b>	-	-	14,4±1,62 <sup>c</sup>	11,03±1,02 <sup>c</sup>
<b>Alginato/HPA 0,30%</b>	11,4±1,14 <sup>b</sup>	-	21,06±1,42 <sup>b</sup>	20,04±1,03 <sup>b</sup>
<b>Alginato/HPA 0,60%</b>	20,4±2,03 <sup>a</sup>	-	27,02±2,83 <sup>a</sup>	25,91±2,02 <sup>a</sup>

\*Os resultados são expressos como valor médio ± desvio padrão. Os valores médios seguidos pela mesma letra não são significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes de acordo com o teste de Tukey.

Em contraste, os filmes adicionados com HPA apresentaram atividade antifúngica contra os dois fungos estudados e o halo de inibição aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de HPA como mostrado na Tabela 3. *C. gloesporioides* mostrou inibição variando de 14,4 a 27,02 mm com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras. *R. oligosporus* mostrou inibição no seu crescimento variando 11,03 a 25,91 mm com diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras.

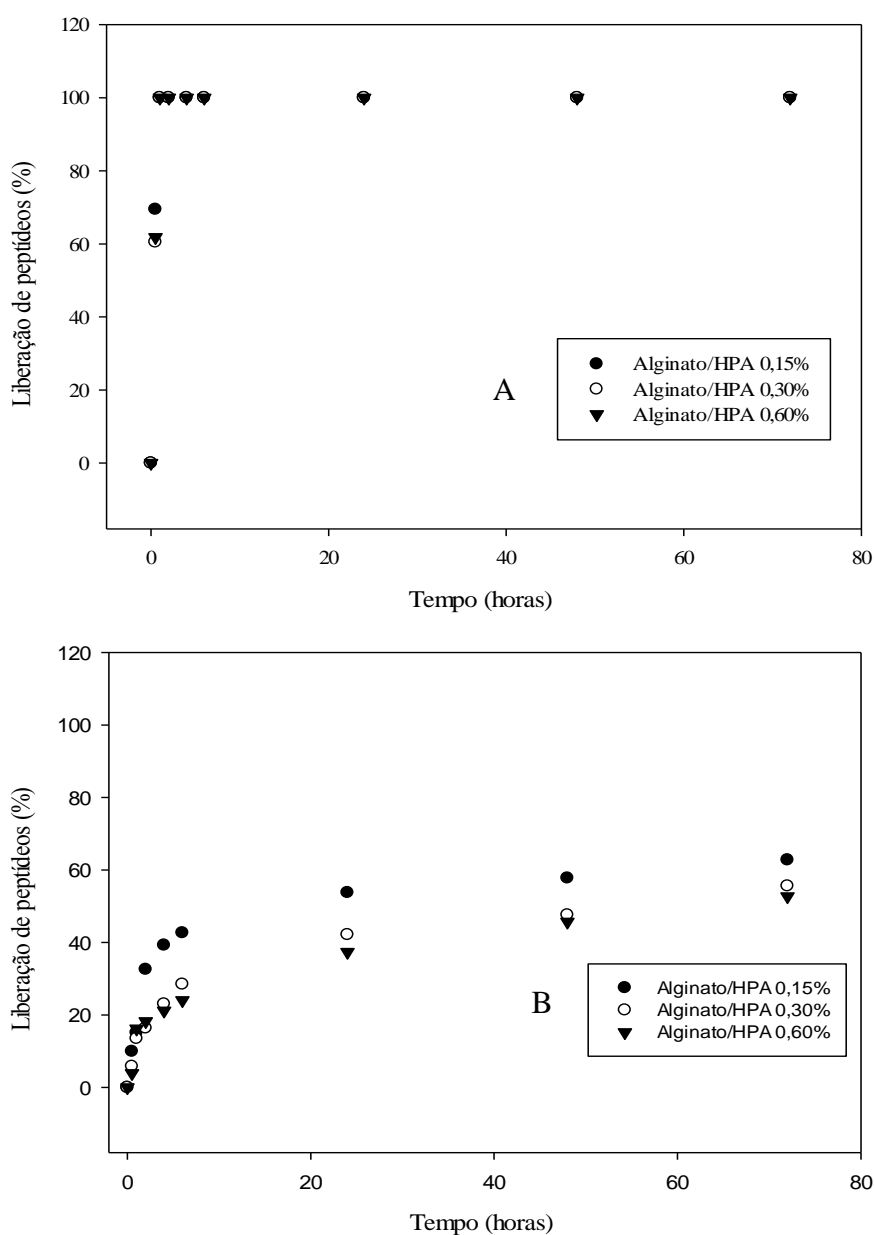
O potencial antimicrobiano dos filmes com HPA vem da bioatividade das substâncias incorporadas, que provaram seu efeito antimicrobiano impedindo o crescimento dos micro-organismos. O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos geralmente envolve alterações nas membranas biológicas como formação de canais de íons ou produção de poros transmembranares, que provocam desequilíbrio de conteúdos celulares, desregulando desse modo o processo de replicação, transcrição e tradução da sequência de DNA, através da ligação a alvos

intracelulares específicos, evitando a multiplicação e o crescimento das células microbianas (Castellano et al., 2016; Zhao et al., 2012).

### 3.9. Estudos de liberação de peptídeos em simuladores de alimentos

A *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA, 2007) recomendou o uso de simuladores de alimentos, como água (para representar meio aquoso) e 95% de etanol (para representar meio gorduroso) para testes de migração.

Os perfis de liberação dos peptídeos de filmes ativos de alginato de sódio em simuladores de alimentos aquosos e gordurosos são apresentados na Figura 4.



**Figura 4.** Liberação de peptídeos (%) de filmes de alginato com diferentes concentrações de HPA (0,15%, 0,30% e 0,60%) em simuladores de alimentos aquosos (A) e gordurosos (B).



Verificou-se que as diferenças na polaridade dos simuladores de alimentos levaram a mudanças no perfil de liberação dos peptídeos dos filmes ativos. No meio aquoso, todos os filmes ativos liberaram quantidade de peptídeos acima de 60% na primeira meia hora do ensaio. A quantidade restante de peptídeos foi liberada dentro de 1 hora de avaliação. Este comportamento não dependia da quantidade inicial do hidrolisado nos filmes e foi atribuído a elevada afinidade dos peptídeos e do alginato com o simulador (Figura 4).

Por outro lado, a taxa de liberação dos peptídeos em etanol (ou seja, um simulante de alimentos gordurosos) foi mais lenta em comparação com a aquosa. Uma baixa porcentagem de recuperação de peptídeos foi obtida em 1 hora de avaliação, cerca de 15%, 13% e 16% para os filmes com 0,15%, 0,30% e 0,60% de HPA, respectivamente (Figura 4). Após 72 h de avaliação, a quantidade de peptídeos liberados permaneceu constante e gradativa; apresentando recuperação de 60%, 53% e 47% para os filmes com 0,15%, 0,30% e 0,60% de HPA, respectivamente.

Os filmes ativos mostraram maior libertação de compostos ativos em água em comparação com o etanol. Existem diferentes fatores que afetam a migração do composto ativo para simuladores de alimentos, como explicado por Tran, Athanassiou, Basit e Bayer (2017). Primeiro é a difusão do líquido na rede do filme, e a segunda é a solubilidade do filme no simulador e a terceira é a difusão do filme para o simulador. A polaridade do migrante e do meio também afetam a migração do composto ativo para o meio. A natureza hidrofílica dos filmes, como já citada anteriormente, os torna mais solúveis na água do que no etanol. A rápida absorção de água pelos filmes enfraquece a sua estrutura, resultando na explosão do composto ativo que migra para a água. Além disso, quando os filmes foram imersos em água, as estruturas dos filmes foram destruídas e grande parte dos filmes completamente dissolvidos na água após 30 minutos de ensaio. No entanto, as estruturas de filmes imersos em etanol ainda eram mantidas mesmo após 72 horas. De acordo com Kurek et al. (2014), o composto ativo no filme permanecerá no filme se a integridade da estrutura for mantida. Isso também influencia a maior concentração de peptídeos detectada na água em comparação com o etanol.

No entanto, a embalagem ativa foi desenvolvida de modo a proporcionar liberação controlada e gradual de composto ativo. Portanto, o simulante de alimentos e o filme que podem fornecer essas duas características importantes são mais desejáveis (Adilah et al., 2018).

Com base no teste de migração, os filmes de alginato incorporados com HPA poderiam ser utilizados em alimentos gordurosos como melhor aplicação dessa embalagem ativa. Ainda, como relatado anteriormente, o filme mostrou boa propriedade de barreira lipídica, ação antioxidante e antimicrobiana e coloração mais escura, avermelhada e amarelada com baixa transmissão de luz. Isso reforça a possível aplicação como embalagem para alimentos gordurosos sensíveis a luz, oxidação lipídica e a ação de micro-organismos.

#### **4. Conclusão**

Foi possível produzir filmes com significativa capacidade antioxidante e antimicrobiana à base de alginato adicionando o HPA as formulações. A incorporação de porcentagens crescentes de HPA deu origem a maior atividade antioxidante e antimicrobiana nos filmes e boas propriedades de barreira à luz UV/Vis, embora em detrimento da permeabilidade ao vapor de água e solubilidade. Por conseguinte, podem ser utilizados agentes de reticulação e/ou uma composição plastificante mais apropriada para melhorar a resistência à umidade, bem como a permeabilidade ao vapor de água desses materiais.

As propriedades dos materiais desenvolvidos sugerem que poderiam ter aplicações como embalagens bioativas para alimentos gordurosos suscetíveis à oxidação e ao crescimento microbiano. No entanto, estudos adicionais sobre a aplicação de filmes de alginato incorporados com HPA em produtos alimentares devem ser conduzidos para otimizar a função desta embalagem ativa. Além disso, essa aplicação potencial poderia maximizar o uso de proteínas de subprodutos agroindustriais que atualmente estão subutilizadas, principalmente as da torta de algodão.

#### **5. Referências**

- Adilah, Z. M., Jamilah, B., & Hanani, Z. N. (2018). Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. *Food Hydrocolloids*, 74, 207-218.
- Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and bioprocess processing*, 98, 244-256.

- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Benbettaïeb, N., Karbowski, T., & Debeaufort, F. (2017). Bioactive edible films for food applications: influence of the bioactive compounds on film structure and properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-17.
- Bierhalz, A. C. K., da Silva, M. A., & Kieckbusch, T. G. (2012). Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 18-25.
- Casariogo, A. B. W. S., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R., & Vicente, A. A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1895-1902.
- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136-148.
- Colín-Chávez, C., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Lizardi-Mendoza, J., & Baladrán-Quintana, R. (2013). Diffusion of natural astaxanthin from polyethylene active packaging films into a fatty food simulant. *Food research international*, 54(1), 873-880.
- FDA Guidance for industry: Preparation of premarket submissions for food contact substances: Chemistry recommendations. United States of America: From Department of Health and Human Services (2007).
- Gao, D., Cao, Y., & Li, H. (2010). Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1855-1860.
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, M. P. (2009). Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. *Food hydrocolloids*, 23(5), 1322-1327.
- Han, J. H., & Krochta, J. M. (1999). Wetting properties and water vapor permeability of whey-protein-coated paper. *Transactions of the ASAE*, 42(5), 1375.
- Han, Y., Yu, M., & Wang, L. (2018). Preparation and characterization of antioxidant soy protein isolate films incorporating licorice residue extract. *Food Hydrocolloids*, 75, 13-21.
- Harper, B. A., Barbut, S., Lim, L. T., & Marcone, M. F. (2013). Characterization of 'wet'alginate and composite films containing gelatin, whey or soy protein. *Food research international*, 52(2), 452-459.
- Hopkins, E. J., Chang, C., Lam, R. S., & Nickerson, M. T. (2015). Effects of flaxseed oil concentration on the performance of a soy protein isolate-based emulsion-type film. *Food Research International*, 67, 418-425.
- Kavoosi, G., Rahmatollahi, A., Dadfar, S. M. M., & Purfard, A. M. (2014). Effects of essential oil on the water binding capacity, physico-mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 556-561.

- Kowalczyk, D., & Biendl, M. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer/candelilla wax emulsion films containing hop extract—A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 60, 384-392.
- Krochta, J. M., & Mulder-Johnston, D. E. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food technology* (USA).
- Kurek, M., Guinault, A., Voilley, A., Galić, K., & Debeaufort, F. (2014). Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food chemistry*, 144, 9-17.
- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2009). Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 94(8), 1307-1313.
- Moreno, O., Atarés, L., & Chiralt, A. (2015). Effect of the incorporation of antimicrobial/antioxidant proteins on the properties of potato starch films. *Carbohydrate polymers*, 133, 353-364.
- Ortiz-Martinez, M., Winkler, R., & García-Lara, S. (2014). Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal of proteomics*, 111, 165-183.
- Otoni, C. G., de Moura, M. R., Aouada, F. A., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Lorevice, M. V., ... & Mattoso, L. H. (2014). Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. *Food Hydrocolloids*, 41, 188-194.
- Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., & Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63, 488-495.
- Rahmani, B., Hosseini, H., Khani, M., Farhoodi, M., Honarvar, Z., Feizollahi, E., ... & Shojaee-Aliabadi, S. (2017). Development and characterisation of chitosan or alginate-coated low density polyethylene films containing *Satureja hortensis* extract. *International journal of biological macromolecules*, 105, 121-130.
- Riquelme, N., Herrera, M. L., & Matiacevich, S. (2017). Active films based on alginate containing lemongrass essential oil encapsulated: effect of process and storage conditions. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 94-103.
- Rostami, A. H., Motamedzadegan, A., Hosseini, S. E., Rezaei, M., & Kamali, A. (2017). Evaluation of Plasticizing and Antioxidant Properties of Silver Carp Protein Hydrolysates in Fish Gelatin Film. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1-11.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2013). In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30(2), 386-392.
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433-1440.
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2012). Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two

sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food hydrocolloids*, 29(2), 374-381.

Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.

Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775.

Stoll, L., Silva, A. M. D., Costa, T. M. H., Flôres, S. H., & Rios, A. D. O. (2017). Active biodegradable film with encapsulated anthocyanins: Effect on the quality attributes of extra-virgin olive oil during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41, 213-218.

Tang, C. H., Jiang, Y., Wen, Q. B., & Yang, X. Q. (2005). Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology*, 120(3), 296-307.

Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134(3), 1571-1579.

Tran, T. N., Athanassiou, A., Basit, A., & Bayer, I. S. (2017). Starch-based bio-elastomers functionalized with red beetroot natural antioxidant. *Food chemistry*, 216, 324-333.

Weng, W., & Zheng, H. (2015). Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate. *Food chemistry*, 169, 255-260.

Xiao, Q. (2018). Drying process of sodium alginate edible films forming solutions studied by LF NMR. *Food Chemistry*. 250, 83-88.

Yuan, G., Lv, H., Yang, B., Chen, X., & Sun, H. (2015). Physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan films containing carvacrol and pomegranate peel extract. *Molecules*, 20(6), 11034-11045.

Zheng, T., Yu, X., & Pilla, S. (2017). Mechanical and moisture sensitivity of fully bio-based dialdehyde carboxymethyl cellulose cross-linked soy protein isolate films. *Carbohydrate polymers*, 157, 1333-1340.

Palou, L., Ali, A., Fallik, E., & Romanazzi, G. (2016). GRAS, plant-and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 41-52.

Castellano, P., Mora, L., Escudero, E., Vignolo, G., Aznar, R., & Toldrá, F. (2016). Antilisterial peptides from Spanish dry-cured hams: Purification and identification. *Food microbiology*, 59, 133-141.

Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojae-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K., ... & Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International journal of biological macromolecules*, 72, 606-613.

Zhao, J., Guo, L., Zeng, H., Yang, X., Yuan, J., Shi, H., ... & Qiu, D. (2012). Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* strain A60. *Peptides*, 33(2), 206-211.

### 3. CONCLUSÃO GERAL

O tratamento térmico mostrou ser capaz de permitir a liberação de mais peptídeos com capacidade antioxidante, conforme demonstrado pelos ensaios DPPH e FRAP. Além disso, o aumento do tempo de incubação de extratos de proteína da torta de algodão com as enzimas comerciais Alcalase®, Flavourzyme® e Neutrase® mostrou-se capaz de também aumentar a liberação dessas moléculas bioativas. Esses tratamentos também mostraram ser capazes de aumentar a atividade antimicrobiana contra o fungo *C. gloeosporioides* e bactéria Gram-positiva *S. aureus*, mas não contra bactéria Gram-negativa *E. coli*. Pode-se concluir que a seleção adequada de um coquetel enzimático, combinado com o tratamento térmico e o tempo de reação do extrato proteico de um subproduto industrial, é capaz de produzir biomoléculas de interesse biotecnológico.

Foi possível produzir filmes com significativa capacidade antioxidante e antimicrobiana à base de alginato adicionando o HPA as formulações. A incorporação de percentagens crescentes de HPA deu origem a crescente atividade antioxidante e antimicrobiana nos filmes e boas propriedades de barreira à luz UV/Vis, embora em detrimento da permeabilidade ao vapor de água e solubilidade. Por conseguinte, podem ser utilizados agentes de reticulação e/ou uma composição plastificante mais apropriada para melhorar a resistência à umidade, bem como a permeabilidade ao vapor de água desses materiais. As propriedades dos materiais desenvolvidos sugerem que poderiam ter aplicações como embalagens bioativas para alimentos gordurosos suscetíveis à oxidação e ao crescimento microbiano. No entanto, estudos adicionais sobre a aplicação de filmes de alginato incorporados com HPA em produtos alimentares devem ser conduzidos para otimizar a função desta embalagem ativa. Além disso, essa aplicação potencial poderia maximizar o uso de proteínas de subprodutos agroindustriais que atualmente estão subutilizadas, principalmente as da torta de algodão.

Diante disso, conclui-se que as proteínas da torta de algodão podem ser utilizadas como matéria-prima para desenvolvimento de produtos com valor agregado como hidrolisados de proteínas e filmes bioativos. Esses dados são inéditos, pois, esta foi a primeira vez que se estudou o efeito do tempo de hidrólise, especificidade enzimática e tratamento térmico sobre as atividades bioativas dos hidrolisados de proteína da torta de algodão e a aplicação desses hidrolisados em filmes de alginato,

destacando a importância deste trabalho para a valorização de subprodutos agroindustriais.