

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Patrícia Costa da Silva

**Peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* e sua aplicação em um alimento
extrusado tipo *snack***

Passo Fundo

2017

Patrícia Costa da Silva
Engenheira de Alimentos

**Peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* e sua aplicação em um alimento
extrusado tipo *snack***

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira
Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Telma Elita
Bertolin

Linha de pesquisa: Qualidade e propriedades
funcionais de alimentos

Passo Fundo
2017

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

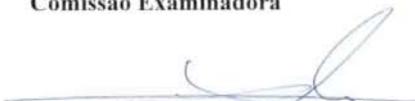
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* e sua aplicação em um alimento extrusado tipo snack

Elaborada por
Patrícia Costa da Silva

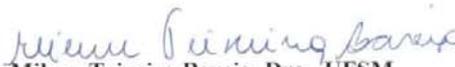
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora


Jorge Alberto Vieira Costa, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)


Telma Elita Bertolin, Dra., UPF


Luciane Maria Colla, Dra., UPF


Milene Teixeira Barcia, Dra., UFSM

Passo Fundo, RS, Brasil
2017

CIP – Catalogação na Publicação

S586p Silva, Patrícia Costa da
Peptídeos bioativos da microalga Spirulina e sua aplicação em um alimento extrusado tipo
snack / Patrícia Costa da Silva. – 2017.
103 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

Coorientadora: Dra. Telma Elita Bertolin.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) – Universidade de Passo
Fundo, 2017.

1. Peptídeos. 2. Spirulina. 3. Lanches. 4. Alimentos - Indústria. I. Costa, Jorge Alberto Vieira,
orientador. II. Bertolin, Telma Elita, coorientadora. III. Título.

CDU: 664

Bibliotecário Luís Diego Dias de S.
da Silva – CRB 10/2241

Dedico este trabalho ao meu amado e querido pai Paulo Roberto Sommer da Silva (*in memoriam*), meu exemplo de honestidade, dedicação e força.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Núbia e irmã Priscila, que ao longo destes dois anos, sentimos a maior dor que nosso coração pode sentir, mas unidas superamos. Obrigada por tudo.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Victor Vaz, por todos os momentos, não importando se bons ou ruins, esteve ao meu lado. Obrigada por confiar e acreditar sempre em nós.

Ao meu orientador professor Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, que confiou no meu trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e crescimento profissional.

À minha co-orientadora professora Dra. Telma Elita Bertolin pela sua atenção, compreensão e carinho.

Ao professor Dr. Vandrê Brião pela disponibilidade de equipamentos e auxílio.

À Tassiele, pela dedicação, não medindo esforços em me ajudar no desenvolvimento prático desta dissertação. Obrigada pela tua companhia.

À Vanessa, que me ajudou voluntariamente, pela sua iniciativa e dedicação.

Ao Vinícius Castoldi, pela tua ajuda e agradável convivência. Obrigada.

À amiga que dividi as alegrias e angústias, Cíntia Guarienti. Obrigada pelo teu apoio, ajuda e amizade. Com certeza a tua presença deixou minha caminhada mais leve.

À minha querida Ana Margarites, que dividimos tantos bons momentos. Obrigada por tudo que me ajudaste, me ensinaste e pela tua sincera amizade.

Às minhas colegas de mestrado, Nyelle, Kelly, Ana, Meri e Vanessa pela amizade que construímos.

À Temabi, especialmente a Caroline, o Paulo e o José Lucas, pela confiança e receptividade inigualável que recebi.

A todo o pessoal do Laboratório de Fermentações, que de alguma maneira, me ajudaram e tornaram meus dias mais alegres.

À Capes pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A Deus que me deu forças e esperança.

É bom ter um ponto de chegada ao fim da jornada, mas o que realmente importa é a jornada em si.

Ursula Le Guin.

RESUMO

A busca por ingredientes que tragam benefícios à saúde é reforçada pelo consumidor que está sinalizando uma demanda por alimentos mais saudáveis. Nesta perspectiva, há um interesse na aplicação de antioxidantes proveniente de fontes naturais devido ao uso limitado dos sintéticos utilizados pela indústria alimentícia. Os peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* representam uma alternativa de ingredientes a serem incorporados, tornando possível o consumo de alimentos processados com maior valor nutritivo, além da funcionalidade. Neste trabalho objetivou-se a utilização de peptídeos bioativos da *Spirulina* sp. no desenvolvimento de alimentos. Para tal, foi conduzido um processo de hidrólise enzimática com posterior separação em sistema de ultrafiltração com membrana de 4 kDa. A matéria-prima *Spirulina* sp., o hidrolisado proteico e os peptídeos isolados foram avaliados quanto a estabilidade térmica pelas análises de Calorimetria Diferencial de Varredura e Termogavimetria e capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS, poder redutor e atividade quelante. Estes mesmos produtos foram adicionados em um alimento tipo *snack* de milho, em que foram avaliadas características como textura, cor e capacidade antioxidante, comparando com o controle (sem adição). O processo de hidrólise enzimática gerou peptídeos com atividade antioxidante, sendo esta atividade maior em relação à matéria-prima integral, apresentando perfis diferentes de capacidade antioxidante para as frações obtidas. Ainda, os resultados de estabilidade térmica demonstraram que o processo de hidrólise aumentou a estabilidade da *Spirulina*, evidenciando na fração < 4 kDa a temperatura até 141°C. Esta mesma fração demonstrou menor perda de massa durante o processo térmico (38%). Os *snacks* produzidos apresentaram alta fraturabilidade e dureza quando adicionados da fração menor que 4 kDa.. A adição do hidrolisado e das frações peptídicas ficaram próximas da coloração amarela do controle. Por fim, os *snacks* adicionados da fração < 4 kDa apresentaram maior poder de inibição de radicais livres utilizando etanol como solvente de extração e os *snacks* adicionados da fração > 4 kDa tiveram maior capacidade em doar elétrons e reduzir espécies oxidativas para o mesmo solvente. Os resultados deste estudo demonstram que peptídeos com atividade antioxidante foram produzidos durante a hidrólise da microalga *Spirulina* sp. e sua bioatividade é melhor alcançada quando na forma de peptídeos isolados, os quais podem ser utilizados como antioxidantes naturais na indústria de alimentos.

Palavras-chave: biopeptídeos, *Spirulina*, *snacks*.

ABSTRACT

The search for ingredients that bring health benefits is reinforced by the consumer who is signaling a demand for healthier foods. In this perspective, there is an interest in the application of antioxidants from natural sources due to the damages caused by the excessive consumption of the synthetics used by the food industry. The bioactive peptides of *Spirulina* microalgae represent an alternative of ingredients to be incorporated, making possible the consumption of processed foods with greater nutritive value, besides the functionality. In this work the objective was to use bioactive peptides of *Spirulina* sp. in food development. For this, an enzymatic hydrolysis process was carried out with subsequent separation in a 4 kDa membrane ultrafiltration system. The raw material *Spirulina* sp., Protein hydrolyzate and isolated peptides were evaluated for thermal stability by Differential Scanning Calorimetry and Thermogravimetry analyzes and antioxidant capacity by ABTS, reducing power and chelating activity. These same products were added in a corn snack type food, in which characteristics such as texture, color and antioxidant capacity were evaluated, comparing with the control (without addition). The enzymatic hydrolysis process generated peptides with antioxidant activity, being this activity greater in relation to the raw material, presenting different profiles of antioxidant capacity for the fractions obtained. Moreover, the thermal stability results showed that the hydrolysis process increased the stability of *Spirulina*, showing in the fraction <4 kDa the temperature up to 141 ° C. This same fraction showed lower mass loss during the thermal process (38%). The snacks produced presented high fracturability and hardness when added with the fraction smaller than 4 kDa. The addition of the hydrolyzate and the peptide fractions were close to the yellow coloration of the control. Finally, the added snacks with fraction < 4 kDa presented greater free radical inhibition using ethanol as extraction solvent and the snacks added with fraction > 4 kDa had greater capacity to donate electrons and reduce oxidative species for the same solvent. The results of this study demonstrate that peptides with antioxidant activity were produced during the hydrolysis of *Spirulina* sp. and their bioactivity is best achieved when in the form of isolated peptides, which can be used as natural antioxidants in the food industry.

Keywords: biopeptides, *Spirulina*, snacks.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} pelo antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	19
Figura 2 - Redução do íon Fe ³⁺ em um complexo Fe ²⁺ pela ação do antioxidante.	20
Figura 3 - Principais etapas envolvendo a obtenção e isolamento de peptídeos bioativos.	23
Figura 4 – Processo de extrusão de alimentos utilizando <i>grits</i> de milho	25
Figura 5 - Sistema de ultrafiltração para obtenção das frações peptídicas.....	29
Figura 6 - Grau de hidrólise da biomassa de <i>Spirulina</i> sp.....	38
Figura 7 - Atividade antioxidante de inibição do radical ABTS da <i>Spirulina</i> não hidrolisada, hidrolisado e das frações peptídicas em diferentes solventes.....	42
Figura 8 - Poder de redução da <i>Spirulina</i> não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas em diferentes solventes.....	43
Figura 9 - Atividade quelante da <i>Spirulina</i> não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas em diferentes solventes.....	44
Figura 10 - Análise de FTIR para a <i>Spirulina</i> , hidrolisado e frações peptídicas.....	46
Figura 11 - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) da <i>Spirulina</i> não hidrolisada, hidrolisada e frações peptídicas.	47
Figura 12 - Análise Termogravimétrica (TGA) da <i>Spirulina</i> não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas.	48
Figura 13 - Efeito do cloreto de sódio na estabilidade dos peptídeos menores que 4 kDa.	49
Figura 14 - Efeito da sacarose na estabilidade dos peptídeos menores que 4 kDa.....	50
Figura 15 - Efeito do pH na estabilidade dos peptídeos menores que 4 kDa.	51
Figura 16 - Efeito da temperatura na estabilidade dos peptídeos menores que 4 kDa.	52
Figura 17 - <i>Snacks</i> produzidos adicionados de <i>Spirulina</i> , hidrolisado e frações peptídicas. ...	56
Figura 18 - Atividade antioxidante dos <i>snacks</i> pelo método de ABTS.....	57
Figura 19 - Atividade antioxidante dos <i>snacks</i> pelo método de Poder Redutor.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização físico-química da biomassa <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	37
Tabela 2 – Concentrações de proteína e rendimentos do sistema de ultrafiltração	39
Tabela 3 - Caracterização físico-química do hidrolisado e frações peptídicas.....	40
Tabela 4 - Composição físico-química dos <i>snacks</i>	53
Tabela 5 - Análises de textura e cor dos <i>Snacks</i> produzidos.....	55

LISTA DE ABRVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DSC: Differential Scanning Calorimetry

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

GH: Grau de hidrólise

TCA: Ácido tricloroacético

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

TGA: Thermogravimetric analysis

UF: Ultrafiltração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O USO DA <i>Spirulina</i> sp. COMO ALIMENTO	15
2.2 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E OXIDAÇÃO EM ALIMENTOS	16
2.2.1 Métodos para determinação da capacidade antioxidante	17
2.2.1.1 Método de sequestro do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)).....	18
2.2.1.2 Método de poder redutor.....	19
2.2.1.3 Método de atividade quelante de metais	20
2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS	20
2.3.1 Fracionamento dos peptídeos bioativos.....	22
2.4 ALIMENTOS EXTRUSADOS	24
3 METODOLOGIA	27
3.1 MICROALGA <i>Spirulina</i> sp.	27
3.2 ENZIMA	27
3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	27
3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA ALGAL	27
3.5 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO ALGAL	28
3.5.1 Hidrólise enzimática	28
3.5.2 Grau de Hidrólise	28
3.6 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS	29
3.6.1 Ultrafiltração por exclusão molecular (UF).....	29
3.6.2 Caracterização físico-química do hidrolisado e das frações peptídicas	30
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	31
3.7.1 Capacidade de sequestro do radical ABTS.....	31
3.7.2 Poder Redutor.....	31
3.7.3 Atividade Quelante do íon Fe ²⁺	32
3.8 ESTABILIDADE DA FRAÇÃO < 4 kDa	32
3.8.1 Efeito do cloreto de sódio e sacarose.....	32
3.8.2 Efeito do pH	33
3.8.3 Efeito da temperatura	33
3.9 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS COM TRANSFORMADAS DE FOURIER (FTIR)	33
3.10 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) E ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	33
3.11 DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS TIPO SNACK ADICIONADOS DE <i>Spirulina</i>, HIDROLISADO E PEPTÍDEOS ISOLADOS	34
3.11.1 Caracterização físico-química dos <i>snacks</i>	34
3.11.2 Textura.....	34
3.11.3 Cor	35
3.11.4 Atividade antioxidante dos <i>snacks</i>	35
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA ALGAL	37
4.2 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO ALGAL	37
4.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS	38

4.3.1 Caracterização físico-química do hidrolisado e das frações peptídicas	40
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	41
4.5 ANÁLISE DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	45
4.6 ESTABILIDADE TÉRMICA	46
4.7 ESTABILIDADE DOS PEPTÍDEOS MENORES QUE 4 kDa	49
4.7.1 Efeito de cloreto de sódio e sacarose na atividade antioxidante dos peptídeos	49
4.7.2 Efeito do pH	50
4.7.3 Efeito da temperatura	51
4.8 DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS TIPO SNACK ADICIONADOS DE <i>Spirulina</i>, HIDROLISADO E PEPTÍDEOS ISOLADOS.....	53
4.8.1 Caracterização físico-química dos <i>snacks</i>	53
4.8.2 Textura e Cor	54
4.8.4 Atividade antioxidante dos <i>snacks</i>	56
5 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICE – ARTIGO CIENTÍFICO	81

1 INTRODUÇÃO

Os novos apelos nutricionais estão gerando necessidades que impulsionam o setor alimentício para o desenvolvimento de produtos que denotem mais saúde para o consumidor. Nessa perspectiva, os ingredientes funcionais oferecem benefícios adicionais às suas funções nutricionais básicas (GRANATO et al. 2010), e o desenvolvimento de alimentos com estes ingredientes implica na incorporação de compostos bioativos com efeitos fisiológicos positivos. A proteína alimentar tem sido estudada não somente em relação ao seu papel nutricional já conhecido, mas como fonte de peptídeos os quais são inativos em sua estrutura primária (LI-CHAN, 2015).

Os peptídeos podem ser liberados, através de hidrólise enzimática *in vitro*, *in vivo* ou a combinação dos dois (HEBERT et al., 2010) e apresentam funções biológicas específicas, tais como ação antimicrobiana (MCCANN et al., 2006), antioxidante (NIMALARATNE et al., 2015), anti-hipertensiva (JIA et al., 2010).

Os antioxidantes são utilizados na prevenção ou inibição da oxidação dos alimentos e no estresse oxidativo decorrente de vários fatores, no entanto a indústria de alimentos tem sido questionada quanto à utilização de antioxidantes sintéticos, como o BHA, BHT e seu uso vêm sendo limitado devido aos potenciais riscos para a saúde, tais como danos nas moléculas de proteína e/ou DNA, toxicidade e efeitos secundários (BOUGATEF et al., 2010; WANG et al., 2012). Conseqüentemente, há um interesse em antioxidantes proveniente de fontes naturais, especificamente os peptídeos bioativos, os quais se destacam pela sua conformação estrutural simples podendo gerar maior estabilidade e apresentar propriedades funcionais como emulsificação e formação de espuma, vantagens estas que se destacam frente a outros antioxidantes naturais (XIE, et al., 2008).

Os peptídeos provenientes de isolados proteicos e seus hidrolisados de origem animal são os mais amplamente estudados, incluindo proteínas da carne, leite e ovo (ARIHARA et al., 2001; NARVA et al., 2004; NIMALARATNE et al., 2015), porém, estas fontes necessitam obter sua proteína isolada para obtenção e isolamento dos peptídeos.

As microalgas são fontes de compostos funcionais, sendo utilizadas para melhorar o valor nutritivo dos alimentos devido à sua riqueza de compostos com atividades biológicas (GOUVEIA et al., 2010). Dentre as cianobactérias, a *Spirulina* desempenha um importante papel devido ao seu elevado valor nutricional relacionado ao seu conteúdo de nutrientes

essenciais, tais como vitaminas, minerais, ácidos graxos poli-insaturados (DE OLIVEIRA et al., 2013), além de ser reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Em relação ao teor proteico, possui cerca de 50-70% de proteína, sendo composta por aminoácidos não essenciais (alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutâmico, glicina, histidina, prolina, serina e tirosina) e essenciais (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e valina) (AMBROSI et al. 2008).

Estudos realizados mostram o desenvolvimento de produtos utilizando a microalga *Spirulina* em iogurtes (PEREZ et al., 2007), massas (PAGNUSSAT et al., 2014), biscoitos (COSTA et al., 2016). Além disso, suas condições de cultivo podem ser modificadas conforme o produto final desejado (maior teor de proteínas, carboidratos ou lipídios), demonstrando seu potencial em diferentes áreas de aplicação: alimentos, fármacos, produção de biocombustíveis a exemplo do bioetanol, biodiesel; estando empregada ao conceito de uma biorrefinaria. Na qual, a biomassa integral pode ser convertida em diferentes produtos, através de tecnologias de baixo impacto ambiental, aplicadas em conjunto.

As pesquisas com microalgas evoluíram e novas tecnologias foram desenvolvidas para converter e utilizar produtos derivados desta matéria-prima. Essas tecnologias permitem o isolamento de substâncias com propriedades bioativas a exemplo da produção de peptídeos bioativos através da hidrólise enzimática (NGO et al., 2011), e a incorporação destes ingredientes é uma das formas de maior proteção à saúde, tornando possível o consumo de alimentos processados com maior valor nutritivo, além da funcionalidade.

Alguns estudos vêm apresentando adição de hidrolisados proteicos em alimentos extrusados (SEGURA-CAMPOS et al., 2014; JEYAKUMARI et al., 2016). No entanto, até o momento não há relatos de adição de peptídeos da *Spirulina* em alimentos. Assim, o objetivo geral deste trabalho é a utilização de peptídeos bioativos da *Spirulina* sp. no desenvolvimento de alimentos.

Os objetivos específicos são:

- a) Produzir hidrolisado proteico da biomassa da *Spirulina* sp.;
- b) Separar os peptídeos através do processo de ultrafiltração e analisar a capacidade antioxidante das frações obtidas;
- c) Avaliar a estabilidade térmica dos produtos obtidos;
- d) Submeter os peptídeos < 4 kDa à variáveis do processamento de alimentos;
- e) Produzir um alimento tipo *snack* adicionado de *Spirulina*, hidrolisado e dos peptídeos isolados e caracterizar quanto à capacidade antioxidante e características tecnológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O USO DA *Spirulina* sp. COMO ALIMENTO

As cianobactérias são reconhecidas como fontes de compostos biologicamente ativos e podem ser empregadas para diversas finalidades: pigmentos, antioxidantes, enzimas, fármacos, alimentos, entre outros. Dentre as cianobactérias, a *Spirulina* desempenha um importante papel devido ao seu elevado valor nutricional relacionado ao conteúdo de nutrientes essenciais, tais como: proteínas, vitaminas, minerais, ácidos graxos poli-insaturados (DE OLIVEIRA et al., 2013), além de ser reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Seu teor de proteínas é superior a qualquer outra fonte alimentar, e apresenta um índice balanceado de aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo um alimento de alto valor biológico (AMBROSI et al., 2008).

As vitaminas presentes na *Spirulina* são a vitamina A, na forma de betacaroteno; vitamina C; vitaminas do grupo B (particularmente a vitamina B12); o ácido fólico e vitamina E. A microalga também contém vários pigmentos, tais como β -caroteno, ficocianina, clorofila, responsáveis pela ação antioxidante com efeitos significativos na eliminação de radicais livres (CHU et al., 2010; ESTRADA et al., 2001).

Em diversos estudos têm-se investigado o uso da biomassa proveniente do cultivo de microalgas com finalidade alimentícia. Em alguns países, como França, Estados Unidos, México, China e Tailândia, a incorporação dessa biomassa é utilizada comercialmente em produtos (DERNER et al., 2006).

No Brasil, pesquisas têm-se demonstrado o uso da *Spirulina* em alimentos, oferecendo diferentes motivos para sua incorporação; como o aumento do valor nutricional do produto, maior digestibilidade, poder antioxidante. Em um estudo realizado por Pagnussatt et al. (2014) com adição de *Spirulina* e farinha de aveia na massa seca, demonstraram que a microalga proporcionou um aumento no teor de proteína de 20% em comparação à massa sem a adição da mesma.

Pães sem glúten incorporados de 3% da *Spirulina*, também apresentaram maior teor proteico e melhor composição de aminoácidos em relação ao controle, sem microalga (FIGUEIRA et al., 2011).

Em outro estudo, avaliou-se a incorporação da biomassa de *Spirulina* em biscoitos, apresentando uma maior digestibilidade (86,9%) que o sem adição na concentração de 1,0 % (MORAIS et al., 2006).

Outra característica importante é o fato de sua parede celular ser composta de mucopolissacarídeos e açúcares simples, o que a diferencia de outras algas que possuem celulose em sua parede celular, permitindo a fácil digestão (BELAY, 2012), tornando-se um alimento para pessoas de todas as idades.

2.2 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E OXIDAÇÃO EM ALIMENTOS

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados (R^{\bullet}), os quais podem ser altamente instáveis e ativos decorrentes de reações químicas com outras moléculas. São produtos do metabolismo celular, liberados durante o processo de redução do oxigênio necessário para conversão dos nutrientes adquiridos da alimentação em energia (VALKO et al., 2007). Derivam de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre, criando, assim, espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS). Espécies reativas de oxigênio (ROS) são representadas por moléculas de radicais livres e não livres, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxigênio singlet ($1/2 O_2$), e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (HALLIWELL et al., 2004).

Em condições normais das células, nos órgãos e tecidos do corpo humano há um equilíbrio entre a liberação de radicais livres e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes no organismo. Porém, decorrente de fatores como alimentação e estilo de vida, o sistema endógeno deixa de proteger o corpo e esse equilíbrio deixa de existir, resultando em uma condição de estresse oxidativo, gerando metabólitos específicos derivados da oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, os quais são prejudiciais às células do organismo humano (MARTELLI et al., 2014; HALLIWELL et al., 2004).

O estresse oxidativo inicia a instabilidade entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e a capacidade do organismo em estabilizá-las pela defesa de sistemas antioxidantes (PERSSON, 2014). Este processo pode danificar as células, promover a oxidação proteica, ocorrendo perda da funcionalidade das proteínas e induzir à peroxidação lipídica, formando os hidroperóxidos os quais causam alterações na estrutura e na função das membranas celulares (LOPACZYNSKI, 2001).

Em sistemas alimentares a oxidação do produto pode ocorrer durante o processamento, transporte e armazenamento, levando à deterioração das substâncias e nutrientes presentes no alimento (SARMADI; ISMAIL, 2010). Além disso, resulta em ranço e/ou perda do valor nutricional, cor, sabor, textura, afetando a segurança de produtos alimentícios. (KOU et al., 2013).

A evidência de que as proteínas e lipídios são suscetíveis à oxidação sugere que os radicais livres podem afetar negativamente essas macromoléculas. No entanto, a capacidade dos radicais livres interagirem com proteínas em alimentos proporciona o desenvolvimento de novos antioxidantes já que as proteínas podem ser utilizadas para inibir as reações oxidativas, protegendo os ácidos graxos insaturáveis (ELIAS et al., 2008).

A utilização de hidrolisados a partir de isolados proteicos do leite, gema de ovo, soro de leite e soja, vêm sendo investigadas na inibição da oxidação em modelos de sistemas alimentícios (DIAZ et al, 2005, SAKANAKA et al., 2006; PEÑA-RAMOS et al., 2003), obtendo resultados satisfatórios com quantidades em torno de 2 mg. mL⁻¹ de hidrolisado na inibição da peroxidação lipídica. Frações peptídicas provenientes da proteína de farelo de arroz foram adicionadas em suco de laranja em um estudo realizado por Khairallah et al. (2015). Avaliou-se a estabilidade e qualidade do suco através de análises físico-químicas (pH, cor, conteúdo de ácido ascórbico), não observando nenhuma diferença significativa entre o controle e a fração peptídica incorporada no suco de laranja, após 42 dias de armazenamento

Porém, ainda pouco se sabe sobre o comportamento dos peptídeos a respeito do poder antioxidante em alimentos.

2.2.1 Métodos para determinação da capacidade antioxidante

Ensaio de avaliação *in vitro* estão disponíveis para fornecer informações importantes sobre o potencial antioxidante.

Os métodos utilizados na quantificação da atividade antioxidante envolvem reações de espécies de oxigênio reativo com alguns reagentes e o complexo formado é analisado utilizando um espectrofotômetro (OROIAN; ESCRICHE, 2015). Os resultados são expressos com base em curva padrão.

Na metodologia de ABTS, a absorvância utilizada é de 734 nm (MOLYNEUX, 2004); no ensaio de poder redutor, a absorvância é de 700 nm (ANTOLOVICH et al., 2002), além disso os antioxidantes podem atuar como quelantes de metais, cuja absorvância é de 562 nm

utilizando a ferrozina como metal de transição (STOOKEY et al., 1970). A interação do antioxidante com o íon Fe^{2+} presente no meio é determinada pelo decréscimo de um complexo colorido com a ferrozina (NAJAFIAN; BABJI, 2012).

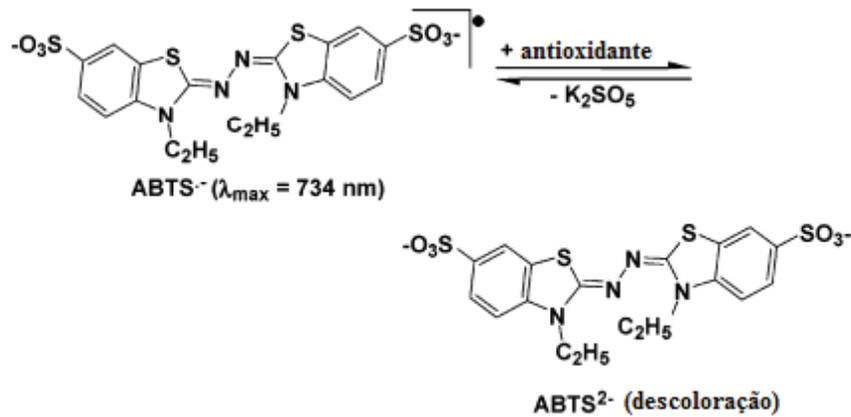
Não existe um método padrão para determinação da capacidade antioxidante em compostos, fazendo-se necessário o uso de diferentes metodologias para sua avaliação. Além de haver interferências, nenhum ensaio, isoladamente, determina o potencial antioxidante total de uma amostra (HUANG et al., 2005). No caso de proteínas e peptídeos, a atividade antioxidante não é única em seu mecanismo de ação, pois proteínas contêm vários aminoácidos com diferentes propriedades antioxidantes. Alguns são mais eficazes como inibidores de radicais, enquanto outros redutores ou quelante de metais (ALEMÁN et al., 2011 e BARZIDEH et al., 2014). Ainda, o uso de diferentes solventes para extração de compostos auxilia em uma melhor avaliação dos componentes envolvidos na atividade antioxidante, devido às diferenças de polaridade.

Uma vez que a área de alimentos é um importante campo de aplicação de antioxidantes, a investigação da capacidade antioxidante de compostos bioativos após o processo é uma ferramenta importante para o conhecimento dos efeitos do processamento na permanência da funcionalidade.

2.2.1.1 Método de sequestro do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

O ensaio de captura do radical ABTS, também conhecida como método da capacidade antioxidante de equivalente de Trolox (TEAC), tem sido empregado para determinar a capacidade antioxidante de diversas matrizes alimentares. Possui uma coloração verde escura com o máximo de absorção a 734 nm. Esta coloração diminui de intensidade na presença de antioxidantes, os quais neutralizam o cátion radicalar $\text{ABTS}^{\bullet+}$, por meio de redução direta através da doação de elétrons ou por sequestro do radical através da doação de átomos de hidrogênio, voltando à forma do composto neutro ABTS (Figura 1) monitorando-se a descoloração da solução (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005). Assim, embora a metodologia da captura do radical ABTS seja geralmente classificada como um método baseado na transferência de elétrons, o mecanismo pela transferência de átomos de hidrogênio também se aplica (SHAHIDI et al., 2015).

Figura 1 - Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Huang et al. (2005).

Um diferencial apresentado pela metodologia é a geração de um radical altamente estável. Sendo que o tempo necessário para o radical agir com a amostra pode levar de 1 a 30 min, sendo frequentemente utilizados 6-7 min. Outra vantagem é o seu comprimento de onda ser próximo ao infravermelho, diminuindo as interferências de diferentes pigmentos que absorvem radiação eletromagnética em comprimentos de onda menores e de compostos resultantes de ações secundárias, o que ocorre com o radical DPPH, o qual apresenta um único pico de absorbância em 515-517 nm (BOROSKI et al., 2015).

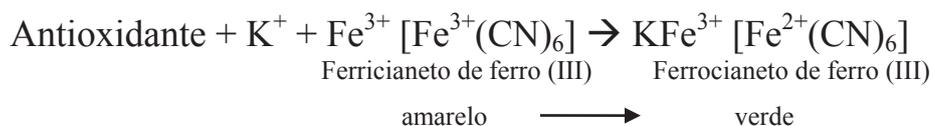
A quantificação deste ensaio é obtida através de uma curva de calibração, utilizando Trolox como padrão e expressos em equivalente de Trolox (TEAC).

2.2.1.2 Método de poder redutor

É um método à base de transferência de elétrons em que o complexo de ferricianeto de ferro (III) apresenta o íon ferro no estado de oxidação (Fe^{3+}). A ação do antioxidante reduz o íon Fe^{3+} de coloração amarela em um complexo Fe^{2+} de coloração verde (Figura 2). A atividade antioxidante é determinada com o aumento de absorbância a 700 nm (ANTOLOVICH et al., 2002).

Este ensaio foi originalmente utilizado para medir o poder redutor no plasma, mas o seu uso foi estendido para avaliar a atividade antioxidante em outros fluidos biológicos, alimentos e extratos de plantas (SHAHIDI et al., 2015).

Figura 2 - Redução do íon Fe^{3+} em um complexo Fe^{2+} pela ação do antioxidante.



A quantificação deste ensaio pode ser mensurada através de uma curva padrão utilizando o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) ou ácido gálico como padrões analíticos.

2.2.1.3 Método de atividade quelante de metais

A propriedade antioxidante de quelar metais é avaliada quando se forma um complexo entre o antioxidante e o metal, de tal forma que os íons metálicos não podem atuar como iniciadores da oxidação lipídica (SHAHIDI et al., 2015). Em geral, a capacidade quelante do metal é determinada medindo o efeito de antioxidantes quelantes em íons ferrosos. Sulfato ferroso e ferrozina são os reagentes mais comumente usados. Uma diminuição da absorbância a 485 nm (para sulfato ferroso) ou 562 nm (para ferrozina) após a adição de antioxidantes, representa a formação de complexo antioxidante-metal, e sua atividade quantificada em espectrofotômetro (SHAHIDI et al., 2015). Geralmente, a capacidade do antioxidante em quelar metais é expressa como equivalente de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), tendo como resultado $\mu\text{mol EDTA.g}^{-1}$ amostra.

2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Sabe-se que a proteína na dieta é considerada como uma fonte de energia e de aminoácidos essenciais, necessários para o crescimento e manutenção das funções fisiológicas.

As proteínas de diferentes fontes podem ser submetidas à hidrólise durante o processamento de alimentos, gerando considerável impacto nas propriedades funcionais do produto desejado. No processo de hidrólise ocorre a quebra da proteína, gerando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres; como resultado da clivagem de ligações peptídicas. Esta quebra faz aumentar a densidade dos peptídeos enquanto o tamanho das moléculas diminui, contribuindo, assim, para o aumento da solubilidade do produto final. Assim, o

interesse tem sido emergente para identificar e caracterizar peptídeos bioativos a partir de fontes vegetais, animais e marinhas.

A hidrólise pode ser feita utilizando enzimas, ácidos ou álcalis. As hidrólises ácidas ou alcalinas tendem a ser um processo difícil de controlar e resultam em produtos com reduzidas qualidades nutricionais (CLEMENTE, 2000). A hidrólise enzimática, geralmente é a escolhida devido a maior segurança na qualidade dos alimentos, o processo não gera subprodutos tóxicos, além dos hidrolisados produzidos possuírem maior valor nutricional e funcional devido à alta especificidade das enzimas em romper ligações peptídicas gerando resíduos de aminoácidos (KHANTAPHANT, 2008; KUMAR, 1999). As proteases são divididas conforme seu sítio de ação: as exopeptidases (flavourzyme, carboxipeptidase, aminopeptidase, dipeptidases) agem clivando as ligações peptídicas próximas aos grupos amino ou carboxi terminal do substrato; e as endopeptidases (tripsina, quimotripsina, pepsina e alcalase) agem nas porções mais internas da cadeia polipeptídica, distante dos grupos terminal do substrato (RAO et al., 1998).

Peptídeos bioativos são considerados frações específicas de proteínas, inativos no interior da sequência da proteína de origem (SARMADI; ISMAIL, 2010). Depois de serem liberados por hidrólise enzimática podem exercer várias funções biológicas. Estes peptídeos podem apresentar tamanho de 2-20 resíduos de aminoácidos e massas moleculares menores que 6.0 kDa (MEISEL, 2003; SUN et al., 2004).

Segundo Castro e Sato (2015), características como baixa toxicidade; e alta especificidade tornam essas biomoléculas de especial relevância para as indústrias alimentícia e farmacêutica.

Um grande número de peptídeos bioativos já foram isolados e caracterizados de diversas fontes proteicas, tais como: soja (ROBLET et al., 2012), milho (PARRIS et al., 2008), trigo (MOTOI; KODAMA, 2003), cevada, arroz (KANNAN et al., 2010), carne (ARIHARA et al., 2001), peixe (BYUN et al., 2009) leite e derivados (NARVA et al., 2004).

Muitas pesquisas estão focando na obtenção de peptídeos com propriedades antioxidantes, pois promovem uma alternativa natural e segura em relação aos antioxidantes sintéticos (HOOK et al., 2001). Além de apresentarem algumas vantagens; como baixo peso molecular e alta biodisponibilidade; são facilmente absorvíveis e devido a sua simples estrutura, podem apresentar maior estabilidade (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Dentre os mecanismos que explicam a capacidade antioxidante dos peptídeos, estes ainda não estão completamente definidos.

Vários estudos têm demonstrado a eficácia de peptídeos como sequestradores de radicais livres, capacidade de doação e oxidação de elétrons (poder redutor) e como agentes quelantes de íons metálicos (SARMADI; ISMAIL, 2010; ERDMANN et al., 2008; XIE et al., 2008, SUN et al., 2004; MOURE et al., 2005; QIAN et al., 2008). No entanto, o que está relatado na literatura é que as ligações peptídicas estão relacionadas com o seu potencial antioxidante e os aminoácidos presentes nestas ligações podem exercer maior funcionalidade quando na forma de dipeptídeos ou tripeptídeos (NAGASAWA, 2001). Além de sua estrutura, o grau de hidrólise, tipo da enzima utilizada no processo e o peso molecular dos peptídeos estão diretamente relacionados ao poder antioxidante e outras funções biológicas (PENÃ-RAMOS, 2002).

Ainda, alguns trabalhos vêm apresentando a estabilidade de peptídeos antioxidantes frente às condições de temperatura, pH, peroxidação lipídica e trato gastrointestinal; parâmetros importantes para posterior incremento destes compostos em alimentos (ZHUANG et al., 2013; ZHU et al., 2013; KHAIRALLAH et al., 2015). Em um estudo recente, Jang et al. (2016) isolaram peptídeos provenientes de uma espécie de peixe (*Arctoscopus japonicus*) com peso molecular < 3kDa e avaliaram a atividade antioxidante em diferentes temperaturas e pH. Os resultados apresentaram um potencial de inibição de 66%, mesmo sendo submetido a temperaturas elevadas (90°C). Este mesmo peptídeo teve maior atividade antioxidante frente a condições de pH 6,0 (80% de inibição), e menor atividade em pH 12,0 (60%), demonstrando a estabilidade antioxidante do peptídeo mesmo em diferentes variações de processo.

Os peptídeos bioativos tornam-se, desta forma, interesse de pesquisas como uma alternativa de ingredientes naturais e reguladores do organismo, devido à sua capacidade de atuar com a mesma eficácia antioxidante a qual se obtêm com as substâncias sintéticas (SAADI et al., 2014).

2.3.1 Fracionamento dos peptídeos bioativos

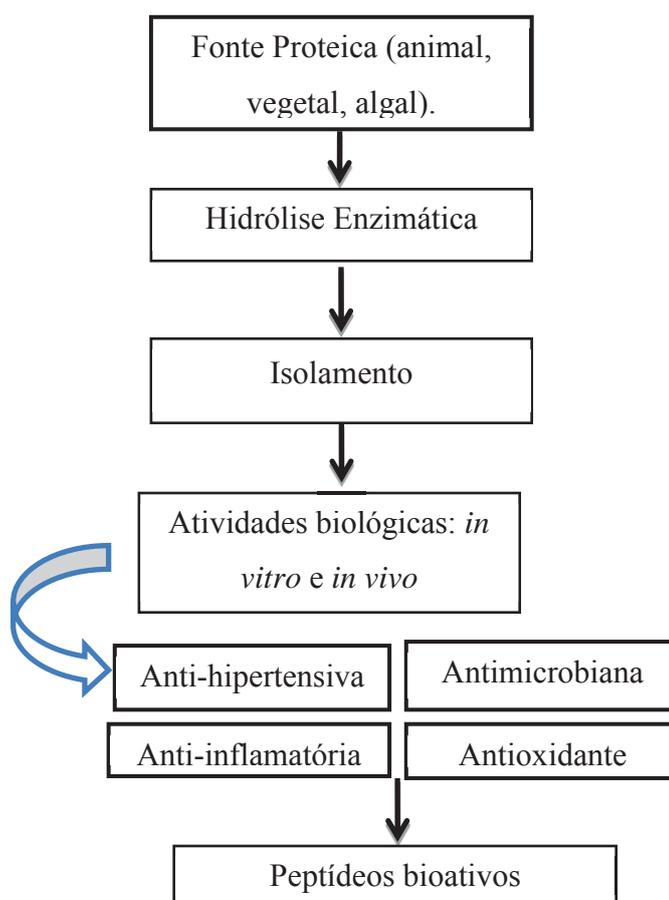
A descoberta de diferentes atividades biológicas nos peptídeos tem gerado atenção para compostos e pelos métodos utilizados para o seu isolamento, identificação, purificação e caracterização (Figura 3) (ESPITIA et al., 2012).

O fracionamento de hidrolisados proteicos é importante em virtude de que a maioria dos peptídeos com propriedades biológicas estão presentes em misturas complexas contendo um grande número de frações de proteínas hidrolisadas. No hidrolisado completo, os

peptídeos bioativos estão presentes juntamente com aminoácidos livres e outras ligações peptídicas (POULIOT et al., 2006).

As metodologias geralmente utilizadas para separação de peptídeos incluem: precipitação seletiva, ultrafiltração, troca iônica, filtração em gel e as tecnologias de cromatografia líquida (URISTA, 2011).

Figura 3 - Principais etapas envolvendo a obtenção e isolamento de peptídeos bioativos.



Fonte: adaptado de CASTRO et al. (2015).

Dentre as metodologias, o processo de separação por membranas tornou-se uma tecnologia importante nas últimas décadas devido a diversas vantagens, as quais fazem dela uma alternativa no fracionamento de biopeptídeos. Estes processos são adequados para a indústria alimentícia em virtude das condições de processo como: *scale-up* de fácil operação e o consumo de energia relativamente baixo (WIJERS et al., 1998; BUTYLINA et al., 2006).

O processo de ultrafiltração (UF) é uma das principais técnicas utilizadas para isolar peptídeos de acordo com a sua massa molar. Além disso, é possível obter amostras do

hidrolisado mais purificadas pela remoção de componentes interferentes, isolando as moléculas bioativas por meio de membranas de 30 à 1 kDa (WIJERS et al., 1998). As frações são recolhidas em duas ou três correntes para obter peptídeos com diferentes dimensões.

A maioria dos peptídeos com potencialidade antioxidante proveniente de fontes alimentares possuem pesos moleculares entre 300 e 1800 Da (JE et al., 2005; RANATHUNGA et al., 2006). Na maioria das vezes eles incluem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, tais como Valina ou Leucina na extremidade N-terminal dos peptídeos; e Prolina, Histidina, Tirosina, Triptofano, Metionina, Cisteína em suas sequências (ELIAS et al., 2008).

Resultados recentes na separação de peptídeos isolados de iogurte mostram que as frações obtidas após troca iônica podem ser divididas em quatro frações sucessivas por UF com membranas de tamanhos moleculares de 30, 10 e 3 kDa (BUTYLINA et al., 2006).

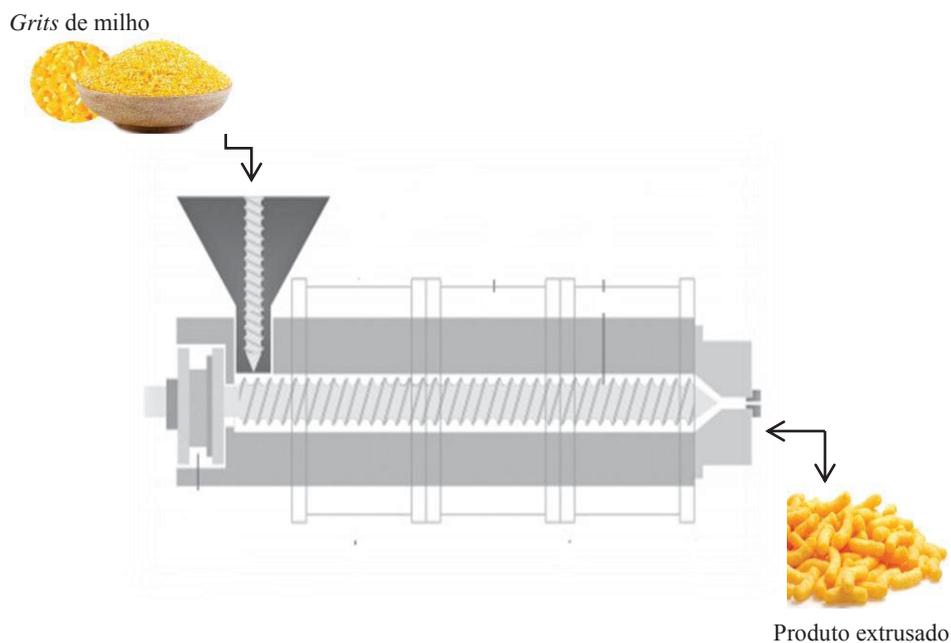
A aplicação de hidrólise enzimática seguida do processo de ultrafiltração pode ser uma alternativa para o isolamento de peptídeos e seu uso em alimentos.

2.4 ALIMENTOS EXTRUSADOS

Alimentos extrusados tipo *snacks* tornaram-se parte dos hábitos alimentares de uma grande parte da população. Podem ser preparados com ingredientes ou componentes que lhes confirmam propriedades funcionais específicas (HUANG et al., 2006).

O processo de extrusão de alimentos é um processo o qual se utiliza altas temperaturas em um curto espaço de tempo, de forma contínua e homogênea. Através do trabalho mecânico, juntamente com o calor e as forças de cisalhamentos aplicadas ao alimento, têm-se como resultado, mudanças na forma, estrutura e composição do produto final (Figura 4). Devido à intensa ruptura e mistura estrutural que este processo provoca, modifica profundamente as matérias-primas, proporcionando novos formatos e estruturas com diferentes características funcionais e nutricionais. A extrusão é geralmente aplicada no processamento de cereais e proteínas destinados à alimentação humana e animal (EMBRAPA, 2015).

Figura 4 – Processo de extrusão de alimentos utilizando *grits* de milho



Fonte: STEEL et al. (2012)

A tecnologia de extrusão é utilizada no processo de produção de vários alimentos, como lanches, cereais, salgadinhos, entre outros. Há uma combinação de vários fatores envolvida, tais como temperatura, umidade, corte e mistura, para produção dos extrusados (LOBATO et al., 2011). Algumas vantagens deste processo alimentício são: a melhoria das características funcionais, pois o cozimento melhora a digestibilidade do produto, os ingredientes são misturados uniformemente, a perda de nutrientes é menor por ser um processo rápido de cozimento, aumenta a vida de prateleira sem necessitar de refrigeração (FERNANDES, 2011). Deve-se considerar como características importantes da matéria-prima para o processamento: teor de umidade, granulometria, pH e composição físico-química (teores de carboidratos, proteínas, gorduras, fibras e açúcares).

O milho (*Zea mays*) é um alimento de baixo custo, além de sua facilidade de produção, adaptação e valor nutritivo; tornando-se um importante cereal consumido no mundo. Também é utilizado como matéria-prima base para produtos extrusados, pelo seu alto percentual de amido (MOURA; ASCHERI, 2013). A elaboração de extrusados expandidos se faz a partir da utilização do milho na forma de *grits*, proveniente da moagem via seca do milho, a qual é feita uma limpeza dos grãos de milho, retirada do germe e o endosperma restante é moído e peneirado em diferentes frações de tamanhos e composição (ASCHERI et al., 2006).

Para produção de snacks de boa qualidade, expansão e textura adequada, os *grits* devem ter granulometria uniforme, pois, como há um cozimento das partículas durante o

processo, a uniformidade previne dureza ou cozimento parcial no produto final (ASCHERI et al., 2006).

A textura é um atributo sensorial crítico que pode determinar a qualidade de um produto, como nos produtos obtidos por extrusão termoplástica. Em *snacks* extrusados, a expansão é desejada e é por isso que a textura desempenha um papel importante no que diz respeito à aceitabilidade entre os consumidores (ANTON e LUCIANO, 2007). A caracterização da textura de *snacks* pode ser feita através da análise instrumental, utilizando diferentes probes (instrumento de medida dos testes), os quais, através da força aplicada, relacionam-se a atributos como dureza, fraturabilidade, coesividade e crocância. Os testes aplicados demonstram o perfil de textura do produto extrusado (LIU et al., 2000; VERONICA et al., 2006; PAULA e CONTI-SILVA., 2014).

Outra característica de qualidade importante nos alimentos extrusados é a cor, pois podem ocorrer mudanças ao longo da extrusão devido à composição dos ingredientes e às reações físico-químicas que ocorrem durante o processamento e a expansão do produto final (BISHARAT et al., 2015). Os alimentos tipo *snack* continuam a ser um alimento versátil, devido ao seu sabor variado, vida de prateleira longa e relativamente baixo custo. Entretanto, este tipo de alimento é mau visto por grande parte dos consumidores pelo fato do seu baixo valor nutritivo.

Diferentes trabalhos na literatura vêm demonstrando interesse na incorporação compostos bioativos proveniente de fontes como algas, frutas e vegetais, em alimentos extrusados a base de milho (CIAN et al., 2013; CAMIRE et al., 2007; DEGHAN-SHOAR et al., 2010; BISHARAT et al., 2015), porém, a muitos destes compostos sofrem degradação devido à sua sensibilidade para condições de processamento como temperatura (RIAZ et al., 2009).

Até o momento não há relatos de peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* sp. em alimentos e novos ingredientes devem ser estudados devido à necessidade da incorporação de compostos que melhorem a composição nutricional e tragam maior funcionalidade para produtos processados. Produtos extrusados tipo *snack*, tornam-se um veículo adequado para atender a demanda dos consumidores por lanches mais saudáveis e convenientes.

METODOLOGIA

3.1 MICROALGA *Spirulina* sp.

A microalga utilizada neste estudo foi a *Spirulina* sp. LEB 18, cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

3.2 ENZIMA

A enzima utilizada neste trabalho foi a Protemax 580L de *Bacillus licheniformis* (Prozyn, São Paulo – SP), a qual, baseado em estudos prévios, apresentou melhores resultados na obtenção de hidrolisados da *Spirulina* sp. (LISBOA et al., 2014).

3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A determinação da atividade da protease foi realizada segundo o método descrito por Ma et al. (2007), a partir de uma curva padrão de tirosina, definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina por minuto, expressa em U.mL⁻¹. Esta determinação serviu como base de cálculo para adição de 5 U.mL⁻¹ de enzima, determinada a partir de estudos prévios (LISBOA et al., 2014).

3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA ALGAL

A caracterização da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi realizada pela quantificação do teor de proteína, carboidratos, lipídeos, umidade e cinzas presentes na biomassa. A determinação do teor de proteínas foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951) com modificações, através da curva padrão de albumina. O teor de carboidratos foi realizado pelo método de Dubois et al. (1956), através da curva padrão de glicose. Para determinação do teor de lipídeos, a quantificação foi feita de acordo com Folch et al. (1957), adaptado por Colla et al. (2002). A umidade foi determinada por secagem direta em estufa a 105 °C até peso

constante, e as cinzas através da carbonização das amostras em bico de Bunsen, seguida de incineração em forno mufla a 550 °C, baseando-se no método da AOAC (2005).

3.5 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO ALGAL

3.5.1 Hidrólise enzimática

Os parâmetros de hidrólise enzimática utilizados neste trabalho foram de acordo com Lisboa et al. (2014). Para a obtenção do hidrolisado foi utilizado 4g de *Spirulina* em 100 mL de tampão bicarbonato-carbonato de sódio (pH 9,5) e 5 U.mL⁻¹ de enzima. Após, colocou-se em incubadora orbital a 180 rpm em temperatura ótima de atividade da enzima (60 °C). Alíquotas foram retiradas a cada hora para quantificação do grau de hidrólise, em um total de 4 h de reação. Ao final, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 10 min e o hidrolisado foi centrifugado a 4200 g por 10 min para remoção do material insolúvel, o sobrenadante foi congelado em ultra freezer à -70°C para posterior liofilização. O processo foi realizado em triplicata.

3.5.2 Grau de Hidrólise

A análise de determinação do grau de hidrólise (GH) foi realizada em triplicata nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 h. Transcorrido cada tempo, alíquotas de 1 mL do hidrolisado foram adicionadas de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25%, sendo deixadas em repouso por 10 min. O TCA é responsável pela precipitação parcial ou total de proteínas não hidrolisadas e peptídeos de maior peso molecular, produzindo uma concentração mais elevada de aminoácidos livres solúveis e peptídeos de menor tamanho que são encontrados no sobrenadante (CARREIRA et al., 2003). Após, o sobrenadante foi centrifugado por 5 min a 4200 g e determinado o teor de proteínas solúveis pelo método de Lowry (1951), expresso em mg de albumina.

O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por Hoyle e Merrit (1994) com modificações, sendo expresso pela quantidade de proteínas solúveis no TCA antes e após a adição da enzima em relação à quantidade de proteína total presente na amostra, e calculado segundo a Equação 1.

$$GH \% = \frac{PS_t - PS_{t_0}}{P_{total}} \times 100 \quad (1)$$

Onde, o branco, PS_{t_0} correspondeu à quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25 % antes da adição da enzima; PS_t foi a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P_{total} foi a quantidade de proteína total na amostra.

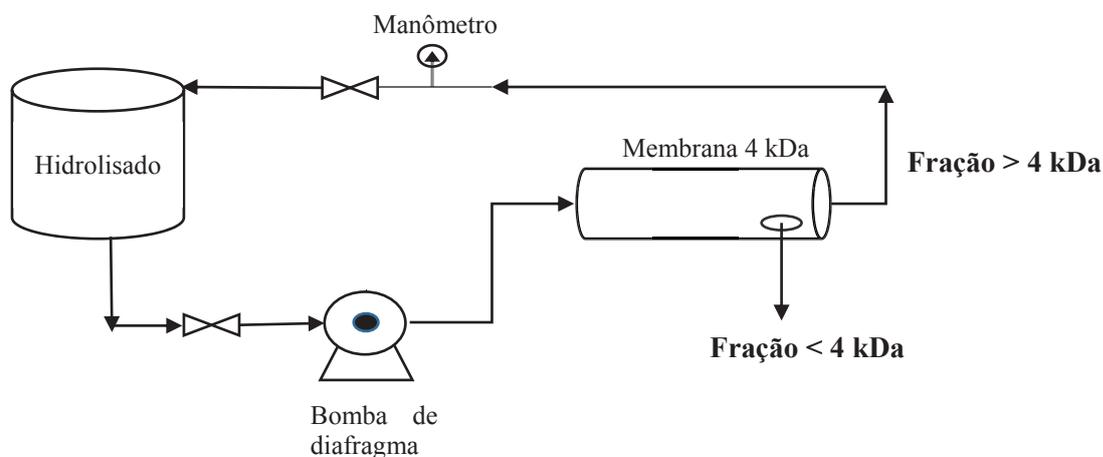
3.6 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS

3.6.1 Ultrafiltração por exclusão molecular

Para obtenção dos peptídeos da microalga *Spirulina* sp., o hidrolisado, depois de centrifugado, foi filtrado por uma membrana tubular de exclusão molecular de 4 kDa.

A ultrafiltração (UF) ocorreu em um equipamento piloto de bancada conforme ilustrado na figura 5. Constituído por uma bomba de diafragma, um reservatório de aço inoxidável de 10 L de capacidade, uma válvula esférica e um manômetro para controle da pressão. O hidrolisado proteico foi alimentado no tanque e impulsionado pela bomba passando pela membrana, separando o permeado (Fração < 4 kDa) e o retido (Fração > 4 kDa). A pressão máxima de operação do sistema foi de 1,5 bar.

Figura 5 - Sistema de ultrafiltração para obtenção das frações peptídicas.



Os rendimentos das frações, o rendimento global das frações e o rendimento do sistema foram calculados conforme as equações 2 a 4.

$$RF \% = \frac{[Proteína_{fração}] \times Volume_{fração}}{[Proteína_{hidrolisado}] \times Volume_{hidrolisado}} \times 100 \quad (2)$$

$$RGF \% = \frac{[Proteína_{fração}] \times Volume_{fração}}{[Proteína_{spirulina}] \times Volume_{spirulina}} \times 100 \quad (3)$$

$$RS \% = \frac{[Proteína_{frações}] \times Volume_{frações}}{[Proteína_{hidrolisado}] \times Volume_{hidrolisado}} \times 100 \quad (4)$$

Sendo,

RF = Rendimento das frações no sistema (%);

RGF = Rendimento global das frações (%);

RS = Rendimento do sistema (%).

As frações peptídicas obtidas foram congeladas em ultra freezer a -70°C para posterior liofilização e caracterização.

3.6.2 Caracterização físico-química do hidrolisado e das frações peptídicas

O hidrolisado proteico e as frações peptídicas isoladas foram caracterizados quanto ao teor de proteína, carboidratos, lipídeos, umidade e cinzas utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005). Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25. Cinzas pelo método gravimétrico em mufla ($550-600^{\circ}\text{C}$) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105°C). Os lipídeos foram extraídos empregando a metodologia de Soxhelt. Os carboidratos foram determinados por diferença.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com o intuito de abranger diferentes mecanismos de ação do antioxidante diante das espécies reativas, foram selecionados os métodos de capacidade de sequestro do radical livre ABTS, poder redutor e habilidade quelante do íon Fe^{2+} . As amostras liofilizadas foram dissolvidas em diferentes solventes (etanol, metanol e água), filtradas e analisadas.

3.7.1 Capacidade de sequestro do radical ABTS

A atividade de sequestro do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foi determinada de acordo com RE et al. (1999), com modificações. Para a análise, foram preparadas duas soluções: solução estoque de ABTS 7 mmol. L^{-1} e solução estoque de persulfato de potássio $2,45 \text{ mmol. L}^{-1}$, ambas diluídas em água. Para formação do radical, as soluções foram misturadas na proporção 1:1 e deixadas no escuro por 16 h. O radical foi diluído em álcool etílico até absorvância ficar em torno de $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ a 734 nm . Para realização da análise, $20 \mu\text{L}$ das amostras diluídas nos solvente água, etanol e metanol, foram adicionados de $980 \mu\text{L}$ (modificado) da solução estoque de ABTS. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos e mantida no escuro por 6 min. Para o branco, os diferentes solventes foram utilizados no lugar da amostra, nas mesmas condições da análise. A absorvância resultante da solução, após o tempo de reação, foi lida em espectrofotômetro e os resultados foram obtidos através de uma curva padrão de Trolox ($0 - 900 \mu\text{mol. L}^{-1}$) sendo expressos em $\mu\text{mol de Trolox. g}^{-1}$ amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

3.7.2 Poder Redutor

O ensaio da atividade antioxidante pelo método de poder redutor foi realizado de acordo com Oyaizu (1986). Para esta determinação, 1 mL de solução da amostra foi misturado com $2,5 \text{ mL}$ de tampão fosfato $0,05\text{M}$ (pH 7,0) e $2,5 \text{ mL}$ de ferricianeto de potássio 1%. Essa mistura foi incubada a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho termostaticado por 20 min. Após, a reação foi interrompida adicionando $2,5 \text{ mL}$ de solução TCA 10% e centrifugada a 3000 g por 10 min. Aliquotas de $2,5 \text{ mL}$ do sobrenadante foram transferidas para tubos de vidro com adição

de 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico 0,1%. A leitura da absorbância foi feita a 700 nm decorridos 10 min. Para o branco, água, etanol e metanol foram utilizados no lugar da amostra, nas mesmas condições. Os resultados foram obtidos através de uma curva padrão de Trolox (0 – 1000 $\mu\text{mol. L}^{-1}$), sendo expressos em $\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$ amostra.

3.7.3 Atividade Quelante do íon Fe^{2+}

A metodologia foi realizada de acordo com Decker and Welsh (1990) com modificação. Aliquotas de 3,7 mL da solução contendo a amostra foram adicionadas de 0,05 mL (modificado) da solução FeCl_2 2 mmol. L^{-1} . A reação do íon complexo foi iniciada pela adição de 0,2 mL de solução de ferrozina 5 mmol. L^{-1} . Esta mistura foi agitada em agitador de tubos e mantida em repouso, no escuro, durante 10 min. Foi utilizada água deionizada como branco nas mesmas condições da análise. As leituras das absorbâncias foram feitas em 562 nm. As atividades quelantes foram calculadas através de uma curva padrão de ácido etilenodiamino tetra-ácético (EDTA; 0 - 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$), expressos em $\mu\text{mol de EDTA. g}^{-1}$ amostra.

3.8 ESTABILIDADE DA FRAÇÃO < 4 kDa

Com o intuito de explorar o potencial antioxidante dos peptídeos de menor peso molecular, sua estabilidade foi avaliada utilizando-se diferentes parâmetros de processo, como temperatura, pH, na presença de cloreto de sódio e sacarose.

3.8.1 Efeito do cloreto de sódio e sacarose

Os peptídeos liofilizados foram adicionados de 1, 2, 3 e 4% (p/v) de cloreto de sódio e as mesmas concentrações para a sacarose. As soluções testadas foram submetidas a uma temperatura de 100 °C por 15 min. Após, foram resfriadas até temperatura ambiente (25 °C) e realizadas as análises de ABTS, poder redutor e atividade quelante. Para o controle, os peptídeos foram submetidos às mesmas condições sem adição dos ingredientes.

3.8.2 Efeito do pH

O pH das soluções aquosas contendo os peptídeos foi alterado para 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 utilizando 2 M de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), sendo mantidas em temperatura ambiente (25 °C) durante 1 h. Após, o pH das soluções foi ajustado para 7,0 e realizadas as análises de ABTS, poder redutor e atividade quelante.

3.8.3 Efeito da temperatura

Os peptídeos foram submetidos às temperaturas de 25 °C, 50 °C e 100 °C durante 1 h. As amostras com temperaturas maiores foram resfriadas até temperatura ambiente (25 °C) para a realização das análises de ABTS, poder redutor e atividade quelante.

3.9 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS COM TRANSFORMADAS DE FOURIER (FTIR)

A absorção do infravermelho ocorreu em equipamento Cary 630 FTIR (*Agilent Technologies, USA*) para o hidrolisado e as frações peptídicas comparando com a *Spirulina* não hidrolisada. Os produtos foram analisados na faixa de 650 a 4000. cm^{-1} .

3.10 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) E ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A microalga *Spirulina*, o hidrolisado e as frações peptídicas obtidas foram analisados quanto à estabilidade térmica (DSC) e perda de massa (TGA), apresentados em formato de termogramas utilizando o software Universal Analysis 2000.

As curvas de DSC foram obtidas usando um sistema de análise térmica modelo DSC Q2000 (*TA Instruments, USA*), utilizando atmosfera com gás nitrogênio ultra-puro 50 mL. min^{-1} , porta-amostra de alumínio hermético, com taxa de aquecimento de 10 °C. min^{-1} , na faixa de temperatura de 25 a 200 °C.

Para a análise termogravimétrica (TGA), os termogramas foram obtidos utilizando um equipamento de análise térmica modelo SDT Q600 (*TA Instruments, USA*), utilizando atmosfera com gás nitrogênio ultra-puro 100 mL. min⁻¹.

3.11 DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS TIPO *SNACK* ADICIONADOS DE *Spirulina*, HIDROLISADO E PETÍDEOS ISOLADOS

Foram desenvolvidos cinco *snacks* de milho, sendo um adicionado de biomassa de *Spirulina*, um de hidrolisado proteico, dois com as frações peptídicas (> e < 4 kDa) e um *snack* controle, sem adição (somente o *grits* de milho). A proporção de produtos adicionados ao *grits* de milho foi 2% (p/p). O processo de extrusão ocorreu na TEMABI, localizada na cidade de Sananduva, RS, Brasil, em que foi utilizada uma extrusora monorosca RX 50 (*Rafamáquinas, Brasil*) de capacidade 50 kg. h⁻¹. O teor de umidade dos *grits* para o processo foi de 12,5 g. 100g⁻¹, temperatura de extrusão em torno de 120 °C e abertura da matriz de 3 mm. Os *snacks* produzidos são de formato cilíndrico.

Após o processo, os *snacks* foram acondicionados em embalagens herméticas para posteriores caracterizações físico-químicas, de textura, cor e análise antioxidante.

3.11.1 Caracterização físico-química dos *snacks*

Análises do teor de proteína, lipídios, umidade e cinzas para os diferentes *snacks* foram realizadas utilizando a metodologia da AOAC (2005). Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25. Cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C). Os lipídeos foram extraídos empregando a metodologia de Soxhlet. Os carboidratos foram determinados por diferença.

3.11.2 Textura

Os parâmetros de textura dos *snacks* foram avaliados em equipamento texturômetro TA-XT plus (*Stable Micro Systems, Inglaterra*), equipado com Software Exponent 32 e carga de célula de 5 kg.

Amostras de aproximadamente 3 cm foram analisadas a uma velocidade de 1 mm/s utilizando o probe Warner–Bratzler em formato de “V”. O teste de corte foi feito perpendicularmente ao eixo principal do *snack*, sendo calculada a força (g) necessária para quebrá-lo.

Os resultados obtidos foram apresentados em termos de fraturabilidade e dureza.

3.11.3 Cor

A análise de cor dos *snacks* foi realizada utilizando o colorímetro de refletância difusa Color Quest II (*Hunterlab, USA*), conectado ao software Versão 1.7 Universal. As amostras foram colocadas em cubeta de quartzo com 20 mm de caminho óptico. Para o cálculo das coordenadas de cor, foi estabelecido o iluminante D65, o ângulo de 10° para o observador e a escala do sistema de cor CIE Lab. As coordenadas medidas foram: L* que representa a luminosidade em escala de 0 (preto) a 100 (branco), a* que representa escala de tonalidades de verde (-) a vermelho (+) e b* que representa a escala de tonalidades de azul (-) a amarelo (+).

3.11.4 Atividade antioxidante dos *snacks*

Para as análises de atividade antioxidante dos *snacks* com adição de *Spirulina*, do hidrolisado das frações peptídicas > 4 kDa e < 4 kDa, foram realizados a trituração dos mesmos em moinho de bancada e passados em peneira Tyler 80. Amostras de 1g foram dissolvidas em 25 mL de diferentes solventes (metanol e etanol) e agitadas à temperatura de 25°C, a 150 rpm por 24 h. Após, o material foi centrifugado a 3000 g por 10 min e o sobrenadante passado em papel filtro qualitativo. Os extratos obtidos foram analisados pelos métodos de ABTS e poder redutor. O mesmo procedimento ocorreu com a amostra controle (somente o *grits* de milho).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata. As diferenças entre as médias foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) no nível de 5% de probabilidade e a comparação entre estas pelo Teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA ALGAL

A Tabela 1 apresenta a caracterização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, em base seca, utilizada neste trabalho. A concentração de proteína presente na microalga serviu de base para os cálculos de grau de hidrólise e para os rendimentos obtidos no sistema de ultrafiltração.

Tabela 1 – Caracterização físico-química da biomassa *Spirulina* sp. LEB 18

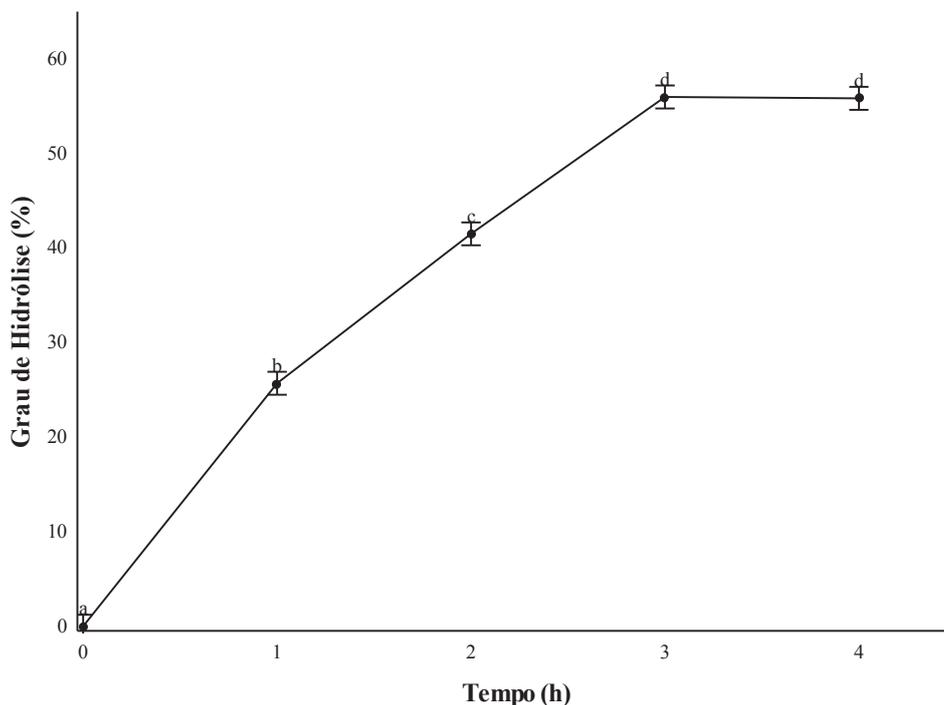
Componentes	Base Seca (g 100g⁻¹) *
Proteínas	65,20 ± 0,71
Carboidratos	11,05 ± 0,41
Lipídios	2,64 ± 0,48
Cinzas	13,65 ± 0,05
Umidade	7,43 ± 0,11

*Resultados de média ± desvio padrão.

Heirikson (1994) verificou em seu estudo o mesmo teor de proteína em *Spirulina platensis* (65%) verificado neste trabalho. Ainda, nota-se que o teor proteico da *Spirulina* sp. é superior a outras fontes alimentares, como soja (35%), carne e peixe (15-20%), leite em pó (35%) e ovos (12%) (BABADZHANOV et al., 2004), demonstrando seu potencial como matéria-prima para obtenção de peptídeos bioativos.

4.2 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO ALGAL

A hidrólise enzimática gerou maior grau de hidrólise (55%) em 3 h de reação, mantendo-se constante ao longo de 4 h, conforme apresentado na figura 6. Este resultado permite ter um parâmetro sobre a extensão da hidrólise nas proteínas, a qual exerce ligação na alergenicidade e solubilidade das mesmas, em regra, quanto maior for o grau de hidrólise, maior será a solubilidade das proteínas e menor sua alergenicidade (DAMODARAM et al., 2010).

Figura 6 - Grau de hidrólise da biomassa de *Spirulina* sp.

Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Ainda, as proteínas, por serem moléculas complexas, quando hidrolisadas por enzimas, resultam em uma mistura de peptídeos e aminoácidos livres, melhorando suas propriedades funcionais como a digestibilidade, solubilidade e capacidade de retenção de água. Essas propriedades dependem do grau de hidrólise, o qual é definido como a proporção de ligações peptídicas clivadas em um hidrolisado proteico (DAMODARAN et al. 2010; ROMAN; SGARBIERI, 2005).

Estudos demonstram que um dos principais critérios na utilização de hidrolisados na alimentação está no tamanho molecular dos peptídeos, pois o comprimento da cadeia peptídica influencia na solubilidade e absorção dos mesmos. Esta absorção está relacionada a um elevado teor de di- e tri-peptídeos, sendo mais efetivos do que uma mistura de aminoácidos livres ou a proteína intacta, apresentando, assim, um maior valor nutritivo, além de influenciar na bioatividade das moléculas (MOHAMED et al. 2000; SU et al. 2011).

4.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS

O hidrolisado proteico foi submetido a um sistema de ultrafiltração (UF) obtendo frações peptídicas maiores e menores que 4 kDa. O fluxo do permeado (Fração < 4 kDa) foi

acompanhado durante o processo. O hidrolisado proteico passava pela membrana e voltava para a alimentação até o fluxo reduzir, mantendo-se constante. Os resultados de concentração de proteína (g.L^{-1}), bem como dos rendimentos obtidos na Fração > 4 kDa e Fração < 4 kDa estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações de proteína e rendimentos do sistema de ultrafiltração

	Proteína (g.L^{-1})[*]	Volume (L)	RF (%)	RGF (%)	RS (%)
<i>Spirulina</i> sp.	26,00 ± 0,71				
Hidrolisado	14,00 ± 0,02	4,8			
Fração > 4 kDa	16,28 ± 0,06	2,4	58,13	62,5	88,94
Fração < 4 kDa	9,41 ± 0,15	2,2	30,80	36,19	

RF: Rendimento das frações; RGF: Rendimento global das frações; RS: Rendimento do sistema.

^{*}Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Os rendimentos das frações obtidas pela ultrafiltração foram baseados nas concentrações de proteína determinadas pelo método de Lowry et al. (1951). Levou-se em consideração o grau de hidrólise obtido (55%) e os volumes reais de entrada e saída do sistema.

A distribuição do peso molecular, de acordo com o rendimento apresentado na Tabela 2, demonstrou que os peptídeos menores que 4 kDa foram responsáveis por cerca de 30% do hidrolisado. Ainda, realizando uma análise global do processo de hidrólise enzimática no presente estudo, verificou-se, que a partir da concentração de *Spirulina* (4% p/v) utilizada para obtenção do hidrolisado proteico, foi possível obter 36% de peptídeos menores que 4 kDa e 62% de peptídeos maiores que 4 kDa.

Em estudos, os hidrolisados proteicos que passaram pelo processo de ultrafiltração apresentaram quantidades de peptídeos de baixo peso molecular proporcionais ao seu grau de hidrólise. Jang et al. (2016) isolaram peptídeos do hidrolisado proteico de uma espécie de peixe com elevado grau de hidrólise (97%), obtendo 23% das frações peptídicas entre 3-5kDa e 43% com peptídeos menores que 3 kDa.

Je (2005) estudaram as frações obtidas do hidrolisado proteico do escamudo do alasca, um peixe muito frequente entre o Japão e o golfo do Alasca, separando-as pelo peso molecular, utilizando membranas de 30 kDa, 10 kDa, 5 kDa, 3 kDa e de 1 kDa. Os autores identificaram que a fração de 1 kDa apresentou maior bioatividade do que as outras frações.

A ligação do peso molecular com características de peptídeos isolados de hidrolisados proteicos em relação a sua bioatividade vem sendo estudada por diferentes autores. Esses estudos revelam que as frações de baixo peso molecular (< 1 a 5 kDa) em geral continham peptídeos antioxidantes mais potentes (JANG et al., 2016; JE et al, 2005; MENDIS et al. 2005; NALINANON et al, 2011).

4.3.1 Caracterização físico-química do hidrolisado e das frações peptídicas

A composição físico-química do hidrolisado proteico e dos peptídeos isolados pela membrana de ultrafiltração estão apresentados na Tabela 3.

O processo de ultrafiltração do hidrolisado da microalga *Spirulina* apresentou pequenas variações no teor de proteínas (52,27 – 60,9%) contidas nas frações isoladas, mantendo-se um elevado teor proteico principalmente na fração < 4 kDa.

Tabela 3 - Caracterização físico-química do hidrolisado e frações peptídicas

Composição (g/100g)	Hidrolisado	Peptídeos > 4 kDa	Peptídeos < 4 kDa
Proteína	55,46 ^{a, b} ± 0,63	52,27 ^a ± 2,84	60,9 ^b ± 0,46
Lipídios	1,73 ^a ± 0,05	3,1 ^b ± 0,39	1,82 ^a ± 0,26
Carboidratos*	9,32	11,76	0,8
Umidade	16,43 ^a ± 0,98	16,11 ^a ± 0,27	14,62 ^a ± 0,32
Cinza	17,05 ^a ± 0,42	16,76 ^a ± 0,30	21,86 ^b ± 0,78

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

*Resultado obtido por diferença.

Este resultado propicia vantagem em relação a outras fontes proteicas que necessitam ter a proteína extraída de sua matéria-prima para posterior processo de hidrólise enzimática (AGRAWAL et al., 2016; NAJAFIAN et al., 20014; PAN et al., 2016).

Ainda, todos os produtos apresentaram baixo teor de lipídios (1,73-3,1%), a maior quantidade ficou na fração > 4 kDa, decorrente das moléculas de lipídios ficarem retidas na membrana, concentrando-as. Já o teor de cinzas ficou entre 17,05-21,86%, sendo maior na fração < 4 kDa, isto pode ser devido ao processo de ultrafiltração, em que sais de menor peso molecular presentes no tampão utilizado no processo de hidrólise permearam pela membrana.

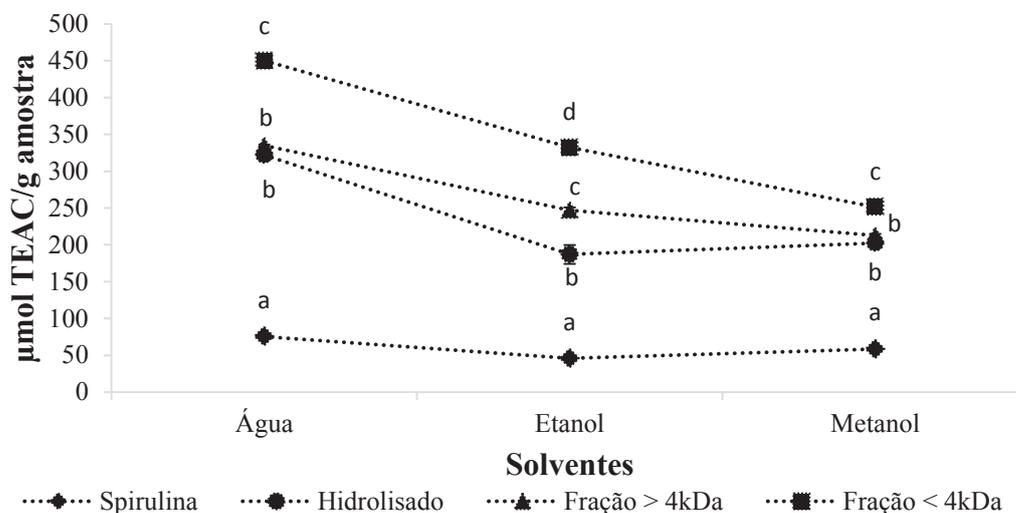
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade dos quatro produtos avaliados (*Spirulina*, hidrolisado, fração > 4kDa e fração < 4kDa) em inibir o radical ABTS utilizando água, metanol e etanol como solventes estão apresentados na Figura 7, expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). O hidrolisado proteico (322,07 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$, 187,05 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$, 202,53 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$) apresentou maior atividade antioxidante ($p < 0,05$) em comparação à matéria-prima *Spirulina* (75,62 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$, 45,97 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$, 58,56 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$) para os solventes, água, etanol e metanol, respectivamente. Este aumento é decorrente das mudanças na estrutura da proteína resultantes do processo de hidrólise enzimática, expondo os peptídeos com propriedades antioxidantes, os quais reagem mais efetivamente com os radicais que a proteína intacta (ELIAS et al., 2008).

A fração com peptídeos menores que 4 kDa em água foi a que apresentou maior capacidade de inibição do radical ABTS (436,15 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$), e, independente do solvente utilizado, o potencial de inibição se manteve superior aos demais produtos analisados, evidenciando a influência do peso molecular na atividade antioxidante. Essa elevada atividade, em comparação à fração de maior peso molecular, é similar aos resultados verificados em pesquisas utilizando membrana de ultrafiltração para o isolamento de frações peptídicas, os quais identificam a relação entre o baixo peso molecular dos peptídeos com a elevada capacidade de sequestro de radicais livres (DONG et al., 2015; KElfala-FOH et al. 2010; NGOH et al., 2015; TING et al., 2011).

Ainda, o fato da fração menor que 4 kDa apresentar seu maior potencial antioxidante quando foi utilizado água como solvente, pode ser devido à presença em maior quantidade de resíduos de aminoácidos hidrofílicos gerados durante a hidrólise e que permearam a membrana de ultrafiltração, facilitando a interação das moléculas com os radicais, inibindo sua ação (NGOH et al., 2015).

Figura 7 - Atividade antioxidante de inibição do radical ABTS da *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisado e das frações peptídicas em diferentes solventes.



Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais para o mesmo solvente não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

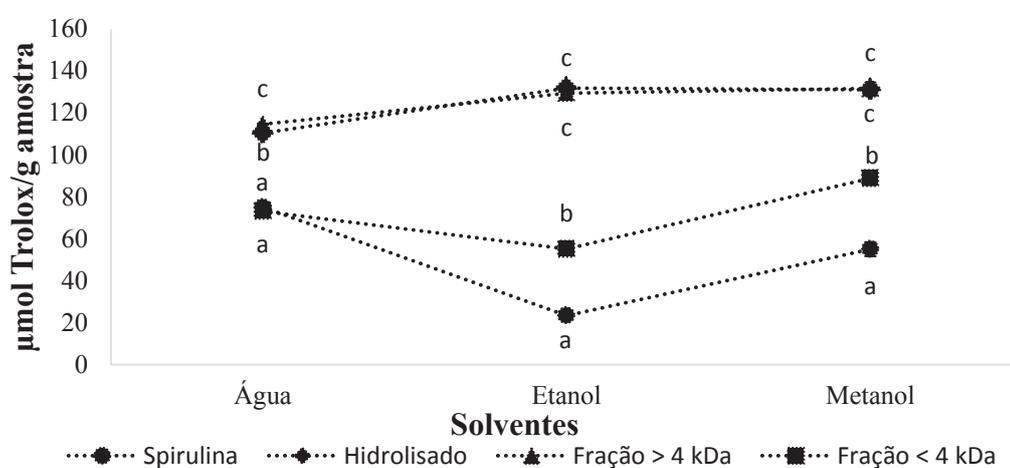
Os resultados da análise do poder de redução dos produtos avaliados são exibidos na Figura 8 e expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). O poder de redução da microalga *Spirulina* aumentou com o processo de hidrólise enzimática e diferenças ($p < 0,05$) foram verificadas entre as frações peptídicas isoladas. Alguns autores explicam que a maior disponibilidade de aminoácidos após a hidrólise pode fornecer uma fonte adicional de prótons e elétrons, mantendo um elevado potencial redox. Isso é influenciado pela interação enzima: substrato, a qual, durante a hidrólise, expõe resíduos de aminoácidos carregados nas cadeias laterais participando do mecanismo oxirredução (BAMDAD, et al., 2011; ZHU et al., 2013).

O hidrolisado proteico e a fração > 4 kDa apresentaram peptídeos com elevada capacidade de doar elétrons ($131 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$) com os solventes metanol e etanol, não havendo diferença significativa entre estes ($p > 0,05$). Isto demonstra que durante a hidrólise foram gerados peptídeos com poder de redução e mantendo este potencial na fração com peptídeos maiores que 4 kDa.. Centenaro et al. (2014), Bamdad et al. (2011) e Girgih et al. (2011) também verificaram nas frações de maior peso molecular um elevado poder redutor. Segundo Girgih et al. (2011) isto é um indicativo do efeito aditivo dos grupos presentes nas ligações peptídicas, em que peptídeos de cadeia longa irão conter maior número de peptídeos redutores que os de cadeia curta. Ainda, Centenaro et al. (2014) e Qian et al. (2008) afirmam que a atividade antioxidante de uma fração peptídica também é derivada das propriedades dos

aminoácidos presentes, como hidrofobicidade, os quais apresentam maior capacidade de transferir elétrons.

A fração < 4 kDa teve seu melhor resultado utilizando metanol como solvente (88,81 $\mu\text{mol TEAC/g}$), no entanto, foi menor que a fração de maior peso molecular, isto pode ocorrer, pois uma atividade antioxidante elevada pode não ser resultante do poder de redução, visto que compostos que inibem radicais pela doação de átomos de hidrogênio por vezes não são bons redutores (BOROSKI, et al. 2015).

Figura 8 - Poder de redução da *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas em diferentes solventes.



Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais para o mesmo solvente não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

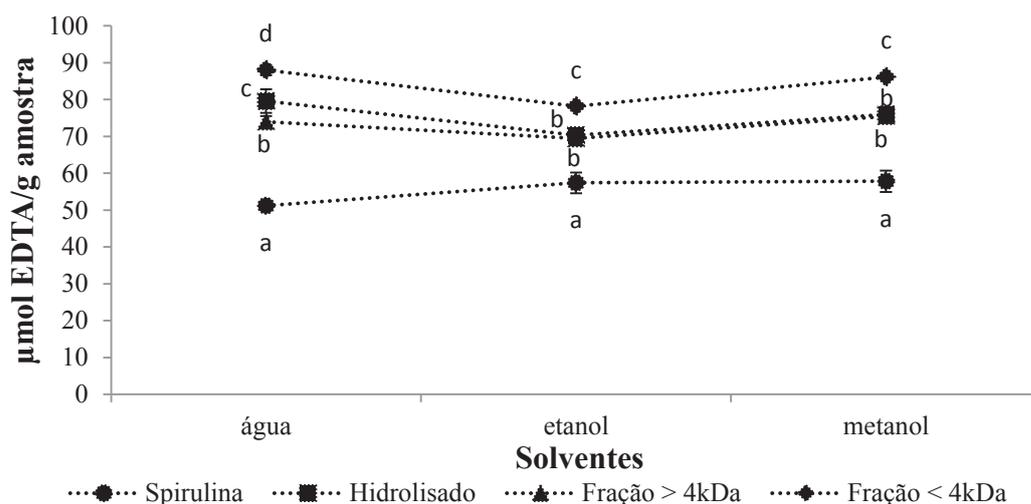
A capacidade antioxidante dos produtos analisados em quelar íons ferro está apresentada na Figura 9. Os resultados são expressos em equivalente de EDTA ($\mu\text{mol EDTA. g}^{-1}$). O ensaio de quelação de metais avalia a capacidade dos antioxidantes em formar complexos com metais de transição (tais como Fe^{2+} e Cu^{2+}) os quais catalisam e promovem a peroxidação lipídica, assim, os compostos antioxidantes agem tornando-os indisponíveis para participar de reações que conduzem à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres. Pesquisas envolvendo peptídeos vêm demonstrando a atuação como agentes antioxidantes através da quelação de íons metálicos, reduzindo a susceptibilidade dos lipídeos à peroxidação oxidativa (GIRGH et al., 2014).

A fração < 4 kDa apresentou a maior atividade quelante ($88,01 \mu\text{mol EDTA. g}^{-1}$) utilizando água como solvente, no entanto, essa atividade permaneceu elevada também nos solventes etanol e metanol em comparação aos outros produtos avaliados ($p < 0,05$), demonstrando a influência do peso molecular dos peptídeos com atividade em quelar íons metálicos. De acordo com Ueda et al. (2003), a ligação dos peptídeos à íons metálicos é

através da interação entre um grupo doador de elétrons e um íon metálico que apresente um ou mais sítios disponíveis, garantindo que o átomo metálico se torne parte de uma estrutura biologicamente estável. Os resultados no presente estudo vêm de encontro com os verificados por Ajibola et al. (2011), os quais realizaram uma comparação entre o hidrolisado proteico de uma espécie de inhame africano e suas frações peptídicas, obtendo melhores resultados de atividade quelante em frações de baixo peso molecular.

Saiga et al (2003) sugerem que a atividade quelante de peptídeos em hidrolisados poderia melhorar a capacidade de redução da taxa de oxidação lipídica acelerada por deteriorantes metálicos, seja no organismo, ou em alimentos; servindo como aditivos alimentares.

Figura 9 - Atividade quelante da *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas em diferentes solventes.



Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais para o mesmo solvente não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A capacidade antioxidante *in vitro* dos produtos analisados foi mensurada utilizando diferentes mecanismos de ação que um antioxidante pode atuar. Para os três diferentes métodos, o processo de hidrólise enzimática aumentou significativamente em comparação a *Spirulina* não hidrolisada. A fração isolada de menor peso molecular apresentou maior eficiência no sequestro de radicais livres e na capacidade de impedir a oxidação de íons metálicos presentes no meio. Já o hidrolisado e a fração de maior peso molecular foram os que apresentaram melhor poder em doar elétrons e ser oxidado. Isto demonstra que a capacidade antioxidante de um composto pode atuar de diferentes maneiras, no caso do presente estudo, o tamanho dos peptídeos e características como hidrofobicidade dos aminoácidos envolvidos nas ligações peptídicas indicaram influência na ação antioxidante.

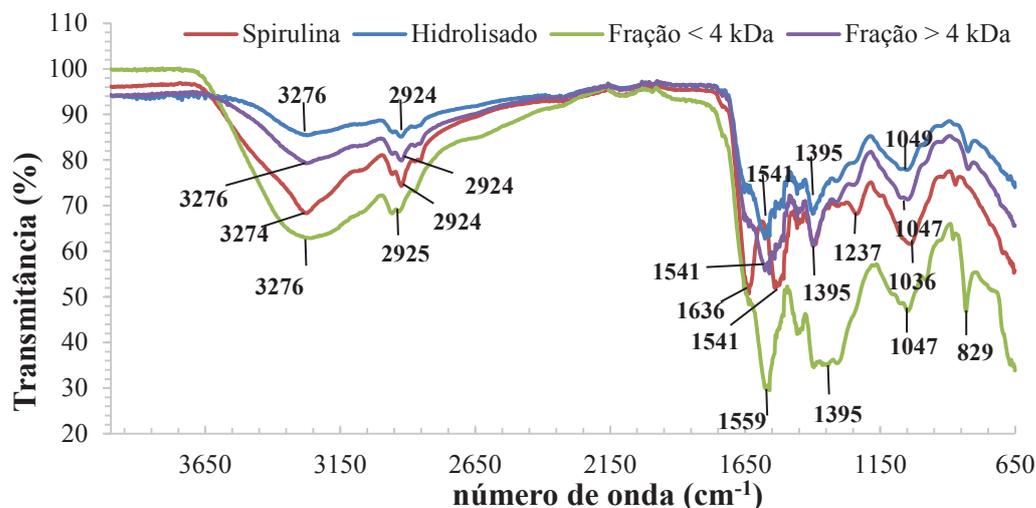
Devido aos diferentes solventes utilizados, pode-se perceber uma tendência para compostos polares envolvidos nos métodos de ABTS e atividade quelante, enquanto que no método de poder redutor, uma menor polaridade prevaleceu, devido aos melhores resultados com metanol e etanol. Este resultado de menor polaridade envolvem o hidrolisado e a fração maior que 4 kDa, em que também pode estar relacionado à presença de outros compostos presentes nos produtos com propriedades antioxidantes, como os compostos fenólicos, clorofila e carotenoides que agem em diferentes polaridades.

Desta forma, a hidrólise enzimática das proteínas da microalga *Spirulina* gerou um perfil de peptídeos capazes de impedir reações de espécies reativas através de diferentes mecanismos de ação. Estes peptídeos apresentam potencial como antioxidante em sistemas alimentares e biológicos. No entanto, mais pesquisas devem ser realizadas para melhor compreensão da relação da composição em aminoácidos envolvidos com o potencial antioxidante.

4.5 ANÁLISE DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Neste estudo, a análise de FTIR foi utilizada para avaliar a diferença dos grupos funcionais presentes na *Spirulina* não hidrolisada em relação ao hidrolisado e as frações obtidas (Figura 10). A microalga *Spirulina* apresentou em sua composição picos referentes à presença de proteínas (3274 cm^{-1} , 1636 cm^{-1} amida I, 1541 cm^{-1} amida II, 1395 cm^{-1} ácidos carboxílicos), lipídios (2924 cm^{-1}), carboidratos (1036 cm^{-1}) e ácidos nucleicos (1237 cm^{-1}). Picos semelhantes foram verificados por Fang et al. (2011) para a microalga *Spirulina platensis*.

Figura 10 - Análise de FTIR para a *Spirulina*, hidrolisado e frações peptídicas.



Os valores adicionados são referentes aos números de onda (cm^{-1}) dados pelo equipamento.

As bandas correspondentes à amida I (estiramento $\text{C}=\text{O}$) e amida II (dobramento N-H e estiramento C-N), após a hidrólise, sofreram modificações. O pico em 1636 cm^{-1} referente às ligações $\text{C}=\text{O}$, não foi identificado no hidrolisado e tampouco nas frações peptídicas.

Possivelmente isto se deve ao mecanismo de ação da enzima utilizada (serino-peptidase) no processo de hidrólise, a qual age no átomo de carbono da carbonila presente na ligação peptídica. A banda da amida II na fração $< 4 \text{ kDa}$ sofreu um deslocamento para 1559 cm^{-1} , este aumento do número de onda é proporcional a força da ligação presente, sugerindo uma maior estabilidade térmica (ARIAS-MOSCOSO et al., 2014). Ainda, a fração $< 4 \text{ kDa}$ apresentou um pico pronunciado em 829 cm^{-1} , não evidente nos outros produtos. Esta banda está relacionada ao dobramento de ligações C-H , envolvendo a presença de compostos aromáticos (ÇELEKLI, et al., 2011).

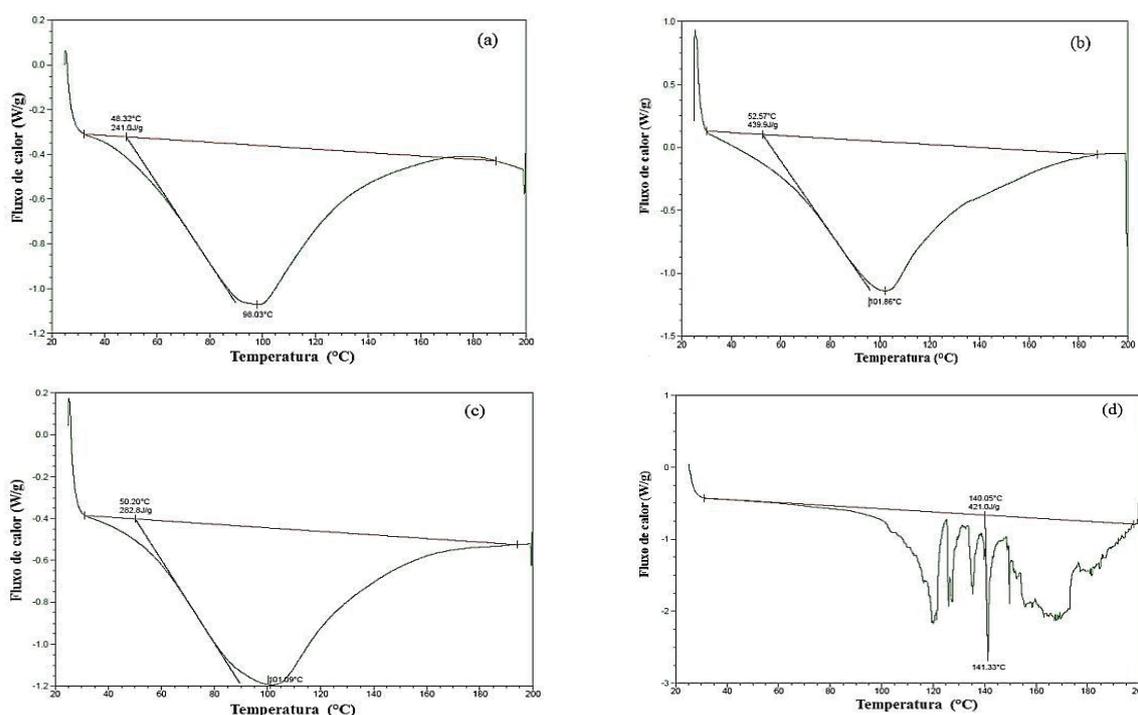
4.6 ESTABILIDADE TÉRMICA

A biomassa de *Spirulina*, o hidrolisado e as frações peptídicas foram analisados termicamente e os resultados estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é utilizada para avaliar a estabilidade das proteínas em função da temperatura. Essas alterações são refletidas nos termogramas de DSC e usadas na avaliação da estabilidade da amostra determinada pela temperatura no ponto máximo do pico (T_m) (GILL et al., 2010). As temperaturas envolvidas no processo de desnaturação das proteínas (T_m) da *Spirulina* não hidrolisada, do hidrolisado e

da fração > 4 kDa tiveram pequenas variações de 98,03 °C, 101,86 °C e 101,09 °C, respectivamente. No entanto, a entalpia envolvida no processo (ΔH) foi maior no hidrolisado (439,9 J/g), enquanto que na *Spirulina* não hidrolisada foi de 241 J/g, demonstrando que com o processo de hidrólise enzimática a energia necessária para que ocorresse a desnaturação aumentou, melhorando a estabilidade térmica (TRIVEDI et al., 2015). A fração < 4 kDa apresentou comportamento diferente dos demais produtos, apresentando um pronunciado pico endotérmico em 141,33 °C. Este aumento da estabilidade pode ser decorrente da estrutura mais simples (ausência das estruturas terciárias e quaternárias) das ligações peptídicas e composição de aminoácidos mais estáveis presentes na fração de menor peso molecular, aumentando a estabilidade das moléculas diante do aumento de temperatura.

Figura 11 - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) da *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisada e frações peptídicas.

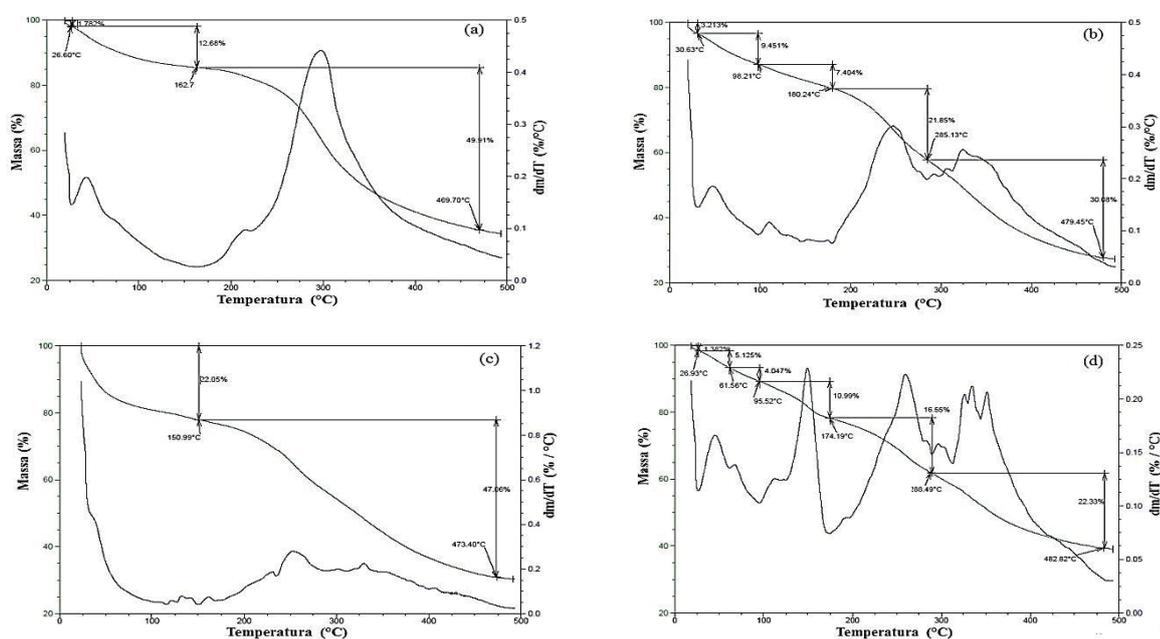


Termogramas de DSC da (a) *Spirulina* não hidrolisada. (b) hidrolisado. (c) fração > 4 kDa. (d) fração < 4 kDa.

A análise de TGA exibe a perda de massa de um determinado produto em relação à temperatura em que o mesmo é submetido. Esta perda envolve alterações físicas ou químicas que podem ocorrer durante o tratamento térmico. Gai et al. (2015) avaliaram a biomassa de *Spirulina platensis* e identificaram 2 fases envolvendo perda de massa até a temperatura de 500 °C: desidratação e desvolatilização (decomposição) dos compostos presentes. O mesmo comportamento foi apresentado pela biomassa de *Spirulina* utilizada nesse estudo (Figura 12),

juntamente com a fração > 4 kDa. Na *Spirulina*, a etapa de desidratação se manteve até $162,76$ °C, em que teve $14,46\%$ de perda de massa. Já na fração > 4 kDa esta etapa foi até 150 °C ocorrendo perda de 22% da massa inicial do produto. A maior perda de massa ocorreu na fase de decomposição dos compostos, em que houve uma diminuição de 50% na biomassa de *Spirulina* ($162,76$ °C a $469,70$ °C) e 47% na fração de maior peso molecular (150 °C a $473,4$ °C).

Figura 12 - Análise Termogravimétrica (TGA) da *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas.



Termogramas de TGA da (a) *Spirulina* não hidrolisada. (b) hidrolisado. (c) fração > 4 kDa. (d) fração < 4 kDa.

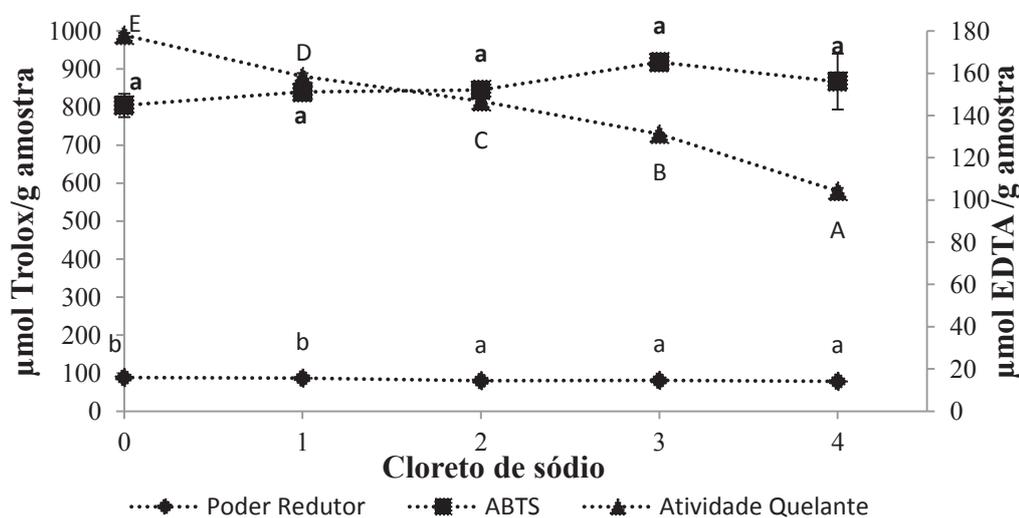
O comportamento termogravimétrico para o hidrolisado e a fração < 4 kDa foram semelhantes. O primeiro evento principal foi até 180 °C com perda de $19,21\%$ para o hidrolisado e até 174 °C com perda de $21,38\%$ para a fração < 4 kDa. A decomposição dos compostos para o hidrolisado ficou entre 180 e 480 °C com perda de 51% de massa e para a fração < 4 kDa envolveu temperaturas entre 174 °C a 482 °C havendo uma menor perda de massa (38%). Com estes resultados demonstra-se que a estabilidade térmica foi maior na fração de menor peso molecular também relacionada à menor perda de massa na etapa de decomposição dos compostos, demonstrando o potencial dos peptídeos na incorporação de alimentos que utilizem temperaturas elevadas.

4.7 ESTABILIDADE DOS PEPTÍDEOS MENORES QUE 4 kDa

4.7.1 Efeito de cloreto de sódio e sacarose na atividade antioxidante dos peptídeos

O cloreto de sódio (NaCl) e a sacarose são ingredientes comuns na indústria de alimentos. As alterações nas propriedades antioxidantes dos peptídeos na presença destes componentes estão apresentadas nas Figuras 13 e 14. O poder de redução dos peptídeos não foi afetado até a adição de 1% de NaCl (88 $\mu\text{mol TEAC/g}$), porém, nas adições de 2%, 3% e 4% acarretou em uma diminuição de sua atividade (80 $\mu\text{mol TEAC/g}$). O mesmo comportamento foi observado na adição de 1%, 2% e 4% de sacarose em comparação ao sem adição, em que uma significativa diminuição ($p < 0,05$) no poder redutor ocorreu (Figura 12), isso indica que a capacidade dos peptídeos em doar elétrons foi diminuída na presença de NaCl e sacarose nestas concentrações. Li et al. (2013) também verificaram uma diminuição no poder redutor do hidrolisado de carpa-do-limo (*Ctenopharyngodon idellus*) na presença de sacarose.

Figura 13 - Efeito do cloreto de sódio na estabilidade dos peptídeos menores que 4 kDa.



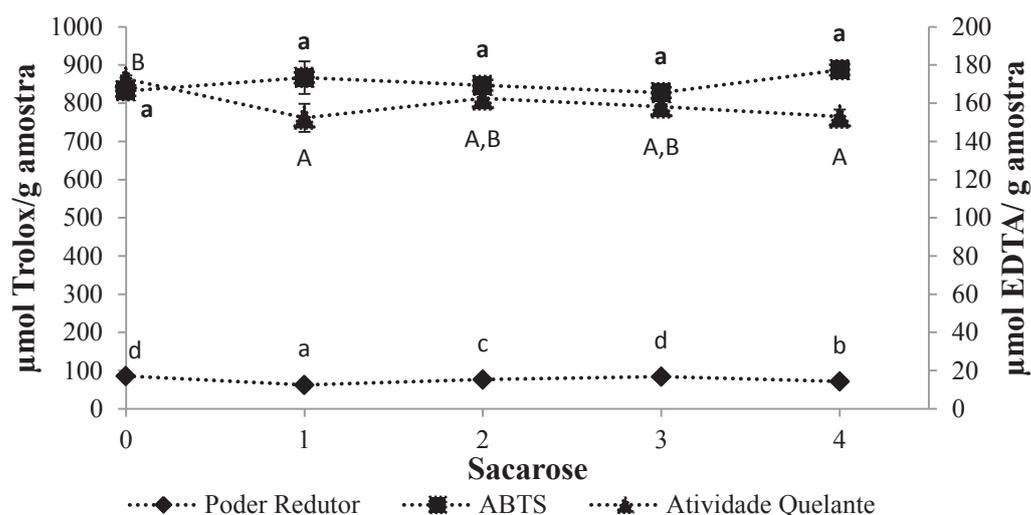
Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais (minúsculas para Poder redutor, minúsculas em negrito para ABTS e maiúsculas para Atividade Quelante) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Em relação à atividade quelante, houve diferenças nos peptídeos sem adição e adicionados de NaCl, ocorrendo perda de mais de 20% da atividade dos peptídeos com o aumento da concentração de NaCl (Figura 11). Segundo Zhu et al. (2014), esta diminuição pode ser decorrente da ruptura causada pelo elevado teor de NaCl em estruturas peptídicas

específicas e nos aminoácidos das cadeias laterais, responsáveis pela atividade quelante de íons metálicos. No entanto, como mostrado na Figura 12, a adição de 2% e 3% de sacarose não afetou a capacidade de quelar íons metálicos presentes no meio pelos peptídeos.

A presença de NaCl e da sacarose não afetaram a capacidade de inibição do radical ABTS pelos peptídeos, mantendo-se estável com a adição de até 4% dos ingredientes.

Figura 14 - Efeito da sacarose na estabilidade dos peptídeos menores que 4 kDa.



Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais (minúsculas para Poder redutor, minúsculas em negrito para ABTS e maiúsculas para Atividade Quelante) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A interação dos peptídeos frente à adição destes ingredientes gerou perfis diferentes de estabilidade, para os três métodos de atividade antioxidante utilizados. Isso é decorrente dos aminoácidos presentes nas ligações peptídicas os quais atuam de variadas formas quando adicionados destas substâncias. Porém, os resultados demonstram que os peptídeos menores que 4 kDa da microalga *Spirulina* sp. podem ser submetidos à certas condições de processamento sem que haja perda da sua funcionalidade.

4.7.2 Efeito do pH

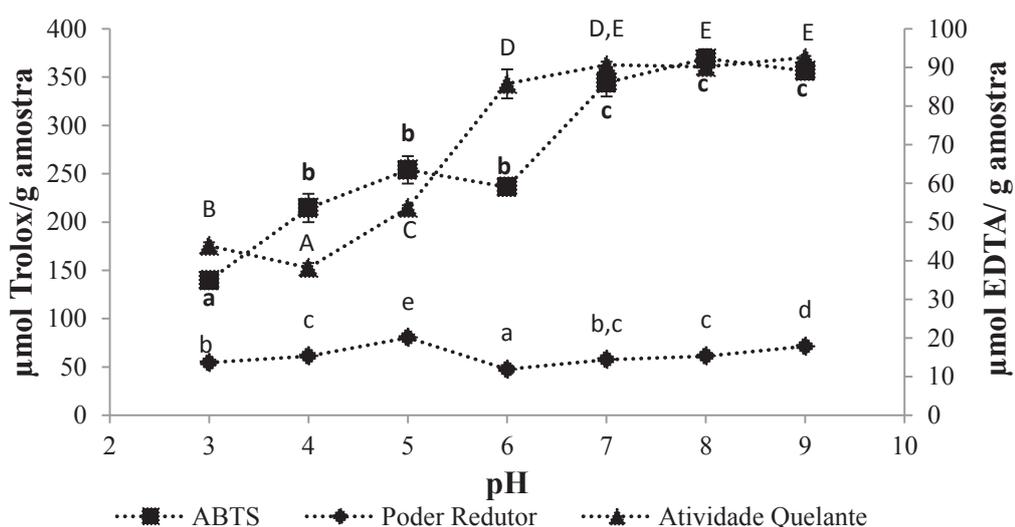
As alterações na atividade antioxidante dos peptídeos menores que 4 kDa em diferentes pH's estão apresentadas na Figura 15. A inibição do radical ABTS e a atividade quelante de metais dos peptídeos ficaram estáveis na faixa de pH entre 7 e 9. Alguns autores relatam que pHs alcalinos promovem a ionização do grupo amina de aminoácidos e peptídeos,

aumentando a liberação de H^+ e, desta forma, a ação dos radicais livres diminui, favorecendo o aumento da atividade antioxidante (HENCHOZ et al., 2007; MENDIS et al., 2005).

Em pH ácido a atividade antioxidante diminuiu para os dois métodos avaliados. De acordo com Sheng e Wang (2010), as mudanças de pH podem modificar especificamente um ou mais aminoácidos, como a glutamina e a asparagina que perdem sua funcionalidade em meio ácido.

O poder redutor dos peptídeos em diferentes faixas de pH não demonstrou uma tendência, tendo seu maior poder redutor em pH 5 (80 $\mu\text{mol TEAC/g}$). A atividade antioxidante diminuiu (61 $\mu\text{mol TEAC/g}$) nos pHs 3,4, 7 e 8, mantendo-se estável nesta faixa. Os peptídeos apresentaram menor atividade redutora em pH 6 .

Figura 15 - Efeito do pH na estabilidade dos peptídeos menores que 4 kDa.



Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais (minúsculas para Poder redutor, minúsculas em negrito para ABTS e maiúsculas para Atividade Quelante) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De um modo geral, os peptídeos menores que 4 kDa, isolados do hidrolisado da microalga *Spirulina*, apresentam capacidade antioxidante em uma ampla faixa de pH. No entanto, uma diminuição pode ser decorrente das alterações na composição de aminoácidos presente nas ligações peptídicas afetadas pelas mudanças de pH.

4.7.3 Efeito da temperatura

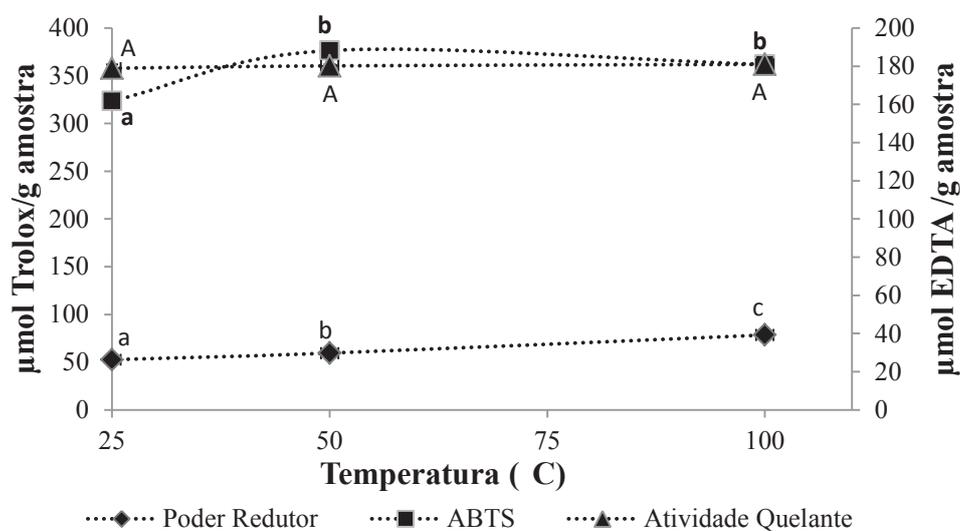
Durante o processamento de alimentos, os produtos que contêm peptídeos ou proteínas frequentemente passam por tratamentos térmicos em diferentes tempos, assim, a estabilidade

após a exposição ao calor é um pré-requisito para a sua incorporação em alimentos (KETNAWA, et al. 2016). Os peptídeos menores que 4 kDa apresentaram boa estabilidade térmica em temperaturas de 25 °C, 50 °C e 100 °C sem perda da funcionalidade nas mesmas condições, como mostrado na Figura 16.

A atividade quelante dos peptídeos manteve-se estável, sem alterações, para as três temperaturas avaliadas. Além disso, o poder redutor dos peptídeos aumentou de 52 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ em 25 °C para 78 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ em 100 °C.

O radical ABTS sofreu menor inibição pelos peptídeos na temperatura de 25 °C, aumentando nas temperaturas de 50 °C e 100 °C.. Alguns trabalhos relatam uma diminuição da atividade antioxidante com o aumento da temperatura (HOU et al., 2014; ZHI-ZHU et al., 2013) isto não aconteceu neste estudo, no entanto, está de acordo com a análise de DSC realizada em que foi demonstrado uma estabilidade térmica acima de 100 °C.

Figura 16 - Efeito da temperatura na estabilidade dos peptídeos menores que 4 kDa.



Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais (minúsculas para Poder redutor, minúsculas em negrito para ABTS e maiúsculas para Atividade Quelante) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Diante do exposto, os peptídeos < 4 kDa mantiveram suas propriedades antioxidantes após tratamento térmico até 100 °C durante 60 min, podendo ser incorporados em alimentos processados termicamente.

4.8 DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS TIPO *SNACK* ADICIONADOS DE *Spirulina*, HIDROLISADO E PEPTÍDEOS ISOLADOS.

4.8.1 Caracterização físico-química dos *snacks*

Os resultados da composição dos *snacks* estão apresentados na Tabela 4. No geral, os perfis da composição dos *snacks* produzidos foram muito semelhantes, mesmo em relação ao controle. No entanto, os peptídeos isolados apresentaram diferença ($p < 0,05$) para os teores de lipídios e proteínas.

Os *snacks* adicionados de $G > 4$ aumentaram o teor de lipídios em relação ao controle (somente *grits* de milho), isto pode ser decorrente da etapa de ultrafiltração, em que moléculas de lipídios migraram para a fração de maior peso molecular concentrando-as.

O mesmo ocorreu para os *snacks* adicionados de peptídeos menores que 4 kDa, os quais aumentaram o teor proteico em relação ao controle, mas, não apresentando diferença em relação aos outros produtos. A fração peptídica de menor peso molecular obteve uma maior concentração das moléculas de proteína e isto influenciou no aumento do teor proteico dos *snacks* adicionados desta fração.

Tabela 4 - Composição físico-química dos *snacks*.

Composição (g. 100g ⁻¹)	Controle	GS	GHD	G > 4	G < 4
Proteínas	6,31 ^a ±0,06	8,26 ^{a, b} ±0,49	7,69 ^{a, b} ±0,81	7,72 ^{a, b} ±0,52	8,71 ^b ±0,01
Lipídios	1,96 ^a ±0,26	3,15 ^{a, b} ±0,49	3,54 ^{a, b} ±0,09	3,93 ^b ±0,72	3,54 ^{a, b} ±0,05
Carboidrato*	85,03	82,35	83,01	82,55	80,18
Umidade	5,97 ^{a, b} ±0,77	5,80 ^{a, b} ±0,08	5,37 ^a ±0,13	5,67 ^{a, b} ±0,17	6,41 ^b ±0,12
Cinza	0,27 ^a ±0,03	0,47 ^a ±0,06	0,48 ^a ±0,11	0,44 ^a ±0,10	0,93 ^a ±0,70

GS: *grits* + *spirulina*; GHD: *grits* + hidrolisado; G > 4: *grits* + fração > 4 kDa; G < 4: *grits* + fração < 4 kDa. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

*Resultado obtido por diferença.

A quantidade de umidade presente no *snack* com adição da fração < 4 kDa foi maior em relação ao *snack* adicionado de hidrolisado, mas não diferenciando dos demais. Os *snacks* produzidos estão de acordo com conteúdo de umidade estabelecido para este tipo de alimento

que é de até 6 g. 100g⁻¹. Quanto ao teor de cinzas, os *snacks* não apresentaram diferença significativa.

4.8.2 Textura e Cor

De acordo com Paula e Conti-Silva (2014), os testes instrumentais e sensoriais são correlacionados, pois as forças instrumentais derivadas dos testes de corte apresentam correlação com a análise sensorial, utilizando um painel treinado, para o *snack* com o mesmo formato (cilíndrico) que o realizado neste estudo. Desta forma, o teste de corte utilizando o formato de “V” foi o escolhido para avaliar a dureza e fraturabilidade dos *snacks* com adição de *Spirulina* não hidrolisada, com o hidrolisado e as frações peptídicas. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

A dureza representa a força aplicada pelos dentes molares para comprimir os alimentos e a fraturabilidade é a capacidade de quebrar o alimento, quando mordido, usando os incisivos. No geral, *snacks* com formato cilíndrico apresentam maiores valores para dureza e fraturabilidade em comparação aos *snacks* com outros formatos (PAULA e CONTI-SILVA, 2014). Sendo assim, no presente estudo, a resistência à ruptura dos produtos variou de 5,69 N a 16,82 N.

Diante dos resultados de textura dos *snacks* produzidos, observou-se um aumento nos parâmetros de fraturabilidade e dureza para os adicionados da fração peptídica < 4 kDa na mesma proporção (2%) que os demais produtos adicionados comparando com o controle.

Este resultado indica que a adição dos peptídeos de menor peso molecular fez aumentar a resistência do produto em relação à fratura ou quebra do mesmo, tendo coerência com o resultado para a dureza. Geralmente produtos com alta fraturabilidade, possuem alto grau de dureza. A fraturabilidade ainda está relacionada com a crocância do produto (ANTON e LUCIANO, 2007).

Esta elevada força comparada aos outros produtos pode ser decorrente de maiores interações proveniente das ligações peptídicas, ocasionando uma estrutura mais compacta e menor expansão do produto, observado também na Figura 15. Jeyakumari et al. (2016), ao adicionar camarão hidrolisado em extrusados, observaram que quanto maior a concentração adicionada (maior teor proteico), mais elevadas eram as forças necessárias para a quebra do produto.

Os parâmetros de coloração dos *snacks* estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Análises de textura e cor dos *Snacks* produzidos.

	Controle	GS	GHD	G > 4	G < 4
Fraturabilidade**	5,69 ^a ± 0,19	8,24 ^{ab} ± 0,03	8,07 ^{ab} ± 0,02	9,15 ^b ± 0,43	15,02 ^c ± 0,47
Dureza**	6,25 ^a ± 0,32	8,40 ^a ± 0,16	8,93 ^a ± 0,28	6,62 ^a ± 0,15	16,82 ^b ± 0,97
L*	81,45 ^d ± 0,46	62,88 ^a ± 1,37	67,22 ^b ± 1,01	66,76 ^b ± 1,13	72,92 ^c ± 0,11
a*	4,34 ^c ± 0,29	-0,85 ^a ± 0,25	0,80 ^b ± 0,34	0,48 ^b ± 0,31	0,72 ^b ± 0,31
b*	45,19 ^d ± 1,29	25,92 ^a ± 0,06	30,69 ^b ± 0,29	31,07 ^b ± 0,32	35,08 ^c ± 0,07

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

GS: *grits* + *spirulina*; GHD: *grits* + hidrolisado; G > 4: *grits* + fração > 4 kDa; G < 4: *grits* + fração < 4 kDa

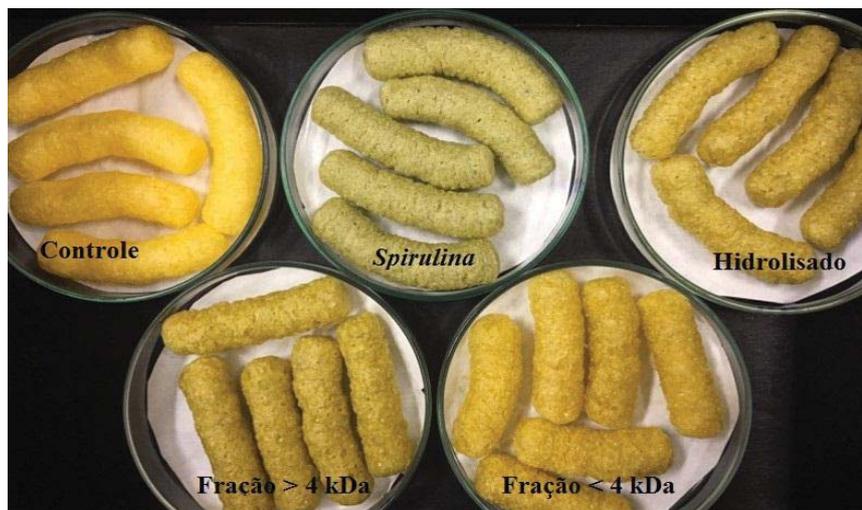
L* = luminosidade; a* e b* = coordenadas cromáticas (+a* = vermelho; - a* = verde; +b* = amarelo; -b* = azul

**Resultados expressos em Newtons (N)

Os resultados de luminosidade dos produtos (L*) apresentaram diferença (p < 0,05) do controle (somente *grits*). Os resultados mostram que os *snacks* perdem luminosidade quando adicionado a *Spirulina* sem hidrolisar (p < 0,05), decorrente da coloração mais escura, característica da microalga, no entanto, nos demais produtos, este parâmetro volta a aumentar novamente. Os *snacks* adicionados da fração < 4 kDa apresentaram diferença em relação aos outros produtos, tendendo a se aproximar a do produto controle. Estas diferenças são devido as diferentes tonalidades que os produtos apresentam.

Ainda, com a adição da *Spirulina* a coloração tende ao verde (Figura 17), verificado através do parâmetro a*. Isto demonstra que as características de cor da matéria-prima não foram afetadas com o processo de extrusão, preservando a coloração original da microalga. Os demais produtos apresentaram uma diminuição da tonalidade de verde, isto é proveniente da hidrólise em que a coloração é um dos parâmetros afetados. Com o processo de hidrólise enzimática há uma diminuição da tonalidade verde presente na biomassa integral e essa coloração permanece nas frações peptídicas, ficando os resultados entre 0,48 a 0,80.

Figura 17 - *Snacks* produzidos adicionados de *Spirulina*, hidrolisado e frações peptídicas.



Fonte: próprio autor (2017).

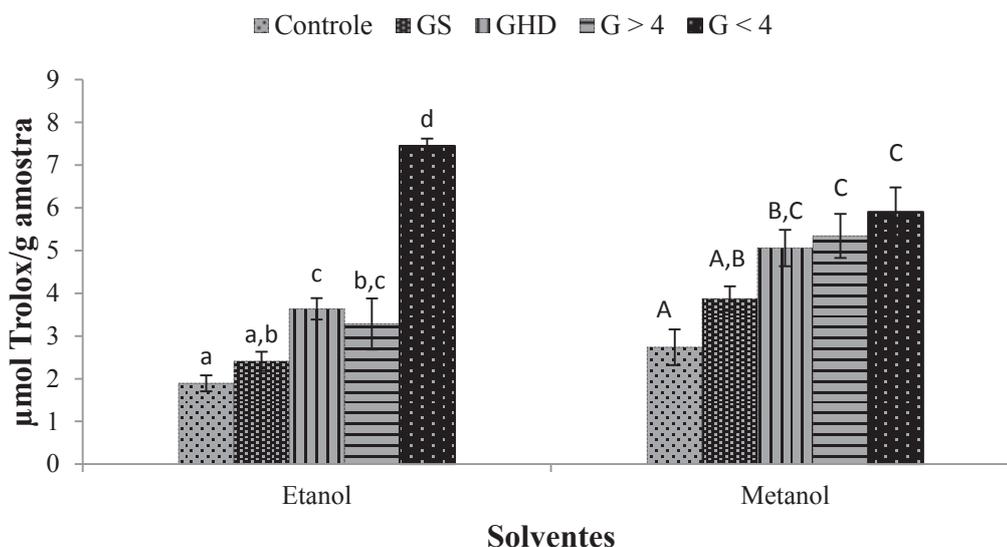
O parâmetro b^* demonstra se a adição de 2% dos produtos alterou a coloração original do controle (amarelo). Os resultados mostram a perda desta coloração em todos os outros *snacks*. A adição da *Spirulina* foi o menor resultado de tendência ao amarelo. A adição do hidrolisado e a fração > 4 kDa não apresentaram diferença neste parâmetro, no entanto, a coloração amarela aumentou. Já na fração < 4 kDa, foi a que apresentou o segundo maior resultado, depois do controle, para a coloração amarela. Este resultado é decorrente da etapa de ultrafiltração, em que alguns pigmentos presentes no hidrolisado ficaram retidos na membrana, não passando para a fração de menor peso molecular.

O perfil de coloração dos *snacks* adicionados de 2% da *Spirulina*, hidrolisado e das frações peptídicas tiveram colorações diferentes do controle, apresentando algumas tendências.

4.8.3 Atividade antioxidante dos *snacks*

Os *snacks* adicionados de *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas foram avaliados em relação ao controle (*grits* de milho extrusado) quanto à capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS e poder redutor. Os resultados estão apresentados nas Figuras 16 e 17.

A adição do hidrolisado em *snack* de milho aumentou o potencial em inibir o radical livre ABTS ($p < 0,05$) de 1,89 para 3,63 $\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$ amostra utilizando o solvente etanol e de 2,73 para 5,05 $\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$ amostra utilizando o solvente metanol (Figura 18).

Figura 18 - Atividade antioxidante dos *snacks* pelo método de ABTS.

GS: *grits* + *spirulina*; GHD: *grits* + hidrolisado; G > 4: *grits* + fração > 4 kDa; G < 4: *grits* + fração < 4 kDa
 Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Letras iguais (minúsculas para o solvente Etanol e maiúsculas para o solvente Metanol) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados similares foram relatados por Segura-Campos et al. (2014) que ao adicionarem hidrolisado de feijão (10% p/p) em massa extrusada, os valores de TEAC aumentaram em comparação a adição de feijão não hidrolisado. Assim, hidrolisados proteicos podem ser incorporados em alimentos para aumentar a sua funcionalidade.

A adição de *Spirulina* integral na concentração de 2% não apresentou diferença do controle. Alguns trabalhos relatam o aumento da bioatividade no alimento decorrente da adição da microalga (DE MARCO et al., 2014; ZOUARI et al., 2011) isso não foi verificado neste estudo. Isto pode ser decorrente dos solventes utilizados não extraírem compostos como a ficocianina, a qual é solúvel em água, também responsável pelo poder antioxidante da microalga. No entanto, a bioatividade no alimento poderia ser aumentada com a adição de uma maior concentração de biomassa, também relatado nesses estudos.

Ainda, para os dois sistemas de extração, os *snacks* adicionados de hidrolisado e da fração > 4 kDa não apresentaram diferença significativa entre si.

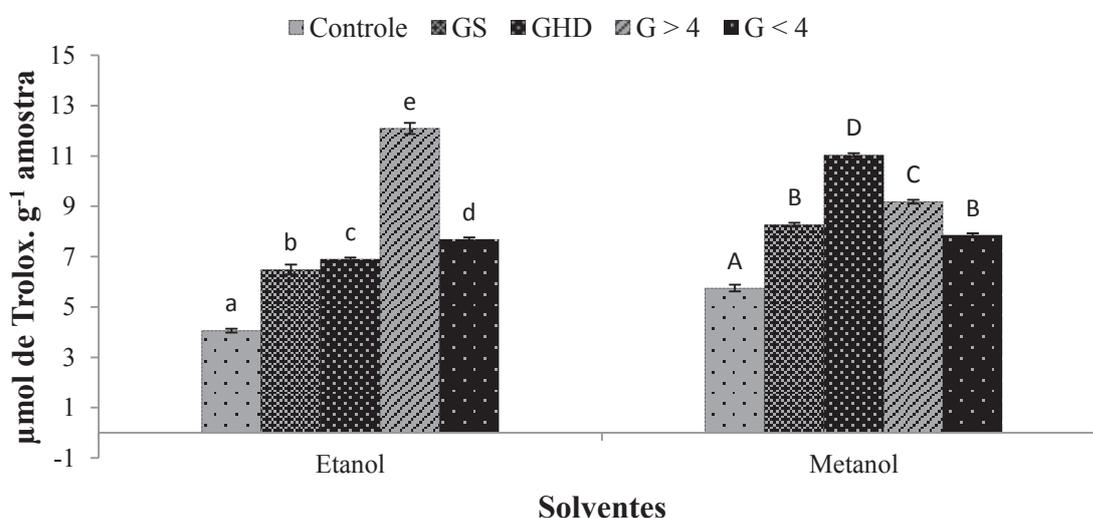
Dentre os *snacks* produzidos, o G < 4 foi o que apresentou maior capacidade em inibir o radical ABTS ($7,45 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$) utilizando o etanol como solvente de extração. Este resultado permite avaliar que aminoácidos, presentes nas ligações peptídicas com menor polaridade, possuem poder antioxidante e fornecem, utilizando-se da mesma proporção que a matéria-prima, maior acesso a essa funcionalidade. Ainda, segundo Aliaga e Lissi (2000), quando se utiliza de uma análise de inibição, a acessibilidade ao sistema oxidação-antioxidante é maior em peptídeos menores e aminoácidos do que em peptídeos maiores e

proteínas, sugerindo que a bioatividade em inibir radicais livres, presente no hidrolisado, provém dos peptídeos de menor peso molecular.

O perfil do poder de redução dos *snacks* (Figura 19) também demonstrou comportamentos diferentes para os dois sistemas de extração. Os *snacks* adicionados da microalga *Spirulina* aumentaram a capacidade antioxidante de 4,08 $\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$ amostra para 6,48 $\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$ amostra. Este resultado indica que a o poder de redução da microalga *Spirulina* provém de compostos menos polares como compostos fenólicos e carotenoides, os quais exibem atividade antioxidante. No entanto, para a extração com metanol, a adição da *Spirulina* não apresentou diferença do *snack* $G < 4$ kDa., isto se deve ao fato da interação do composto redutor com a matriz alimentícia, tornando-se um sistema complexo de atividade oxi-redução e favorecendo a extração de compostos redutores de maior afinidade pelo solvente.

Mesmo assim, todos os *snacks* adicionados dos produtos apresentaram maior atividade em reduzir espécies oxidativas em relação à amostra sem adição (*grits* de milho).

Figura 19 - Atividade antioxidante dos *snacks* pelo método de Poder Redutor.



GS: *grits* + *spirulina*; GHD: *grits* + hidrolisado; G > 4: *grits* + fração > 4 kDa; G < 4: *grits* + fração < 4 kDa
Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Letras iguais (minúsculas para o solvente Etanol e maiúsculas para o solvente Metanol) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O *snack* adicionado da fração > 4 kDa teve um aumento significativo no poder redutor ($12 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$) em comparação ao *snack* controle ($4 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$) e aos outros produtos quando extraído com solvente etanol. Peptídeos de maior peso molecular foram os responsáveis pelo poder redutor do hidrolisado da *Spirulina*, como demonstrado nas análises

anteriores, e esta atividade apresentou o mesmo comportamento quando adicionado no alimento.

Até onde se sabe, não há relatos na literatura da adição de peptídeos em alimentos extrusados e suas interações de estrutura peptídica com a matriz alimentícia podem ser muito específicas, tornando difícil a comparação com outros trabalhos. Porém, estes resultados indicam que a adição de peptídeos isolados fornece maior atividade antioxidante ao produto extrusado através da inibição de radicais livres e como doadores de elétrons.

Assim, este estudo teve o intuito de apresentar os perfis de capacidade antioxidante dos *snacks* produzidos adicionados destes produtos, demonstrando que peptídeos podem ser incorporados em alimentos melhorando sua funcionalidade.

5 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que uma maior capacidade antioxidante da *Spirulina* sp. é alcançada quando na forma de peptídeos isolados, apresentando propriedades antioxidantes distintas. Peptídeos de menor peso molecular apresentaram maior atividade em inibir radicais livres e quelar íons metálicos, já os de maior peso molecular apresentaram melhor poder redutor. O mesmo perfil foi verificado quando adicionadas nos *snacks*, em que a adição de 2% das frações peptídicas fez aumentar o poder de inibição do radical ABTS e poder redutor dos *snacks* em relação ao controle (sem adição), evidenciando a relação do peso molecular com a bioatividade envolvida.

Entretanto, os *snacks* adicionados dos peptídeos bioativos < 4 kDa apresentaram altos valores para a fraturabilidade e dureza. Quanto à coloração, a cor amarela, característica de *snack* de milho, tende a ficar próxima do controle com a adição dos peptídeos de menor peso molecular.

A microalga *Spirulina* sp. apresenta vantagem por não necessitar do isolamento de sua proteína como fonte de obtenção de peptídeos bioativos. Ainda, a estabilidade térmica dos peptídeos obtidos aumentou em relação à matéria-prima, sendo capaz de ter maior resistência a processamentos com temperaturas mais elevadas.

Mais pesquisas precisam ser realizadas na investigação da composição de aminoácidos que envolvem as propriedades apresentadas, no entanto, com base nos resultados apresentados sugere-se que os peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* sp. podem ser usados como antioxidantes naturais para aplicação no desenvolvimento de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJIBOLA, C. F.; FASHAKIN, J. B.; FAGBEMI, T. N.; ALUKO, R. E. Effect of Peptide Size on Antioxidant Properties of African Yam Bean Seed (*Sphenostylis stenocarpa*) Protein Hydrolysate Fractions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 10, p. 6685-6702, 2011.
- AK, B., AVŞAROĞLU, E., İŞIK, O., ÖZYURT, G., KAFKAS, E., ETYEMEZ, M. USLU, L. Nutritional and physicochemical characteristics of bread enriched with microalgae *Spirulina platensis*. **International Journal of Engineering Research and Application**, v. 6, n. 12, p. 30-38, 2016.
- ALEMÁN, A.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 407–413, 2011.
- ALIAGA, C.; LISSI, E. A. Reactions of the radical cation derived from 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS*+) with amino acids. Kinetics and mechanism. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 1052-1059, 2000.
- ALVES, C. R.; VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. *Spirulina* como fonte proteica na recuperação de ratos desnutridos: efeitos sobre o músculo esquelético. **Revista Digital Buenos Aires**, v. 10, n.86, 2005.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; PATSALIDES, E. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.
- ANTON, A. A.; LUCIANO, F. B. Instrumental texture evaluation of extruded snack foods: a review evaluación instrumental de textura en alimentos extruidos: una revisión. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, n. 4, p. 245-251, 2007.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 115- 123, 2008.
- ARIAS-MOSCOSO, J. L.; MALDONADO-ARCE, A.; ROUZAUD-SANDEZ, O.; MÁRQUEZ-RÍOS, E.; TORRES-ARREOLA, W.; SANTACRUZ-ORTEGA, H.; GRAXIOLA-CORTÉS, M. G.; EZQUERRA-BRAUER, J. M. Physicochemical Characterization of Protein Hydrolysates Produced by Autolysis of Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) Byproducts. **Food Biophysics**, v. 10, p. 145-154, 2014.

- ARIHARA, K.; NAKASHIMA, Y.; MUKAI, T.; ISHIKAWA, S.; ITOH, M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. **Meat Science**, v.57, n.3, p. 319–324, 2001.
- ASCHERI, D. P. R.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 897-905, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18. Ed. Washington: AOAC, 2005.
- AZLAN, A.; PRASAD, K. N.; KHOO, H. E.; ABDUL-AZIZ, N.; MOHAMAD, A.; ISMAIL, A. Comparison of fatty acids, vitamin E and physicochemical properties of Canarium odontophyllum Miq. (dabai), olive, and palm oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 772–776, 2010.
- BABADZHANOV, A.S.; ABDUSAMATOVA, N.; YUSUPOVA, F.M.; FAIZULLAEVA, N.; MEZHLYMYAN, L. G.; MALIKOVA, M. K. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 3, p. 276-279, 2004.
- BAMDAD, F.; WU, J.; CHEN, L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p. 20-28, 2011.
- BARZIDEH, Z.; LATIFF, A. A.; GAN, C. Y.; ABEDIN, M. Z.; ALIAS, A. K. ACE inhibitory and antioxidant activities of collagen hydrolysates from the ribbon jellyfish (*Chrysaora sp.*). **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 495–504, 2014.
- BERKER, K. I.; GUCLU, K.; TOR, I.; APAK, R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. **Talanta**, v. 72, p. 1157-1165, 2007.
- BELAY, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): production and quality assurance. **Food Additive**. Published by InTech, 2012. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/28916.pdf>. Acesso em 30/09/2015.
- BETANCUR-ANCONA, D.; SOSA-ESPINOZA, T.; RUIZ-RUIZ, J.; SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRETO, L. 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 and Technology**, v.49, n. 1, p. 2-8, 2014.

BISHARAT, G.I.; LAZOU, A.E.; PANAGIOTOU, N.M.; KROKIDA, M.K.; AROULIS, Z.B. Antioxidant potential and quality characteristics of vegetable-enriched cornbased extruded snacks. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, p. 3986–4000, 2014.

BYUN, H. G.; LEE, J. K.; PARK, H. G.; JEON, J. K.; Kim, S. K. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. **Process Biochemistry**, v. 44, n.8, p. 842–846, 2009.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S.M.; DE MORAIS, D.R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. Editora Arris, 1º edição, Curitiba, Appris, 2015.

BOSCH, V.; CILLA, A.; GARCIA-LLATAS, G.; GILABERT, V.; BOIX, R.; ALEGRIA, A. Kinetics of ascorbic acid degradation in fruit-based infant foods during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 298–303, 2013.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; LAILA, M.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of *sardinelle* (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, 118, 559–565, 2010.

BUTYLINA, S.; LUQUE, S.; NYSTRÖM, M. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration, **Journal Membrane Science**, v. 280, n. 1, p. 418-426, 2006.

CAMIRE, M. E., DOUGHERTY, M. P., & BRIGGS, J. L. Functionality of fruit powders in extruded corn breakfast cereals. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 765-770, 2007.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 284-295, 2015.

CASTEL, V.; ANDRICH, O.; NETTO, F. M.; SANTIAGO, L. G.; CARRARA, C. R. Comparison between isoelectric precipitation and ultrafiltration processes to obtain *Amaranthus mantegazzianus* protein concentrates at pilot plant scale. **Journal of Food Engineering**, v. 112, p. 288-295, 2012.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their Generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v.74, p. 185-198, 2015.

CENTENARO, G.S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M.L., PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2877–2893, 2014.

ÇELEKLI, A.; BOZKURT, H. Bio-sorption of cadmium and nickel ions using *Spirulina platensis*: Kinetic and equilibrium studies. **Desalination**, v. 275, p. 141-147, 2011.

CHEN , H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 49–53, 1998.

CHEN, G.T.; ZHAO, L. Y.; CONG, T.; BAO, S. F. *In vitro* study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. **Journal of the Science and Food Agricultural**, v. 87, p. 357–362, 2007.

CHU, W. L.; LIM, Y.W.; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P. E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 254-262, 2000.

COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas. **Vetor**, v. 12, p.61-78, 2002.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, Michele Greque de.; Miranda, M. Z. . Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-química, sensorial e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição (UNESP)**, v. 17, p. 333-340, 2006.

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

DECKER, E. A., WELCH, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 674-677, 1990.

DE OLIVEIRA, C. A.; CAMPOS, A. A. O. ; RIBEIRO, S. M. R.; OLIVEIRA, W. C.; DO NASCIMENTO, A. G. Potencial nutricional, funcional e terapêutico da cianobactéria *Spirulina*. Nutritional, functional and therapeutic potential of cyanobacterium *Spirulina*. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição**, v.1, p. 52-59, 2013.

DEHGHAN-SHOAR, Z., HARDACRE, A. K., & BRENNAN, C. S. The physico-chemical characteristics of extruded snacks enriched with tomato lycopene. **Food Chemistry**, v.123, n. 4, p. 1117-1122, 2010.

DEKKERS, E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G.; MARSHALL, M. R. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 640–645, 2011.

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

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, n. 36, v. 6, p. 1959-1967, 2006

DIAZ, M.; DECKER, E. A. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.8208–8213, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DONG, Y.; QI, G.; YANG, Z.; WANG, H.; WANG, S.; CHEN, G. Preparation, Separation and Antioxidant Properties of Hydrolysates Derived from *Grifola frondosa* Protein. **Food Chemistry and Safety**, v. 33, p. 500-506, 2015.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.

EMBRAPA. Extrusão de alimentos. **Ageitec** – Agência Embrapa de Informação tecnológica. Disponível em:

http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5s gie02wyiv80z4s473wy7guo3.html. Acesso em: 14/10/2015.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, n. 10, p. 643–654, 2008.

ESTRADA, J. E.; BESCO'S, P. B.; DEL FRENO, A.M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II FARMACO**, v 56, p. 497-500, 2001.

ESPITIA, P. J.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, p. 187-204, 2012.

FANG, L.; ZHOU, C.; CAI, P.; CHEN, W.; RONG, X.; DAI, K.; LIANG, W.; GU, J. D.; HUANG, Q. Binding characteristics of copper and cadmium by cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 810-815, 2011.

FERNANDES, A. F. **Utilização de concentrado e isolado proteico de soro lácteo na extrusão de alimentos**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2011.

FIGUEIRA, F. S. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 4, p. 308-316, 2011.

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

KELFALA-FOH, M. B.; AMADOU, I.; FOH, B. M.; KAMARA, M. T.; XIA, W. functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p. 1851–1869, 2010.

GAI, C.; LIU, Z.; HAN, G.; PENG, N.; FAN, A. Combustion behavior and kinetics of low-lipid microalgae via thermogravimetric analysis. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 148–154, 2015.

GAUTAM, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of β -carotene-rich vegetables on the bioaccessibility of zinc and iron from food grains. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 668–672, 2010.

GILL P, MOGHADAM.; T.T, RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, p. 167-193, 2010.

GIRGIH A. T.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. In vitro antioxidant properties of hemp seed protein hydrolysate fractions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.88 p. 381–389, 2011.

GOUVEIA, L.; COUTINHO, C.; MEDONÇA, E.; BATISTA, A. P.; SOUSA, I.; BANDARRA, N. M.; RAYMUNDO, A. Sweet biscuits with *Isochrysis galbana* microalga biomass as a functional ingredient. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 891–896, 2008.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A. E.; SOUSA, J. M.; MOURA, P.; BANDARA, N. M. Microalgae a source of natural bioactive molecules as functional ingredients. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, p. 21–37, 2010.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292-302, 2010.

HAGEN, H.; SANDNES, K. Process for improvement of meat quality in fish, protein hydrolysate and method of producing a protein hydrolysate. **International Patent**, 2004.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2 p. 231-55, 2004.

HAMID A. A.; AIYELAAGBE O. O.; USMAN, L. A.; AMEEN, O. M.; LAWAL, A. Antioxidants: its medicinal and pharmacological applications. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, n. 8, p.142-151, 2010.

HEBERT, E.; SAAVEDRA, L.; FERRANTI, P. Bioactive peptides derived from casein and whey proteins. **Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications**, p. 233–249, 2010.

HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, p. 289–297, 2013.

HENCHOZ, Y.; SCHAPPLER, J.; GEISER, L.; PRAT, J.; CARRUPT, P. A.; VEUTHEY, J. L. Rapid determination of pKa values of 20 amino acids by CZE with UV and capacitively coupled contactless conductivity detections. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1869–1878, 2007.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina* super alimento del future**. Barcelona: Ediciones S. A. Urano, p. 222, 1994.

HOOK, V. Y. H.; BURTON, D. S.; YASOTHORNSRIKUL, R. H.; HASTINGS, L. J. Deftos Proteolysis of ProPTHrP (1–141) by “Prohormone Thiol Protease” at multibasic residues generates PTHrP-related peptides: Implications for PTHrP peptide production in lung cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 932–938, 2001.

HOU, Y.; ZHOU, J.; LIU, W.; CHENG, Y.; WU, L.; YANG, G. Preparation and Characterization of Antioxidant Peptides from Fermented Goat Placenta. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, n. 6, p. 769-776, 2014.

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

HUANG, S. J.; MAU, J.L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. **Food Science Technology**. V. 39, P. 707–716, 2006.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HU, C. C.; HSIAO, C. H.; HUANG, S.Y.; FU, S. H.; LAI, C. C.; HONG, T.M. Antioxidant activity of fermented soybean extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 18, p. 5735–5739, 2004.

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

JE, J. Y.; QIAN, Z. J.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p 840–846, 2007.

JE, J. Y.; KIM, S.Y.; KIM, S.K. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 157–162, 2005

JEYAKUMARI, A.; DAS, M. S. R.; BINDU, J.; JOSHY, C. G.; ZYNUDHEEN, A. A. Optimisation and comparative study on the addition of shrimp protein hydrolysate and shrimp powder on physicochemical properties of extruded snack. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p.1578–1585, 2016.

JIA, J.; MAA, H.; ZHAO, W.; WANG, Z.; TIAN, W.; LUO, L. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. **Food Chemistry**, v. 119, p. 336–342, 2010.

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

KHAIRALLAH, M.G., HETTIARACHCHY, N.S., RAYAPROLU, S. J. Stability and quality of a bioactive peptide fraction incorporated orange juice. **Food Science and Technology**, v. 66, p. 523-529, 2015.

KANNAN, A.; HETTIARACHCHY, N.S.; LAY, J.O.; LIYANAGE, R. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. **Peptides**, v. 31, n. 9, p. 1629–1634, 2010.

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

KOU, X.; GAO, J.; XUE, Z.; ZHANG, Z.; WANG, H.; WANG, X. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 591–598, 2013.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advanced**, v. 17, p. 561–594, 1999.

LI, X. X.; HAN, L. J.; CHEN, L. J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 88, p.1660–1666, 2008(a).

LI, Y. H.; JIANG, B.; ZHANG, T.; MU, W.; LIU, J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). **Food Chemistry**, v.106, p. 444–450, 2008(b).

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P. COSTA, J. A. V. Utilisation Of Spirulinasp. And Chlorellapyrenoidosa Biomass For The Production of Enzymatic Protein Hydrolysates. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n.5, p. 29-38, 2014.

LIU, Y.; HSIEH, F.; HEYMANN, H.; HUFF, H. E. Effect of process conditions on the physical and sensory properties of extruded oat-corn puff. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1253-1259, 2000.

LOBATO, L. P.; ANIBAL, D.; LAZARETTI, M. M.; GROSSMANN, M.V. E. Extruded puffed functional ingredient with oat bran and soy flour. **Food Science and Tecnology**, v. 44, n. 4, p. 933-939, 2011.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S. H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutrition Research**, v. 21, n. 1-2, p. 295-307, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin-phenol reagent, **Journal of Biochemistry Engineering**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. **Marine Biotechnology**, 2007.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, 2014.

MCCANN, K. B.; SHIELL, B. J.; MICHALSKI, W. P.; LEE, A.; WAN, J.; ROGINSKI, H. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine aS1-casein. **International Dairy Journal**, 2006.

MENDIS, E., RAJAPAKSE, N., BYUNB, H.G., KIM, S.K. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences**, v. 77, p. 2166-2178, 2005.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical**, 2003.

MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1973–1977, 2008.

MENSOR, L.I.; MENEZES, F.S.; LEITAO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.; COUBE, C.S.; LEITAO, S.G., Screening of Brazilian plants extracts for antioxidants activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físicoquímicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição Araraquara (UNESP)**, v. 17, p. 333-340, 2006.

MOTOI, H.; KODAMA, T. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. **Nahrung**, v. 47, n. 5, p. 354–358, 2003.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

MOURA, L. S. M.; ASCHERI, J. L. R. Efeitos das variáveis de extrusão sobre propriedades de pasta de farinhas mistas pré-gelatinizadas de arroz (*Oryza sativae*, l.), feijão (*Phaseolus vulgaris* l.) e milho (*Zea mays* l.). **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 24, n. 1, p.101-113, 2013.

MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7600–7608, 2005.

NAGASAWA, T.; YONEKURA, T.; NISHIZAWA, N.; KITTS, D. D. In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 225, p. 29–34, 2001.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, p. 178 – 185, 2012.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolsate. **Journal of Functional Foods**, v.9, p.280–289, 2014.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; SHAHIDI, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1354-1362, 2011.

NARVA, M.; HALLEN, J.; VAANEN, K.; Korpela, R. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on bone cells in vitro. **Life Sciences**, v.75, n.14, p.1727–1734, 2004.

NASCIMENTO, R.J.; ARAÚJO, C.R.; MELO, E.A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava L.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

NGO, D.; WIJESEKARA, I.; VO, T.; TA, Q.; KIM, S. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: an overview. **Food Research International**, v. 44, p. 523–529, 2011.

NGOH, Y.Y.; GAN, C.Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidant and -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). **Food Chemistry**, v. 190, p. 331–337, 2015.

NI, X.; YUE, L.; CHI, Z.; LI, J.; WANG, X.; MADZAK, C. Alkaline Protease Gene Cloning from the Yeast *Aureobasidium pullulans* HN2-3 and the Protease Surface Display on *Yarrowia lipolytica* for Bioactive Peptide Production. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 81-89, 2009.

NIMALARATNE, C.; BANDARA, N.; WU, J. Purification and characterization of antioxidante peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. **Food Chemistry**, v.188, p. 467-472, 2015.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidant isolated from eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 33, p. 770–780, 1985.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v.44, p.307–315, 1986.

PAEK, P.; JUNG, J. W. K.; NAM, K. S.; SHAHIOLI, F.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidant peptides from lecithin-free egg yolk protein. **Journal of American Oil Chemistry Society**, p. 651–656, 2001.

PAGNUSSATT, F. A.; SPIER, F.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J.A.V, GUTKOSKI, L. C. Technological and nutritional assessment of dry pasta with oatmeal and the microalga *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Food Technhology**, v. 17, n. 4, p. 296-304, 2014.

PARRIS, N.; MOREAU, R. A.; JOHNSTON, D. B.; DICKEY, L. C.; ALUKO, R. E. Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from commercial wet- and dry-milled corn germ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2620–2623, 2008.

PAULA, A. M.; CONTI-SILVA, A. C. Texture profile and correlation between sensory and instrumental analyses on extruded snacks. **Journal of Food Engineering**, v. 121, p. 9-14, 2014.

PEÑA-RAMOS E.A.; XIONG Y. L. Antioxidant activity of soy protein hydrolyzates in a liposomal system. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2952–2956, 2002.

PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. **Meat Science**, v.64, p. 259–263, 2003.

PERSSON, T.; POPESCU, B.O.; CEDAZO – MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. **Ministério da saúde, 2014**. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv91110.pdf> Acesso em: 24/09/2015.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**. v. 16, n. 11, p. 1306-1314, 2006.

POKORNÝ, J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 8, p. 883, 2007.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S. F.; GROLEAU, P. E. Membrane-based fractionation and purification strategies for bioactive peptides. In: Mine, Y.; SHAHIDI, F. **Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Diseases**, p. 639-658, 2006.

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

PRIYANKA, M.; KEMPANNA, C.; AMAN, P. Quality characteristics of ice cream enriched with *Spirulina* powder. **International Journal of Food and Nutritional Sciences**, v.2, p. 44–50, 2013.

QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresource Technology**, v.99, p.1690–1698, 2008.

RANATHUNGA, S.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S.K. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*) European. **Food Research and Technology**, v. 222, p. 310–315, 2006.

RAO M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALLA, A; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REVILLA, E.; MARIA, C.S.; MIRAMONTES, E.; BAUTISTA, J.; GARCÍA-MARTINEZ, A.; CREMADES, O. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. **Food Research International**, v. 42, p. 387–393, 2009.

RIAZ, M., ASIF, M., & ALI, R. Stability of vitamins during extrusion. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 4, p. 361-368, 2009.

ROBLET, C.; AMIOT, J.; LAVIGNE, C.; MARETTE, A.; LESSARD, M.; JEAN, J.; RAMASSAMY, C.; MORESOLI, C.; BAZINET, L. Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. **Food Research International**, v.46, p. 237–49, 2012.

RODRIGUÉZ DE MARCO, E.; STEFOLLANI, M.; MARTÍNEZ, C. S.; LEÓN, A. E. Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. **Food Science and Technology**, v. 58, p. 102–108, 2014.

ROMAN, J. A., SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 468, 2005.

SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; HAMID, A. A.; MOHD, H. Recent advances in food Biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 80-116, 2014.

SABEENA, F. K. H.; BARON, C. P.; NIELSEN, N. S.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1. In vitro assays and evaluation in x-3 enriched milk. **Food Chemistry**, v.123, p. 1081–1089, 2010.

SAIGA, A.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3661–3667, 2003.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. **Food Chemistry**, v. 95, p. 243–249, 2006.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 3, n. 10, p. 1949-1956, 2010.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **Journal AOAC International**, v. 91, n. 4, p. 914-931, 2008.

SEGURA-CAMPOS, M. R.; GARCÍA-RODRIGUEZ, K.; RUIZ-RUIZ, J. C.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. In vitro bioactivity, nutritional and sensory properties of semolina pasta added with hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 8C, P. 1-8, 2014.

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

SHENG J.; WANG, H. Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice. **Food Research International**, v. 43, p. 902–906, 2010.

SMITH, J; HONG-SHUM, L. Food additives databook. **Blackwell Publishing**, 2011.

STEEL, C. J; LEORO, M. G. V; SCHMIELE, M; FERREIRA, R. E; CHANG, Y. K. Thermoplastic Extrusion in Food Processing. **Thermoplastic Elastomers**, InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/thermoplasticelastomers/thermoplastic-extrusion-in-food-processing>.

STOOKEY, L. L. Ferrozine – A new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 779-781, 1970.

SUN, J.; HE, H.; XIE, B. J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6646–6652, 2004.

TING, B. P. C. P.; MINE, Y.; JUNEJA, L. R.; OKUBO, T.; GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Comparative Composition and Antioxidant Activity of Peptide Fractions Obtained by Ultrafiltration of Egg Yolk Protein Enzymatic Hydrolysates. **Membranes**, v. 1, p. 149-161, 2011.

TRIVEDI, M. K.; BRANTON, A.; TRIVEDI, D.; NAYAK, G.; SINGH, R.; JANA, S. Physical Spectroscopic and Thermal Characterization of Biofield Treated Fish Peptone. **European Journal of Biophysics**, v. 3, n. 6, p. 51-58, 2015.

UEDA, E.; GOUT, P.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ionprotein binding. **Journal of Chromatography A**, v. 988, p. 1-23, 2003.

URISTA, M. C.; FERNÁNDEZ, A. R.; RODRÍGUEZ, R. F.; CUENCA, A. A.; JURADO, T. A. Review: Production and Functionality of Active Peptides from Milk. **Food Science and Technology International**, v. 17, n.4, p. 293-317, 2011.

VALKON, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VERONICA, A. O.; OLUSOLA, O. O.; ADEBOWALE, E. A. Qualities of extruded puffed snacks from maize/soybean mixture. **Journal of Food Processing Engineering**, v. 29, p. 149-161, 2006.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; PERES, A. M.; MENDONÇA, A.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 87, p. 289-295, 2004.

WANG, B.; LI, Z. R.; CHI, C. F.; ZHANG, Q. H.; LUO, H. Y. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. **Peptides**, 36, 240–250, 2012.

WIJERS, M. C.; POULIOT, Y.; GAUTHIER, S. F.; POULIOT, M.; NADEAU, L. Use of nanofiltration membranes for the desalting of peptide fractions from whey protein enzymatic hydrolysates. **Le Lait**, v. 78, n. 6, p. 621-632, 1998.

XIE Z.; HUANG J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 111, p. 370–6, 2008.

XIONG, Q.; KADOTA, S.; TADATA, T.; NAMBA, T. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche desertiola*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.19, p. 1580-1585, 1996.

ZHU, C. Z.; ZHANG, W. G.; KANG, Z. L.; ZHOU, G. H.; XU, X. L. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham. **Meat Science**, v. 96, p. 783-789, 2013

ZHUANG, H., TANG, N., YUAN, Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1810-1821, 2013.

ZOUARI, N.; ABID, M.; FAKHFAKH, N.; AYADI, M. A.; ZORGUI, L.; AYADI, M.; ATTIA, H. Blue-green algae (*Arthrospira platensis*) as an ingredient in pasta: Free radical scavenging activity, sensory and cooking characteristics evaluation. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 62, p. 811–813, 2011.

ZOU, T. B.; HE, T. P.; LI, H. B.; TANG, H. W.; XIA, E. Q. The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. **Molecules**, n. 21, v. 72, 2016.

APÊNDICE – ARTIGO CIENTÍFICO

Peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* e sua aplicação em um alimento extrusado tipo *snack*

Patrícia Costa da Silva, Tassiele Toledo, Vandrê Brião, Telma Elita Bertolin, Jorge Alberto Vieira Costa

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo (UPF), rodovia BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brasil.

Resumo

A busca por ingredientes que tragam benefícios à saúde é reforçada pelo consumidor que demonstra interesse por alimentos mais saudáveis. Nesta perspectiva, há um interesse na aplicação de antioxidantes proveniente de fontes naturais devido ao uso limitado dos sintéticos utilizados pela indústria alimentícia. Os peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* representam uma alternativa de ingredientes a serem incorporados, tornando possível o consumo de alimentos processados com maior valor nutritivo, além da funcionalidade. Neste trabalho, foi conduzido um processo de hidrólise enzimática da microalga *Spirulina* sp. com posterior separação das frações peptídicas em sistema de ultrafiltração utilizando uma membrana de 4 kDa. A matéria-prima *Spirulina* sp., o hidrolisado proteico e os peptídeos isolados foram avaliados quanto a capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS, poder redutor e atividade quelante. Estes mesmos produtos foram adicionados em um alimento tipo *snack* de milho, em que foram avaliadas características como textura, cor e capacidade antioxidante, comparando com o controle (sem adição). O processo de hidrólise enzimática gerou peptídeos com atividade antioxidante, sendo esta atividade maior em relação à matéria-prima integral, apresentando diferentes perfis de capacidade antioxidante para as frações obtidas. Os *snacks* produzidos demonstraram alta fraturabilidade e dureza quando adicionados da fração menor que 4 kDa. A luminosidade dos *snacks* diminuiu com adição da *Spirulina*, mas foi aumentando conforme a diminuição do peso molecular das frações. A adição do hidrolisado e das frações peptídicas ficaram próximas da coloração amarela do controle e apresentaram menores valores para a tonalidade verde característica da *Spirulina*. Por fim, os *snacks* adicionados das frações menor que 4 kDa e maior que 4 kDa aumentaram a atividade antioxidante do alimento, através dos métodos do radical ABTS e Poder Redutor, respectivamente. Os resultados deste estudo demonstram que a capacidade antioxidante da microalga *Spirulina* foi maior com o processo de hidrólise enzimática e essa bioatividade é melhor alcançada quando na forma de peptídeos isolados, os quais podem ser utilizados como antioxidantes naturais na indústria de alimentos

Palavras-chave: biopeptídeos, *snack*, antioxidante

1. Introdução

Os novos apelos nutricionais estão gerando necessidades que impulsionam o setor alimentício para o desenvolvimento de produtos que denotem mais saúde para o consumidor. Nessa perspectiva, os ingredientes funcionais oferecem benefícios adicionais às suas funções nutricionais básicas (GRANATO et al. 2010), e o desenvolvimento de alimentos com estes ingredientes implica na incorporação de compostos bioativos com efeitos fisiológicos positivos. A proteína alimentar tem sido estudada não somente em relação ao seu papel nutricional já conhecido, mas como fonte de peptídeos os quais são inativos em sua estrutura primária (LI-CHAN, 2015).

Os peptídeos podem ser liberados, através de hidrólise enzimática *in vitro*, *in vivo* ou a combinação dos dois (HEBERT et al., 2010) e apresentam funções biológicas específicas, tais como ação antimicrobiana (MCCANN et al., 2006), antioxidante (NIMALARATNE et al., 2015), anti-hipertensiva (JIA et al., 2010).

Os antioxidantes são utilizados na prevenção ou inibição da oxidação dos alimentos e no estresse oxidativo decorrente de vários fatores, no entanto a indústria de alimentos tem sido questionada quanto à utilização de antioxidantes sintéticos, como o BHA, BHT e seu uso vêm sendo limitado devido aos potenciais riscos para a saúde, tais como danos nas moléculas de proteína e/ou DNA, toxicidade e efeitos secundários (BOUGATEF et al., 2010; WANG et al., 2012). Consequentemente, há um interesse em antioxidantes proveniente de fontes naturais, especificamente os peptídeos bioativos, os quais se destacam pela sua conformação estrutural simples podendo gerar maior estabilidade e apresentar propriedades funcionais como emulsificação e formação de espuma, vantagens estas que se destacam frente a outros antioxidantes naturais (XIE, et al., 2008).

Os peptídeos provenientes de isolados proteicos e seus hidrolisados de origem animal são os mais amplamente estudados, incluindo proteínas da carne, leite e ovo (ARIHARA et al., 2001; NARVA et al., 2004; NIMALARATNE et al., 2015), porém, estas fontes necessitam obter sua proteína isolada para obtenção e isolamento dos peptídeos.

As microalgas são fontes de compostos funcionais, sendo utilizadas para melhorar o valor nutritivo dos alimentos devido à sua riqueza de compostos com atividades biológicas (GOUVEIA et al., 2010). Dentre as cianobactérias, a *Spirulina* desempenha um importante papel devido ao seu elevado valor nutricional relacionado ao seu conteúdo de nutrientes essenciais, tais como vitaminas, minerais, ácidos graxos poli-insaturados (DE OLIVEIRA et al., 2013), além de ser reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância

Sanitária – Anvisa. Em relação ao teor proteico, possui cerca de 50-70% de proteína (AMBROSI et al. 2008). As pesquisas com microalgas evoluíram e novas tecnologias foram desenvolvidas para converter e utilizar produtos derivados desta matéria-prima. Essas tecnologias permitem o isolamento de substâncias com propriedades bioativas a exemplo da produção de peptídeos bioativos através da hidrólise enzimática (NGO et al., 2011), e a incorporação destes ingredientes é uma das formas de maior proteção à saúde, tornando possível o consumo de alimentos processados com maior valor nutritivo, além da funcionalidade.

Alimentos extrusados tipo *snacks* tornaram-se parte dos hábitos alimentares de uma grande parte da população. Podem ser preparados com ingredientes ou componentes que lhes confirmam propriedades funcionais específicas (HUANG et al., 2006). A textura é um atributo sensorial crítico que pode determinar a qualidade de um produto, como nos produtos obtidos por extrusão termoplástica. Em *snacks* extrusados, a expansão é desejada e é por isso que a textura desempenha um papel importante no que diz respeito à aceitabilidade entre os consumidores (ANTON e LUCIANO, 2007). Ainda, a cor é uma característica de qualidade importante nos alimentos extrusados, pois podem ocorrer mudanças ao longo da extrusão devido à composição dos ingredientes e às reações físico-químicas que ocorrem durante o processamento e a expansão do produto final (BISHARAT et al., 2014).

Alguns estudos vêm apresentando adição de hidrolisados proteicos em alimentos extrusados (SEGURA-CAMPOS et al., 2014; JEYAKUMARI et al., 2016), no entanto, até o momento não há relatos de adição de peptídeos da *Spirulina* sp. em alimentos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi utilização de peptídeos bioativos da *Spirulina* sp. no desenvolvimento de alimentos.

2. Materiais

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados para as análises de atividade antioxidante são da marca Sigma-Aldrich. Os demais reagentes são de uso laboratorial de padrão analítico.

2.2. Microalga *Spirulina* sp. e enzima

A microalga utilizada neste estudo foi a *Spirulina* sp. LEB 18, cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A enzima

utilizada no processo de hidrólise enzimática foi a Protemax 580L de *Bacillus licheniformis* (Prozyn, São Paulo – SP), a qual, baseado em estudos prévios, apresentou melhores resultados na obtenção de hidrolisados da *Spirulina* sp. (LISBOA et al., 2014). Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina por min.

3. Métodos

3.1. Hidrólise enzimática

Os parâmetros de hidrólise enzimática utilizados neste trabalho foram de acordo com Lisboa et al. (2014). Para a obtenção do hidrolisado foi utilizado 4g de *Spirulina* em 100 mL de tampão bicarbonato-carbonato de sódio (pH 9,5) e 5 U.mL⁻¹ de enzima. Após, colocou-se em incubadora orbital a 15 g em temperatura ótima de atividade da enzima (60 °C). Alíquotas foram retiradas a cada hora para quantificação do grau de hidrólise, em um total de 4 h de reação. Ao final, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 10 min e o hidrolisado foi centrifugado a 4200 g por 10 min para remoção do material insolúvel, o sobrenadante foi congelado em ultra freezer à -70°C para posterior liofilização. O processo foi realizado em triplicata

3.2 Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) ocorreu em um equipamento piloto de bancada. Constituído por uma membrana tubular de 4 kDa, uma bomba de diafragma, um reservatório de aço inoxidável de 10 L de capacidade, uma válvula esférica e um manômetro para controle da pressão. O hidrolisado proteico foi alimentado no tanque e impulsionado pela bomba passando pela membrana, separando o permeado (Fração < 4 kDa) e o retido (Fração > 4 kDa). A pressão máxima de operação do sistema foi de 1,5 bar. As frações peptídicas obtidas foram congeladas em ultrafreezes a -70°C por 24 h e secas em liofilizador por 48 h.

3.3 Atividade antioxidante

3.3.1 Capacidade de inibição do radical ABTS

A inibição do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foi determinada de acordo com RE et al. (1999), em que foram preparadas a solução estoque

de ABTS 7 mmol. L⁻¹ e solução estoque de persulfato de potássio 2,45 mmol. L⁻¹. Para formação do radical, as soluções foram misturadas na proporção 1:1 e deixadas no escuro por 16 h. O radical foi diluído em álcool etílico até absorvância ficar em torno de 0,700. Para realização da análise, 0,2 mL das amostras foram adicionadas de 980 µl do ABTS. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos e mantida no escuro por 6 min. Para o branco, foi utilizado o radical ABTS puro, sem a amostra. A absorvância resultante da solução foi medida a 734 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram obtidos através de uma curva padrão de Trolox, sendo expressos em µmol de Trolox / g amostra.

3.3.2 Poder Redutor

O ensaio da atividade antioxidante pelo método de poder redutor foi realizado de acordo com Oyaizu (1986), com adaptação de Berker et al. (2007). Para esta determinação, 1 mL de solução da amostra foi misturado com 2,5 mL de tampão fosfato 0,05M (pH 7,0) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio 1%. Essa mistura foi incubada a 50 °C em banho termostaticado por 20 min. Após, a reação foi interrompida adicionando 2,5 mL de solução TCA 10% e centrifugada a 3000 g por 10 min. Alíquotas de 2,5 mL do sobrenadante foram transferidas para tubos de vidro com adição de 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico 0,1%. A leitura da absorvância foi feita a 700 nm decorridos 10 min. Os resultados foram obtidos através de uma curva padrão de Trolox, sendo expressos em µmol de Trolox / g amostra.

3.3.3 Atividade Quelante do íon Fe²⁺

A metodologia foi realizada de acordo com Decker and Welsh (1990) com modificação. Alíquotas de 3,7 mL da solução contendo a amostra foram adicionadas de 0,05 mL (modificado) da solução FeCl₂ 2 mmol. L⁻¹. A reação do íon complexo foi iniciada pela adição de 0,2 mL de solução de ferrozina 5 mmol. L⁻¹. Esta mistura foi agitada em agitador de tubos e mantida em repouso, no escuro, durante 10 min. Foi utilizada água deionizada como branco nas mesmas condições da análise. As leituras das absorvâncias foram feitas em 562 nm. As atividades quelantes foram calculadas através de uma curva padrão de ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA; 0 - 100 µmol. L⁻¹), expressos em µmol de EDTA. g⁻¹ amostra.

3.4. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) E ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A microalga *Spirulina*, o hidrolisado e as frações peptídicas obtidas foram analisados quanto à estabilidade térmica (DSC) e perda de massa (TGA), apresentados em formato de termogramas utilizando o software Universal Analysis 2000. As curvas de DSC foram obtidas usando um sistema de análise térmica modelo DSC Q2000 (TA Instruments, USA), utilizando atmosfera com gás nitrogênio ultra-puro 50 mL. min⁻¹, porta-amostra de alumínio hermético, com taxa de aquecimento de 10 °C. min⁻¹, na faixa de temperatura de 25 a 200 °C.

Para a análise termogravimétrica (TGA), os termogramas foram obtidos utilizando um equipamento de análise térmica modelo SDT Q600 (TA Instruments, USA), utilizando atmosfera com gás nitrogênio ultra-puro 100 mL. min⁻¹.

3.5. DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS TIPO SNACK ADICIONADOS DE *Spirulina*, HIDROLISADO E PETÍDEOS ISOLADOS

Foram desenvolvidos cinco snacks de milho, sendo um adicionado de biomassa de *Spirulina*, um de hidrolisado proteico, dois com as frações peptídicas (> e < 4 kDa) e um snack controle, sem adição (somente o grits de milho). A proporção de produtos adicionados ao grits de milho foi 2% (p/p). O processo de extrusão ocorreu na TEMABI, localizada na cidade de Sananduva, RS, Brasil, em que foi utilizada uma extrusora monorosca RX 50 (Rafamáquinas, Brasil) de capacidade 50 kg. h⁻¹. O teor de umidade dos grits para o processo foi de 12,5 g. 100g⁻¹, temperatura de extrusão em torno de 120 °C e abertura da matriz de 3 mm. Os snacks produzidos são de formato cilíndrico. Após o processo, os snacks foram acondicionados em embalagens herméticas para posteriores caracterizações físico-químicas, de textura, cor e análise antioxidante.

3.5.1. Caracterização físico-química dos snacks

Análises do teor de proteína, lipídios, umidade e cinzas para os diferentes snacks foram realizadas utilizando a metodologia da AOAC (2005). Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25. Cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C). Os lipídeos

foram extraídos empregando a metodologia de Soxhlet. Os carboidratos foram determinados por diferença.

3.5.2. Textura

Os parâmetros de textura dos snacks foram avaliados em equipamento texturômetro TA-XT plus (Stable Micro Systems, Inglaterra), equipado com Software Exponent 32 e carga de célula de 5 kg. Amostras de aproximadamente 3 cm foram analisadas a uma velocidade de 1 mm/s utilizando o probe Warner–Bratzler em formato de “V”. O teste de corte foi feito perpendicularmente ao eixo principal do snack, sendo calculada a força (g) necessária para quebrá-lo. Os resultados obtidos foram apresentados em termos de fraturabilidade e dureza.

3.5.3. Cor

A análise de cor dos snacks foi realizada utilizando o colorímetro de refletância difusa Color Quest II (Hunterlab, USA), conectado ao software Versão 1.7 Universal. As amostras foram colocadas em cubeta de quartzo com 20 mm de caminho óptico. Para o cálculo das coordenadas de cor, foi estabelecido o iluminante D65, o ângulo de 10° para o observador e a escala do sistema de cor CIE Lab. As coordenadas medidas foram: L* que representa a luminosidade em escala de 0 (preto) a 100 (branco), a* que representa escala de tonalidades de verde (-) a vermelho (+) e b* que representa a escala de tonalidades de azul (-) a amarelo (+).

3.6. Atividade antioxidante dos snacks

Para as análises de atividade antioxidante dos snacks com adição de Spirulina, do hidrolisado das frações peptídicas > 4 kDa e < 4 kDa, foram realizados a trituração dos mesmos em moinho de bancada e passados em peneira Tyler 80. Amostras de 1g foram dissolvidas em 25 mL de diferentes solventes (metanol e etanol) e agitadas à temperatura de 25°C, a 150 rpm por 24 h. Após, o material foi centrifugado a 3000 g por 10 min e o sobrenadante passado em papel filtro qualitativo. Os extratos obtidos foram analisados pelos métodos de ABTS e poder redutor. O mesmo procedimento ocorreu com a amostra controle (somente o grits de milho).

3.7. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. As diferenças entre as médias foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) no nível de 5% de probabilidade e a comparação entre estas pelo Teste de Tukey.

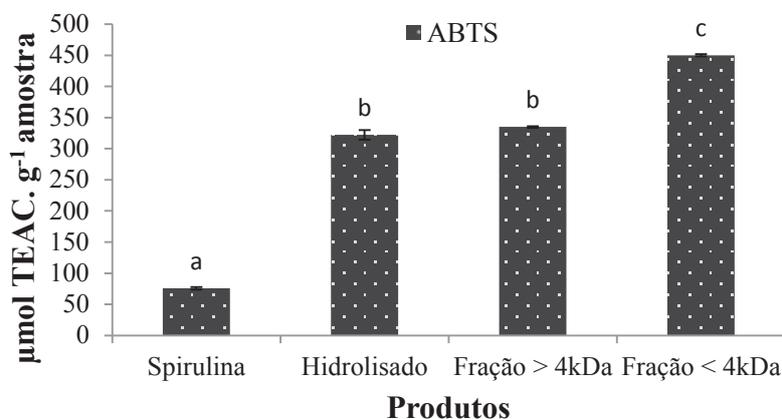
4. Resultados e discussão

4.1. Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade dos quatro produtos avaliados (*Spirulina*, hidrolisado, fração > 4kDa e fração < 4kDa) em inibir o radical ABTS estão apresentados na Figura 1, expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). O hidrolisado proteico (322,07 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$) apresentou maior atividade antioxidante ($p < 0,05$) em comparação à matéria-prima *Spirulina* (75,62 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$), este aumento é decorrente das mudanças na estrutura da proteína resultantes do processo de hidrólise enzimática, expondo os peptídeos com propriedades antioxidantes, os quais reagem mais efetivamente com os radicais que a proteína intacta (ELIAS et al., 2008).

A fração com peptídeos menores que 4 kDa foi a que apresentou maior capacidade de inibição do radical ABTS (436,15 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$), e o potencial de inibição se manteve superior aos demais produtos analisados, evidenciando a influência do peso molecular na atividade antioxidante. Essa elevada atividade, em comparação à fração de maior peso molecular, é similar aos resultados verificados em pesquisas utilizando membrana de ultrafiltração para o isolamento de frações peptídicas, os quais identificam a relação entre o baixo peso molecular dos peptídeos com a elevada capacidade de sequestro de radicais livres (DONG et al., 2015; KElfala-FOH et al. 2010; NGOH et al., 2015; TING et al., 2011).

Figura 1 – Atividade antioxidante da microalga *Spirulina*, hidrolisado e frações peptídicas pelo método de ABTS.

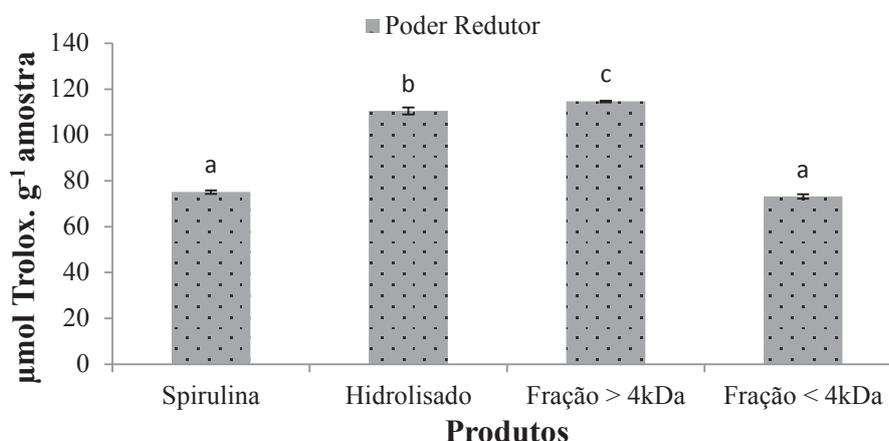


Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados da análise do poder de redução dos produtos foram avaliados (Figura 2) e expressos em equivalente de Trolox. g^{-1} amostra. O poder de redução da microalga *Spirulina* aumentou com o processo de hidrólise enzimática e diferenças ($p < 0,05$) foram verificadas entre as frações peptídicas isoladas. Alguns autores explicam que a maior disponibilidade de aminoácidos após a hidrólise pode fornecer uma fonte adicional de prótons e elétrons, mantendo um elevado potencial redox. Isso é influenciado pela interação enzima: substrato, a qual, durante a hidrólise, expõe resíduos de aminoácidos carregados nas cadeias laterais participando do mecanismo oxirredução (BAMDAD, et al., 2011; ZHU et al., 2013).

O hidrolisado proteico e a fração > 4 kDa apresentaram peptídeos com elevada capacidade de doar elétrons ($110 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ e $114 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$), com diferença entre eles ($p > 0,05$). Isto demonstra que durante a hidrólise foram gerados peptídeos com poder de redução estando este potencial antioxidante em peptídeos maiores que 4 kDa. Centenaro et al. (2014), Bamdad et al. (2011) e Girgih et al. (2011) também verificaram nas frações de maior peso molecular um elevado poder redutor.

Figura 2 – Atividade antioxidante da microalga *Spirulina*, hidrolisado e frações peptídicas pelo método de poder redutor.



Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

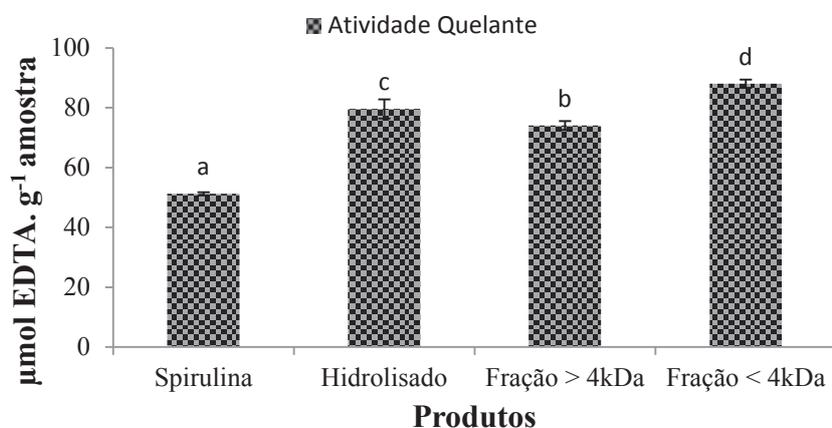
Segundo Girgih et al. (2011) isto é um indicativo do efeito aditivo dos grupos presentes nas ligações peptídicas, em que peptídeos de cadeia longa irão conter maior número de peptídeos redutores que os de cadeia curta. Ainda, Centenaro et al. (2014) e Qian et al. (2008) afirmam que a atividade antioxidante de uma fração peptídica também é derivada das propriedades dos aminoácidos presentes, como hidrofobicidade, os quais apresentam maior capacidade de transferir elétrons.

A fração < 4 kDa não teve diferença ($p > 0,05$) da microalga *Spirulina*, não apresentando o mesmo resultado demonstrado para a capacidade em inibir o radical ABTS. Entretanto, isto pode ocorrer, pois uma atividade antioxidante elevada pode não ser resultante do poder de redução, visto que compostos que inibem radicais pela doação de átomos de hidrogênio por vezes não são bons redutores (BOROSKI, et al. 2015).

Ainda, os produtos foram analisados pela capacidade antioxidante em quelar íons ferro, apresentados na Figura 3. Os resultados são expressos em equivalente de EDTA ($\mu\text{mol EDTA. g}^{-1}$ amostra).

O ensaio de quelação de metais avalia a capacidade dos antioxidantes em formar complexos com metais de transição (tais como Fe^{2+} e Cu^{2+}) os quais catalisam e promovem a peroxidação lipídica, assim, os compostos antioxidantes agem tornando-os indisponíveis para participar de reações que conduzem à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres. Pesquisas envolvendo peptídeos vêm demonstrando a atuação como agentes antioxidantes através da quelação de íons metálicos, reduzindo a susceptibilidade dos lipídeos à peroxidação oxidativa (GIRGH et al., 2014).

Figura 3 – Atividade antioxidante da microalga *Spirulina*, hidrolisado e frações peptídicas pelo método de atividade quelante.



Os valores representam a média \pm desvio padrão dos ensaios. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A fração < 4 kDa apresentou a maior atividade quelante ($88,01 \mu\text{mol EDTA. g}^{-1}$), demonstrando a influência do peso molecular nos peptídeos com atividade em quelar íons metálicos. De acordo com Ueda et al. (2003), a ligação dos peptídeos à íons metálicos é através da interação entre um grupo doador de elétrons e um íon metálico que apresente um ou mais sítios disponíveis, garantindo que o átomo metálico se torne parte de uma estrutura biologicamente estável. Os resultados no presente estudo vêm de encontro com os verificados por Ajibola et al. (2011), os quais realizaram uma comparação entre o hidrolisado proteico de uma espécie de inhame africano e suas frações peptídicas, obtendo melhores resultados de atividade quelante em frações de baixo peso molecular.

Saiga et al (2003) sugerem que a atividade quelante de peptídeos em hidrolisados poderia melhorar a capacidade de redução da taxa de oxidação lipídica acelerada por deteriorantes metálicos, seja no organismo, ou em alimentos; servindo como aditivos alimentares.

A capacidade antioxidante *in vitro* dos produtos analisados foi mensurada utilizando diferentes mecanismos de ação que um antioxidante pode atuar. Para os três diferentes métodos, o processo de hidrólise enzimática aumentou significativamente em comparação a *Spirulina* não hidrolisada. A fração isolada de menor peso molecular apresentou maior eficiência no sequestro de radicais livres e na capacidade de impedir a oxidação de íons metálicos presentes no meio. Já a fração de maior peso molecular apresentou melhor poder em doar elétrons e ser oxidado. Isto demonstra que a capacidade antioxidante de um composto

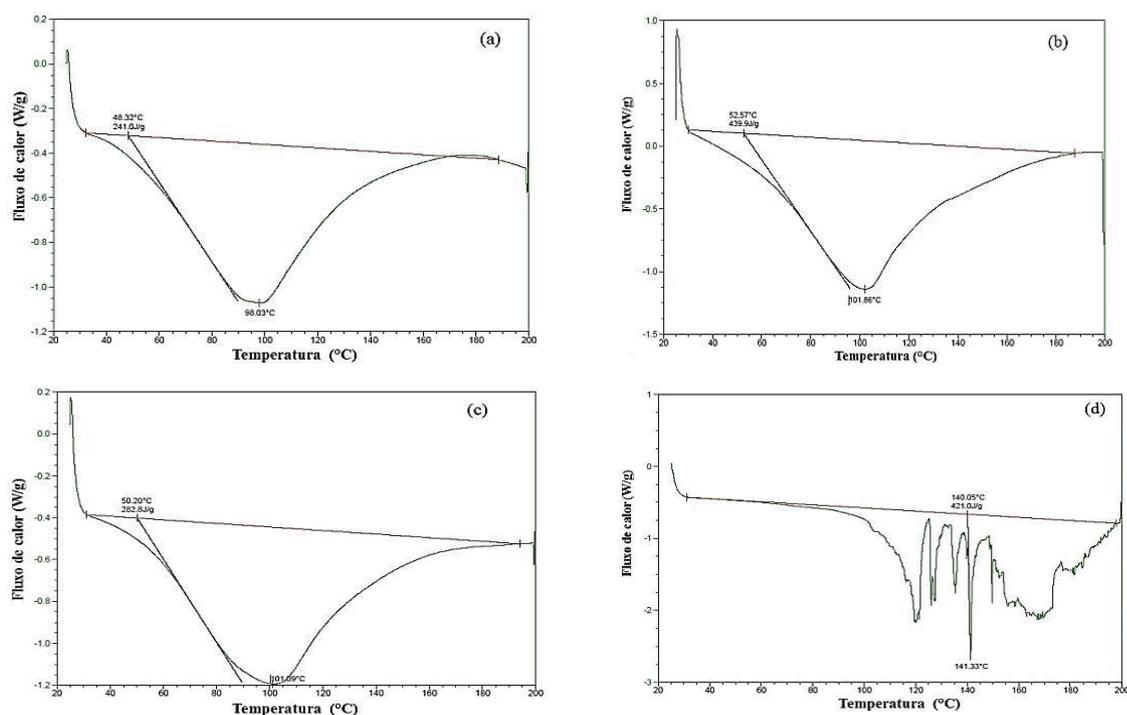
pode atuar de diferentes maneiras, no caso do presente estudo, o tamanho dos peptídeos indicou influência na ação antioxidante destes compostos.

4.2 Estabilidade Térmica

4.2.1. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é utilizada para avaliar a estabilidade das proteínas em função da temperatura. Essas alterações são refletidas nos termogramas de DSC (Figura 4) e usadas na avaliação da estabilidade da amostra determinada pela temperatura no ponto máximo do pico (T_m) (GILL et al.,2010).

Figura 4 – Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) da *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisada e das frações peptídicas.



Termogramas de DSC da (a) *Spirulina* não hidrolisada. (b) hidrolisado. (c) fração > 4 kDa. (d) fração < 4 kDa.

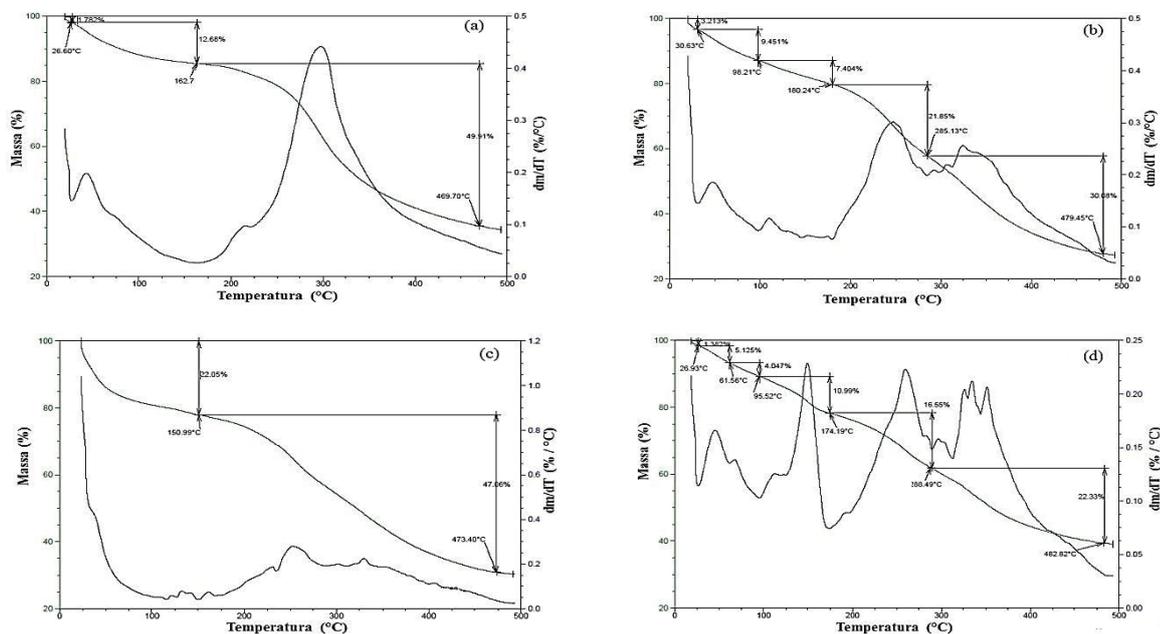
As temperaturas envolvidas no processo de desnaturação das proteínas (T_m) da *Spirulina* não hidrolisada, do hidrolisado e da fração > 4 kDa tiveram pequenas variações de 98,03 °C, 101,86 °C e 101,09 °C, respectivamente. No entanto, a entalpia envolvida no processo (ΔH) foi maior no hidrolisado (439,9 J/g), enquanto que na *Spirulina* não hidrolisada foi de 241 J/g, demonstrando que com o processo de hidrólise enzimática a energia necessária para que ocorresse a desnaturação aumentou, melhorando a estabilidade térmica (TRIVEDI et al., 2015). A fração < 4 kDa apresentou comportamento diferente dos demais produtos,

apresentando um pronunciado pico endotérmico em 141,33 °C. Este aumento da estabilidade pode ser decorrente da estrutura mais simples (ausência das estruturas terciárias e quaternárias) das ligações peptídicas e composição de aminoácidos mais estáveis presentes na fração de menor peso molecular, aumentando a estabilidade das moléculas diante do aumento de temperatura.

4.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA exhibe a perda de massa de um determinado produto em relação à temperatura em que o mesmo é submetido. Esta perda envolve alterações físicas ou químicas que podem ocorrer durante o tratamento térmico. Gai et al. (2015) avaliaram a biomassa de *Spirulina platensis* e identificaram 2 fases envolvendo perda de massa até a temperatura de 500 °C: desidratação e desvolatilização (decomposição) dos compostos presentes. O mesmo comportamento foi apresentado pela biomassa de *Spirulina* utilizada nesse estudo (Figura 5), juntamente com a fração > 4 kDa. Na *Spirulina*, a etapa de desidratação se manteve até 162,76 °C, em que teve 14,46% de perda de massa. Já na fração > 4 kDa esta etapa foi até 150 °C ocorrendo perda de 22% da massa inicial do produto. A maior perda de massa ocorreu na fase de decomposição dos compostos, em que houve uma diminuição de 50% na biomassa de *Spirulina* (162,76 °C a 469,70 °C) e 47% na fração de maior peso molecular (150 °C a 473,4 °C).

Figura 5 - Análise Termogravimétrica (TGA) da *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas.



Termogramas de TGA da (a) *Spirulina* não hidrolisada. (b) hidrolisado. (c) fração > 4 kDa. (d) fração < 4 kDa.

O comportamento termogravimétrico para o hidrolisado e a fração < 4 kDa foram semelhantes. O primeiro evento principal foi até 180 °C com perda de 19,21% para o hidrolisado e até 174 °C com perda de 21,38% para a fração < 4 kDa. A decomposição dos compostos para o hidrolisado ficou entre 180 e 480 °C com perda de 51% de massa e para a fração < 4 kDa envolveu temperaturas entre 174 °C a 482 °C havendo uma menor perda de massa (38%). Com estes resultados demonstra-se que a estabilidade térmica foi maior na fração de menor peso molecular também relacionada à menor perda de massa na etapa de decomposição dos compostos, demonstrando o potencial dos peptídeos na incorporação de alimentos que utilizem temperaturas elevadas.

4.3 Desenvolvimento de alimentos tipo *snack* adicionados de *spirulina*, hidrolisado e peptídeos isolados

4.3.1 Caracterização físico-química dos *snacks*

Os resultados da composição dos *snacks* estão apresentados na Tabela 1. No geral, os perfis da composição dos *snacks* produzidos foram muito semelhantes, mesmo em relação ao controle. No entanto, os peptídeos isolados apresentaram diferença ($p < 0,05$) para os teores de lipídios e proteínas.

Os *snacks* adicionados de $G > 4$ aumentaram o teor de lipídios em relação ao controle (somente *grits* de milho), isto pode ser decorrente da etapa de ultrafiltração, em que moléculas de lipídios migraram para a fração de maior peso molecular concentrando-as. O mesmo ocorreu para os *snacks* adicionados de peptídeos menores que 4 kDa, os quais aumentaram o teor proteico em relação ao controle, mas, não apresentando diferença em relação aos outros produtos. A fração peptídica de menor peso molecular obteve uma maior concentração das moléculas de proteína e isto influenciou no aumento do teor proteico dos *snacks* adicionados desta fração.

Tabela 1 - Composição físico-química dos *snacks*

Composição (g. 100g ⁻¹)	Controle	GS	GHD	G > 4	G < 4
Proteínas	6,31 ^a ±0,06	8,26 ^{a, b} ± 0,49	7,69 ^{a, b} ± 0,81	7,72 ^{a, b} ± 0,52	8,71 ^b ± 0,01
Lipídios	1,96 ^a ±0,26	3,15 ^{a, b} ± 0,49	3,54 ^{a, b} ± 0,09	3,93 ^b ± 0,72	3,54 ^{a, b} ± 0,05
Carboidrato*	85,03	82,35	83,01	82,55	80,18
Umidade	5,97 ^{a, b} ± 0,77	5,80 ^{a, b} ± 0,08	5,37 ^a ± 0,13	5,67 ^{a, b} ± 0,17	6,41 ^b ± 0,12
Cinza	0,27 ^a ± 0,03	0,47 ^a ± 0,06	0,48 ^a ± 0,11	0,44 ^a ± 0,10	0,93 ^a ± 0,70

GS: *grits* + *spirulina*; GHD: *grits* + hidrolisado; G > 4: *grits* + fração > 4 kDa; G < 4: *grits* + fração < 4 kDa.

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

*Resultado obtido por diferença.

A quantidade de umidade presente no *snack* com adição da fração < 4 kDa foi maior em relação ao *snack* adicionado de hidrolisado, mas não diferenciando dos demais. Os *snacks* produzidos estão de acordo com conteúdo de umidade estabelecido para este tipo de alimento que é de até 6 g. 100g⁻¹. Quanto ao teor de cinzas, os *snacks* não apresentaram diferença significativa.

4.3.2 Textura e cor

De acordo com Paula e Conti-Silva (2014), os testes instrumentais e sensoriais são correlacionados, pois as forças instrumentais derivadas dos testes de corte apresentam correlação com a análise sensorial, utilizando um painel treinado, para o *snack* com o mesmo formato (cilíndrico) que o realizado neste estudo. Desta forma, o teste de corte utilizando o

formato de “V” foi o escolhido para avaliar a dureza e fraturabilidade dos *snacks* com adição de *Spirulina* não hidrolisada, com o hidrolisado e as frações peptídicas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

A dureza representa a força aplicada pelos dentes molares para comprimir os alimentos e a fraturabilidade é a capacidade de quebrar o alimento, quando mordido, usando os incisivos. No geral, *snacks* com formato cilíndrico apresentam maiores valores para dureza e fraturabilidade em comparação aos *snacks* com outros formatos (PAULA e CONTI-SILVA, 2014). Sendo assim, no presente estudo, a resistência à ruptura dos produtos variou de 5,69 N a 16,82 N.

Diante dos resultados de textura dos *snacks* produzidos, observou-se um aumento nos parâmetros de fraturabilidade e dureza para os adicionados da fração peptídica < 4 kDa na mesma proporção (2%) que os demais produtos adicionados comparando com o controle. Este resultado indica que a adição dos peptídeos de menor peso molecular fez aumentar a resistência do produto em relação à fratura ou quebra do mesmo, tendo coerência com o resultado para a dureza. Geralmente produtos com alta fraturabilidade, possuem alto grau de dureza. A fraturabilidade ainda está relacionada com a crocância do produto (ANTON e LUCIANO, 2007).

Esta elevada força comparada aos outros produtos pode ser decorrente de maiores interações proveniente das ligações peptídicas, ocasionando uma estrutura mais compacta e menor expansão do produto (Figura 6). Jeyakumari et al. (2016), ao adicionar camarão hidrolisado em extrusados, observaram que quanto maior a concentração adicionada (maior teor proteico), mais elevadas eram as forças necessárias para a quebra do produto.

Os parâmetros de coloração dos *snacks* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análises de textura e cor dos *Snacks* produzidos.

	Controle	GS	GHD	G > 4	G < 4
Fraturabilidade**	5,69 ^a ± 0,19	8,24 ^{ab} ± 0,03	8,07 ^{ab} ± 0,02	9,15 ^b ± 0,43	15,02 ^c ± 0,47
Dureza**	6,25 ^a ± 0,32	8,40 ^a ± 0,16	8,93 ^a ± 0,28	6,62 ^a ± 0,15	16,82 ^b ± 0,97
L*	81,45 ^d ± 0,46	62,88 ^a ± 1,37	67,22 ^b ± 1,01	66,76 ^b ± 1,13	72,92 ^c ± 0,11
a*	4,34 ^c ± 0,29	-0,85 ^a ± 0,25	0,80 ^b ± 0,34	0,48 ^b ± 0,31	0,72 ^b ± 0,31
b*	45,19 ^d ± 1,29	25,92 ^a ± 0,06	30,69 ^b ± 0,29	31,07 ^b ± 0,32	35,08 ^c ± 0,07

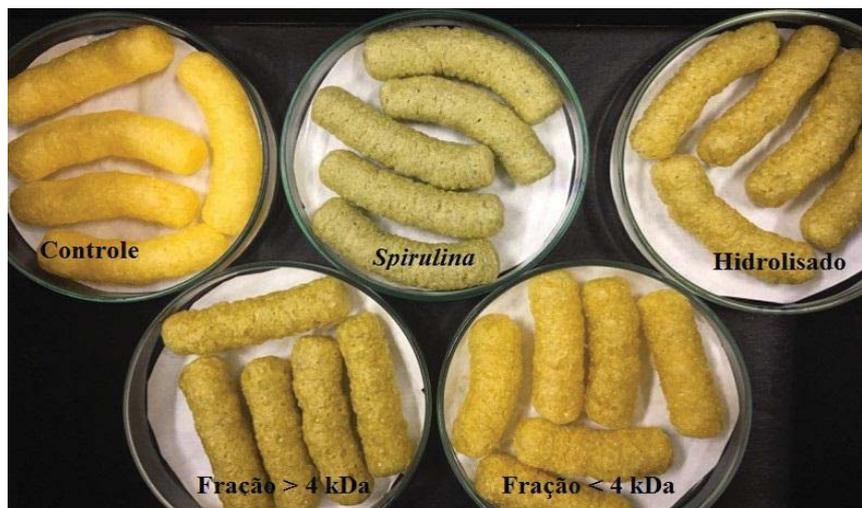
Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

GS: *grits* + *spirulina*; GHD: *grits* + hidrolisado; G > 4: *grits* + fração > 4 kDa; G < 4: *grits* + fração < 4 kDa
L* = luminosidade; a* e b* = coordenadas cromáticas (+a* = vermelho; -a* = verde; +b* = amarelo; -b* = azul
**Resultados expressos em Newtons (N)

Os resultados de luminosidade dos produtos (L*) apresentaram diferença ($p < 0,05$) do controle (somente *grits*). Os resultados mostram que os *snacks* perdem luminosidade quando adicionado a *Spirulina* sem hidrolisar ($p < 0,05$), decorrente da coloração mais escura, característica da microalga, no entanto, nos demais produtos, este parâmetro volta a aumentar novamente. Os *snacks* adicionados da fração < 4 kDa apresentaram diferença em relação aos outros produtos, tendendo a se aproximar a do produto controle. Estas diferenças são devido as diferentes tonalidades que os produtos apresentam.

Ainda, com a adição da *Spirulina* a coloração tende ao verde (Figura 6), verificado através do parâmetro a*. Isto demonstra que as características de cor da matéria-prima não foram afetadas com o processo de extrusão, preservando a coloração original da microalga. Os demais produtos apresentaram uma diminuição da tonalidade de verde, isto é proveniente da hidrólise em que a coloração é um dos parâmetros afetados. Com o processo de hidrólise enzimática há uma diminuição da tonalidade verde presente na biomassa integral e essa coloração permanece nas frações peptídicas, ficando os resultados entre 0,48 a 0,80.

Figura 6 – *Snacks* produzidos adicionados de *Spirulina*, hidrolisado e frações peptídicas.



O parâmetro b^* demonstra se a adição de 2% dos produtos alterou a coloração original do controle (amarelo). Os resultados mostram a perda desta coloração em todos os outros *snacks*. A adição da *Spirulina* foi o menor resultado de tendência ao amarelo. A adição do hidrolisado e a fração > 4 kDa não apresentaram diferença neste parâmetro, no entanto, a coloração amarela aumentou. Já na fração < 4 kDa, foi a que apresentou o segundo maior resultado, depois do controle, para a coloração amarela. Este resultado é decorrente da etapa de ultrafiltração, em que alguns pigmentos presentes no hidrolisado ficaram retidos na membrana, não passando para a fração de menor peso molecular.

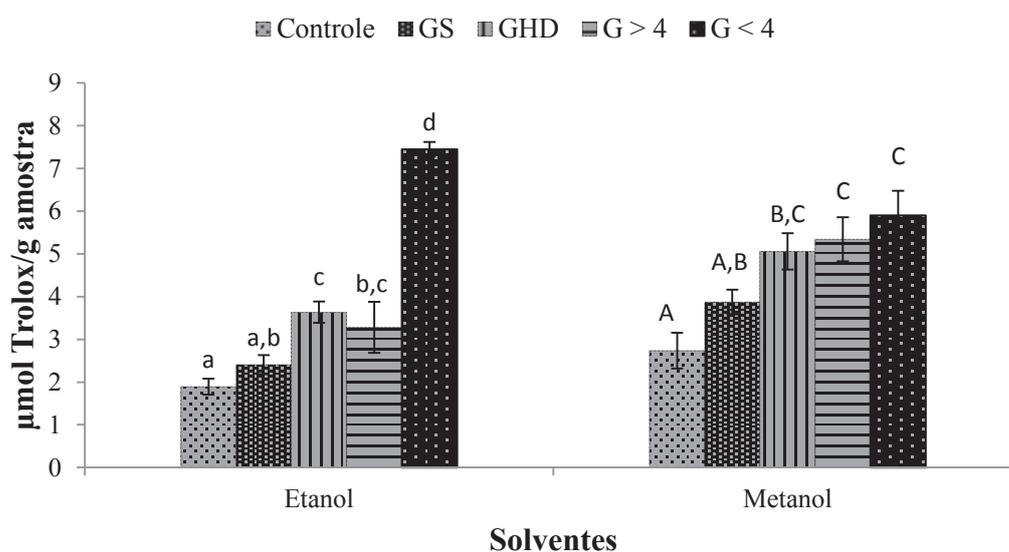
O perfil de coloração dos *snacks* adicionados de 2% da *Spirulina*, hidrolisado e das frações peptídicas tiveram colorações diferentes do controle, apresentando algumas tendências. A luminosidade dos *snacks* adicionados de peptídeos de menor peso molecular tende a se aproximar a do produto controle. Com o processo de hidrólise enzimática há uma diminuição da tonalidade verde presente na biomassa integral e essa coloração permanece nas frações peptídicas. A cor amarela, característica de *snack* de milho, diminui com a adição de *Spirulina*, mas tende a aumentar com os peptídeos de menor peso molecular.

4.4 Atividade antioxidante dos *snacks*

Os *snacks* adicionados de *Spirulina* não hidrolisada, hidrolisado e frações peptídicas foram avaliados em relação ao controle (*grits* de milho extrusado) quanto à capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS e poder redutor. Os resultados estão apresentados nas Figuras 7 e 8.

A adição do hidrolisado em *snack* de milho aumentou o potencial em inibir o radical livre ABTS ($p < 0,05$) de 1,89 para $3,63 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ amostra utilizando o solvente etanol e de 2,73 para $5,05 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ amostra utilizando o solvente metanol (Figura 7).

Figura 7 - Atividade antioxidante dos *snacks* pelo método de ABTS.



GS: *grits* + *spirulina*; GHD: *grits* + hidrolisado; G > 4: *grits* + fração > 4 kDa; G < 4: *grits* + fração < 4 kDa
Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Letras iguais (minúsculas para o solvente Etanol e maiúsculas para o solvente Metanol) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados similares foram relatados por Segura-Campos et al. (2014) que ao adicionarem hidrolisado de feijão (10% p/p) em massa extrusada, os valores de TEAC aumentaram em comparação a adição de feijão não hidrolisado. Assim, hidrolisados proteicos podem ser incorporados em alimentos para aumentar a sua funcionalidade.

A adição de *Spirulina* integral na concentração de 2% não apresentou diferença do controle. Alguns trabalhos relatam o aumento da bioatividade no alimento decorrente da adição da microalga (DE MARCO et al., 2014; ZOUARI et al., 2011) isso não foi verificado neste estudo. Isto pode ter sido decorrente dos solventes utilizados no processo não extraírem compostos como a ficocianina, a qual é solúvel em água, também responsável pelo poder antioxidante da microalga. No entanto a bioatividade no alimento poderia ser aumentada com a adição de uma maior concentração de biomassa, também relatado nesses estudos.

Ainda, para os dois sistemas de extração, os *snacks* adicionados de hidrolisado e da fração > 4 kDa não apresentaram diferença significativa entre si.

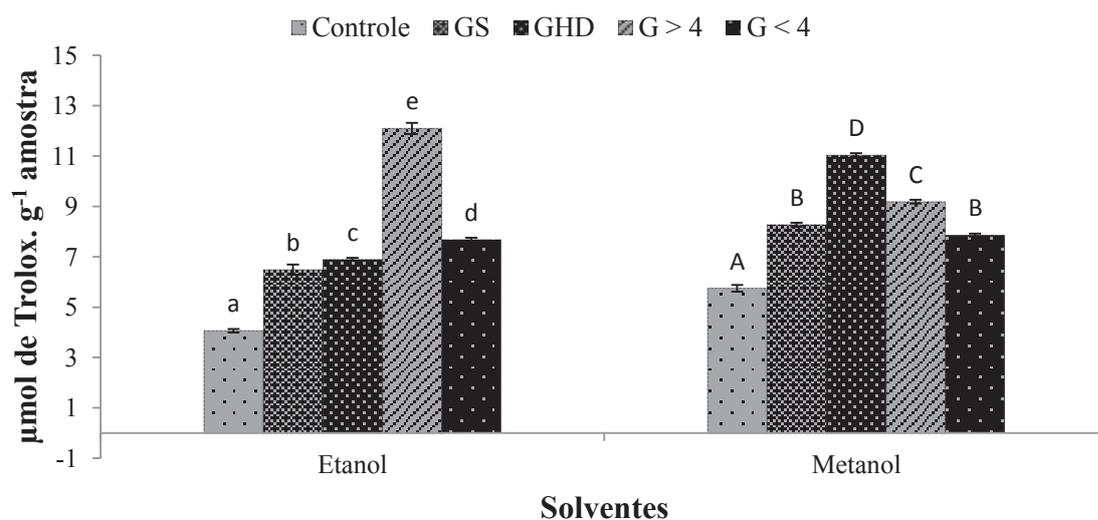
Dentre os *snacks* produzidos, o G < 4 foi o que apresentou maior capacidade em inibir o radical ABTS ($7,45 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$) utilizando o etanol como solvente de extração. Este resultado permite avaliar que aminoácidos, presentes nas ligações peptídicas com menor

polaridade, possuem poder antioxidante e fornecem, utilizando-se da mesma proporção que a matéria-prima, maior acesso a essa funcionalidade. Ainda, segundo Aliaga e Lissi (2000), quando se utiliza de uma análise de inibição, a acessibilidade ao sistema oxidação-antioxidante é maior em peptídeos menores e aminoácidos do que em peptídeos maiores e proteínas, sugerindo que a bioatividade em inibir radicais livres, presente no hidrolisado, provém dos peptídeos de menor peso molecular.

O perfil do poder de redução dos *snacks* (Figura 8) também demonstrou comportamentos diferentes para os dois sistemas de extração. Os *snacks* adicionados da microalga *Spirulina* aumentaram a capacidade antioxidante de 4,08 $\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$ amostra para 6,48 $\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$ amostra. Este resultado indica que a o poder de redução da microalga *Spirulina* provém de compostos menos polares como compostos fenólicos e carotenoides, os quais exibem atividade antioxidante. No entanto, para a extração com metanol, a adição da *Spirulina* não apresentou diferença do *snack* G < 4 kDa., isto se deve ao fato da interação do composto redutor com a matriz alimentícia, tornando-se um sistema complexo de atividade oxi-redução e favorecendo a extração de compostos redutores de maior afinidade pelo solvente.

Mesmo assim, todos os *snacks* adicionados dos produtos apresentaram maior bioatividade em reduzir espécies oxidativas em relação à amostra sem adição (*grits* de milho).

Figura 8 - Atividade antioxidante dos *snacks* pelo método de Poder Redutor.



GS: *grits* + *spirulina*; GHD: *grits* + hidrolisado; G > 4: *grits* + fração > 4 kDa; G < 4: *grits* + fração < 4 kDa
 Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Letras iguais (minúsculas para o solvente Etanol e maiúsculas para o solvente Metanol) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O *snack* adicionado da fração > 4 kDa obteve um aumento significativo no poder redutor ($12 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$) em comparação ao *snack* controle ($4 \mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$) e aos outros produtos quando extraído com solvente etanol. Peptídeos de maior peso molecular foram os responsáveis pelo poder redutor do hidrolisado da *Spirulina*, como demonstrado nas análises anteriores, e esta atividade apresentou o mesmo comportamento quando adicionado no alimento.

Até onde se sabe, não há relatos na literatura da adição de peptídeos em alimentos extrusados e suas interações de estrutura peptídica com a matriz alimentícia podem ser muito específicas, tornando difícil a comparação com outros trabalhos. Porém, estes resultados indicam que a adição de peptídeos isolados fornece maior atividade antioxidante ao produto extrusado através da inibição de radicais e como doadores de elétrons.

Assim, este estudo teve o intuito de apresentar os perfis de capacidade antioxidante dos *snacks* produzidos adicionados destes produtos, demonstrando que peptídeos podem ser incorporados em alimentos melhorando sua funcionalidade.

5 Conclusões

Este estudo demonstrou que uma maior capacidade antioxidante da *Spirulina* sp. é melhor alcançada quando na forma de peptídeos isolados, apresentando propriedades antioxidantes distintas. O mesmo perfil foi verificado quando adicionadas nos *snacks*, em que a adição de 2% das frações peptídicas fez aumentar o poder de inibição do radical ABTS e poder redutor dos *snacks* em relação ao controle (sem adição), evidenciando a relação do peso molecular com a bioatividade envolvida.

Entretanto, os *snacks* adicionados dos peptídeos bioativos menores que 4 kDa apresentaram altos valores para a fraturabilidade e dureza. Quanto à coloração, a cor amarela, característica de *snack* de milho, tende a ficar próxima ao controle com a adição dos peptídeos de menor peso molecular.

A microalga *Spirulina* sp. apresenta vantagem por não necessitar do isolamento de sua proteína como fonte de obtenção de peptídeos bioativos. Ainda, a estabilidade térmica dos peptídeos obtidos aumentou em relação à matéria-prima, sendo capaz de ter maior resistência a processamentos com temperaturas mais elevadas.

Mais pesquisas precisam ser realizadas na investigação da composição de aminoácidos que envolvem as propriedades apresentadas, no entanto, com base nos resultados apresentados

sugere-se que os peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* sp. podem ser usados como antioxidantes naturais para aplicação no desenvolvimento de alimentos.

Referências

- ALIAGA, C., LISSI, E. A. (2000). Reactions of the radical cation derived from 2, 2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{*+}) with amino acids. Kinetics and mechanism. *Canadian Journal of Chemistry*, 78, 1052-1059.
- ANTON, A. A., LUCIANO, F. B. (2007). Instrumental texture evaluation of extruded snack foods: a review evaluación instrumental de textura en alimentos extruidos: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 245-251.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). (2005). *Official methods of analysis of the association analytical chemists*. (18th ed.). Washington: AOAC.
- BARZIDEH, Z., LATIFF, A. A., GAN, C. Y., ABEDIN, M. Z., ALIAS, A. K. (2014). ACE inhibitory and antioxidant activities of collagen hydrolysates from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). *Food Technology and Biotechnology*, 52, 495–504.
- BERKER, K. I., GUCLU, K., TOR, I., APAK, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridytriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165.
- BISHARAT, G.I., LAZOU, A.E., PANAGIOTOU, N.M., KROKIDA, M.K., AROULIS, Z.B. (2014). Antioxidant potential and quality characteristics of vegetable-enriched cornbased extruded snacks. *Journal of Food Science Technology*, 52, 3986–4000.
- DE MARCO, E. R., STEFFOLANI, M. E., MARTÍNEZ, C. S., LEÓN, A. E. (2014). Effects of spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 58, 102-108.
- GOUVEIA, L., MARQUES, A. E., SOUSA, J. M., MOURA, P., BANDARA, N. M. (2010). Microalgae a source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7, 21–37.
- GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (2010) Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 3, 292-302.
- HEBERT, E., SAAVEDRA, L., FERRANTI, P. (2010). Bioactive peptides derived from casein and whey proteins. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 233–249.
- HUANG, S. J., MAU, J.L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. *Food Science Technology*. 39, 707–716.
- JEYAKUMARI, A., DAS, M. S. R., BINDU, J., JOSHY, C. G., ZYNUDHEEN, A. A. (2016). Optimisation and comparative study on the addition of shrimp protein hydrolysate and

shrimp powder on physicochemical properties of extruded snack. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 1578–1585.

JIA, J.; MAA, H., ZHAO, W., WANG, Z., TIAN, W., LUO, L. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119, 336–342.

LISBOA, C. R., PEREIRA, A. M., FERREIRA, S. P. COSTA, J. A. V. (2014). Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* Biomass for the Production of Enzymatic Protein Hydrolysates. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 4, 29-38.

MCCANN, K. B., SHIELL, B. J., MICHALSKI, W. P., LEE, A.; WAN, J., ROGINSKI, H. (2006). Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine aS1-casein. *International Dairy Journal*.

NIMALARATNE, C., BANDARA, N., WU, J. (2015). Purification and characterization of antioxidante peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry*, 188, 467-472.

OYAIZU, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

PAULA, A. M., CONTI-SILVA, A. C. (2014). Texture profile and correlation between sensory and instrumental analyses on extruded snacks. *Journal of Food Engineering*, 121, 9-14.

RE, R.; PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANALLA, A; YANG, M., RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*, 26, 9-10, 1231-1237.

SEGURA-CAMPOS, M. R.; GARCÍA-RODRIGUEZ, K.; RUIZ-RUIZ, J. C.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. (2014). In vitro bioactivity, nutritional and sensory properties of semolina pasta added with hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 8C, 1-8.

ZOURAI, N., ABID, M., FAKHFAKH, N.; AYADI, M. A., ZORGUI, L., AYADI, M., ATTIA, H. (2011). Blue-green algae (*Arthrospira platensis*) as an ingredient in pasta: Free radical scavenging activity, sensory and cooking characteristics evaluation. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 62, 811–813.