

APLICAÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE *Spirulina* EM GELATINA

A.M. Pereira¹, T.D. Santos², J.A.V.Costa³

1- Laboratório de Engenharia Bioquímica - Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP 96203900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone (53) 32336908 – e-mail: (alinemassia@hotmail.com)

2- Laboratório de Engenharia Bioquímica - Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP 96203900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone (53) 32336908 – e-mail: (thaisadsantos@yahoo.com.br)

3- Laboratório de Engenharia Bioquímica - Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP 96203900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone (53) 32336908 – e-mail: (jorgealbertovc@gmail.com)

RESUMO- Introduzir hidrolisados proteicos na dieta pode aumentar o aproveitamento nutricional de proteínas e conferir outros benefícios à saúde associados às suas propriedades bioativas. Biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi utilizada para obtenção de hidrolisado proteico. O hidrolisado proteico obtido foi adicionado em gelatina comercial sabor limão nas concentrações de 0,75, 1,5 e 2,25% m m⁻¹. As amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros de cor, textura e atividade antioxidante. Os resultados indicaram que a adição do hidrolisado proteico aumentou em aproximadamente 3 vezes a atividade antioxidante avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS e poder redutor das amostras de gelatina. A cor e a textura da sobremesa de gelatina foram mantidas com a adição de até 1,5 % de hidrolisado proteico. Este estudo contribui para a aplicação de hidrolisados proteicos microalgais em alimentos a fim de proporcionar atividade antioxidante a esses.

ABSTRACT- Introducing protein hydrolysates in the diet can increase the nutritional use of proteins and confer other health benefits associated with their bioactive properties. Biomass of *Spirulina* sp. LEB 18 was used to obtain protein hydrolysate. The obtained protein hydrolysate was added in commercial lemon flavored gelatin at concentrations of 0.75, 1.5 and 2.25% w w⁻¹. The samples were evaluated for color, texture and antioxidant activity parameters. The results indicated that the addition of the protein hydrolysate increased by approximately 3 times the antioxidant activity evaluated by the methods of DPPH, ABTS and reducing power of the gelatin samples. The color and texture of the gelatin dessert were maintained with an increase of up to 1.5% of protein hydrolysate. This study contributes to the application of microalgal protein hydrolysates in foods in order to provide antioxidant activity to them.

PALAVRAS-CHAVE: Alimentos funcionais; atividade antioxidante; cor; perfil de textura.

KEYWORDS: Antioxidant activity; color; functional foods; texture profile.

1. INTRODUÇÃO

Gelatina é um polímero biodegradável capaz de formar hidrogel, obtido de fontes naturais, comercialmente disponível a baixo custo, capaz de aumentar a estabilidade de substâncias ativas e que pode ser utilizado em alimentos (RAJABI et al., 2015; SCHRIEBER; GAREIS, 2007). Sobremesas do tipo gelatina são constituídas de gelatina em pó, açúcar, aromatizantes, e podem conter aditivos regulados por legislação específica (BERTÉ et al., 2011). Elas estão entre as sobremesas de elevada aceitação por crianças e adolescentes e além disso, são alimentos amplamente consumidos e de fácil preparo (BARBOSA et al., 2013), o que torna interessante o estudo e desenvolvimento desses alimentos adicionados de compostos bioativos.

A inclusão de compostos antioxidantes na dieta é uma maneira de promover saúde pois esses compostos são capazes de aumentar o equilíbrio de antioxidantes-pro oxidantes no corpo humano (SAMARANAYAKA; LI-



CHAN, 2011). Peptídeos com propriedades antioxidantes, obtidos da hidrólise enzimática de proteínas, vem sendo estudados para elaboração de alimentos funcionais (ALMEIDA et al., 2011). Peptídeos microalgais com amplo espectro de propriedades ativas, como antioxidantes (LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016), anti-hipertensivos (HEO et al., 2017; SHEIH; FANG; WU, 2009), anti-inflamatórios (VO; RYU; KIM, 2013) e antitumorais (KANG; KIM, 2013) tem sido relatados na literatura. A estabilidade da atividade bioativa destes peptídeos vem sendo estudados (KO et al., 2012; PEREIRA et al., 2019), porém há poucos estudos da sua aplicação para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Logo, o objetivo desse estudo foi adicionar hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 em sobremesa de gelatina sabor limão e avaliar a atividade antioxidante, coloração e perfil de textura deste alimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O hidrolisado proteico para realização deste estudo foi obtido de biomassa microalgal de *Spirulina* sp. LEB 18, obtida e caracterizada como descrito previamente por Pereira, Lisboa e Costa (2018). As proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram hidrolisadas com a enzima Protamax 580L de *Bacillus licheniformis*. As reações enzimáticas foram realizadas, em biorreator do tipo frasco agitado, utilizando 4 % m v⁻¹ de substrato e 5 U mL⁻¹ de enzima, 100 mL de volume reacional e 120 min de reação, de acordo com Pereira et al. (2019).

2.1. Aplicação do hidrolisado proteico em gelatina

Gelatina comercial sabor limão foi adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 em concentrações de 0,75; 1,5 e 2,25 % (m m⁻¹), denominadas F1, F2 e F3, respectivamente. Gelatina comercial sem adição de hidrolisado proteico foi utilizada como controle. As misturas foram dissolvidas à 40 °C com água potável e refrigeradas (4 °C) até geleificação.

2.2. Caracterização da gelatina adicionada de hidrolisado proteico

Atividade antioxidante: As amostras de gelatina após liofilizadas, foram utilizadas para determinação da atividade antioxidante. Soluções contendo 100 mg mL⁻¹ de amostra foram preparadas em água destilada. Após, 0,6 mL dessa solução foram acrescentados de 0,4 mL de ácido acético 20 % v v⁻¹ (concentração final de 60 mg mL⁻¹) e avaliadas quanto a capacidade de inibição do radical DPPH, ABTS e quanto ao poder redutor. Para avaliação do poder redutor, a solução foi diluída 10 vezes com tampão fosfato de sódio pH 6,6.

A capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada de acordo com Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) adaptado por Maadane et al. (2015). A inibição do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi determinada de acordo com Re et al. (1999) adaptada por Sadat et al. (2011). A atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS foram calculadas de acordo com a Equação 1. O poder redutor foi determinado de acordo com Oyaizu (1986) adaptado por Yen, Chen (1995).

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = [1 - (\text{abs}_{\text{amostra}} - \text{abs}_{\text{branco}} / \text{abs}_{\text{controle}})] \times 100 \quad (1)$$

Cor: A cor da gelatina de limão adicionada de hidrolisados proteicos de *Spirulina* sp. LEB 18 foi determinada em colorímetro (Minolta, CR-400, Japão) utilizando o sistema de escala de cor da Comissão Internacional de Iluminação para determinar os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* . Os valores de L^* representam a luminosidade e os valores de a^* e b^* , as coordenadas de cromaticidade, em que a^* varia de verde para vermelho ($-a^*$: verde, $+a^*$: vermelho) e b^* varia de azul para amarelo ($-b^*$: azul, $+b^*$: amarelo) (CIE, 1986).

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antioxidante da gelatina

A capacidade de inibir o radical DPPH das amostras adicionadas do hidrolisado proteico foi aproximadamente 3 vezes superior à atividade antioxidante da amostra controle (gelatina comercial), conforme mostra a 0. O incremento da concentração de hidrolisado proteico adicionado não influenciou a capacidade de inibir o radical DPPH, pois não houve diferença significativa entre as amostras. O mesmo foi observado quanto à inibição do radical ABTS e ao poder redutor. Para todos os métodos avaliados houve aumento da atividade antioxidante em relação ao controle. Logo, a adição de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 em sobremesa a base de gelatina tornou esse alimento promissor para o mercado de alimentos funcionais.

Tabela 1- Atividade antioxidante de gelatina de limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18.

Formulação	DPPH (%)	ABTS (%)	Poder redutor (abs)
Controle	$11,5^b \pm 1,2$	$6,3^d \pm 1,1$	$0,152^b \pm 0,038$
F1	$35,7^a \pm 2,7$	$26,8^a \pm 3,2$	$0,245^{ab} \pm 0,033$
F2	$37,2^a \pm 0,9$	$22,8^{abc} \pm 5,5$	$0,298^a \pm 0,057$
F3	$35,2^a \pm 3,8$	$26,0^{ab} \pm 2,2$	$0,338^a \pm 0,038$

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$); F1: gelatina adicionada de 0,75 % de hidrolisado proteico; F2: gelatina adicionada de 1,5 % de hidrolisado proteico; F3: gelatina adicionada de 2,25 % de hidrolisado proteico.

3.2. Cor

Os valores negativos de a^* e positivos de b^* indicam que as amostras tendem a tonalidade verde. Pode-se observar que a amostra F3, com adição de 2,25 % de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18, apresentou o menor valor de a^* em módulo indicando a menor intensidade da cor verde e a maior diferença desse parâmetro em relação ao controle, conforme mostra a Tabela 2. Entretanto, estes valores são próximos aos encontrados por Komaiko e McClements (2015) para sobremesa comercial de gelatina sabor limão, que foram L^* entre 30 e 35 e os parâmetros a^* e b^* de aproximadamente -20 e 20 , respectivamente. Os parâmetros L^* e b^* das amostras com adição de 0,75 e 1,5 % de hidrolisado proteico não diferiram significativamente em comparação com a amostra controle. Os resultados indicam que hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 pode ser adicionado em até 1,5 % em gelatina sabor limão sem causar alteração significativa desses parâmetros de cor.

3.3. Perfil de textura

O perfil de textura de amostras de gelatina foi avaliado para verificar se a adição de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 interfere nas características mecânicas do alimento. As propriedades de dureza, gomosidade e elasticidade não foram comprometidas com a incorporação de hidrolisado proteico, nas concentrações de 0,75 e 1,5 %, formulações F1 e F2, respectivamente, comparados à amostra controle, conforme mostra a Figura 1. Embora a adição de 2,25 % de hidrolisado proteico tenha causado a maior redução da dureza da gelatina, esta foi superior ao valor encontrado em alguns estudos, como por exemplo, de Pang et al. (2014), que reportaram dureza de aproximadamente 0,3 N para gelatina adicionada de proteínas de leite. Para superar a

diminuição da dureza e possibilitar a incorporação de maiores concentrações de hidrolisado proteico, técnicas de encapsulamento que permitam a adição do composto ativo sem que haja modificação da textura podem ser estudadas.

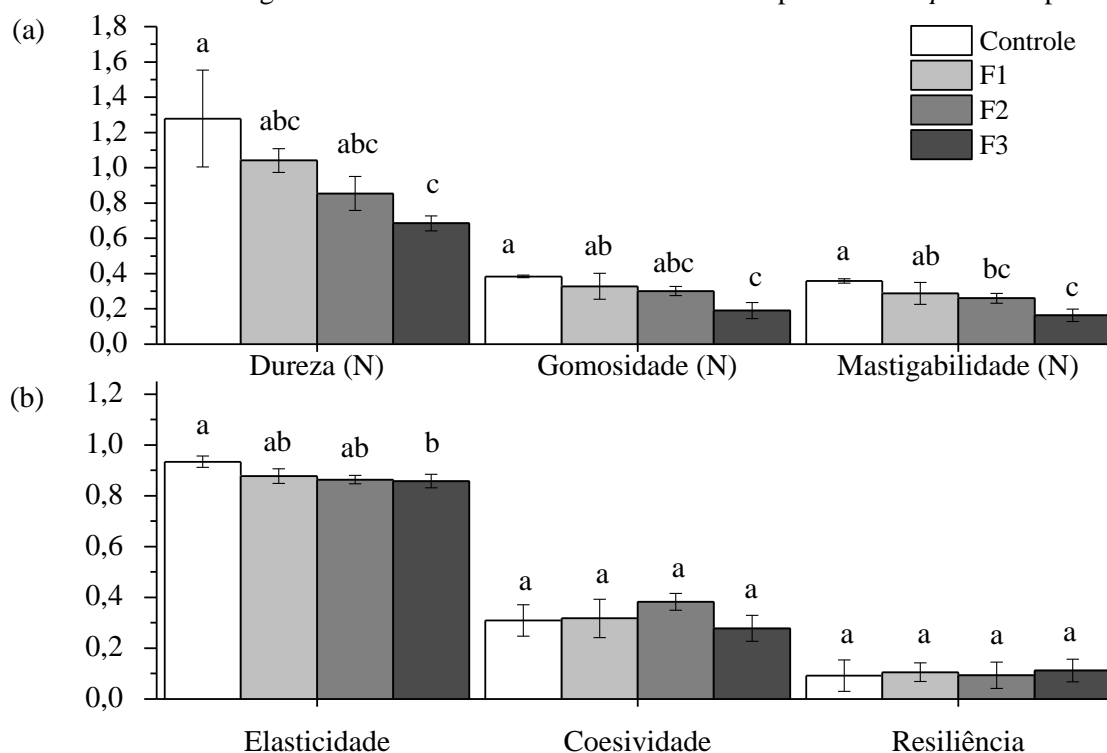
A mastigabilidade foi mantida apenas com a adição de 0,75 % de hidrolisado proteico. As propriedades de coesividade e resiliência das gelatinas de limão para todas as concentrações de hidrolisado proteico adicionadas foram significativamente iguais às propriedades da gelatina comercial. Os parâmetros de dureza, gomosidade, mastigabilidade, elasticidade, coesividade e resiliência estão condizentes com a literatura para sobremesas de gelatina de acordo com Xia et al. (2018).

Tabela 2 - Parâmetros de cor de gelatina com adição de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18.

Formulação	L^*	a^*	b^*	Cor
Controle	54,91 ^a ± 1,41	-31,19 ^a ± 3,79	38,11 ^a ± 3,50	
F1	50,74 ^{ab} ± 3,63	-26,49 ^{bc} ± 1,28	37,98 ^a ± 1,62	
F2	48,24 ^{ab} ± 3,27	-19,63 ^d ± 1,89	33,89 ^a ± 3,39	
F3	37,61 ^b ± 3,01	-14,53 ^e ± 1,56	26,76 ^b ± 3,53	

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$); F1: gelatina adicionada de 0,75 % de hidrolisado proteico; F2: gelatina adicionada de 1,5 % de hidrolisado proteico; F3: gelatina adicionada de 2,25 % de hidrolisado proteico.

Figura 1 - Perfil de textura de gelatina de limão adicionada de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18.



Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$); F1: gelatina adicionada de 0,75 % de hidrolisado proteico; F2: gelatina adicionada de 1,5 % de hidrolisado proteico; F3: gelatina adicionada de 2,25 % de hidrolisado proteico.



4. CONCLUSÃO

A adição de hidrolisado proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 foi capaz de aumentar a atividade antioxidante de sobremesa de gelatina. A incorporação do hidrolisado proteico em concentrações de até 1,5 % pode ser realizada sem alterações nas características de cor e textura deste alimento. Esses resultados indicam que hidrolisados proteicos de *Spirulina* são promissores para a indústria de alimentos funcionais. Estudos futuros devem ser realizados, principalmente quanto à análise sensorial, para garantir a aceitação do produto adicionado de hidrolisado proteico microalgal.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I. M. C.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Dietary antioxidant supplements: Benefits of their combined use. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3232–3237, 2011.
- BARBOSA, M. I. M. J.; SANTOS, R. B.; CHARÃO, K. DOS S.; SOUTO, R. M.; JÚNIOR, J. L. B. Desenvolvimento e análise sensorial de gelatina elaborada com frutas liofilizadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 129–136, 2013.
- BERTÉ, K. A. S.; IZIDORO, D. R.; DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 2, p. 354–360, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CIE. **Colorimetry**. 2. ed. Wien, Austria: Commission International de l'Éclairage, 1986.
- HEO, S. Y.; KO, S. C.; KIM, C.; OH, G. W.; RYU, B.; QIAN, Z.; KIM, G.; PARK, W.; CHOI, I. W.; PHAN, T.; HEO, S. J.; KANG, D. H.; YI, M.; JUNG, W. K. A heptameric peptide purified from *Spirulina* sp. gastrointestinal hydrolysate inhibits angiotensin I-converting enzyme- and angiotensin II-induced vascular dysfunction in human endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, p. 1072–1082, 2017.
- KANG, K.-H.; KIM, S.-K. Beneficial effect of peptides from microalgae on anticancer. **Current protein & peptide science**, v. 14, n. 3, p. 212–7, 2013.
- KO, S. C.; KANG, N.; KIM, E.-A.; KANG, M. C.; LEE, S. H.; KANG, S. M.; LEE, J. B.; JEON, B. T.; KIM, S. K.; PARK, S. J.; PARK, P. J.; JUNG, W. K.; KIM, D.; JEON, Y. J. A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2005–2011, 2012.
- KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade nanoemulsion filled hydrogels formed by spontaneous emulsification and gelation: Optical properties, rheology, and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 67–75, 2015.
- LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; COSTA, J. A. V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 3, p. 79–86, 2016.
- MAADANE, A.; MERGHOU, N.; AINANE, T.; EL ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.
- PANG, Z.; DEETH, H.; SOPADE, P.; SHARMA, R.; BANSAL, N. Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 483–493, 2014.



- PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 47, p. 187–194, 2018.
- PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 10, p. 4543–4551, 19 out. 2019.
- RAJABI, H.; GHORBANI, M.; JAFARI, S. M.; SADEGHI MAHOONAK, A.; RAJABZADEH, G. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 327–337, 2015.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.
- SADAT, L.; CAKIR-KIEFER, C.; N'NEGUE, M. A.; GAILLARD, J. L.; GIRARDET, J. M.; MICLO, L. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 214–221, 2011.
- SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–254, 2011.
- SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2007.
- SHEIH, I. C.; FANG, T. J.; WU, T. K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 279–284, 2009.
- VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1336–1346, 2013.
- XIA, Q.; GU, M.; LIU, J.; NIU, Y.; YU, L. (LUCY). Novel composite gels of gelatin and soluble dietary fiber from black bean coats with interpenetrating polymer networks. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 72–78, 2018.
- YEN, G.-C.; CHEN, H.-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 43, p. 27–32, 1995.