

## FILME ANTIOXIDANTE DE CELULOSE BACTERIANA NANOFIBRILADA E PEPTÍDEOS

Helder L. S. Lima<sup>1D</sup>, Maria K. A. Barroso<sup>2IC</sup>, Matheus O. Barros<sup>3IC</sup>, Ana I. S. Brígida<sup>4D</sup>, Maria F. Borges<sup>5D</sup>, Morsyleide F. Rosa<sup>6D</sup>.

1 - Universidade Federal do Ceará, Programa de pós-graduação em Engenharia química, Fortaleza-CE, 60455-760, helderlevi@gmail.com

2 - Universidade Federal do Ceará, Depto. Tecnologia de Alimentos, Fortaleza-CE, 60356-001, mariakarolinaaraujo@yahoo.com.br

3 - Instituto Federal do Ceará, Química Industrial, Fortaleza-CE, 60040-531, matheus.oliveira\_@hotmail.com.br

4 - Embrapa Agroindústria de Alimentos, Guaratiba-RJ, 23020-470, ana.iraidey@embrapa.br

5 - Embrapa Agroindústria Tropical, Tecnologia da Biomassa, Fortaleza-CE, 60511-110, morsyleide.rosa@embrapa.br

6 - Embrapa Agroindústria Tropical, Microbiologia de Alimentos, Fortaleza-CE, 60511-110, maria.fatima@embrapa.br

### RESUMO

No presente trabalho obtiveram-se filmes antioxidantes de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF) por meio da incorporação de peptídeos antioxidantes de gelatina de pele de Tilápia (PAGPT). A CBNF foi obtida por desconstrução mecânica (em VITAMIX® 5200 Standard) da celulose bacteriana (CB) previamente submetida à oxidação mediada a TEMPO. Para a obtenção dos filmes, diferentes misturas contendo proporções de PAGPT e CBNF foram secas a 50°C. O filme com adição de sorbitol e PAGPT (37% m/m) apresentou aspecto translúcido e resistente. A atividade antioxidante nos filmes aumentou gradativamente com o acréscimo da proporção de PAGPT nos filmes, alcançando maiores valores nos filmes com quantidade acima de 57% desses peptídeos. A oxidação mediada a TEMPO não afetou a estabilidade térmica nem a solubilidade da CB. A adição de sorbitol e dos peptídeos aumentou a permeabilidade ao vapor de água e reduziu a estabilidade térmica dos filmes. A quantidade de sorbitol e PAGPT foi totalmente solubilizada em meio aquoso após 24 horas de agitação.

### INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é um dos materiais nanoestruturados mais estudados atualmente para aplicações na indústria de alimentos uma vez que apresenta alta resistência mecânica, pureza, baixo custo, grau alimentar, alta capacidade de absorção de água, versatilidade e permeabilidade seletiva para diversos tipos de substâncias bioativas que podem ser liberadas de forma controlada [1-4]. A CB é um polímero que pode ser obtido na forma de filmes íntegros (quando obtida em cultivo estático) ou pellets (quando obtida em cultivo agitado) [5]. Além disso, após sua obtenção, pode ser transformada em pó ou ser microfluidizada aumentando ainda mais sua aplicabilidade. A celulose vegetal nanofibrilada foi desenvolvida porém poucos trabalhos avaliaram a desconstrução mecânica da CB. Para o preparo de uma solução estável de celulose nanofibrilada se fez necessário uma funcionalização como por exemplo a oxidação mediada a TEMPO. Tal oxidação proporciona a inserção de grupos aldeídos na estrutura química e aumenta a versatilidade do material visando algumas aplicações [18]. Uma desconstrução mecânica da CB seca nativa não proporciona a formação de um fluido com aspecto de gel necessário para a estabilidade e formação de um filme resistente quando seco.

Pesquisas investem no desenvolvimento de materiais biodegradáveis que possam ser aplicados em diversas áreas incluindo filmes ou embalagens para alimentos para substituição (ainda que parcial) dos polímeros convencionais. Atenção especial tem sido dada para os filmes bioativos que podem ser obtidos pela incorporação de substâncias naturais em matrizes poliméricas não sintéticas. Embalagens ativas e filmes funcionalizados visam à manutenção da segurança, qualidade sensorial e nutricional de alimentos. A incorporação de aditivos naturais em matrizes poliméricas é uma alternativa à adição direta de aditivos químicos tradicionais em alguns tipos de alimentos [6-7]. Filmes comestíveis obtidos pela

incorporação de substâncias auxiliam na melhoria de ação dos compostos bioativos utilizados já que proporcionam liberação controlada, melhorando assim a qualidade do produto. Produtos mais naturais e funcionais são uma exigência do consumidor desde a última década.

Peptídeos bioativos são compostos formados por dois ou mais aminoácidos que apresentam alguma atividade biológica (antioxidante, anti-microbiana, anti-câncer, anti-hipertensiva, imunoregulatória etc). Atualmente, são considerados como potenciais substitutos dos aditivos químicos convencionais uma vez que apresentam diversidade química, vários tipos de atividades biológicas e podem ser incorporadas em matrizes poliméricas [8]. Os peptídeos bioativos podem ser sintetizados a partir de aminoácidos ou obtidos a partir da hidrólise de proteínas. Dentre as fontes proteicas de peptídeos que vem sendo estudadas atualmente, tem-se os resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) que atualmente é o peixe mais produzido no Brasil. Da pele de tilápia é possível extrair gelatina que pode ser hidrolisada enzimaticamente produzindo peptídeos com atividade biológica [9].

Alguns peptídeos já foram incorporados em membranas de CB com sucesso [3-4, 9]. Neste trabalho objetivou-se a obtenção de filmes de celulose bacteriana (CB) nanofibrilada com atividade antioxidante por meio da incorporação de peptídeos presentes em hidrolisado de gelatina de pele de tilápia (PAGPT).

## MATERIAIS E MÉTODOS

A CB foi obtida por cultivo estático de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 em meio sintético HS [10] seguindo protocolo descrito por H. L. S. Lima [11] modificando-se apenas a área de cultivo (25x27cm<sup>2</sup>). As películas de CB foram secas em estufa com circulação de ar a 50°C por 24 horas com posterior trituração em moinho analítico de corte antes da utilização na oxidação mediada a TEMPO (- N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina). A CB oxidada a TEMPO (CBOX) foi obtida segundo A. Isogai e colaboradores [13] com adaptações (utilizou-se solução 1% de CB seca triturada e Nabr). A CB nanofibrilada foi obtida após tratamento mecânico de CB oxidada a TEMPO 1% (m/m, em massa seca) em liquidificador de alta velocidade (VITAMIX® 5200 Standard - Getting Started) por três ciclos sucessivos de 10 minutos. A solução fluida obtida foi degaseificada em bomba á vácuo antes da utilização. O hidrolisado contendo os PAGPT foi obtido por hidrólise enzimática da gelatina de pele de tilápia sob temperatura e pH controlados utilizando alcalase®, conforme processo previamente otimizado por L. R. F. Faria [14]. A alcalase® 2.4L foi gentilmente cedida pela Novozymes®. A gelatina de pele de tilápia foi obtida seguindo metodologia estabelecida por M. M. S, Filho [12]

Para a obtenção dos filmes antioxidantes a base de CBNF e PAGPT, 120 mL da solução filmogênica contendo CBNF e PAGPT foram secos a 50°C (estufa com circulação de ar) em placas de Petri de 14,5 cm de diâmetro. As soluções filmogênicas foram obtidas por simples mistura da solução de CBNF 1% e a solução de PAGPT na proporção de 1:1 (m/m). As soluções de PAGPT foram obtidas por diluições do hidrolisado bruto. Primeiramente avaliou-se a influência da concentração de peptídeos na solução filmogênica (0,1 g/L - 13,3 g/L) sobre a atividade antioxidante dos filmes. Em seguida, os filmes controle 1 (C1 - filme de CB íntegra seca), controle 2 (C2 - CBNF sem peptídeos), controle 3 (C3 - CBNF sem peptídeos e com adição de sorbitol) e P1 (CBNF com sorbitol e peptídeos) foram caracterizados quanto à análise termogravimétrica (ATG), permeabilidade ao vapor (PVA) e solubilidade. Nos filmes C3 e P1 o plastificante sorbitol foi dissolvido na solução de PAGPT antes da mistura com a solução de CBNF na proporção de 2,5 g/L da solução filmogênica.

A atividade antioxidante dos filmes foi determinada pelo método de DPPH [15] sendo adaptada para filmes. Para tanto 9 mg de cada filme (de dimensão ~ 5x15 mm) foi imerso em 1,5 ml de água e submetido a agitação (120 r.p.m) por 20 minutos em shaker orbital. Após esse tempo, seguiu-se a análise normalmente com a adição de 1,5 mL da solução de DPPH em ambiente escuro mantendo-se a agitação por 30 minutos. A análise termogravimétrica (ATG) dos filmes foi realizada em analisador Shimadzu, modelo TGA-50, na faixa de 30 a 600°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio a 40 ml/min, com massas de amostra entre 9 e 11 mg. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada gravimetricamente segundo método ASTM E96-00 [16]. As espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro digital Mitutoyo - Digimatic Micrometer (0,001mm de resolução) com 8 medidas em diferentes locais do filme. A solubilidade dos filmes foi determinada após imersão em água por 24 horas N. Gontard [19].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa do estudo observa-se que a atividade antioxidante nos filmes aumenta gradativamente com o acréscimo da proporção de PAGPT, alcançando maiores valores nos filmes com quantidade acima de 57% desses peptídeos (Figura 1a). Os filmes na faixa de 1,7 a 23,6% de PAGPT apresentaram menores atividades (~1%/mg CBNF). Os filmes de CBNF nesta primeira etapa do estudo apresentaram aspecto quebradiço e por isso dificuldade de manuseio. O filme contendo 46,9% de peptídeos e atividade intermediária (3,5%/mg CBNF) foi selecionado para a etapa de caracterização onde adicionou-se sorbitol como plastificante. A quantidade utilizada corresponde a 50% em massa da matriz (celulose) sendo suficiente para a formação de filme translúcido e resistente ao manuseio (Figura 1b).

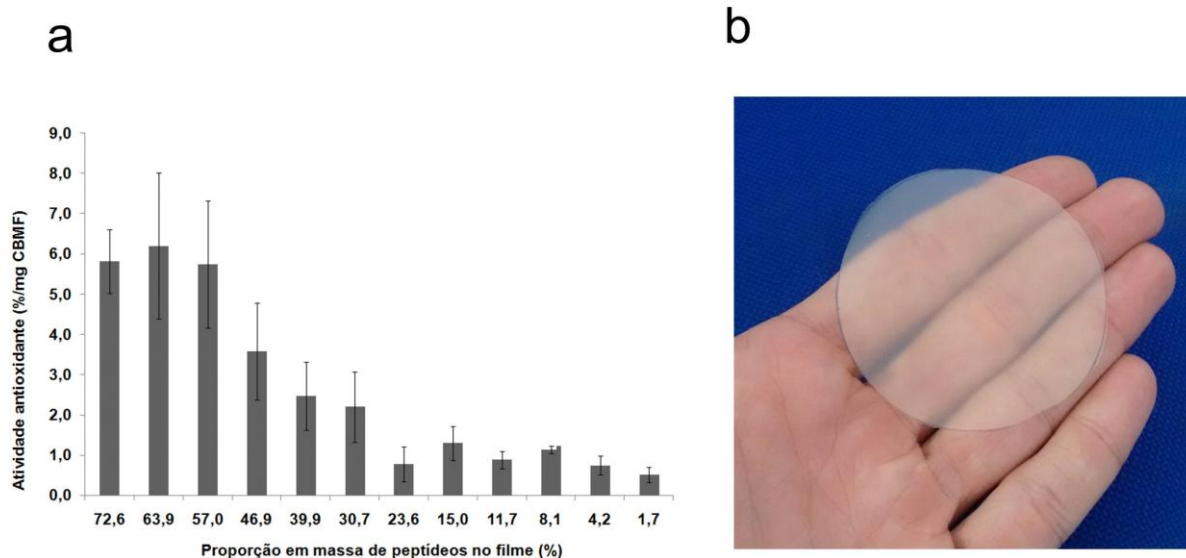


Figura 1 – Atividade antioxidante das películas de CBNF em função da concentração de peptídeos no filme (a), Filme de CBNF contendo sorbitol e 37% (m/m) de peptídeos (b).

Como esperado, não houve solubilidade nos filmes de CB e CBNF uma vez que a celulose é quimicamente insolúvel (Tabela 1). A quantidade de sorbitol e/ou peptídeos adicionada aos filmes C3 e C4 foi completamente dissolvida após 24 horas de agitação. A permeabilidade da membrana de CBNF apresentou menor valor (0,48 g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup>) quando comparada com a membrana de CB íntegra (0,73 g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup>). Embora o filme C2 seja mais hidrofílico, uma vez que é formado por CBOX, o mesmo apresentou menor permeabilidade que pode estar relacionada com uma maior compactação das nanofibras no filme seco.

Tabela 1 – Permeabilidade ao vapor (a) e Solubilidade (b) dos filmes.

Filme	Proporção de Celulose no filme (% m/m)	Proporção de PAGPT no filme (% m/m)	Proporção de Sorbitol no filme (% m/m)	Permeabilidade ao vapor de água (g.mm/kPa.h.m <sup>2</sup> )	Solubilidade
C1	100,00	0,00	0,00	0,73 ± 0,07	0,00 ± 0,04
C2	100,00	0,00	0,00	0,48 ± 0,04	0,00 ± 0,02
C3	66,66	0,00	33,33	0,93 ± 0,09	0,35 ± 0,06
P1	41,94	37,08	20,98	1,60 ± 0,15	0,57 ± 0,07

A CB íntegra não funcionalizada é uma membrana de alta porosidade. Nanofibras de celulose formam filmes densos e fortes [20]. A permeabilidade nos filmes de CBNF aumentou em ~100% com a adição do plastificante. A adição dos peptídeos também contribuiu para uma aumento da permeabilidade em ~140% e ~230% quando comparados com o filme de CBNF (C2) e CBNF com sorbitol (C3) respectivamente. O plastificante sorbitol tem baixa massa molar e capacidade de interagir com a água através de pontes de hidrogênio. Tais fatores contribuem para o aumento da permeabilidade uma vez

que o sorbitol se dispersa facilmente entre as cadeias poliméricas, diminui a interação entre elas, e aumenta retenção de umidade. O mesmo raciocínio se aplica aos peptídeos que são solúveis em meio aquoso.

Figura 2 – Perfil termogravimétrico dos filmes

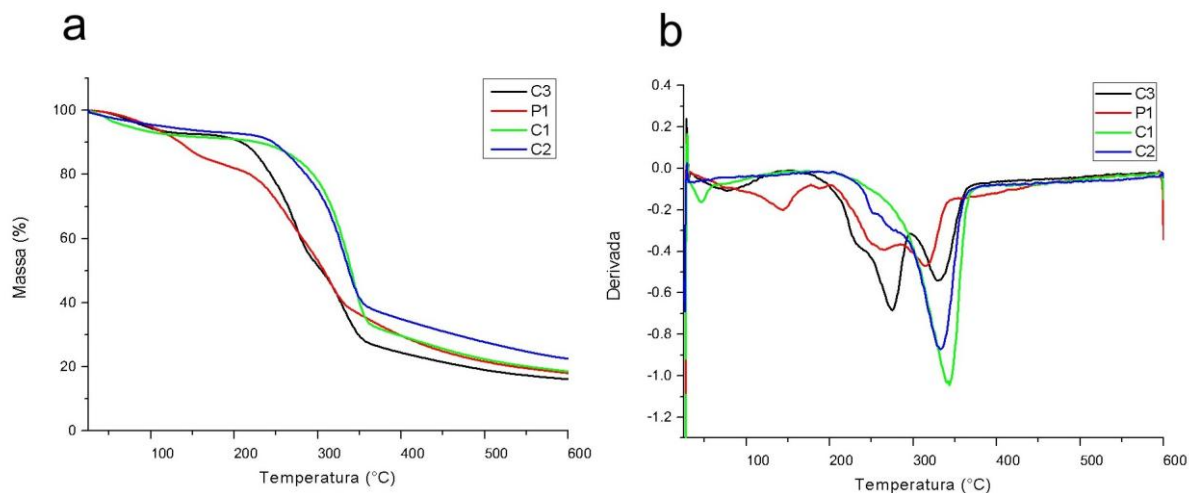


Tabela 2 – Temperaturas iniciais e finais de degradação, picos de DTG e resíduos

Filme	Proporção de Celulose no filme (% m/m)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa no intervalo (Ti-Tf) (%)	Picos de DTG - Tmáx (°C)	Resíduo em 600°C (%)
C	100	225	376	58,47	343	18,61
C2	100	220	375	55,29	332	22,55
C3	66,66	190	367	64,87	330, 275	16,07
P1	41,94	110	353	57,65	314, 259, 144	17,98

Os perfis de degradação térmica das amostras de CB e CBNF apresentam semelhança entre si com temperaturas iniciais (Ti), finais (Tf) e máximas (Tmáx) de degradação próximas (Figura 2a, Tabela 2). A oxidação a TEMPO não prejudicou a estabilidade térmica dos filmes de CBNF quando comparado com a CB. Os maiores teores de cinzas a 600°C na CBNF se devem a presença de carboxilato de sódio oriundos da celulose TEMPO-oxidada [17]. O filme com sorbitol (C3) apresentou Ti ligeiramente inferior (190°C) quando comparado com os filmes sem plastificante (220-225°C) e um pico (DTG) expressivo em 275°C em virtude da presença de sorbitol (33%) em grande quantidade (O mesmo pico se repete de forma menos intensa no filme P1 (259°C). No filme P1 observa-se um pico em 144°C referente à presença dos peptídeos. A presença de sorbitol reduz de forma significativa a estabilidade térmica de filmes protéicos [21]. Entretanto tal redução não representa necessariamente um problema caso a aplicação seja em alimentos que não sofrerão tratamento térmico severo após adição do filme.

## CONCLUSÕES

Filmes antioxidantes de celulose bacteriana nanofibrilada podem ser obtidos através da incorporação de peptídeos antioxidantes da gelatina da pele de tilápia pela técnica de mistura e secagem. Para os filmes sem a presença de plastificante as maiores atividades foram obtidas nas concentração acima de 57% de PAGPT. A atividade antioxidante dos filmes é influenciada pela quantidade de PAGPT da solução filmogênica. A adição de sorbitol e dos peptídeos aumentou a permeabilidade ao vapor de água e reduziu a estabilidade térmica dos filmes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. Paximada, Food Hydrocoll., 2016, 53, 225.
- [2] Z. Shi, Food hydrocoll., 2013, 35, 539.
- [3] T. V. Nguyen, Food microb., 2008, 25, 3, 471.
- [4] C. Gao, Food hydrocoll., 2014, 36, 204.
- [5] P. R. Chawla, Food technol. and biotechnol. 2009, 47, 2, 107.
- [6] P. Appendini e J. H. Hotchkiss, Innov. food sci. & emerg. technol. 2002, 3, 113.
- [7] V. Coma, Meat sci., 2008, 78, 1-2, 90.
- [8] P.J. P. Espitia, Comp. rev. food sci. and food saf. 2012, 11.
- [9] S. B. Lin, J. Biomat. app. 2015, 29, 1428.
- [10] S. Hestrin e M. Schramm, Biochem. j., 1954, 58, 345
- [11] H. L. S. Lima, Dissertação, PPGEQ, Universidade federal do Ceará, 2012.
- [12] M. M. S, Filho, Boletim de pesquisa e desenvolvimento / EMBRAPA, 2012, ISSN 1679-6543
- [13] A. Isogai, Nanoscale. 2011, 3, 1, 71.
- [14] L. R. F, Faria; Congresso, Sinaferm, 2015.
- [15] J. Yang, Proc. biochem. 2009, 44, 10, 1152.
- [16] ASTM - American Society for Testing and Materials - E-96-00; Annual Book of ASTM Standards, ASTM: Philadelphia, 2000.
- [17] H, Fukuzumi, Pol.degrad. and stab., 2010, 95, 9, 1502.
- [18] H, Luo, Mater. Chem. and phys., 2013,143, 373.
- [19] N. Gontard, Int. J. of Food Sci. & Technol., 2007, 29, 1, 39
- [20] G. Rodionova, Cellulose, 2012, 19, 4, 1115.
- [21] P. L. M. Barreto, Pol. Degrad. Stab., 2003, 79, 1, 147.

## AGRADECIMENTOS

Embrapa agroindústria tropical, CNPQ, CAPES, FUNCAP, Universidade Federal do Ceará, Rede-Agronano

Nome completo do apresentador:	Helder Levi Silva Lima
Nome completo do autor principal:	Helder Levi Silva Lima
email para contato:	Helderlevi@gmail.com

É sócio da ABPOL??  SIM  NÃO

No caso do **autor principal não ser o apresentador**, indicar qual dos autores será o apresentador do trabalho!! Lembrando que o certificado de apresentação será emitido em nome do **apresentador do trabalho**.

***Em qual dos temas abaixo se enquadra seu trabalho?? (assinale numerada caso haja preferencia por mais áreas).***

	A- Compósitos poliméricos e compósitos de base lignocelulósica
	B- (Bio)polímeros, polímeros biodegradáveis e aplicações.
	C- Blendas, nanocompósitos e modificação de (bio)polímeros.
	D- Processos de liberação controlada com base em (bio)polímeros e suas aplicações.
	E- Processamento e caracterização de polímeros.
x	F- Nanofibras e nanoestrutura com base em (bio)polímeros.
	G- Outros.