



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

## FILMES DE CELULOSE BACTERIANA COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

H. L. S. LIMA<sup>1</sup>, M.K.A. BARROSO<sup>1</sup>, M.J.M. CARNEIRO<sup>1</sup>, A.I.S. BRÍGIDA<sup>2</sup>, M.F. BORGES<sup>3</sup>,  
M.F ROSA<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará

<sup>2</sup> EMBRAPA - Embrapa Agroindústria de Alimentos

<sup>3</sup> EMBRAPA – Embrapa Agroindústria Tropical

E-mail para contato: ana.iraidey@embrapa.br; morsyleide.rosa@embrapa.br

**RESUMO** – No presente trabalho objetivou-se a obtenção de filmes antioxidantes de celulose bacteriana íntegra (CBI) e CB microfluidizada (CBMF) através da incorporação de peptídeos antioxidantes (PAGPT). Os PAGPT foram obtidos após hidrólise enzimática da gelatina de pele de Tilápia. Para os filmes de CBI, os peptídeos foram adsorvidos pela técnica de banho-finito sob agitação. Para os filmes de CBMF, diferentes misturas contendo proporções de PAGPT e CBMF foram secas a 50°C. O filme com maior atividade antioxidante foi obtido após absorção por 6 horas e 5 g/L de PAGPT. Não houve perda de atividade antioxidante nos filmes de CBMF com PAGPT quando comparado com o hidrolisado bruto, sendo a maior atividade obtida com 1g/L de PAGPT. A incorporação de PAGPT nos filmes de CBMF não prejudicou a estabilidade térmica do filme obtido.

### 1. 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 (Paximada *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2014). A CB é um polímero bastante versátil uma vez que pode ser obtida na forma de filmes íntegros (quando obtida em cultivo estático) e pellets (quando obtida em cultivo agitado) (Chawla *et al.*, 2009). Além disso, após sua obtenção, a CB pode ser transformada em pó ou ser microfluidizada aumentando ainda mais sua aplicabilidade.

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

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

ativas e filmes funcionalizados visam a manutenção da segurança, qualidade sensorial e nutricional de alimentos. A incorporação de aditivos naturais em matrizes poliméricas são uma alternativa à adição direta de aditivos químicos tradicionais em alguns tipos de alimentos (Coma, 2008; Appendini e Hotchkiss, 2002). Filmes comestíveis obtidos pela incorporação de substâncias auxiliam na melhoria de ação dos compostos bioativos utilizados já que aumentam a estabilidade térmica, melhoram as propriedades de barreira e proporcionam liberação controlada, melhorando assim as características sensoriais do produto mantendo-o mais natural. 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 (Espitia *et al.*, 2012). 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 (Lin *et al.*, 2015).

Alguns peptídeos já foram incorporados em membranas de CB com sucesso (Nguyen *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015). Neste trabalho objetivou-se a obtenção de filmes de CB com atividade antioxidante através da incorporação de peptídeos presente em hidrolisado de gelatina de pele de tilápia. Duas estratégias foram avaliadas para obtenção dos filmes ativos: adsorção de peptídeos antioxidantes presentes em hidrolisado de gelatina de pele de tilápia (PAGPT) em filmes íntegros de celulose bacteriana (CBI) e incorporação de PAGPT em CB microfluidizada (CBMF).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material

Alcalase<sup>®</sup> 2.4L foi gentilmente cedida pela Novozymes<sup>®</sup>. Os reagentes 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), ácido ascórbico, glicose, peptona, extrato de levedura fosfato de sódio e ácido cítrico foram adquiridos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).

A gelatina de pele de tilápia foi obtida seguindo Filho *et al.* (2012). E os PAGPT foram obtidos através de hidrólise enzimática da gelatina de pele de tilápia sob temperatura e pH controlados utilizando alcalase<sup>®</sup>, conforme processo otimizado por Faria *et al.* (2015). Os filmes de CB íntegros (Figura 1a) foram obtidos por cultivo estático de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 em meio sintético HS (Hestrin and Schramm, 1954) seguindo protocolo descrito por Lima (2014).

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



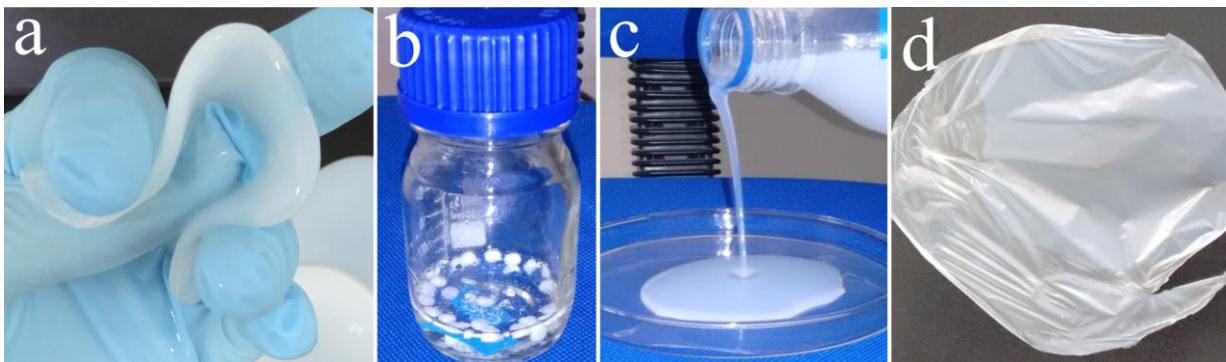


Figura 1 – Filme de CB purificado íntegro em estado úmido (a), sistema para adsorção com CB liofilizada (b), suspensão de CBMF (C) e filme de CBMF seco - controle (d).

## 2.2. Adsorção de peptídeos em filmes íntegros de CB

Para a obtenção dos filmes antioxidantes de CB íntegra, os PAGPT foram incorporados na película de CB por adsorção utilizando a técnica de banho-finito sob agitação e temperatura controladas (150 rpm, 27°C) em frascos Schott de 100 ml com 20 ml de solução (hidrolisado puro ou diluído) e 100 mg do adsorvente (CB liofilizada) (Figura 1b). Nesta etapa do estudo avaliou-se a influência do tempo de adsorção (0,25 a 24 horas) e concentração de peptídeos (5 e 10 g/L) na atividade antioxidante dos filmes obtidos. Após a adsorção, as películas foram lavadas três vezes em água destilada para a remoção dos peptídeos não aderidos na matriz antes da análise de atividade antioxidante.

## 2.3. Incorporação de peptídeos em CBMF

Para a obtenção da CBMF (Figura 1c), a CB foi previamente oxidada a TEMPO seguindo Isogai *et al.* (2011). Para a microfluidização mecânica uma suspensão (1%) de CB oxidada (CBO) foi homogeneizada em Ultra-turrax (10 min, 50.000 rpm) e, em seguida, conduzida ao microfluidizador (Microfluidizer® - Microfluidics Corporation) onde foi processada seguindo a seguinte seqüência de passagens: câmara de 400  $\mu\text{m}$  (10 passos), 100  $\mu\text{m}$  (10 passos) e 87  $\mu\text{m}$  (10 passos).

Para a obtenção dos filmes de CBMF com atividade antioxidante, soluções de hidrolisado de gelatina em diferentes concentrações foram misturadas com solução de CBMF (0,6% m/v), na proporção 1:9, para a formação da solução filmogênica. Avaliou-se o efeito da concentração dos peptídeos da solução filmogênica (0,25 a 1 g/L) na atividade antioxidante dos filmes secos obtidos (Figura 1d). Para a obtenção dos filmes secos, 50 ml de cada formulação foi seca em placas de Petri de 14,5 cm de diâmetro a 50°C por 24 horas em estufa sem recirculação interna.

## 2.4. Métodos Analíticos

A atividade antioxidante do hidrolisado e dos filmes foram determinados pelo método de DPPH (Yang *et al.*, 2009). Para determinação da atividade das soluções, 1,5 ml destas foram adicionadas a

1,5 ml de solução de DPPH 0,1 mM. Para determinação da atividade dos filmes, 4 mg foram adicionados a 3 ml de solução de DPPH 0,05 mM. Após a mistura, o tubo foi agitado em vortex por 10 segundos e, após 30 minutos de repouso em temperatura ambiente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro em 517 nm. Ácido ascórbico a 1000 ppm foi utilizado como controle positivo e água destilada como branco. A eficiência de incorporação (E) foi definida como o percentual de atividade presente no suporte frente à atividade oferecida.

A película íntegra de CB, o filme de CBMF controle (sem peptídeos) e o filme CBMF incorporado com 1% de PAGPT foram caracterizados por análise termogravimétrica (ATG) 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.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, estudou-se o efeito da concentração inicial de peptídeos na cinética de adsorção (Figura 2a) para obtenção de filmes íntegros de CB. A CB liofilizada sem peptídeos não apresentou atividade antioxidante. Para os filmes íntegros obtidos por adsorção dos PAGPT, a maior atividade foi obtida na concentração inicial ( $C_i$ ) de 5 g/L de peptídeo e 6 horas de adsorção. Comparando os tempos de 0,25h e 1h com o de 6h, a atividade antioxidante de 6 horas é pelo menos 2 vezes superior na  $C_i$  de 5 g/L. Na  $C_i$  de 10 g/L o incremento máximo foi de 1% no valor de atividade nos tempos de 18 e 24 horas frente os valores de tempos iniciais (0,25h e 1h). O resultado de maior atividade encontrada na CB obtida com  $C_i$  de 5 g/L pode estar relacionado à influência da concentração de PAGPT para os tipos de peptídeos imobilizados. O hidrolisado bruto contém diferentes tipos de peptídeos e frações de diferentes tamanhos. Cada fração pode contribuir diferentemente na atividade antioxidante final. Frações contendo maior quantidade de aminoácidos não polares tendem a apresentar atividade antioxidante maior (Lin *et al.*, 2015).

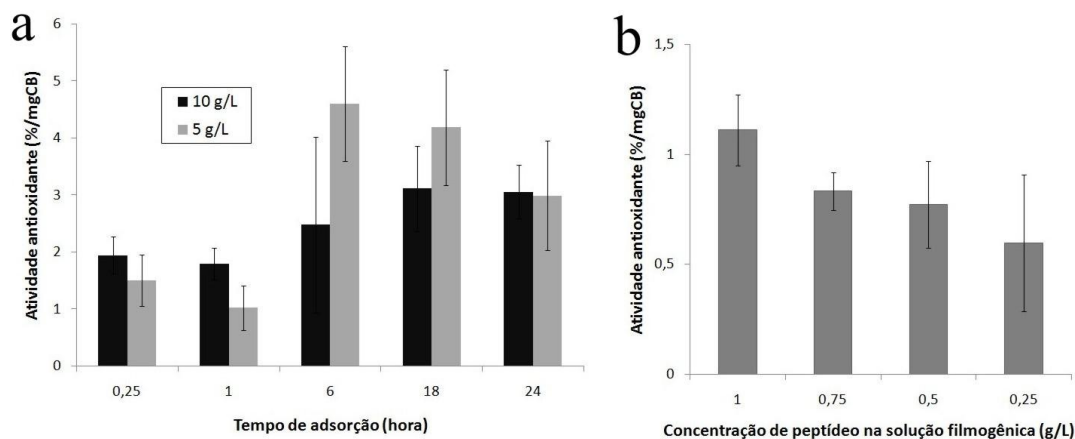


Figura 2 – Atividade antioxidante das películas íntegras de CB em função do tempo e concentração de PAGPT (a) e atividade antioxidante das películas de CBMF em função da concentração de PAGPT.

Quanto aos filmes de CBMF, todos apresentaram atividade na faixa estudada (Figura 2b). O filme controle (sem peptídeos) de CBMF não apresentou atividade antioxidante. A atividade dos filmes decresceu a medida que a concentração de peptídeos na mistura diminuiu, de forma que a maior atividade foi obtida no filme mais concentrado (1 g/l de PAGPT).

Comparando as duas formas de obtenção, a atividade variou de 1,02 a 4,6 %/mgCB nos filmes íntegros enquanto que nos filmes de CBMF o melhor resultado foi 1,1 %/mgCB. Contudo, os valores de eficiência de incorporação foram 263% e 324% para adsorção em CB íntegra e incorporação em CB microfluidizada, respectivamente. Valores de eficiência maior que 100% devem estar relacionados à separação de aglomerados de peptídeos durante a interação com a CB tanto na forma íntegra, quanto na forma microfluidizada. A inibição da ação antioxidante dos peptídeos pela presença de partículas maiores e interações entre eles tem sido relatada na literatura. Farvin *et al.* (2014), por exemplo, observaram menor atividade antioxidante no hidrolisado bruto de “Cod Fish” frente aos fracionados, especialmente na atividade quelante. A diferença da eficiência entre os dois processos de obtenção pode estar relacionada a maior interação dos peptídeos com os grupamentos aldeídos presentes na CB microfluidizada. A oxidação mediada a TEMPO realizada para obtenção da CBMF proporciona a inserção de grupos aldeídos na estrutura química e aumenta a versatilidade do material em algumas aplicações (Luo *et al.*, 2013).

Os perfis de degradação térmica das amostras de CBMF + pep 1%, CB íntegra controle (sem PAGPT) e CBMF controle (sem PAGPT) apresentam semelhança entre si com temperaturas iniciais ( $T_i$ ), finais ( $T_f$ ) e máximas ( $T_{máx}$ ) de degradação próximas (Figura 3 e Tabela 1). A oxidação a TEMPO não prejudicou a estabilidade térmica dos filmes de CBMF de forma expressiva embora haja a presença de um pico em 244°C (CBMF) e 252°C (CBMF + pep 1%) sugerindo menor estabilidade quando comparada com a CB nativa não oxidada. Os maiores teores de cinzas a 600°C em ambos os filmes de CBMF se devem a presença de carboxilato de sódio oriundos da celulose TEMPO-oxidada (Fukuzumi *et al.*, 2010). A presença dos peptídeos na película de CBMF + pep 1% também não prejudicou a estabilidade térmica do filme obtido.

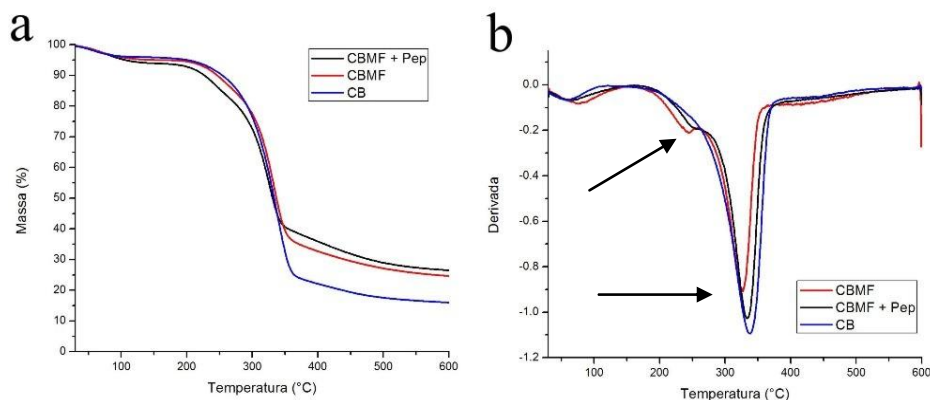


Figura 3 – Perfil termogravimétrico da película de celulose bacteriana íntegra (CB), filme de CB microfluidizada controle (CBMF) e filme de CBMF com 1g/L de peptídeos (CBMF + pep): TG (a), DTG (b)

Tabela 1 – Temperaturas iniciais e finais de degradação, picos de DTG e resíduos

Filme	Perda de massa			Picos de DTG - $T_{\max}$ (°C)	Resíduo em 600°C (%)
	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa no intervalo (Ti- Tf) (%)		
CB	211	372	70,66	337	15,94
CBMF	199	355	57,24	244, 333	24,58
CBMF + pep 1%	210	373	53,81	252, 327	26,47

## 4. CONCLUSÕES

Filmes antioxidantes de celulose bacteriana (CB) e CB microfluidizada (CBMF) podem ser obtidos através da incorporação de peptídeos antioxidantes da gelatina da pele de tilápia (PAGPT) pela técnica de adsorção e mistura respectivamente. Para os filmes de CB íntegra a maior atividade foi obtida na concentração inicial ( $C_i$ ) de 5 g/L de peptídeo e 6 horas de adsorção. Para os filmes de CBMF a maior atividade antioxidante foi obtida no filme com maior concentração de PAGPT (1 g/L). A incorporação de PAGPT nos filmes de CBMF não prejudicou a estabilidade térmica do filme obtido.

## 5. REFERÊNCIAS

- APPENDINI, P. and HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food Sci. & Emerg. Technol.* v. 3, p. 113-126, 2002
- CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A. and SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol. and Biotechnol.* v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
- COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci.*, v.78, n.1-2, p. 90–103, 2008.
- ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S. and MEDEIROS, E. A. A. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comp. Rev. Food Sci. and Food Saf.* v.11, 2012.
- FARIA, L. R. F.; FONSECA, T. F.; BRÍGIDA, A. I. S.; SILVA, C. M.; SANTOS, A. A. e AZEVEDO, T. L. Efeito das condições de reação na obtenção de hidrolisado de gelatina de tilápia com atividade antioxidante. *Congresso, Sinaferm*, 2015.
- FARVIN, K.H.S.; ANDERSEN, L.L.; NIELSEN, H.H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

hydrolysates: *In vitro* assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chem.*, v. 149, p. 326-334, 2014.

FILHO, M. M. S.; NUNES, Y. L.; CLAUDINO, R. L.; ROSA, M. F.; ITO, E. N.; FURTADO, A. A. L.; RODRIGUES, M. L. L. e MELO, E. F. Obtenção e caracterização de gelatina de pele de tilápia. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical*, ISSN 1679-6543, 64, 2012.

FUKUZUMI, H.; SAITO, T.; OKITA, Y.; ISOGAI, A. Thermal stabilization of TEMPO-oxidized cellulose, *Pol.Degrad. and Stab.*, v. 95, n. 9, p. 1502-1508, 2010.

GAO, C.; YAN, T.; DU, J.; HE, F.; LUO, H. and WAN, Y. Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilizing  $\epsilon$ -polylysine nanocoatings. *Food Hydrocoll.*, v. 36, p. 204-211, 2014.

HESTRIN, S. and SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.*, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.

ISOGAI, A.; SAITO, T. and FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*. v. 3, n. 1, p. 71-85, 2011.

LIMA, H. S. L. Avaliação do potencial do líquido de sisal e do suco de caju para a produção de celulose bacteriana. *Dissertação*, Fortaleza, 2012.

LIN, Q.; ZHENG, Y.; WANG, G.; SHI, X.; ZHANG, T.; YU, J.; SUN, J. Protein adsorption behaviors of carboxymethylated bacterial cellulose membranes. *Int. J. of Biol. Macromol.*, v. 73, p. 264-269, 2015

LIN, S. B.; CHEN, C. C.; CHEN, L. C. and CHEN, H. C. The bioactive composite film prepared from bacterial cellulose and modified by hydrolyzed gelatin peptide. *J. Biomat. App.* v. 29, n. 10, p. 1428-1438, 2015.

LUO, H.; XIONG, G.; HU, D.; REN, K.; YAO, F.; ZHU, Y.; GAO, C.; WAN, Y. Characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose scaffolds for tissue engineering applications. *Mater. Chem. and Phys.*, v. 143, n. 1, p. 373-379, 2013

NGUYEN, V. T.; GIDLEY, M. J. and DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microb.*, v. 25, n. 3, p. 471-478, 2008.

PAXIMADA, P.; TSOUKO, E.; KOPSAHELIS, N.; KOUTINAS, A. A. and MANDALA, I. Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. *Food Hydrocoll.* v. 53, p. 225-232, 2016.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O. and YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocoll.*, v. 35, p. 539-545, 2013.

YANG, J. I.; LIANG, W. S.; CHOW, C. J. and SIEBERT, K. J. Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. *Proc. Biochem.* v. 44, n. 10, p. 1152-1157, 2009.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

