

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**COENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS  
PROVENIENTES DE CULTIVO DE *Chryseobacterium* sp. kr6**

DIEGO BERTOLINI

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Folmer Corrêa

Porto Alegre

Março/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**COENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS  
PROVENIENTES DE CULTIVO DE *Chryseobacterium* sp. kr6**

Diego Bertolini  
Biomédico - UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Folmer Corrêa

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil  
Março/2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Bertolini, Diego  
Coencapsulação em lipossomas de compostos bioativos  
provenientes de cultivo de *Chryseobacterium* sp. kr6 /  
Diego Bertolini. -- 2019.  
103 f.  
Orientador: Adriano Brandelli.

Coorientadora: Ana Paula Folmer Corrêa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Peptídeos bioativos. 2. Pigmento. 3. Lipossomas.  
4. *Chryseobacterium* sp.. 5. Penas. I. Brandelli,  
Adriano, orient. II. Corrêa, Ana Paula Folmer,  
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Adriano, pela oportunidade e pela confiança, desde o meu TCC e durante o desenvolvimento do meu mestrado. Pela orientação, pelos ensinamentos e pela paciência.

À Ana Paula, também pela orientação e por ter sido sempre tão presente em todas as etapas do meu trabalho, mesmo com a distância física nos últimos meses do mestrado. Pelo conhecimento transmitido, pela paciência, pelo bom-humor e pela amizade.

Aos meus amigos do laboratório 218 e à Cris, do K106, pelo carinho, risadas, trocas de conhecimentos e experiências, por toda a ajuda e pela amizade e companheirismo formados durante o período do mestrado.

Aos meus amigos e amigas, que me acompanham desde a faculdade ou fora dela, pelo apoio e pelas conversas, desabafos, risadas, pelo ombro amigo e por compartilharem comigo os (muitos) dramas da pós-graduação.

À minha família, pelo apoio e amor incondicionais, por terem sempre estado comigo, mesmo nos momentos de dificuldade, me oferecendo suporte. Por toda a dedicação durante os altos e baixos do mestrado. Por terem sempre acreditado em mim e no meu potencial.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

# COENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS PROVENIENTES DE CULTIVO DE *Chryseobacterium* sp. kr6<sup>1</sup>

Autor: Diego Bertolini

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Folmer Corrêa

## RESUMO

Compostos com atividade biológica possuem um grande potencial para aplicação em diversas áreas, como alimentos, medicina e cosmética. Entretanto, sua sensibilidade a condições adversas e sua fácil degradação representam obstáculos para sua aplicação, sendo necessário o desenvolvimento de métodos seguros para a proteção desses compostos. O objetivo desse trabalho foi realizar a coencapsulação, em lipossomas de fosfatidilcolina (PC), de peptídeos bioativos de penas de frango hidrolisadas por *Chryseobacterium* sp. kr6 e de o pigmento produzido por essa linhagem bacteriana, além de caracterizar esses lipossomas quanto a suas características físico-químicas e atividades biológicas. Os lipossomas controle vazios apresentaram diâmetro médio de 168,5 nm, variando para 185,4, 102,0 e 98,5 nm com a encapsulação dos peptídeos e do pigmento e com a sua coencapsulação, respectivamente. Todas as formulações apresentaram distribuição de tamanho relativamente estreita e monodispersa. Os lipossomas controle apresentaram um potencial zeta de -20 mV, enquanto que as formulações contendo os compostos bioativos apresentaram potenciais iguais ou superiores, em módulo, a -30 mV, indicando estabilidade. As análises de infravermelho revelaram espectros típicos da PC, sugerindo a incorporação dos compostos no interior dos lipossomas. O ensaio de captura do radical ABTS demonstrou que a encapsulação não reduziu a atividade antioxidante dos compostos. Nenhuma das formulações apresentou atividade de inibição contra linhagens bacterianas, como demonstrado pelo ensaio de difusão em ágar. Dessa forma, é sugerido que a encapsulação em lipossomas é uma alternativa promissora para a aplicação de pigmentos e peptídeos bioativos.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98 p.) Março, 2019.

# CO-ENCAPSULATION IN LIPOSOMES OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM CULTURE OF *Chryseobacterium* sp. kr6<sup>1</sup>

Author: Diego Bertolini

Advisor: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Co-Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Folmer Corrêa

## ABSTRACT

Biologically active compounds have a great potential for application in several areas, such as food industry, medicine and cosmetics. However, their sensibility to adverse conditions and easy degradation represent an obstacle for their application, therefore it is necessary to develop safe methods for protecting these compounds. The aim of this study was to co-encapsulate, in phosphatidylcholine (PC) liposome, bioactive peptides obtained from chicken feathers hydrolyzed by *Chryseobacterium* sp. kr6 and the pigment produced by this strain and also to characterize these liposomes as to their physicochemical characteristics and biological activities. Control empty liposomes showed mean diameter of 168,5 nm, varying to 185,4, 102,0 and 98,5 nm after the encapsulation of the peptides and the pigment and their co-encapsulation, respectively. All formulations showed relatively narrow and monodisperse size distribution. Control liposomes presented zeta potential of -20,9 mV, while the formulations containing the bioactive compounds presented potentials of -30 mV or higher in magnitude, indicating stability. Infrared analysis revealed typical spectra for PC, suggesting the incorporation of the compounds within the liposomes. ABTS radical scavenging assay showed that the encapsulation did not reduce de antioxidant activity of the compounds. None of the formulations presented inhibitory activity against bacterial strains, as demonstrated by the agar diffusion assay. Thus, it is suggested that the encapsulation in liposomes is a promising alternative for application of pigments and bioactive peptides.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (98 p.) March, 2019.

## Sumário

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.2 Objetivo Geral.....	3
2.3 Objetivos Específicos .....	3
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
3.1 Compostos bioativos .....	4
3.1.1 Peptídeos bioativos.....	5
3.1.2 Pigmentos .....	9
3.1.2.1 Pigmentos microbianos .....	10
3.1.2.2 Pigmentos do tipo flexirubina .....	11
3.2 Queratinas .....	13
3.3 Gênero <i>Chryseobacterium</i> e linhagem kr6 .....	14
3.4 Nanotecnologia.....	16
3.5 Lipossomas .....	18
3.5.1 Preparação e caracterização de lipossomas.....	23
3.5.2 Aplicações.....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1 Microrganismo .....	29
4.2 Produção dos peptídeos bioativos.....	29
4.3 Extração do pigmento.....	29
4.4 Produção dos lipossomas.....	30
4.5 Caracterização físico-química dos lipossomas.....	31
4.5.1 Análises de espalhamento de luz e potencial zeta.....	31
4.5.2 Eficiência de encapsulação (EE).....	31
4.5.3 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	32
4.6 Determinação de atividades biológicas .....	32
4.6.1 Atividade antioxidante .....	32



4.6.2 Atividade antibacteriana .....	33
4.7 Análise estatística .....	33
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
5.1 Caracterização físico-química dos lipossomas .....	34
5.1.1 Análises de espalhamento de luz e potencial zeta .....	34
5.1.2 Eficiência de encapsulação (EE) .....	35
5.1.3 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	35
5.2 Determinação de atividades biológicas.....	37
5.2.1 Atividade antioxidante.....	37
5.2.2 Atividade antibacteriana .....	38
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
6.1 Caracterização físico-química dos lipossomas .....	40
6.1.1 Análises de espalhamento de luz e potencial zeta .....	40
6.1.2 Eficiência de encapsulação (EE) .....	42
6.1.3 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	44
6.2 Determinação de atividades biológicas.....	46
6.2.1 Atividade antioxidante.....	46
6.2.2 Atividade antibacteriana .....	48
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>9. APÊNDICES .....</b>	<b>68</b>
9.1 Artigo científico.....	68

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Determinação do tamanho, PDI, potencial  $\zeta$  e EE obtidos para os lipossomas. PC: lipossomas vazios; PC<sub>Pep</sub>: lipossomas contendo peptídeos; PC<sub>Pig</sub>: lipossomas contendo pigmento; PC<sub>P+P</sub>: lipossomas contendo peptídeos e pigmento coencapsulados .....**35**

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana dos compostos bioativos livres e após encapsulação em lipossomas. C: controle com DMSO; PC: lipossomas vazios; Pep: peptídeos livres; PC<sub>Pep</sub>: peptídeos encapsulados; Pig: pigmento livre; PC<sub>Pig</sub>: pigmento encapsulado; P+P: mistura dos peptídeos com o pigmento na forma livre; PC<sub>P+P</sub>: compostos coencapsulados.....**38**

### Artigo científico

**Table 1.** Determination of size, PDI,  $\zeta$  potential and EE of the liposomes. PC: empty liposomes; PC<sub>Pep</sub>: liposomes containing the peptides; PC<sub>Pig</sub>: liposomes containing the pigment; PC<sub>P+P</sub>: co-encapsulated compounds.....**75**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura geral de pigmentos do tipo flexirubina ..... 11
- Figura 2.** Representação esquemática de diferentes tipos de nanoestruturas... 18
- Figura 3.** Estrutura geral esquemática dos lipossomas em solução aquosa ..... 20
- Figura 4.** Diferentes morfologias possíveis para lipossomas. SUV: vesículas unilamelares pequenas; LUV: vesículas unilamelares grandes; MLV: vesículas multilamelares; MVV: vesículas multivesiculares ..... 21
- Figura 5.** Formulações de lipossomas produzidos pelo método de hidratação de filme. PC: lipossomas controle vazios; PC<sub>Pep</sub>: lipossomas encapsulando peptídeos; PC<sub>Pig</sub>: lipossomas encapsulando pigmento; PC<sub>P+P</sub>: lipossomas coencapsulando peptídeos e pigmento ..... 34
- Figura 6.** Espectro FTIR dos compostos bioativos livres e após encapsulação em lipossomas. (A) Peptídeos não encapsulados; (B) pigmento não encapsulado; (C) preparações de lipossomas. PC: lipossomas vazios; PC<sub>Pep</sub>: lipossomas contendo peptídeos; PC<sub>Pig</sub>: lipossomas contendo pigmento; PC<sub>P+P</sub>: lipossomas contendo peptídeos e pigmento coencapsulados ..... 36
- Figura 7.** Atividade antioxidante como % de captura do radical (A) e em miliequivalentes de Trolox. PC: lipossomas vazios; Pep: peptídeos livres; PC<sub>Pep</sub>: peptídeos encapsulados; Pig: pigmento livre; PC<sub>Pig</sub>: pigmento encapsulado; Pep+Pig: mistura dos peptídeos com o pigmento na forma livre; PC<sub>P+P</sub>: compostos coencapsulados ..... 38
- Figura 8.** Atividade antimicrobiana do extrato de pigmento a concentração de 10,0 mg/mL contra *Listeria monocytogenes* ATCC7644 ..... 39

### Artigo científico

- Figure 1.** FTIR spectra of free and encapsulated bioactive compounds. (A) Free peptides; (B) free pigment; (C) liposome formulations ..... 78
- Figure 2.** Antioxidant activity as % ABTS scavenging (A) and Trolox mEq (B). PC: empty liposomes; Pep: free peptides; PC<sub>Pep</sub>: encapsulated peptides; Pig: free pigment; PC<sub>Pig</sub>: encapsulated pigment; Pep+Pig association of free peptides and pigment; PC<sub>P+P</sub>: co-encapsulated compounds ..... 81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain-heart infusion</i> , Infusão de cérebro e coração
RDC	Resolução da diretoria colegiada
BHT	Hidroxitolueno butilado
BHA	Hidroxianisol butilado
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
RNA	Ácido ribonucleico
GC%	Porcentagem das bases guanina e citosina no genoma
ECA	Enzima conversora de angiotensina-I
KOH	Hidróxido de potássio
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> , Geralmente reconhecido como seguro
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i> , Vesícula unilamelar pequena
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i> , Vesícula unilamelar grande
MLV	<i>Multilamellar vesicle</i> , Vesícula multilamelar
MVV	<i>Multivesicular vesicle</i> , Vesícula multivesicular
PC	Fosfatidilcolina, Lipossomas vazios
T <sub>c</sub>	Temperatura de transição de fase
PEG	Polietilenoglicol
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> , Espalhamento de luz dinâmico
PDI	<i>Polydispersity index</i> , índice de polidispersividade
TEM	<i>Transmission electronic microscopy</i> , Microscopia eletrônica de transmissão
AFM	<i>Atomic force microscopy</i> , Microscopia de força atômica
EE	Eficiência de encapsulação
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , Cromatografia líquida de alta performance
DMSO	Dimetilsulfóxido
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectrum</i> , Espectro infravermelho com transformada de Fourier
KBr	Brometo de potássio
ABTS	2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino)-6-ácido sulfônico
UFC	Unidade formadora de colônia

Pep	Peptídeos
PC <sub>Pep</sub>	Peptídeos encapsulados em lipossomas
Pig	Pigmento
PC <sub>Pig</sub>	Pigmento encapsulado em lipossomas
Pep+Pig	Combinação de peptídeos e pigmento
PC <sub>P+P</sub>	Combinação de peptídeos e pigmento coencapsulados em lipossomas
mEq	Miliequivalentes
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , trifosfato de adenosina



## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos é continuamente confrontada com desafios tecnológicos para a produção de produtos seguros e de alta qualidade, além de buscar atender a demanda crescente dos consumidores por alimentos funcionais e que sejam minimamente processados. Atualmente, a indústria de alimentos é altamente dependente do uso de conservantes químicos, os quais podem ser prejudiciais à saúde humana, além de reduzirem o valor nutricional dos alimentos, sendo evidente a necessidade de desenvolver novas substâncias que possam substituir esses conservantes. Mais recentemente, tem sido observado um número crescente de estudos relacionados a substâncias naturais, conhecidas como compostos bioativos, que possam ser utilizadas em produtos alimentícios sem as desvantagens trazidas pelo uso de conservantes químicos.

Compostos bioativos são substâncias naturais que podem, ou não, ser essenciais para o organismo humano e que podem possuir um papel na promoção da saúde humana através da prevenção ou do combate a doenças (BIESALSKI et al., 2009; BRAGA; VIEIRA & DE OLIVEIRA, 2018). Esses compostos podem ser obtidos de uma vasta variedade de fontes, como, por exemplo, produtos de origem animal (CORRÊA et al., 2011; FONTOURA et al., 2014; LESNIEROWSKI & STANGIERSKI, 2018; ZOU et al., 2016), plantas (DURAK et al., 2013; PINILLA & BRANDELLI, 2016) e microrganismos (ARULDASS et al., 2016; JIMÉNEZ et al., 2018), além de poder exercer diferentes bioatividades no organismo humano (CORRÊA et al., 2011; ELBATANONY et al., 2019; MANN et al., 2014; VENIL et al., 2014).

Peptídeos bioativos são fragmentos proteicos criptografados na sequência de proteínas nativas e exercem efeitos benéficos na saúde humana após serem liberados de suas sequências parentais através de hidrólise. Além de serem uma forma simples de produzir alimentos funcionais, a geração e aplicação de peptídeos bioativos de diferentes fontes é uma forma eficaz de lidar com o excesso de subprodutos gerados pela indústria de alimentos (CORRÊA et al., 2011; FONTOURA et al., 2014; HALIM, YUSOF & SARBON, 2016; RYDER et al., 2016). Possivelmente a forma mais vantajosa de gerar peptídeos bioativos é a hidrólise enzimática, uma vez que essa é mais específica, menos provável de gerar substâncias tóxicas e reduzir o valor nutricional das proteínas, além de

ocorrer em condições mais brandas de pH e temperatura em comparação à hidrólise química (HIJAZIN, SIMÕES & SILVEIRA, 2010; LORENZO et al., 2018). Nesse contexto, o uso de enzimas hidrolíticas obtidas de microrganismos como forma de produzir peptídeos bioativos é uma tendência crescente (CORRÊA et al., 2014; BRANDELLI, SALA & KALIL, 2015; AGUILAR & SATO, 2018).

Pigmentos são de grande interesse na indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética e têxtil, tendo sido largamente utilizados para tornar produtos esteticamente mais atrativos ao consumidor. Pigmentos microbianos possuem vantagens sobre pigmentos sintéticos ou vegetais, principalmente em virtude de sua estabilidade, disponibilidade de diversas fontes ambientais e por serem relativamente fáceis de se obter e extrair (ARULDASS, DUFOSSÉ & AHMAD, 2018). Diversas pesquisas têm focado na bioatividade de pigmentos bacterianos, uma vez que são conhecidos por exercerem diferentes efeitos biológicos (CORREA-LLANTÉN, AMENÁBAR & BLAMEY, 2012; VENIL et al., 2016; JIMÉNEZ et al., 2018).

Apesar de seu enorme potencial para diferentes usos industriais, a aplicabilidade de compostos bioativos é dificultada por sua baixa estabilidade a condições ambientais adversas. Essa limitação, no entanto, pode ser superada com o emprego de métodos de encapsulação, capazes de proteger esses compostos da degradação (BRANDELLI, 2012). Lipossomas são normalmente considerados mais apropriados para aplicação em matrizes alimentícias, principalmente por não serem tóxicos, por sua biocompatibilidade e por serem bem caracterizados e facilmente produzidos (IMRAN et al., 2015; MOZAFARI et al., 2008). Lipossomas consistem de um núcleo aquoso envolto por uma ou mais bicamadas fosfolípídicas formando vesículas esféricas, sendo adequados para a encapsulação tanto de materiais anfifílicos, quanto hidrofílicos ou lipofílicos. Na indústria de alimentos, lipossomas têm sido usados como sistemas para encapsulação e liberação controlada de diversos compostos bioativos, como proteínas, enzimas, vitaminas e antioxidantes (TAYLOR et al., 2005; MOZAFARI et al., 2008). Deste modo, este trabalho teve como objetivo produzir, caracterizar e avaliar as atividades biológicas de lipossomas coencapsulando peptídeos bioativos obtidos da hidrólise enzimática de penas de frango por *Chryseobacterium* sp. kr6 e um pigmento extraído desta linhagem.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Encapsular em lipossomas, de forma isolada e em conjunto, peptídeos bioativos obtidos da hidrólise enzimática de pena de frango e um pigmento do tipo flexirubina, obtidos a partir de um cultivo de *Chryseobacterium* sp. kr6 cultivado em ágar BHI.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Produzir peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de penas de frango por *Chryseobacterium* sp. kr6.
- 2.2.2 Extrair o pigmento do tipo flexirubina produzido por *Chryseobacterium* sp. kr6 cultivado em ágar BHI.
- 2.2.3 Produzir lipossomas encapsulando os peptídeos e o pigmento separadamente e coencapsulando ambos os compostos.
- 2.2.4 Avaliar a bioatividade dos compostos, separadamente e em conjunto, antes e após a encapsulação, por meio de ensaios de atividade antioxidante e antibacteriana.
- 2.2.5 Fazer a caracterização dos lipossomas produzidos quanto a seu tamanho, polidispersividade, potencial zeta, espectro infravermelho e eficiência de encapsulação.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Compostos bioativos

De acordo com a resolução da diretoria colegiada RDC 02/2002, substâncias bioativas em alimentos são definidas como substâncias nutrientes, ou não, que possuem uma ação metabólica ou fisiológica específica. De uma forma mais geral, compostos bioativos são substâncias naturais, sejam elas essenciais ou não ao funcionamento normal do organismo humano, que sejam capazes de modular processos fisiológicos, proporcionando efeitos benéficos à saúde humana além do valor nutricional básico do produto (BIESALSKI et al., 2009).

Diferentes classes de compostos bioativos são encontrados em alimentos, como, carotenoides, flavonoides, curcuminoides, fitosteróis e alguns ácidos graxos (MCCLEMENTS & XIAO, 2017). Tais compostos podem estar presentes em alimentos, tanto naturalmente quanto em formulações alimentícias processadas, e são comumente conhecidos como nutracêuticos (KHORASANI, DANAEI & MOZAFARI, 2018; MCCLEMENTS & XIAO, 2017). Um nutracêutico pode ser qualquer componente não-tóxico presente em alimentos que comprovadamente traz benefícios à saúde humana, geralmente consistindo de produtos à base de plantas, vitaminas, minerais, aminoácidos, proteínas e enzimas, além de prebióticos e probióticos (SHINDE et al., 2014; KHORASANI, DANAEI & MOZAFARI, 2018).

Além dos nutracêuticos, compostos bioativos podem ser obtidos de fontes menos convencionais, ou seja, de produtos ou matérias-primas não normalmente utilizados diretamente na dieta humana. Por exemplo, microalgas são conhecidas por serem capazes de produzir uma variedade de compostos utilizáveis na nutrição e na saúde humana, como peptídeos, lipídios, pigmentos ou carboidratos, com larga aplicabilidade em virtude de suas capacidades bioativas ou por servirem como suplementos prebióticos (RIZWAN et al., 2018). Além disso, o grande volume de resíduos gerados pela indústria representa uma fonte promissora de compostos bioativos. Subprodutos e resíduos da indústria de alimentos podem ser reaproveitados, servindo de fonte para a geração de compostos com atividade biológica, reduzindo seu impacto no meio ambiente e otimizando a cadeia de produção (ARROYO et al., 2019). Como exemplo, podemos citar a produção de peptídeos bioativos através da hidrólise de frações proteicas do leite (CORRÊA et

al., 2011, 2014), a obtenção de compostos fenólicos e vitaminas da extração do bagaço de uvas restante da produção de vinhos (BARBA et al., 2016), extração de compostos fenólicos, glicosídeos e enzimas de cascas e sementes de frutas (ASIF et al., 2016; SEPÚLVEDA et al., 2018) e a produção de peptídeos antioxidantes a partir da hidrólise de resíduos queratinosos provenientes da avicultura (FONTOURA et al., 2014; YEO et al., 2018).

Além de benefícios diretos à saúde, compostos bioativos também podem ser utilizados na conservação de alimentos. Ao contrário do que ocorre em organismos vivos, a degradação de alimentos possui um caráter irreversível. No entanto, é possível retardar essa degradação, impedindo que o alimento perca suas características nutricionais e organolépticas e, conseqüentemente, sua qualidade. Nesse sentido, os compostos bioativos podem contribuir na preservação dos alimentos, uma vez que tais compostos podem possuir capacidade de inibir reações de oxidação e peroxidação lipídica, além de contribuir no controle de uma vasta gama de bactérias e fungos patogênicos e degradadores de importância na indústria de alimentos (PINA-PÉREZ et al., 2017; LORENZO et al., 2018; ARROYO et al., 2019). Tais características permitem que os compostos bioativos possam trazer benefícios à saúde humana indiretamente, além de substituírem conservantes químicos, que podem ser prejudiciais à saúde e reduzir o valor nutricional de produtos alimentícios.

### 3.1.1 Peptídeos bioativos

A importância das proteínas na dieta é amplamente reconhecida, uma vez que já se reconhece a relação entre dieta e saúde como um fator chave na prevenção e no combate a doenças e promoção do bem-estar. As proteínas são um dos mais importantes componentes de alimentos, especialmente aquelas provenientes de produtos de origem animal, como carne, leite e ovos, possuindo propriedades nutricionais, funcionais e biológicas diversas (TOLDRÁ et al., 2018). A importância das proteínas como uma fonte essencial de aminoácidos já tem sido bem documentada, entretanto, mais recentemente, tem sido reconhecido que as proteínas da dieta podem exercer outras funcionalidades além de seu valor nutricional por meio de peptídeos biologicamente ativos. Esses peptídeos, no entanto, permanecem inativos dentro das seqüências das proteínas precursoras,

sendo capazes de exercer sua atividade apenas após serem liberadas dessas sequências por meio de hidrólise por enzimas digestivas, por fermentação microbiológica, ou durante o processamento dos alimentos (MANN et al., 2019). Dessa forma, peptídeos bioativos podem ser definidos, segundo KITTTS & WEILER, (2003), como fragmentos específicos de proteínas que, uma vez produzidos por meio de hidrólise, possuem um impacto positivo sobre as funções fisiológicas do organismo, podendo, em última análise, influenciar positivamente a saúde.

Peptídeos bioativos podem ser liberados de suas sequências parentais por cinco formas, basicamente: a) hidrólise enzimática por enzimas digestivas, b) fermentação por cultivos microbianos, c) proteólise por enzimas provenientes de microrganismos ou plantas, d) durante o processamento de produtos alimentícios, e) hidrólise química, utilizando ácidos ou álcalis (KORHONEN & PIHLANTO, 2003; LORENZO et al., 2018). O processamento tradicional de alimentos emprega tanto microrganismos quanto enzimas para alterar a estrutura do alimento, impactando profundamente o perfil peptídico do produto final (LORENZO et al., 2018).

A geração de peptídeos bioativos através da hidrólise de proteínas precursoras pode ser catalisada por ácidos, álcalis ou por enzimas hidrolíticas. No entanto, a hidrólise química tende a ser um processo de difícil controle, sendo totalmente inespecífica, podendo destruir certos aminoácidos, como triptofano, lisina e treonina, e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, além de poder levar à formação de substâncias tóxicas, comprometendo o valor nutricional do hidrolisado final (ADLER-NISSEN, 1985; CLEMENTE, 2000; HIJAZIN, SIMÕES & SILVEIRA, 2010). A hidrólise enzimática, por outro lado, oferece vantagens quando comparada à hidrólise ácida ou alcalina, uma vez que ocorre em condições mais brandas de temperatura e pH, possui maior especificidade, fácil controle de reação e do grau de hidrólise e formação mínima de subprodutos indesejados, além da possibilidade de utilização das enzimas em concentrações reduzidas (CLEMENTE, 2000; HIJAZIN, SIMÕES & SILVEIRA, 2010).

As proteínas do leite têm sido consideradas as mais importantes fontes de peptídeos bioativos, com diversos estudos tendo sido realizados nos últimos anos focando no uso de proteases para a geração de peptídeos biologicamente ativos a partir das frações proteicas do leite, as caseínas e as proteínas do soro (CORRÊA, 2013). Entretanto, existe uma infinidade de diferentes fontes que podem ser utilizadas na obtenção de peptídeos bioativos, desde fontes vegetais, até fontes

animais ou resíduos (FONTOURA et al., 2014; RYDER et al., 2016; LEE & HUR, 2017; GIANFRANCESCHI et al., 2018). Tais peptídeos são compostos por sequências de 2 a 30 aminoácidos, tamanho que os torna menos suscetíveis à degradação enzimática e melhora sua biodisponibilidade (RYDER et al., 2016), podendo possuir diferentes efeitos biológicos, incluindo atividades antiproliferativa, anti-hipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, anticolesterolêmica, opioide, antidiabética, antitrombótica e imunomodulatória, entre outras (ARSHAD et al., 2019). A atividade exercida pelos peptídeos e a sua especificidade, contudo, dependem de seu tamanho, sequência, estrutura, carga elétrica e hidrofobicidade, sendo que uma única sequência peptídica pode ser capaz de exercer diferentes efeitos biológicos (GIANFRANCESCHI et al., 2018; ARSHAD et al., 2019).

Apesar da diversidade de peptídeos bioativos que podem exercer variadas atividades biológicas, possivelmente os de maior importância na indústria de alimentos sejam os peptídeos antioxidantes e antimicrobianos, uma vez que reações de oxidação em alimentos e contaminação microbiológica são as principais causas de deterioração de produtos alimentícios (ANTOLOVICH et al., 2002; GRAM et al., 2002).

Reações de oxidação podem afetar diferentes biomoléculas, como lipídios, proteínas e carboidratos, no entanto, a oxidação lipídica é a principal causa de deterioração em alimentos, tanto por ser responsável pela perda da qualidade e do valor nutricional do alimento, quanto por gerar produtos que reagem com proteínas, levando à oxidação também dessas moléculas (VILJANEN et al., 2004; SARMADI & ISMAIL, 2010). Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em concentrações reduzidas em relação a um substrato oxidável, podem inibir ou retardar significativamente a reação de oxidação deste substrato. Tais compostos não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, uma vez que são estáveis tanto na forma reduzida quanto na oxidada (LOBO et al., 2010).

Antioxidantes sintéticos, como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), são utilizados atualmente como agentes antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos (JIANG et al., 2018). No entanto, existe uma preocupação com o uso de compostos sintéticos, uma vez que esses podem ser prejudiciais à saúde, havendo um crescente interesse no uso de antioxidantes naturais, com peptídeos antioxidantes recebendo destaque pela

possibilidade de serem isolados de uma variedade de fontes animais e vegetais (MATSUI et al., 2018). A capacidade antioxidante desses peptídeos é determinada pelo seu tamanho, pela sua estrutura e pela sua composição e sequência de aminoácidos (SARMADI & ISMAIL, 2010). Com relação a tais características, a literatura documenta o teor de aminoácidos hidrofóbicos como um dos principais fatores que influenciam a capacidade antioxidante de peptídeos bioativos, com uma maior quantidade de resíduos hidrofóbicos conferindo maior atividade antioxidante (POWNALL, UDENIGWE & ALUKO, 2010; JIANG et al., 2018; MATSUI et al., 2018).

A deterioração microbiológica é a causa mais comum de degradação de alimentos, podendo se manifestar como um crescimento visível (na forma de colônias ou limo), através de mudanças texturais no alimento ou pelo surgimento de odores ou sabores desagradáveis (GRAM et al., 2002). Além disso, no curso das últimas décadas tem sido observado um número crescente de microrganismos resistentes a antibióticos convencionais, causado pelo uso indiscriminado dessas substâncias e pela capacidade genética de mutação dos microrganismos (DE CASTRO & SATO, 2015). Com isso, existe um maior interesse no desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos naturais que, além de potencialmente possibilitarem contornar a problemática da resistência a antimicrobianos, também possuem a vantagem de apresentar baixa toxicidade e maior especificidade. Peptídeos antimicrobianos estão naturalmente presentes na natureza, sendo essenciais para o sistema imunológico por serem a primeira linha de defesa contra a colonização por microrganismos exógenos (DE CASTRO & SATO, 2015). Uma grande quantidade de peptídeos antimicrobianos possui origem no sistema imunológico animal, como a pleurocidina, lactoferrina, lisozima e as defensinas (PISOSCHI et al., 2018).

Diversos gêneros bacterianos também são conhecidos por produzirem peptídeos antimicrobianos, como as bacteriocinas nisina, produzida por *Lactococcus* sp. (LOPES, PINILLA & BRANDELLI, 2017) e pediocina, produzida por *Pediococcus* sp. (SKARIYACHAN & GOVINDARAJAN, 2019). A maioria dos peptídeos antimicrobianos compartilham a característica de serem sequências curtas compostas majoritariamente por resíduos de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos, características imperativas para sua atividade (DE CASTRO & SATO, 2015; PINAZO et al., 2016). De uma forma geral, primeiramente é estabelecido uma interação eletrostática entre o peptídeo catiônico e a membrana bacteriana negativamente carregada. O caráter hidrofóbico dos peptídeos, então, permite a sua interação com

a porção hidrofóbica da membrana, resultando na formação de um canal transmembrana transiente, interferindo com a permeabilidade seletiva da célula ou com a geração de energia, ou também podendo gerar a ruptura da célula (MOSQUERA et al., 2016; AHMED & CHUN, 2018). No entanto, o alvo dos peptídeos antimicrobianos não é sempre a membrana, uma vez que eles podem transpô-la e agir sobre componentes intracelulares, interferindo em funções celulares essenciais ou causando a floculação do citoplasma (BENKERROUM, 2010).

### 3.1.2 Pigmentos

Pigmentos são compostos orgânicos ou inorgânicos, insolúveis em água, considerados de grande interesse na indústria de alimentos, cosmética e têxtil, sendo largamente utilizados com o intuito de tornar o produto mais atrativo ao consumidor, mas também na indústria farmacêutica por possuírem, muitas vezes, atividades biológicas de interesse médico. Apesar de os diferentes tipos de pigmentos poderem ser quimicamente heterogêneos e biossinteticamente não relacionados, todos possuem uma característica comum: suas estruturas moleculares possuem cromóforos, responsáveis por conferir aos pigmentos suas cores características (PEREIRA, VALENTÃO & ANDRADE, 2014).

Pigmentos podem tanto ser produzidos sinteticamente quanto obtidos de fontes naturais pelo uso de diferentes métodos de extração físicos ou químicos. No entanto, apesar de pigmentos sintéticos serem largamente utilizados na indústria, muitos apresentam notável toxicidade, sendo altamente prejudiciais à saúde, o que tem motivado a redução da utilização desses compostos e sua substituição por corantes naturais, os quais, em geral, não são tóxicos ou carcinogênicos, além de serem biodegradáveis (VENIL, ZAKARIA & AHMAD, 2013).

Na natureza, pigmentos estão presentes em todas as classes taxonômicas, ocorrendo amplamente em vegetais, microrganismos, microalgas e até mesmo no reino animal (PEREIRA, VALENTÃO & ANDRADE, 2014; ARULDASS, DUFOSSÉ & AHMAD, 2018). Dentre as classes de pigmentos naturais, os carotenoides extraídos de plantas têm sido os mais extensivamente estudados. No entanto, de acordo com estudos recentes, está cada vez mais evidente que pigmentos de origem microbiana são mais vantajosos se comparados a pigmentos

de origem vegetal e, evidentemente, pigmentos sintéticos, principalmente por sua estabilidade, disponibilidade independente de variações sazonais, custo-benefício e disponibilidade de métodos simples para extração, além de ser possível aumentar seu rendimento através de melhoramento genético de linhagens microbianas (NIGAM & LUKE, 2016). Em especial, o custo da extração de pigmentos bacterianos pode ser minimizado através de processos biotecnológicos de melhoramento genético, descoberta de novas linhagens bacterianas altamente pigmentadas e com o aproveitamento de resíduos da indústria agrícola como substratos (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014; ARULDASS et al., 2016).

### 3.1.2.1 Pigmentos microbianos

Apesar da maioria dos estudos a respeito desses compostos ainda estar na fase de pesquisa e desenvolvimento, a produção de pigmentos microbianos é, atualmente, um campo crescente na pesquisa, uma vez que várias aplicações industriais já foram demonstradas (VENIL, ZAKARIA & AHMAD, 2013). Pigmentos extraídos de fontes naturais, incluindo microrganismos, possuem usos variados na produção de produtos do dia-a-dia, como a pigmentação de papéis, coloração de roupas e tecidos na indústria têxtil, na indústria de alimentos, como corantes alimentares, além de também possuírem emprego na prática agrícola (NUMAN et al., 2018a).

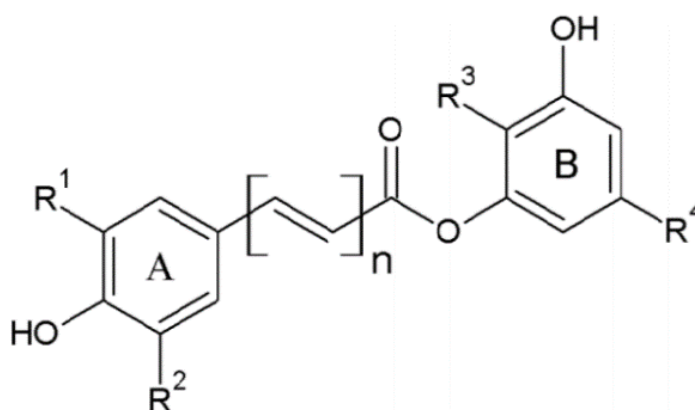
O interesse em pigmentos microbianos, entretanto, vem crescendo consideravelmente em anos mais recentes porque, além das aplicações já citadas anteriormente, esses pigmentos são capazes de exercer uma larga gama de bioatividades de interesse farmacológico, como capacidade antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, potencial cicatrizante, como provitamina A, entre outras (UNGUREANU et al., 2011; SUN et al., 2012; UMADEVI & KRISHNAVENI, 2013; TULI et al., 2015; JIMTHA et al., 2017; JIMÉNEZ et al., 2018; NUMAN et al., 2018b; MAJUMDAR et al., 2019). Outro fato que evidencia o potencial para aplicação de pigmentos microbianos é sua baixa toxicidade. VENIL et al. (2017) documenta que, em um estudo de toxicidade aguda e sub-aguda do pigmento tipo flexirubina produzido por *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497, nenhum sinal de toxicidade foi observado; a administração do pigmento em doses até 5.000 mg/kg em ratos Sprage-Dawley não causou a mortalidade de animais, além de não serem



observadas alterações físicas, comportamentais, bioquímicas ou hematológicas após o tratamento. Evidências de mutagenicidade também não foram observadas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Já NUMAN et al. (2018b) avaliou, dentre diferentes efeitos farmacológicos, a hemocompatibilidade do pigmento produzido por *Arthrobacter gandavensis*, representada pelo grau de hemólise após incubação de hemácias humanas com o pigmento em concentrações de 100 a 1.000 µg/mL. Foram observados níveis desprezíveis de hemólise mesmo nas mais altas concentrações avaliadas, resultado que sugere a segurança deste pigmento para o uso humano.

### 3.1.2.2 Pigmentos do tipo flexirubina

Pigmentos do tipo flexirubina são, estruturalmente, aril-poliênos contendo um cromóforo de ácido poliênico terminado em um grupamento hidroxifenílico e esterificado com um resorcinol dialquilado. Variações na estrutura desses pigmentos (Figura 1) podem ocorrer no comprimento da cadeia do polieno (6 a 8 ligações duplas), no substituinte (metil ou cloro) na meta posição dos grupamentos fenil e no substituinte alquila do resorcinol (ACHENBACH et al., 1983; OREN, 2011; SCHÖNER et al., 2014). Estudos utilizando precursores radioativos e degradação química demonstraram que a tirosina serve como precursor do anel benzênico (anel A), bem como dos primeiros três átomos de carbono da cadeia do polieno. Além disso, foi observado que a maior parte da cadeia poliênica e do anel do resorcinol esterificado (anel B) com seus substituintes possui o acetato como precursor (REICHENBACH, KLEINIG & ACHENBACH, 1974).



**Figura 1.** Estrutura geral de pigmentos do tipo flexirubina.

A flexirubina foi isolada e caracterizada pela primeira vez em 1974 de uma linhagem de *Flexibacter elegans* por REICHENBACH & KLEINIG, sendo posteriormente identificados pigmentos do tipo flexirubina em outras bactérias da família Flavobacteriaceae (BOWMAN, 2000; SHIMOMURA, KAJI & HIRAIISHI, 2005; VENIL et al., 2014; WEN et al., 2016). Por muito tempo, acreditava-se que a flexirubina se tratava de um pigmento carotenóide. Entretanto, após caracterização química e física, se constatou que, na realidade, se tratava de uma nova classe de pigmentos (REICHENBACH, KLEINIG & ACHENBACH, 1974; ACHENBACH et al., 1983). Estando essa informação estabelecida, e com o conhecimento de que cada gênero bacteriano produtor de pigmentos do tipo flexirubina produz variações especificamente modificadas, somado ao fato de que tais pigmentos possuem uma distribuição bastante limitada, os pigmentos dessa classe podem ser considerados excelentes marcadores quimiosistemáticos (REICHENBACH, KLEINIG & ACHENBACH, 1974; FAUTZ & REICHENBACH, 1979). Em algumas bactérias das famílias Flavobacteriaceae, Cytophagaceae e Chitinophagaceae, os pigmentos do tipo flexirubina podem estar presentes juntamente com pigmentos carotenóides (BERNARDET & BOWMAN, 2010). Diferentes atividades biológicas já foram reportadas nesses pigmentos, desde atividades antioxidantes e antimicrobianas, até sua utilização no tratamento de doenças crônicas de pele, eczema e úlceras gástricas (KIM, 2013).

A produção de pigmentos do tipo flexirubina pode ser verificada por meio de um teste simples. Este teste se baseia na mudança de cor de colônias produtoras de flexirubinas de amarelo ou laranja para vermelho, roxo ou marrom ao entrarem em contato com uma solução alcalina de KOH 20%, sendo a cor das colônias revertida para a original após neutralização do pH. Esse teste pode ser útil quando aliado à extração do pigmento com acetona, seguida por cromatografia em sílica gel ou camada delgada, além de verificar o espectro de absorção de luz do pigmento purificado antes e depois do teste de mudança de cor. No entanto, mudanças sutis na composição do pigmento seriam capazes de tornar o teste ineficaz para a identificação de flexirubinas, além do fato de outros tipos de pigmentos, como as xantomadinas ou carotenóides fenólicos, poderem possuir similaridades estruturais às flexirubinas, levando a resultados falso-positivos. Análises utilizando precursores radioativamente marcados servem como testes mais específicos e precisos, baseando-se no fato de que a tirosina é um precursor presente apenas na

biossíntese de flexirubinas, enquanto que o malevonato não é incorporado nesses pigmentos (FAUTZ & REICHENBACH, 1980).

### 3.2 Queratinas

Queratinas são proteínas estruturais insolúveis encontradas na epiderme e em anexos epidérmicos de vertebrados superiores, sendo constituintes de cabelos, lãs, unhas, cascos, chifres, bicos e penas, especialmente abundantes em abatedouros. Resíduos ricos em queratina são de difícil degradação por essas proteínas serem densamente enoveladas e fortemente estabilizadas por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Pontes dissulfeto também estão presentes em grande quantidade na estrutura das queratinas, fazendo ligações cruzadas entre cadeias peptídicas e, conseqüentemente, conferindo grande estabilidade mecânica e resistência à hidrólise por proteases comuns (BRANDELLI, DAROIT & RIFFEL, 2010; KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & JUSTYNA, 2011). Em virtude dessas características, que conferem uma alta recalcitrância, as queratinas acabam por representar um desafio ao manejo de resíduos, uma vez que enormes quantidades de queratina são geradas da atividade agroindustrial em todo o mundo.

Dentre as diferentes queratinas, aquelas constituintes de penas são consideradas as mais complexas. Elas são compostas por aproximadamente 20 tipos, diferindo entre si por apenas alguns aminoácidos. A distribuição de aminoácidos nas moléculas dessas queratinas também não é homogênea, com regiões da cadeia polipeptídica concentrando resíduos ácidos, básicos ou hidrofóbicos. Por causa dessa complexidade, o ataque químico ou enzimático às queratinas de penas não é uniforme, diferente de queratinas provenientes de lã ou pelos (FERRARO, ANTON & SANTÉ-LHOUTELLIER, 2016).

Dito isso, na natureza as queratinas são degradadas com relativa rapidez e eficiência por microrganismos queratinolíticos, ou seja, microrganismos capazes de metabolizar queratinas e utilizá-las como fonte única de carbono, nitrogênio, enxofre e energia através da produção de enzimas queratinolíticas (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & JUSTYNA, 2011). Enzimas queratinolíticas são produzidas por fungos, actinomicetos e bactérias, sendo frequentemente isoladas de microrganismos presentes em solos onde ocorre deposição de material queratinoso (BRANDELLI, DAROIT & RIFFEL, 2010).

Apesar de queratinas serem utilizadas predominantemente para fins de aplicação na indústria cosmética, com seu potencial para geração de peptídeos bioativos não sendo plenamente explorado até então (FERRARO, ANTON & SANTÉ-LHOUELIER, 2016), diversos trabalhos nas últimas décadas já têm abordado a utilização dessa classe de proteínas para esse fim (HOLKAR et al., 2018). Muitos desses estudos destacam a utilização de penas como fonte de queratinas, uma vez que estas possuem uma alta composição de proteínas (aproximadamente 90% de seu peso), sendo uma fonte promissora para produção de hidrolisados proteicos a baixo custo. O gênero *Bacillus* sp. se destaca como um produtor de queratinases, sendo o mais utilizado em estudos de geração de hidrolisados queratinoso com atividade biológica (BRANDELLI, DAROIT & RIFFEL, 2010; FAKHFAKH et al., 2011; CALLEGARO, WELTER & DAROIT, 2018). Entretanto, outros gêneros bacterianos já foram documentados por serem produtores de enzimas queratinolíticas com aplicação na geração de peptídeos bioativos, como *Vibrio* sp. (SANGALI & BRANDELLI, 2000), *Chryseobacterium* sp. (RIFFEL et al., 2003) e *Fervidobacterium* sp. (YEO et al., 2018).

### 3.3 Gênero *Chryseobacterium* sp. e linhagem kr6

O gênero *Chryseobacterium* sp., pertencente à família Flavobacteriaceae e ao filo Bacteroidetes, foi descrito pela primeira vez por VANDAMME e colaboradores (1994). Esse gênero foi introduzido após a reclassificação de membros do gênero *Flavobacterium* sp., realizada com base em estudos de similaridade de RNA ribossomal, uma vez que a descrição original desse gênero se baseou em parâmetros de pouca importância taxonômica. As características principais do gênero *Chryseobacterium* sp. são: bactérias Gram-negativas, sem motilidade e não-esporuladas; crescimento na forma de colônias circulares, lisas, convexas e brilhantes, apresentando pigmentação (amarelas ou alaranjadas) em virtude da produção de pigmentos do tipo flexirubina; metabolismo aeróbico, quimiorganotrófico e com temperatura ótima de crescimento de 30°C, com a maioria das linhagens também crescendo bem a 37°C; membrana citoplasmática com predominância de ácidos graxos de cadeia ramificada, genoma com conteúdo GC (GC%) de 33 a 39 mol% e menaquinona 6 como a única quinona presente no processo de respiração. A espécie *C. gleum* é a espécie tipo deste gênero

(VANDAMME et al., 1994; BERNARDET, HUGO & BRUUN, 2006).

Após sua primeira caracterização, o gênero se expandiu rapidamente, atualmente possuindo mais de 50 espécies. Bactérias desse gênero são ubíquas na natureza, sendo encontradas principalmente em amostras de solo e água. No entanto, espécies já foram isoladas das mais variadas fontes, como laticínios (HUGO et al., 2003), peixes (ZAMORA et al., 2012), carne de frango e plantas avícolas (RIFFEL et al., 2003; KÄMPFER et al., 2014), rizomas de plantas (CHO et al., 2010; KÄMPFER et al., 2014), resíduos e sedimentos industriais contaminados (PIRES et al., 2010; KÄMPFER et al., 2015) e até mesmo de ambientes polares (BAJERSKI et al., 2013). Apesar de não ser considerado especialmente patogênico, o gênero *Chryseobacterium* sp. pode ser um patógeno de humanos, mesmo que raramente, na maioria das vezes sendo um patógeno oportunista isolado, principalmente, em crianças ou pacientes imunocomprometidos (DOUVOYIANNIS et al., 2010). Isolados já foram identificados em feridas causadas por queimaduras (KIENZLE, MULLER & PEGG, 2001), em pacientes acometidos de fibrose cística (LAMBIASE et al., 2007), causando bacteremia ou pneumonia em infantes (DOUVOYIANNIS et al., 2010; ABDALHAMID et al., 2016), além de infecções intra-abdominais, endocardites, meningites e infecções associadas a acessos intravenosos, como cateteres (BOOTH, 2014).

Mais recentemente, estudos demonstraram que o gênero *Chryseobacterium* sp. é produtor de importantes compostos bioativos, como agentes de biocontrole, probióticos, sulfobacinas e proteases (RIFFEL et al., 2003; CHAUDHARI et al., 2009; KIM et al., 2012), além de pigmentos do tipo flexirubina com atividades biológicas, caracteristicamente produzidos pelo gênero (VENIL ET AL., 2014; ARULDASS, DUFOSSÉ & AHMAD, 2018; JIMÉNEZ et al., 2018).

*Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 foi isolada do efluente de uma indústria de processamento de aves e descrita e caracterizada pela primeira vez por RIFFEL e colaboradores (2003). Por ser produtora de uma queratinase, esta linhagem é capaz de crescer em meio contendo penas como única fonte de carbono, nitrogênio, enxofre e energia, conseguindo degradar completamente as penas, sugerindo um potencial em processos biotecnológicos envolvendo queratinólise (RIFFEL et al., 2003). Além de queratinas, a queratinase produzida pela linhagem kr6 também é capaz de hidrolisar outras proteínas, como caseína, albumina e hemoglobina, e pode ser purificada a partir do sobrenadante de um cultivo em meio

mineral mínimo contendo farinha de pena (0,5 g/L de NaCl, 0,4 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,015 g/L de  $\text{CaCl}_2$  e 10 g/L de farinha de pena) (RIFFEL et al., 2007; SILVEIRA, JAEGER & BRANDELLI, 2008). A linhagem *Chryseobacterium* sp. kr6 também é uma boa produtora de compostos bioativos, uma vez que a hidrólise de penas por essa linhagem gera peptídeos bioativos com atividade antioxidante e de inibição da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) e da dipeptidil peptidase-IV (FONTOURA et al., 2014), além de produzir um pigmento do tipo flexirubina com atividade antioxidante (JIMÉNEZ et al., 2018).

### 3.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um campo interdisciplinar da ciência que engloba várias áreas, incluindo física, química, biotecnologia, medicina e engenharia, e se refere à manipulação, preparação, processamento e aplicação de nanomateriais, cujas estruturas possuam pelo menos uma de suas dimensões dentro da escala nanométrica, convencionalmente considerada como sendo na faixa de 1 a 100 nm. Neste tamanho nanométrico, os materiais adquirem propriedades únicas, ausentes em sua forma original (BAJPAI et al., 2018). O limite superior de 100 nm, entretanto, foi convencionalmente estabelecido por um consenso geral, sem que haja alguma evidência científica que suporte a determinação de partículas acima desse tamanho como estando fora da escala nanométrica, sendo que, para diversos materiais, um limite maior do que 100 nm é admitido (KHORASANI, DANAEI & MOZAFARI, 2018).

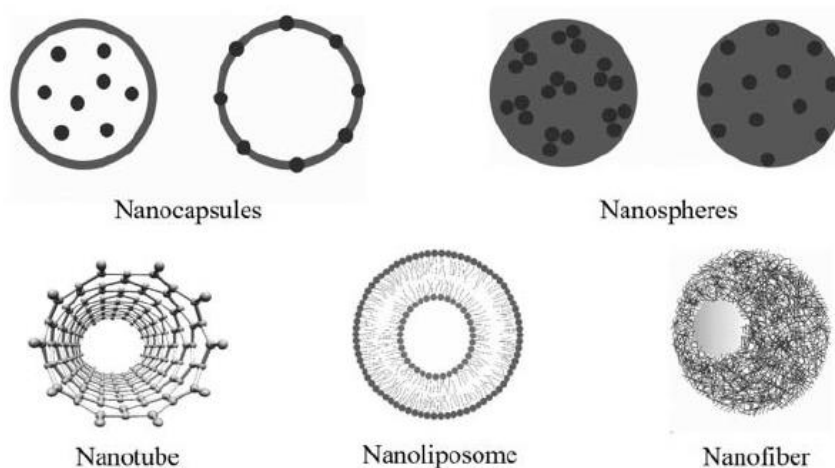
A principal característica que confere às nanopartículas suas propriedades específicas é seu tamanho diminuto. Nesta faixa de tamanho, as propriedades dos materiais e partículas mudam, pois, à medida que objetos se tornam muito pequenos, suas superfícies diminuem em menor escala em relação a seus volumes, levando materiais nanométricos a ter relações de superfície/volume significativamente maiores que objetos macrométricos. Uma maior área de superfície significa que nanomateriais possuem maior reatividade, diferente elasticidade, tensão e magnetismo, condutividade aumentada, e maior tendência a refletir ou refratar a luz (FRANCISCO & GARCÍA-ESTEPA, 2018; KHORASANI, DANAEI & MOZAFARI, 2018). O tamanho reduzido das nanopartículas também lhes confere outras características únicas, como maior solubilidade e menor toxicidade (Bajpai et al., 2018).

Uma das principais aplicações da nanotecnologia na indústria de alimentos é no desenvolvimento de sistemas de encapsulação, ou seja, formulações compostas por nanopartículas encapsulando compostos de interesse para aplicação em alimentos, como moléculas bioativas, compostos de sabor e aroma ou componentes de cor (JOYE, DAVIDOV-PARDO & MCCLEMENTS, 2016). Com o emprego de métodos de encapsulação, substâncias insolúveis, como pigmentos ou vitaminas, podem ser formuladas de forma a se comportarem como moléculas verdadeiramente dissolvidas, possibilitando que uma maior quantidade da substância de interesse seja assimilada na matriz alimentícia e, conseqüentemente, que uma dispersão mais homogênea e estável dessa substância seja alcançada. Além disso, a encapsulação de moléculas sensíveis, como vitaminas e antioxidantes, proporciona proteção dessas moléculas contra degradação durante a produção ou a estocagem de alimentos (PETERS et al., 2011). Outros benefícios trazidos pela nanoencapsulação é um significativo aumento na biodisponibilidade da substância encapsulada, além da possibilidade de mascarar odores ou sabores indesejáveis dessa substância (CUSHEN et al., 2012).

De uma forma geral, nanopartículas podem ser obtidas em diferentes morfologias e utilizando-se diferentes materiais (Figura 2), sendo que a escolha do tipo de nanopartícula a ser utilizada deve levar em conta as características do composto a ser encapsulado e do nanomaterial e a natureza da matriz na qual a nanoformulação será aplicada. Geralmente, nanocápsulas poliméricas são mais apropriadas para a encapsulação de compostos hidrofóbicos, uma vez que tais nanopartículas frequentemente são formadas por um núcleo oleoso envolto por uma camada polimérica. Já nanolipossomas, compostos por uma bicamada fosfolipídica concêntrica envolvendo um núcleo aquoso, são adequados para a encapsulação tanto de substâncias hidrofílicas, quando hidrofóbicas e anfifílicas (LOPES & BRANDELLI, 2018).

A aplicabilidade das nanopartículas em alimentos, no entanto, possui algumas ressalvas quanto aos materiais que as constituem. Nanopartículas baseadas em polímeros sintéticos não podem ser usadas em formulações alimentícias, sendo necessário o emprego de materiais de grau alimentar para esse fim. Desse modo, apenas nanopartículas constituídas de materiais baseados em lipídios, proteínas e polissacarídeos podem ser aplicadas em alimentos. Além disso, mesmo que tais componentes sejam classificados como GRAS (*“generally*

*recognized as safe*”, ou “geralmente reconhecidos como seguros”), não necessariamente significa que nanoformulações utilizando tais materiais sejam inerentemente seguras (PETERS et al., 2011).



**Figura 2.** Representação esquemática de diferentes tipos de nanoestruturas (LOPES & BRANDELLI, 2018). Respectivamente, nanocápsulas, nanoesferas, nanotubos, nanolipossomas e nanofibras.

Além de suas diversas aplicações na indústria de alimentos, a nanotecnologia também oferece vantagens quando comparada a métodos convencionais de administração de substâncias de interesse na saúde humana, como melhora na eficácia, toxicidade reduzida e uma maior aceitação pelos pacientes à administração de uma droga, além de ser um método mais conveniente aos pacientes (BOZZUTO & MOLINARI, 2015; SINGH et al., 2012). Além disso, a encapsulação pode reduzir significativamente a quantidade de material necessária para exercer um efeito específico (MOZAFARI et al., 2006). Ainda, pelo fato de protegerem o composto de interesse, melhorando a estabilidade do composto encapsulado, sistemas de encapsulação diminuem a quantidade necessária da substância para que seu efeito esperado seja obtido. Além disso, sistemas de nanoencapsulação permitem a liberação controlada da substância encapsulada. Sendo assim, a nanoencapsulação pode ser uma opção economicamente interessante, por reduzir os custos com obtenção ou perda do composto ativo (KHORASANI, DANAEI & MOZAFARI, 2018).

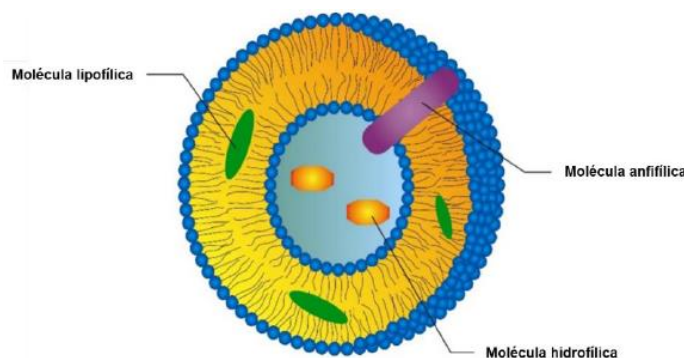
### 3.5 Lipossomas

Os lipossomas são um dos métodos mais comumente estudados para a encapsulação, proteção e liberação de compostos bioativos hidrofílicos, uma vez



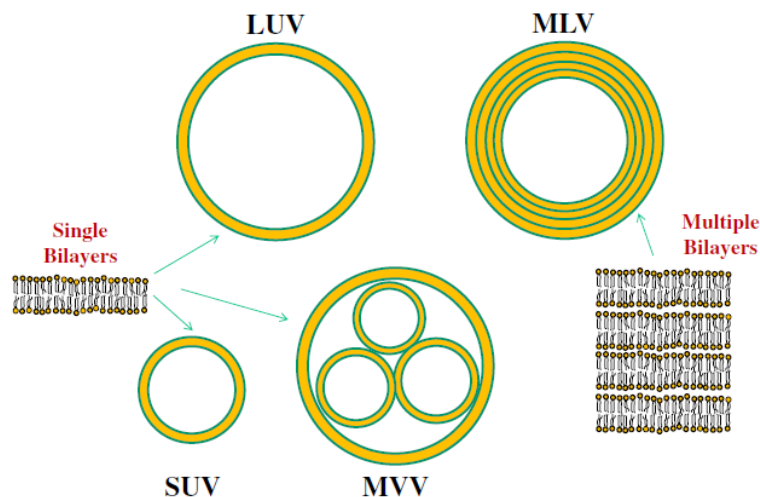
que podem ser produzidos a partir de materiais de grau alimentar e utilizando métodos de laboratório relativamente simples (MCCLEMENTS, 2015). Lipossomas são estruturas esféricas consistindo de uma ou mais bicamadas concêntricas compostas por fosfolipídios envolvendo um núcleo aquoso (Figura 3). Os lipossomas são frequentemente empregados em estudos de encapsulação de compostos bioativos, uma vez que, durante sua formação, compostos hidrofóbicos podem ser incorporados à membrana lipídica, ao passo que substâncias hidrofílicas presentes na fase aquosa podem ser encapsuladas no interior do núcleo do lipossoma. Dessa forma, lipossomas são capazes de encapsular, concomitantemente, substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas dentro de uma única estrutura (SINGH et al., 2012).

Lipossomas são produzidos por processos chamados de “*bottom-up*”, nos quais partículas menores se juntam, formando a nanoestrutura. Por possuírem um controle mais fácil e menores custo e energia necessária, os processos *bottom-up* são preferíveis quando comparados a processos “*top-down*”, nos quais um aglomerado de matéria-prima é quebrado ou dividido por força externa, formando as nanopartículas (JOYE, DAVIDOV-PARDO & MCCLEMENTS, 2016). No caso dos lipossomas, sua formação ocorre pela agregação de fosfolipídios em função da sua estrutura anfipática, que lhes confere uma tendência natural de se arranjam formando bicamadas quando em ambiente aquoso, de forma a minimizar o contato entre as caudas hidrofóbicas de ácidos graxos dos fosfolipídios e o ambiente aquoso. A interação desfavorável entre os ácidos graxos e a água é minimizada quando as extremidades dessa bicamada se dobram sobre si mesmas, formando vesículas totalmente fechadas, podendo assimilar em seu interior substâncias dissolvidas no meio aquoso durante esse processo (SINGH et al., 2012). Dito isso, a formação dos lipossomas não é um processo espontâneo, sendo necessário fornecer a energia adequada ao sistema, como por meio de sonicação, agitação ou aquecimento, para que os fosfolipídios se organizem em bicamadas (MOZAFARI et al., 2008). Os fosfolipídios utilizados como ingredientes para a produção de lipossomas são, mais frequentemente, isolados de ovos, soja, girassol e leite (MOZAFARI et al., 2008; MCCLEMENTS, 2015).



**Figura 3.** Estrutura geral esquemática dos lipossomas em solução aquosa (BRANDELLI, LOPES & BOELTER, 2017).

Quanto à sua morfologia, os lipossomas são tipicamente esféricos, podendo conter uma ou múltiplas bicamadas anfifílicas (TAYLOR et al., 2005). No entanto, sua estrutura e seu tamanho podem variar dependendo de sua composição, método de preparo e condições ambientais (Figura 4). Lipossomas unilamelares, ou seja, compostos por uma única bicamada fosfolipídica, podem ser classificados como vesículas unilamelares pequenas (SUVs, diâmetro < 100 nm) ou vesículas unilamelares grandes (LUVs, diâmetro > 100 nm) (MCCLEMENTS, 2015). Populações de SUVs tendem a ser bem caracterizadas, homogêneas em tamanho e possuir propriedades consistentes. Já LUVs, possuindo uma maior fase aquosa em relação à fase fosfolipídica, são altamente eficientes na encapsulação de grandes volumes de substâncias hidrofílicas. No entanto, por esse mesmo motivo, a permeabilidade e a estabilidade das LUVs podem ser um problema (SINGH et al., 2012). Já vesículas multilamelares (MLVs) são compostas por múltiplas bicamadas concêntricas, formando estruturas em forma de cebola (MCCLEMENTS, 2015). MLVs são mais heterogêneas, tendem a ser mais estáveis durante seu armazenamento e costumam proporcionar uma liberação mais lenta e prolongada do composto encapsulado. Também se considera que esses lipossomas sejam mais eficientes na encapsulação de compostos hidrofóbicos, por possuírem uma grande proporção de fosfolipídios em comparação à sua fase aquosa (SINGH et al., 2012). Ainda, lipossomas podem ser vesículas multivesiculares (MVV), consistindo de múltiplas vesículas menores dentro de uma vesícula maior (MCCLEMENTS, 2015).



**Figura 4.** Diferentes morfologias possíveis para lipossomas. SUV: vesículas unilamelares pequenas; LUV: vesículas unilamelares grandes; MLV: vesículas multilamelares; MVV: vesículas multivesiculares (MCCLEMENTS, 2015).

As características ópticas de uma suspensão contendo lipossomas dependem do tamanho das partículas presentes na suspensão, que determinam o seu comportamento de dispersão da luz. Suspensões que possuem lipossomas grandes irão dispersar a luz de forma suficiente a permitir que eles sejam vistos a olho nu e a amostra irá apresentar uma aparência turva ou esbranquiçada (TAYLOR et al., 2005). No entanto, o emprego de métodos adicionais durante a produção dos lipossomas pode reduzir drasticamente o seu tamanho, levando a suspensão a adquirir uma aparência mais límpida ou transparente, já que lipossomas pequenos não são capazes de dispersar a luz fortemente (MCCLEMENTS, 2015).

O fosfolípido mais comumente utilizado na produção de lipossomas é a fosfatidilcolina (PC). Outros fosfolípidos não possuem a tendência de formar lipossomas quando usados isoladamente, mas podem ser adicionados para modificar as propriedades das bicamadas (SINGH et al., 2012). As características elétricas dos lipossomas dependem do tipo e da concentração dos fosfolípidos presentes em sua composição. Fosfolípidos como o fosfatidilglicerol, o fosfatidilinositol e o ácido fosfático, por possuírem regiões carregadas em suas moléculas, podem promover a repulsão eletrostática entre os lipossomas, impedindo sua agregação ou fusão. Além disso, o grau de ionização dos grupamentos eletricamente carregados dessas moléculas varia de acordo com o pH, o que significa que sistemas de encapsulação contendo tais componentes são sensíveis a mudanças de pH (MCCLEMENTS, 2015).

Sistemas contendo fosfolipídios possuem um comportamento de fase complexo, uma vez que podem existir regiões do lipossoma com uma estrutura mais ordenada, chamada de fase gel, ou com uma estrutura mais fluida, chamada de cristalina líquida, com o equilíbrio entre essas fases mudando em função da temperatura. Temperaturas mais elevadas favorecem a fase mais fluida e permeável, enquanto que temperaturas mais baixas favorecem a fase gel mais ordenada (SINGH et al., 2012). A temperatura na qual a mudança da fase gel para a cristalina líquida ocorre é chamada de temperatura de transição de fase ( $T_c$ ). A  $T_c$  pode variar de acordo com a composição da formulação, uma vez que fosfolipídios contendo cadeias polipeptídicas mais longas e mais saturadas aumentam a  $T_c$  e, conseqüentemente, também a estabilidade térmica dos lipossomas (TAYLOR et al., 2005; BOZZUTO & MOLINARI, 2015). A presença de colesterol também influencia a estabilidade dos lipossomas, pois a presença dessa molécula altera a interação tanto entre as cabeças polares quanto as caudas apolares dos fosfolipídios, levando a um empacotamento mais denso dos fosfolipídios, reduzindo a permeabilidade dos lipossomas e também aumentando sua estabilidade *in vivo* e *in vitro* (MAHERANI et al., 2011; BOZZUTO & MOLINARI, 2015).

Uma questão importante que dificulta a viabilidade da aplicação de lipossomas na indústria é a sua baixa estabilidade físico-química. Apesar de a formação de bicamadas em meio aquoso ser um processo termodinamicamente favorável, a manutenção dessa estrutura não é (MCCLEMENTS, 2015). Por consequência, as propriedades dos lipossomas podem mudar durante seu armazenamento, transporte ou utilização, podendo afetar seu desempenho. A estabilidade dos lipossomas depende tanto de fatores extrínsecos, como pH, força iônica e temperatura, quanto de fatores intrínsecos, como composição e concentração de fosfolipídios e a natureza e concentração do composto encapsulado (TAYLOR et al., 2005). A estabilidade dos lipossomas pode ser melhorada por mudanças em passos nos processos de preparação, como o revestimento das vesículas com polímeros, como o polietilenoglicol (PEG) ou quitosana, a adição de ingredientes catiônicos ou aniônicos para aumentar a repulsão eletrostática entre os lipossomas, ou a utilização de agentes estabilizantes, como colesterol ou glicerol (MOZAFARI et al., 2008).

### 3.5.1 Preparação e caracterização de lipossomas

Como dito anteriormente, a formação dos lipossomas não é um processo espontâneo. Os lipossomas são formados quando fosfolipídios são dispersos em uma solução aquosa e, por sua natureza anfifílica, formam bicamadas. No entanto, apenas quando a energia adequada é fornecida ao sistema, na forma de sonicação, agitação ou aquecimento, por exemplo, é que os fosfolipídios se organizarão nas estruturas de bicamada. A escolha do método de preparo deve levar em consideração alguns parâmetros (BOZZUTO & MOLINARI, 2015; BRANDELLI, LOPES & BOELTER, 2017):

- As características físico-químicas do material a ser encapsulado e dos fosfolipídios utilizados;
- A natureza do meio no qual as vesículas serão dispersas;
- A concentração da substância encapsulada, considerando sua potencial toxicidade;
- Processos adicionais envolvidos na aplicação dos lipossomas;
- Tamanho, polidispersividade e vida de prateleira considerados ótimos para a aplicação desejada;
- Custo e reprodutibilidade entre lotes e possibilidade em larga escala, mantendo a segurança e a eficiência do produto final.

Dessa forma, há uma variedade de métodos que podem ser empregados na produção de lipossomas, cada um com suas vantagens e desvantagens. Os métodos mais comumente utilizados são descritos a seguir (MAHERANI et al., 2012; BOZZUTO & MOLINARI, 2015; MCCLEMENTS, 2015):

#### Hidratação de filme

Envolve a dispersão de fosfolipídios em um solvente orgânico em um recipiente adequado, evaporação do solvente, com a formação de um filme de fosfolipídio no interior do recipiente, e dissolução do filme em meio aquoso, com os fosfolipídios se organizando em bicamadas. Compostos a serem encapsulados podem ser incluídos no meio aquoso, se a substância for hidrofílica, ou no filme lipídico, se for hidrofóbica. Esse método geralmente produz MLVs grandes e com tamanho heterogêneo, sendo necessários métodos como sonicação ou extrusão para a geração de SUVs pequenas e homogêneas.

### Evaporação de fase reversa

Nesse método os fosfolípidios são dispersos em um solvente orgânico, com posterior adição de uma solução aquosa contendo o composto de interesse a ser encapsulado. Após a mistura ser homogeneizada, ocorre a formação de uma emulsão água-em-óleo. O solvente orgânico é, então, evaporado, o que resulta na formação de um gel. Por fim, esse gel é submetido a agitação, resultando na formação dos lipossomas. Esse método é afetado pela solubilidade dos lipídios no solvente orgânico e pela eliminação desse solvente do produto final. Todavia, a evaporação de fase reversa proporciona, em geral, uma maior eficiência de encapsulação que a hidratação de filme.

### Pró-lipossomas

Esse método se baseia na reidratação de uma mistura de lipídios previamente seca por algum método de desidratação. Com esse método, são produzidos lipossomas do tipo MLV, proporcionando uma alta eficiência de encapsulação. O método de pró-lipossomas é largamente utilizado na nanomedicina.

### Deslocamento de solvente

Os fosfolípidios são dissolvidos em um solvente orgânico anfifílico e essa mistura é injetada em uma solução aquosa. O solvente, então, se desloca rapidamente para o ambiente aquoso circundante, o que leva os fosfolípidios a se arranjam em bicamadas, formando os lipossomas.

### Deslocamento de surfactante

Se baseia no mesmo princípio do deslocamento de solvente, porém um surfactante solúvel em água é utilizado no lugar de um solvente orgânico. O deslocamento do surfactante para a solução aquosa circundante induz os fosfolípidios a formarem os lipossomas.

### Homogeneização

Os fosfolípidios são dispersos em uma solução aquosa, formando uma suspensão de duas fases. Essa suspensão é homogeneizada vigorosamente,

geralmente resultando na formação de SUVs. O tamanho dos lipossomas formados pode ser reduzido com o aumento da intensidade e do tempo de agitação.

Após sua produção, os lipossomas devem ser avaliados e caracterizados quanto a parâmetros que influenciam na sua estabilidade. Esses parâmetros devem ser determinados e controlados para assegurar a eficiência e a estabilidade dos lipossomas, objetivando que a formulação possa ser qualificada para a aplicação desejada. Alguns métodos comumente empregados para a caracterização de lipossomas são listados a seguir (LAOUINI et al., 2012; MAHERANI et al., 2012; DELGADO, 2013):

#### Espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering, DLS*)

Esse método é utilizado na determinação do tamanho médio das partículas em suspensão e o seu índice de polidispersividade (PDI), ou seja, sua distribuição de tamanho. Se baseia no princípio de que partículas presentes em uma suspensão se difundem em todas as direções e estão em movimento constante (movimento Browniano), espalhando em diferentes intensidades a luz laser incidida sobre essas partículas. A velocidade de difusão das partículas pelo movimento Browniano está diretamente relacionada com o tamanho das partículas, uma vez que partículas menores se difundem mais rapidamente que partículas maiores, resultando em uma maior intensidade do espalhamento da luz.

#### Microscopia eletrônica

Diversas variações da microscopia eletrônica, como a microscopia de transmissão (TEM) e a microscopia de força atômica (AFM), fornecem informações importantes sobre a preparação de lipossomas, uma vez que permitem uma visualização da morfologia das partículas e avaliação do seu tamanho e distribuição de tamanho. No entanto, a preparação das amostras para microscopia pode ser complicada, uma vez que pode gerar artefatos, induzir retração do tamanho e distorção da forma dos lipossomas, além de consumir muito tempo para se obter uma distribuição representativa do tamanho da população de partículas.

### Potencial zeta ( $\zeta$ )

A maioria das partículas em um sistema coloidal adquire uma carga elétrica superficial, que depende da natureza da partícula e do meio de suspensão. A presença dessa carga leva ao acúmulo de íons de carga oposta à da superfície da partícula na região de interface entre esta e o meio na qual a partícula está suspensa. Esse acúmulo de íons leva à formação de uma camada elétrica revestindo a partícula, cujo potencial elétrico pode ser determinado. A medição do potencial  $\zeta$  é feita pela incidência de um feixe de luz sobre a amostra e aplicação de um campo magnético de força conhecida. A velocidade de movimentação das partículas é proporcional ao seu potencial  $\zeta$  e esse movimento induz mudanças na frequência do feixe de luz, gerando um espectro de frequências, utilizado no cálculo da velocidade das partículas, que é convertida em valores de mobilidade eletroforética.

### Eficiência de encapsulação (EE)

Uma característica importante para a aplicação de lipossomas em qualquer área de interesse é a capacidade de encapsular uma quantidade suficiente da substância bioativa capaz de exercer sua atividade. As substâncias podem estar inseridas na parede do lipossoma, adsorvidas na sua superfície ou enclausuradas dentro do seu núcleo aquoso. O conhecimento das características dos lipossomas é importante para o desenvolvimento de formulações com uma EE ótima, uma vez que a composição lipídica e o método de preparo podem interferir na EE. Para determinação da EE, deve ser feita a separação do composto não encapsulado e os lipossomas contendo o composto encapsulado, que pode ser feita por filtração por membranas com *cutoff* adequado, diálise ou separação por tamanho em coluna cromatográfica. A determinação da EE pode ser feita diretamente, quantificando o composto presente nos lipossomas, ou indiretamente, através da determinação da quantidade não encapsulada do composto. Diferentes métodos podem ser empregados para essa quantificação, como espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), métodos enzimáticos, entre outros.

### 3.5.2 Aplicações

O uso de lipossomas para a aplicação em diferentes áreas vem ganhando



interesse em virtude das diversas vantagens trazidas pela encapsulação de compostos. A maioria das aplicações dos lipossomas se baseia na capacidade dessas vesículas de impedir ou diminuir a interação da substância encapsulada com o ambiente externo e, assim, reduzir a perda dessa substância por degradação. Essa proteção torna possível a redução da quantidade do composto bioativo a ser adicionado, por exemplo, em uma formulação alimentícia para compensar a perda durante seu armazenamento, o que torna economicamente muito mais viável a aplicação do composto de interesse (SINGH et al., 2012).

Na indústria de alimentos, a maioria das aplicações tem sido direcionada à alteração de características organolépticas e sensoriais, como textura, sabor ou aroma de componentes do alimento, e, principalmente, à encapsulação de componentes ou aditivos bioativos, permitindo uma liberação controlada e aumentando a biodisponibilidade dessas substâncias (MOZAFARI et al., 2008).

Sistemas de encapsulação baseados em lipossomas são aplicados, principalmente, na encapsulação de bioativos hidrofílicos, já que seu núcleo aquoso pode encapsular inúmeras substâncias, como moléculas pequenas e íons (sais, açúcares, peptídeos), biopolímeros (proteínas, polissacarídeos) e partículas (gotículas lipídicas, probióticos). Já a porção hidrofóbica da parede dos lipossomas pode assimilar diferentes substâncias hidrofóbicas, como vitaminas e carotenoides (MCCLEMENTS, 2015).

A encapsulação de hidrolisados proteicos bioativos é largamente estudada, com diversos trabalhos demonstrando a eficiência dos lipossomas em manter a atividade desses hidrolisados e protegê-los de degradação, possibilitando sua aplicação (ZAVAREZE et al., 2014; HOSSEINI, RAMEZANZADE & NIKKHAH, 2017; CORRÊA et al., 2019). Apesar de ser menos comum, lipossomas também servem como um método de aplicação de enzimas alimentares, como a bromelina, usada como amaciante de carnes (LEE et al., 2000) e a  $\beta$ -galactosidase, usada para auxiliar na digestão de alimentos lácteos (RAO, CHAWAN & VEERAMACHANENI, 1995), proporcionando proteção e estabilização e aumento da sua biodisponibilidade. Outra aplicação muito estudada é a encapsulação de peptídeos antimicrobianos, uma vez que sua encapsulação em lipossomas proporciona resultados promissores, apresentando os lipossomas como uma solução para proteção desses compostos, aumento de sua eficácia e estabilidade e possibilidade de aplicação em alimentos (LARIDI et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2008; MALHEIROS

et al., 2010, 2011).

Contudo, a aplicabilidade dos lipossomas não se limita à indústria de alimentos. Na área médica, lipossomas podem ser empregados como carreadores de quimioterápicos, podendo ser especificamente modificados para evadir o sistema fagocitário mononuclear, se tornando lipossomas de longa circulação no organismo (DRUMMOND et al., 1999; TANG et al., 2018), ser adicionados de grupamentos funcionais capazes de se ligarem a marcadores de células tumorais, conferindo aos lipossomas especificidade de ligação a essas células (WEISSMANN et al., 1975; MOGHIMIPOUR et al., 2018) e ser formulados com uma composição específica que permite a liberação do quimioterápico em resposta a estímulos ambientais específicos, como, por exemplo, mudanças de pH fisiológico (YUBA et al., 2018). Lipossomas também podem servir como carreadores de sondas de contraste para exames de diagnóstico por imagem, permitindo sua penetração em barreiras fisiológicas, como a barreira hematoencefálica, como forma de aplicação de vacinas, servindo como superfície para adsorção de antígenos ou adjuvantes. Na área da cosmética, uma vez que lipossomas possuem características desejáveis, como melhora na hidratação da pele e penetração mais profunda, depositando compostos ativos na derme, o que permite sua ação mais prolongada e duradoura (LI et al., 2019). Ainda, lipossomas podem ser usados como biossensores, podendo ser carregados com moléculas sinalizadoras, como marcadores fluorescentes ou quimioluminescentes e enzimas, servindo como dispositivos analíticos utilizados na detecção de analitos em materiais biológicos, como sangue, urina ou saliva (MAZUR et al., 2017).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo

Foi utilizada nesse estudo a linhagem bacteriana *Chryseobacterium* sp. kr6, isolada a partir de penas de frango (Riffel et al., 2003). A bactéria encontra-se armazenada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do ICTA – UFRGS, conservada em glicerol 20% (v/v) a -20°C. A linhagem bacteriana foi semanalmente repicada em ágar *brain-heart infusion* (BHI) 37,0 g/L, cultivada a 30°C, e mantida em geladeira a 4°C.

### 4.2 Produção dos peptídeos bioativos

Anteriormente ao cultivo, penas de frango foram cuidadosamente lavadas em água corrente e secas em estufa a 40°C. A produção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise de penas de frango foi realizada conforme descrito por Fontoura e colaboradores (2014). A bactéria foi cultivada em meio mineral mínimo contendo penas (0,5 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,015 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 10 g/L de penas, pH 8,0) durante 48 h, em agitador rotativo a 125 rpm, a 30°C. Após a incubação, o cultivo foi centrifugado e o sobrenadante foi submetido a ultrafiltração por membranas com *cutoff* de 10 kDa. A fração filtrada foi utilizada na encapsulação e nas análises de atividades biológicas.

### 4.3 Extração do pigmento

Para a extração de um pigmento do tipo flexirubina produzido por *Chryseobacterium* sp. kr6, previamente caracterizado por Jiménez e colaboradores (2018), foi feita uma suspensão bacteriana em solução salina 0,85% ajustada a uma densidade óptica de 1,0 a um comprimento de onda de 600 nm. Em seguida, a suspensão foi semeada em placas de ágar BHI (37,0 g/L) com o auxílio de uma alça de Drigalski e as placas foram cultivadas a 30°C. Após 24 h de cultivo, a biomassa bacteriana foi raspada das placas e seca em estufa a 40°C. Após a secagem, a biomassa foi macerada com acetona até evaporação do solvente e formação de um pó fino, adicionada de 2 mL de acetona e colocada em um banho sônico (Ultrasonic

Cleaner USC 700, Unique). Após centrifugação (10.000 g, 5 min, 4°C), o sobrenadante foi coletado e seco com nitrogênio.

#### 4.4 Produção dos lipossomas

Os peptídeos bioativos produzidos da hidrólise de pena de frango e o pigmento tipo flexirubina foram encapsulados em lipossomas constituídos de Phospholipon 90G, fosfatidilcolina purificada de soja (PC), da marca Lipoid (Alemanha), pelo método de hidratação de filme lipídico (Malheiros et al., 2010), com algumas modificações. Brevemente, 85 mg de PC foram dispersos em 15 mL de clorofórmio, em um balão de fundo redondo. Em seguida, foi feita a evaporação do solvente em um rotaevaporador (90 rpm, 40°C, em vácuo) até a formação de um fino filme de PC no fundo do balão. Os balões contendo os filmes foram armazenados em um dessecador de sílica *overnight* para total evaporação do solvente. Para formação dos lipossomas, uma solução de tampão fosfato 10 mM pH 7,0 foi aquecida a 45°C durante 1 min e transferida para os balões contendo os filmes de PC. Após 2 ciclos de agitação por 2 min a 45°C seguido por 2 min de descanso, a solução contendo a fosfatidilcolina dissolvida foi transferida para tubos de ensaio, que foram submetidos a 5 ciclos de aquecimento a 45°C por 2 min seguido por 1 min de agitação vigorosa em vórtex. Em seguida, a solução contendo os lipossomas já formados foi submetida a 5 ciclos de ultrassonicação em ultrassom de sonda (frequência de 20 kHz e potência de 250 W) em banho de gelo por 1 min seguido por 1 min de descanso. Por fim, os lipossomas foram filtrados em filtros de 0,22 µm (Sartorius, Göttinger, Alemanha) para esterilização.

Para encapsulação do pigmento, 1,5 mg foi dissolvido em etanol absoluto e adicionado ao clorofórmio usado para a dispersão da PC. Para encapsulação dos peptídeos, uma solução 9,0 mg/mL dissolvida em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 foi usada para dissolução do filme de fosfatidilcolina. Para a coencapsulação, ambos os compostos foram adicionados durante o processo, nos mesmos passos e nas mesmas concentrações que foram usadas quando encapsulados separadamente.

## 4.5 Caracterização físico-química dos lipossomas

### 4.5.1 Análises de espalhamento de luz e potencial zeta ( $\zeta$ )

Para a determinação do tamanho médio, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta, as formulações de lipossomas foram diluídas em água MilliQ. O tamanho médio e o PDI foram medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) com um laser de He-Ne com comprimento de onda de 633 nm e um ângulo de incidência de 90°. O potencial  $\zeta$  foi determinado utilizando um Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). As análises foram realizadas a 25°C e pH 7,0.

### 4.5.2 Eficiência de encapsulação (EE)

Imediatamente após a produção dos lipossomas, alíquotas de 1,0 mL das soluções de lipossomas foram submetidas a ultrafiltração em membrana com *cutoff* de 10 kDa. A fração filtrada, contendo os compostos biotivos que não foram internalizados pelos lipossomas, e a fração retida, contendo lipossomas encapsulando os compostos, foram utilizadas na determinação da EE dos peptídeos e do pigmento, respectivamente.

Para determinar a EE dos peptídeos, a fração filtrada foi liofilizada e ressuspendida em 1,0 mL de água destilada e foi feita dosagem de proteínas através do método Folin-Ciocalteu (Lowry. et al., 1994), utilizando albumina de soro bovino 1,0 mg/mL como padrão. A EE foi avaliada pela comparação da quantidade de peptídeos não encapsulados na fração filtrada ( $C_f$ ) com a quantidade total adicionada para a encapsulação ( $C_t$ ), de acordo com a fórmula:

$$EE(\text{peptídeos}) = \frac{(C_t - C_f)}{C_t} \times 100$$

A EE do pigmento foi medida a partir da fração retida contendo lipossomas. A fração foi congelada a -80°C e, em seguida, liofilizada. Após a liofilização, os lipossomas foram dissolvidos em 1,0 mL de etanol absoluto, centrifugados a 5000 g por 5 min e a absorbância do sobrenadante foi medida a 450 nm (Jiménez et al., 2018). A EE foi determinada pela relação entre a absorbância do

pigmento encapsulado nos lipossomas ( $A_e$ ) e a absorbância da quantidade inicial de pigmento adicionado para encapsulação ( $A_t$ ), segundo a fórmula:

$$EE(\text{pigmento}) = \frac{A_e}{A_t} \times 100$$

#### 4.5.3 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu IRPrestige-21 (Shimadzu, Quioto, Japão). Para essa análise, os peptídeos na sua forma livre e as formulações de lipossomas foram previamente liofilizadas, misturadas com brometo de potássio (KBr) e comprimidas na forma de discos compactos (Pinilla, Noreña & Brandelli, 2017). O espectro do pigmento não-encapsulado foi obtido com a amostra líquida, dissolvida em etanol e posicionada entre dois cristais de NaCl. A faixa de varredura utilizada foi de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e foram realizados 64 varrimentos com uma resolução estabelecida em 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 4.6 Determinação de atividades biológicas

#### 4.6.1 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos foi realizada pelo ensaio de captura do radical ABTS [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino)-6-ácido sulfônico], que envolve a geração do radical cromóforo  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pela oxidação do composto ABTS por persulfato de potássio (Nenadis et al., 2004). O radical foi produzido pela reação entre as soluções de ABTS 7,0 mM e persulfato de potássio 140,0 mM. A mistura foi deixada em repouso no escuro à temperatura ambiente por 16 h e, então, diluída em etanol absoluto até alcançar uma absorbância de  $0,7 \pm 0,02$  a 734 nm. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  de amostra foi misturado com 1,0 mL da solução diluída de radical e a absorbância a 734 nm foi medida após 6 min. Uma solução de trolox 2,0 mM [6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico] dissolvido em etanol absoluto foi utilizada para obtenção de uma curva-padrão.

#### 4.6.2 Atividade antibacteriana

A capacidade de inibição dos compostos bioativos livres e encapsulados contra bactérias indicadoras de alimentos foi avaliada pelo método descrito por Motta & Brandelli (2002), com algumas modificações. As linhagens utilizadas foram *Staphylococcus aureus* 1901, *Escherichia coli* 8739, *Salmonella enteritidis* SE86 e *Listeria monocytogenes* ATCC7644. Os inóculos foram preparados pela suspensão das linhagens em solução salina 0,85% (m/v) estéril até uma concentração de  $10^8$  UFC/mL e semeados em placas de ágar BHI (37 g/L). Em seguida, alíquotas de 20  $\mu$ L das amostras foram aplicadas diretamente sobre o ágar recém inoculado e as placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. Após o período de incubação, as placas foram avaliadas para observação e medição de zonas de inibição. DMSO foi utilizado como controle negativo.

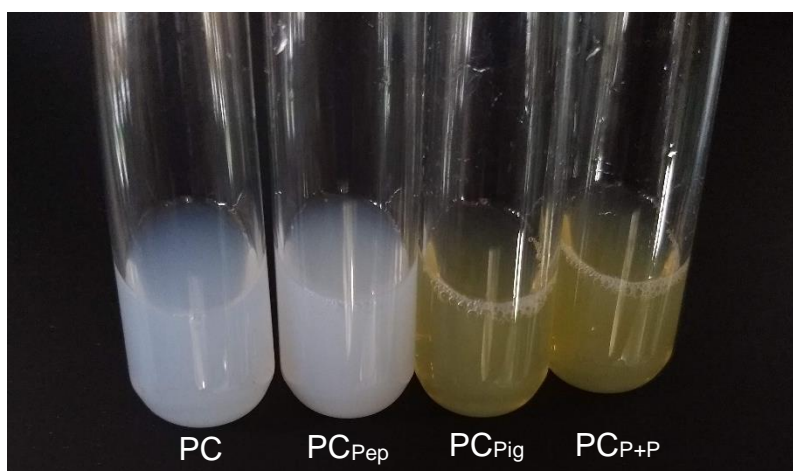
#### 4.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio-padrão. A análise dos resultados de tamanho, PDI, potencial  $\zeta$  e atividades biológicas foi feita por análise de variância (ANOVA) com correção de Tukey e os resultados de eficiência de encapsulação foram analisados pelo teste t de Student seguido de correção de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicatas e repetidas pelo menos 3 vezes. Diferenças foram consideradas significativas com uma significância de  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Produção dos lipossomas

As formulações de lipossomas controle (PC), encapsulando os peptídeos e o extrato de pigmento isoladamente ( $PC_{Pep}$  e  $PC_{Pig}$ , respectivamente) e coencapsulando os compostos ( $PC_{P+P}$ ), produzidas pelo método de hidratação de filme, são apresentadas na Figura 5.



**Figura 5.** Formulações de lipossomas produzidos pelo método de hidratação de filme. PC: lipossomas controle vazios;  $PC_{Pep}$ : lipossomas encapsulando peptídeos;  $PC_{Pig}$ : lipossomas encapsulando pigmento;  $PC_{P+P}$ : lipossomas coencapsulando peptídeos e pigmento.

### 5.2 Caracterização físico-química dos lipossomas

#### 5.2.1 Análises de espalhamento de luz e potencial zeta ( $\zeta$ )

Os resultados para o tamanho, PDI e potencial  $\zeta$  dos lipossomas contendo os peptídeos bioativos da hidrólise enzimática de penas e o extrato do pigmento de *Chryseobacterium* sp. kr6 são apresentados na Tabela 1. O diâmetro médio dos lipossomas para todas as formulações não ultrapassou 200 nm. O tamanho dos lipossomas encapsulando os peptídeos isoladamente ( $PC_{Pep}$ ) não diferiu estatisticamente do tamanho dos lipossomas controle vazios (PC). No entanto, tanto os lipossomas contendo o pigmento isolado ( $PC_{Pig}$ ), quanto coencapsulando peptídeos e pigmento ( $PC_{P+P}$ ), apresentaram um tamanho significativamente menor,



mas sem diferença significativa entre si. O PDI permaneceu abaixo de 0,3 para todas as formulações, com os lipossomas contendo o pigmento ( $PC_{Pig}$  e  $PC_{P+P}$ ) apresentando um PDI ligeiramente maior que as demais formulações. O potencial  $\zeta$  dos lipossomas controle foi de -20,9 mV, com um aumento significativo na carga observado após a encapsulação dos compostos bioativos, sendo obtidos potenciais de -30,0 mV para os lipossomas  $PC_{Pep}$ , -33,8 mV para  $PC_{Pig}$  e -38,2 mV para  $PC_{P+P}$ .

**Tabela 1.** Determinação do tamanho, PDI, potencial  $\zeta$  e EE obtidos para os lipossomas. PC: lipossomas vazios;  $PC_{Pep}$ : lipossomas contendo peptídeos;  $PC_{Pig}$ : lipossomas contendo pigmento;  $PC_{P+P}$ : lipossomas contendo peptídeos e pigmento coencapsulados.

	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial $\zeta$ (mV)	EE peptídeos (%)	EE pigmento (%)
PC	168,5 ± 7,7 <sup>a</sup>	0,226 ± 0,02 <sup>a,b</sup>	-20,9 ± 3,06 <sup>a</sup>	-	-
$PC_{Pep}$	185,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,224 ± 0,02 <sup>a</sup>	-30,0 ± 1,41 <sup>b</sup>	64,98 ± 2,77 <sup>a</sup>	-
$PC_{Pig}$	102,0 ± 8,0 <sup>b</sup>	0,292 ± 0,01 <sup>b,c</sup>	-33,8 ± 0,72 <sup>b,c</sup>	-	89,76 ± 1,65 <sup>a</sup>
$PC_{P+P}$	98,5 ± 7,8 <sup>b</sup>	0,295 ± 0,04 <sup>c</sup>	-38,2 ± 0,36 <sup>c</sup>	53,28 ± 3,42 <sup>b</sup>	92,35 ± 2,24 <sup>a</sup>

\*Valores representam médias ± desvios-padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. Diferentes letras sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativa a  $P < 0,05$ .

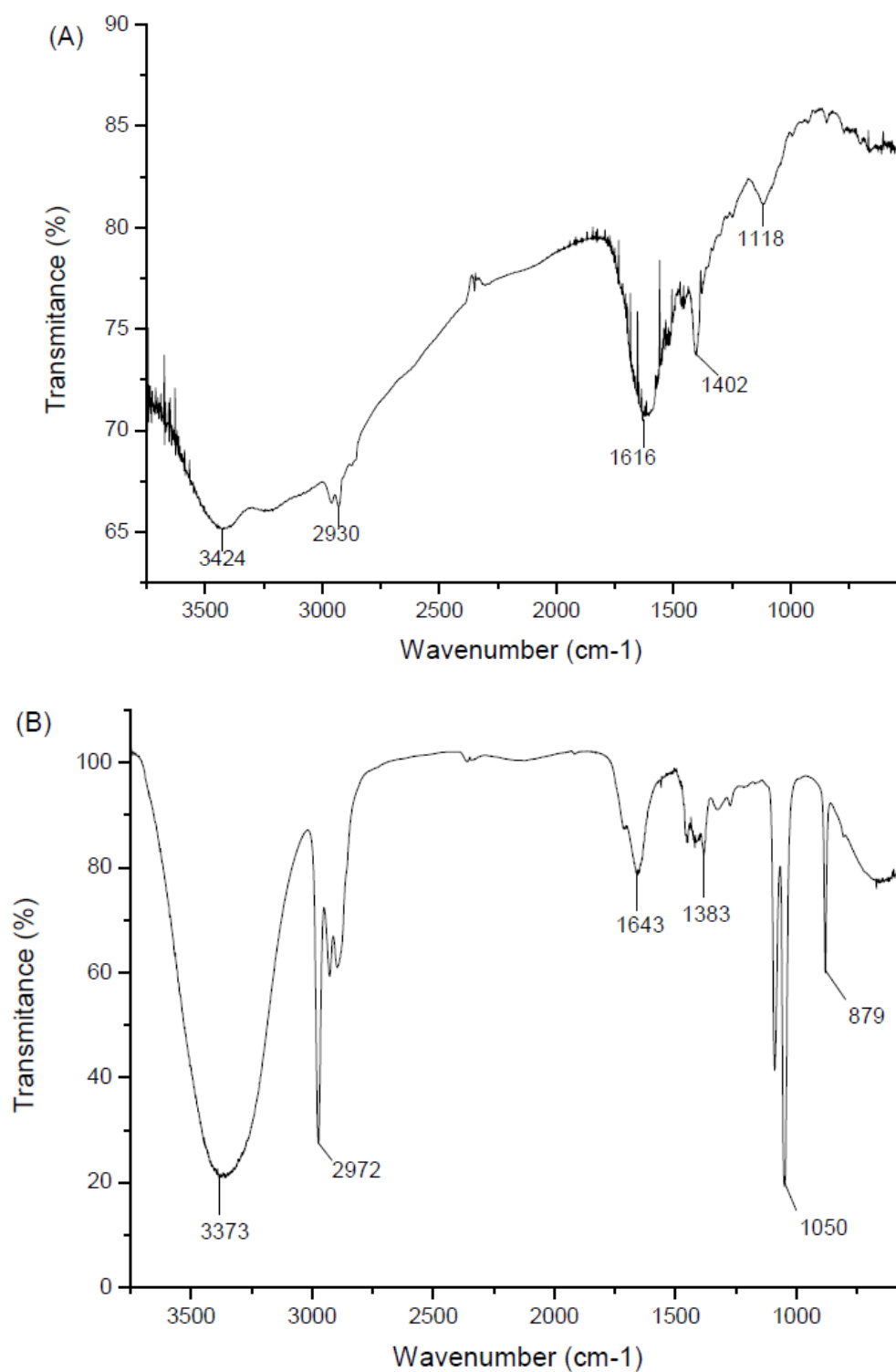
### 5.2.2 Eficiência de encapsulação (EE)

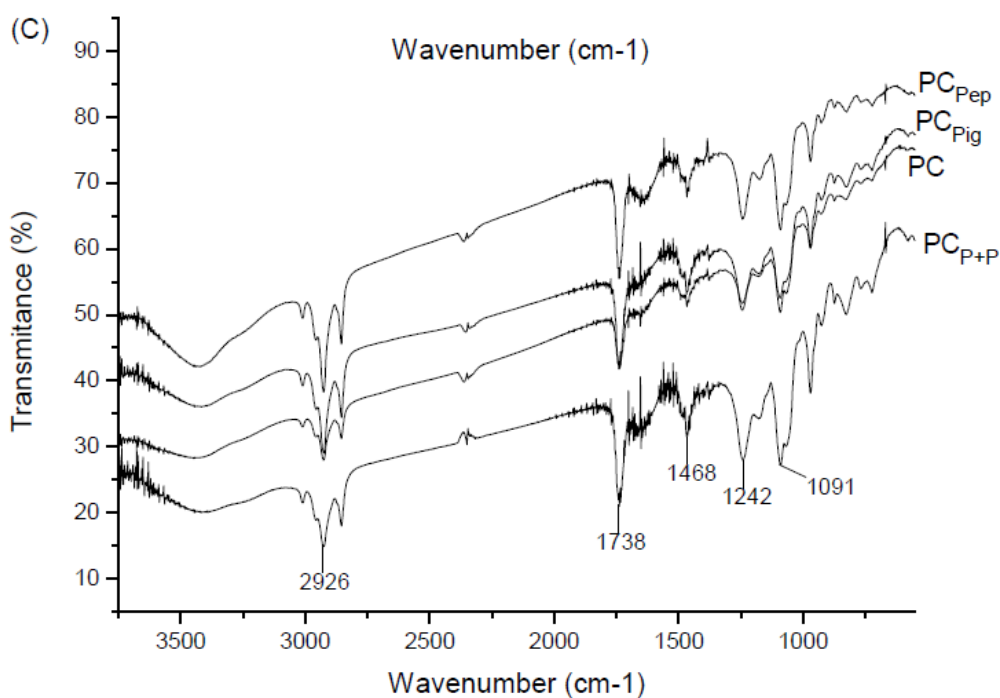
A EE dos peptídeos bioativos e do pigmento, expressa em porcentagem de composto encapsulado, é apresentada na Tabela 1. A EE dos peptídeos foi significativamente menor do que para o pigmento, sendo que no caso da coencapsulação com o pigmento, a EE dos peptídeos foi menor (53,28%) que a obtida para os peptídeos encapsulados isoladamente (64,98%). A EE do pigmento, tanto isoladamente, quanto coencapsulado com os peptídeos, foi por volta de 90%.

### 5.2.3 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho para as preparações de lipossomas vazios e contendo compostos bioativos são apresentados na Figura 6. A figura 6A representa o espectro obtido para os pigmentos não encapsulados, revelando bandas a 3424, 2930, 1616, 1402 e 1118  $cm^{-1}$ . A 6B representa o espectro do pigmento não encapsulado, sendo observadas bandas a 3373, 2972, 1643, 1383, 1050 e 879. Em 6C, são apresentados os espectros obtidos para as quatro

diferentes formulações de lipossomas preparadas, com bandas a 2926, 1738, 1468, 1242 e 1091  $\text{cm}^{-1}$ .





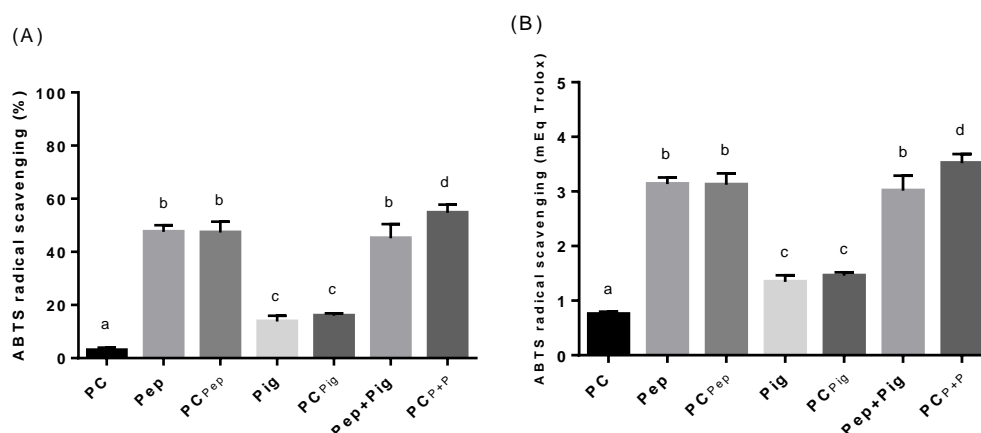
**Figura 6.** Espectro FTIR dos compostos bioativos livres e após encapsulação em lipossomas. (A) Peptídeos não encapsulados; (B) pigmento não encapsulado; (C) preparações de lipossomas. PC: lipossomas vazios; PC<sub>Pep</sub>: lipossomas contendo peptídeos; PC<sub>Pig</sub>: lipossomas contendo pigmento; PC<sub>P+P</sub>: lipossomas contendo peptídeos e pigmento coencapsulados.

### 5.3 Determinação de atividades biológicas

#### 5.3.1 Atividade antioxidante

Na Figura 7, é apresentada a atividade antioxidante, expressa em termos de captura do radical ABTS, dos compostos bioativos na sua forma livre e encapsulada em lipossomas. A atividade dos peptídeos não se mostrou alterada após sua encapsulação em lipossomas (Pep e PC<sub>Pep</sub>, respectivamente), sendo 47,6% a atividade dos peptídeos livres e 47,3% a atividade dos peptídeos encapsulados. Da mesma forma, não foi observada mudança significativa entre a atividade do pigmento livre e após sua encapsulação (Pig e PC<sub>Pig</sub>, respectivamente), com o pigmento livre apresentando atividade de 13,8% na forma livre e 16,0% na forma encapsulada. Por outro lado, a mistura dos peptídeos com o pigmento antes da sua coencapsulação (Pep+Pig) apresentou uma atividade de 45,1%, sendo que,

ao serem coencapsulados (PC<sub>P+P</sub>), sua atividade se apresentou ligeiramente aumentada (54,7%).



**Figura 7.** Atividade antioxidante como % de captura do radical (A) e em miliequivalentes de Trolox (B). PC: lipossomas vazios; Pep: peptídeos livres; PC<sub>Pep</sub>: peptídeos encapsulados; Pig: pigmento livre; PC<sub>Pig</sub>: pigmento encapsulado; Pep+Pig: mistura dos peptídeos com o pigmento na forma livre; PC<sub>P+P</sub>: compostos coencapsulados.

### 5.3.2 Atividade antibacteriana

A capacidade de inibição do crescimento bacteriano dos compostos livres e encapsulados frente a bactérias de importância clínica e alimentar, expressa como o diâmetro em milímetros (mm) dos halos de inibição, é apresentada na Tabela 2. Nenhum dos compostos avaliados, tanto em sua forma livre (Pep, Pig e P+P), quanto na sua forma encapsulada (PC<sub>Pep</sub>, PC<sub>Pig</sub> e PC<sub>P+P</sub>), foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma das linhagens bacterianas testadas nas concentrações utilizadas para encapsulação. Halos de inibição contra *Listeria monocytogenes* ATCC7644 para pigmento a uma concentração de 10,0 mg/mL são apresentados na Figura 8.

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana dos compostos bioativos livres e após encapsulação em lipossomas. C: controle com DMSO; PC: lipossomas vazios; Pep: peptídeos livres; PC<sub>Pep</sub>: peptídeos encapsulados; Pig: pigmento livre; PC<sub>Pig</sub>: pigmento encapsulado; P+P: mistura dos peptídeos com o pigmento na forma livre; PC<sub>P+P</sub>: compostos coencapsulados.

	C	PC	Pep	PC <sub>Pep</sub>	Pig	PC <sub>Pig</sub>	P+P	PC <sub>P+P</sub>
<i>S. aureus</i> 1901	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.
<i>E. coli</i> 8739	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.
<i>S. enteritidis</i> SE86	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.
<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.

\*S.I.: sem inibição



**Figura 8.** Atividade antimicrobiana do extrato de pigmento a concentração de 10,0 mg/mL contra *Listeria monocytogenes* ATCC7644.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização físico-química dos lipossomas

#### 6.1.1 Análises de espalhamento de luz e potencial zeta ( $\zeta$ )

No presente trabalho, foram produzidos com sucesso nanolipossomas constituídos de fosfatidilcolina (PC) encapsulando peptídeos bioativos da hidrólise enzimática de penas de frango e um pigmento bacteriano amarelo-alaranjado do tipo flexirubina. O diâmetro médio, PDI e potencial  $\zeta$  das partículas foram determinados como forma de avaliar a estabilidade dos lipossomas na suspensão coloidal. O tamanho dos lipossomas não excedeu 200 nm. Os lipossomas controle vazios apresentaram um diâmetro médio de 168,5 nm, um PDI de 0,226 e um potencial  $\zeta$  de -20,9 mV. É reconhecido que o tamanho das partículas influencia fortemente a dispersividade e a solubilidade dos compostos bioativos encapsulados. Quanto menor o tamanho das partículas, maior é a solubilidade e a biodisponibilidade do composto, uma vez que nanoformulações proporcionam uma maior área superficial em comparação a microformulações (MOHAN et al., 2015). Além disso, uma distribuição de tamanho mais estreita, expressa como um baixo PDI, é documentada por influenciar a estabilidade de formulações coloidais, com valores até 0,3 sendo esperados para sistemas preparados com materiais biológicos (MALHEIROS et al., 2011).

A encapsulação dos peptídeos bioativos sozinhos não resultou em alteração no tamanho das vesículas comparado aos lipossomas controle, com um diâmetro médio de 185,4 nm e um PDI de 0,224. Este tamanho relativamente pequeno e sua monodispersão podem ser atribuídos ao uso de sonicação para redução e uniformização do tamanho dos lipossomas. SILVA e colaboradores (2010) avaliaram o efeito de diferentes amplitudes de sonicação no tamanho e na polidispersividade de lipossomas vazios e observaram que o uso de maiores amplitudes resultou em lipossomas menores, com tamanhos por volta de 100 nm ou menores. A pureza da PC usada como encapsulante também pode ser um fator importante, uma vez que a presença de compostos não-fosfolipídicos nas paredes dos lipossomas produzidos com lecitina de soja não purificada pode ser responsável pelo seu tamanho aumentado (TALADRID et al., 2017). Resultados similares foram

obtidos por MALHEIROS e colaboradores (2011) para lipossomas encapsulando um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus* sp. P34, com tamanhos variando de 144,6 nm a 162,9 nm e um PDI não excedendo 0,27. Tamanhos aproximados também foram observados em lipossomas contendo peptídeos do soro de leite ovino, apesar de valores mais elevados de PDI, acima de 0,4, terem sido obtidos (CORRÊA et al., 2019).

Por outro lado, observamos tamanhos reduzidos para os lipossomas encapsulando o extrato de pigmento, com 102 nm e PDI de 0,292, e a mistura dos peptídeos e o pigmento, com 98,5 nm e PDI de 0,295. A incorporação do pigmento à parede lipídica dos lipossomas, aparentemente, é responsável por essa redução no tamanho. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a respeito da encapsulação de pigmentos do tipo flexirubina em lipossomas, havendo, assim, pouca informação sobre os efeitos deste tipo de pigmento em membranas lipídicas. Dito isso, já se tem documentado que a presença de pigmentos carotenoides polares em membranas bacterianas parece aumentar sua fluidez abaixo de sua temperatura de transição de fase (CHATTOPADHYAY & JAGANNADHAM, 2001; GRUSZECKI & STRZAŁKA, 2005). Além disso, já foi observado que a produção de carotenoides por bactérias antárticas se mostrou aumentada após um ciclo de congelamento e descongelamento, sugerindo a importância desses pigmentos na manutenção da fluidez da membrana (SINGH et al., 2017). Essa característica também foi observada em membranas modelo, com concentrações do carotenoide licopeno de 1,0% ou maiores exercendo um efeito fluidizante nas paredes de lipossomas, apesar de o  $\beta$ -caroteno e a luteína causarem um efeito de enrijecimento da membrana (XIA et al., 2015).

Extrapolando as informações fornecidas por esses resultados para flexirubinas, o tamanho reduzido observado para os lipossomas encapsulando o pigmento em nosso trabalho pode ser explicado por um aumento da fluidez causado pela incorporação do pigmento nos lipossomas, resultando em um efeito mais intenso da sonicação e, assim, uma redução mais eficiente no tamanho dos lipossomas. Tamanhos reduzidos para lipossomas encapsulando pigmentos também foram observados por HASAN e colaboradores (2014) para lipossomas encapsulando curcumina. Como sugerido pelos autores, outra explicação para o tamanho reduzido pode ser uma forte interação entre o pigmento e os lipídios, resultando em uma compactação do núcleo das vesículas. No tocante ao PDI,

apesar de uma distribuição de tamanho mais larga ter sido observada, os valores permaneceram abaixo de 0,3, podendo ser considerados dentro da faixa esperada para lipossomas contendo material biológico.

O potencial  $\zeta$  diz respeito à carga elétrica formada na superfície de partículas em suspensão em uma solução aquosa. Este potencial de superfície afeta fortemente a estabilidade de sistemas coloidais, uma vez que, quanto maior em módulo for o seu valor, mais forte será a repulsão eletrostática entre as partículas, superando a tendência natural à agregação (BRANDELLI & TAYLOR, 2015). Convencionalmente, valores inferiores a -30 mV e superiores a +30 mV são considerados potenciais altos, indicando estabilidade. Como mostrado na Tabela 1, a encapsulação dos peptídeos bioativos e do extrato de pigmento resultou em um aumento considerável no módulo do potencial  $\zeta$  dos lipossomas em comparação às vesículas vazias, com potenciais de -30,0 mV para os lipossomas contendo os peptídeos, -33,8 mV para os lipossomas contendo o pigmento e -38,2 mV para os lipossomas coencapsulando os compostos. Além disso, pouca sedimentação foi observada para os lipossomas encapsulando os peptídeos ao longo do tempo, sugerindo um baixo índice de agregação. Já para os lipossomas contendo o pigmento, tanto encapsulado sozinho quanto coencapsulado com os peptídeos, não houve nenhuma sedimentação aparente, o que pode ser o resultado de um potencial  $\zeta$  altamente negativo combinado a um tamanho reduzido das partículas.

#### 6.1.2 Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação (EE) pode ser definida como a quantidade do composto bioativo efetivamente assimilada pela estrutura carreadora, tanto no seu núcleo quanto em sua superfície ou paredes, em relação à quantidade inicial do material bioativo (MOHAN et al., 2015). A EE depende de vários aspectos, como a relação núcleo/parede, as condições nas quais o processo de encapsulação é realizado e a técnica selecionada para a encapsulação. A EE obtida para os peptídeos foi de 64,98%. MALHEIROS e colaboradores (2011) reportaram uma EE de 100% para lipossomas de PC parcialmente purificada contendo o peptídeo antimicrobiano P34. Uma EE similarmente alta (94%) foi obtida por MALHEIROS e colaboradores (2010) para lipossomas de PC contendo a bacteriocina catiônica nisina. Tais valores de EE foram atribuídos à interação eletrostática dos peptídeos



com os fosfolipídios usados na produção dos lipossomas.

É reconhecido que a composição lipídica e a carga líquida dos lipossomas afetam a EE (LARIDI et al., 2003). Uma vez que a PC não apresenta carga líquida em pH neutro, interações eletrostáticas entre a bicamada dos lipossomas e os peptídeos podem ser ignoradas (TEIXEIRA et al., 2008). Além disso, a inserção dos peptídeos nos lipossomas pode ocorrer em função de interações hidrofóbicas com a parede de PC (TEIXEIRA et al., 2008; MAHERANI et al., 2012).

Uma EE de 48% foi obtida para lipossomas contendo peptídeos do soro de leite ovino (CORRÊA et al., 2019). Os autores associam a quantidade de peptídeos usados na formulação e a EE como uma razão para o baixo valor obtido. De forma similar, a concentração relativamente alta de peptídeos usadas em nosso trabalho (9,0 mg/mL) pode ser responsável pela EE moderada obtida, com a quantidade de PC não sendo suficiente para encapsular todos os peptídeos presentes na formulação. Esse resultado corrobora com MOSQUERA e colaboradores (2014), que reportaram que concentrações crescentes de peptídeos resultaram em uma redução significativa na EE. Considerando que eficiências de 50% ou maiores podem aumentar o risco de perda do composto encapsulado (FATHI, MOZAFARI & MOHEBBI, 2012), ao passo que, por outro lado, baixos valores de EE implicariam em um uso ineficiente da substância bioativa, a EE alcançada para os peptídeos bioativos em nosso trabalho pode ser considerada satisfatória.

Com relação ao pigmento, foi obtida uma EE muito maior em comparação com os peptídeos, com aproximadamente 90% do extrato de pigmento tendo sido incorporado nos lipossomas. Esse resultado já era esperado pelo fato de que o pigmento possui um caráter altamente lipofílico, sendo eficientemente incorporado pela porção hidrofóbica da bicamada. Uma encapsulação eficiente parece ser comum para pigmentos lipofílicos, com EE moderadas a altas sendo frequentemente alcançadas para esses compostos. Por exemplo, EE variando de 63,2% a 67,3% foram obtidas por HASAN e colaboradores (2014) para a encapsulação de curcumina em lipossomas de lecitina de soja, canola e salmão. Eficiência similar foi obtida por HATAHET e colaboradores (2018), com 68% da quantidade inicial de quercetina sendo encapsulada em lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). PAINI e colaboradores (2015) obtiveram uma EE alta, de 92%, para lipossomas de lecitina de canola contendo apigenina. A hidrofobicidade do composto encapsulado

é mencionada por todos os autores dos trabalhos citados como a principal razão para os altos valores obtidos.

Após a coencapsulação dos compostos, não se observou uma redução na EE do extrato de pigmento. Todavia, verificamos uma perda significativa de eficiência na encapsulação dos peptídeos, com apenas 53,28% da concentração inicial sendo internalizada nos lipossomas. Como mencionado anteriormente, as interações entre os aminoácidos hidrofóbicos na sequência dos peptídeos e a porção hidrofóbica das moléculas de PC nas paredes dos lipossomas podem contribuir com a inserção dos peptídeos nas nanovesículas (TEIXEIRA et al., 2008), o que significa que a porção hidrofóbica das paredes deve estar disponível para tais associações. Quando os peptídeos são coencapsulados com o extrato de pigmento, o segundo se associa mais fortemente com esta porção das paredes por sua alta afinidade do que o primeiro, resultando em uma fração menor da porção hidrofóbica das paredes disponível para interação com os peptídeos.

### 6.1.3 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas para obter informações a respeito das interações entre os lipossomas e os compostos bioativos encapsulados. O espectro dos peptídeos mostra absorções características de queratinas (POURJAVAHERI-JAD et al., 2014; SHARMA et al., 2016). Em  $3424\text{ cm}^{-1}$  podemos observar uma área de absorção correspondente à vibração de estiramento da ligação N-H. A banda em  $2930\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo ao estiramento de C-H, representa o esqueleto de carbono dos peptídeos. As bandas observadas em  $1616\text{ cm}^{-1}$  e  $1402\text{ cm}^{-1}$  caracterizam os grupamentos amida I e amida II das proteínas. Em  $1118\text{ cm}^{-1}$  podemos observar uma banda que corresponde à vibração de estiramento do grupamento amina.

O espectro do extrato de pigmento não encapsulados apresenta bandas por volta de  $2972\text{ cm}^{-1}$ , que caracterizam a ligação C-H presente na cadeia poli-insaturada do anel aromático. A banda observada em  $1643\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento C=O do éster ligando o fenol e a cadeia poli-insaturada. A banda em  $1383\text{ cm}^{-1}$  pode corresponder ao espectro característico do anel fenólico. A banda presente em  $879\text{ cm}^{-1}$  pode corresponder a uma ligação C-Cl, sugerindo a presença de um átomo de cloro no anel do resorcinol. O pigmento parcialmente purificado

produzido por *Chryseobacterium* sp. kr6 já foi caracterizado por JIMÉNEZ e colaboradores (2018) e a análise de FTIR revelou um espectro similar. Pequenas diferenças nas posições e no número dos picos podem ser atribuídas ao fato de que, em nosso trabalho, não foi empregado nenhum passo de purificação. As bandas em  $1050\text{ cm}^{-1}$  podem corresponder ao estiramento da ligação C-O, também observado por VENIL e colaboradores (2014) no espectro do pigmento de *Chryseobacterium* sp. UTM-3<sup>T</sup>. A larga área de absorção por volta de  $3373\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo à vibração de estiramento do grupo O-H, pertence ao etanol utilizado como solvente para a análise.

Os espectros obtidos para os lipossomas vazios e encapsulando os compostos bioativos apresentam absorções características da PC. As bandas em  $2926\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento C-H dos ácidos graxos. Em  $1738\text{ cm}^{-1}$ , observamos bandas correspondentes ao éster ligando o glicerol às cadeias de ácidos graxos. A banda observada em  $1468\text{ cm}^{-1}$  é característica do grupamento amida. As bandas em  $1242\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento C-N da colina, enquanto que as bandas em  $1091\text{ cm}^{-1}$  são característicos do fosfato. Espectros similares, com bandas características da PC, também foram observados por PINILLA, NOREÑA & BRANDELLI (2017), que produziram lipossomas contendo um extrato bioativo de alho. Os espectros dos lipossomas contendo os peptídeos bioativos sozinhos ou coencapsulado com o pigmento apresentam uma banda mais intensa correspondente ao grupo amida a  $1468\text{ cm}^{-1}$  comparados às outras formulações. Isto pode ser causado pelo grupo amida pertencente à estrutura dos peptídeos somado à amida das moléculas de PC, resultando em um aumento na intensidade desta banda. O espectro dos lipossomas vazios e contendo o extrato de pigmento sozinho é essencialmente o mesmo, em virtude do fato de que a concentração do extrato na formulação não é igual a, pelo menos, 5% da concentração de PC, podendo não estar presente em concentração suficiente para ser detectado pelo método. De forma geral, nenhum dos espectros apresentou novas bandas, sugerindo que os compostos bioativos não se associaram com os lipossomas através da formação de novas ligações químicas.

## 6.2 Determinação de atividades biológicas

### 6.2.1 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos compostos bioativos obtidos da cultura de *Chryseobacterium* sp. kr6 livres e encapsulados foram avaliadas pelo ensaio de captura do radical ABTS. Na presença de substâncias doadoras de prótons ou que interrompem reações em cadeia, o radical ABTS●<sup>+</sup> é reduzido a um produto incolor (NENADIS et al., 2004). Desse modo, uma redução de absorbância da solução de radical reflete a capacidade antioxidante do composto avaliado. A encapsulação nos lipossomas não resultou em alteração na capacidade dos peptídeos de captura do ABTS●<sup>+</sup>, com uma atividade de 47,6% antes da encapsulação e 47,3% após a encapsulação. Esses resultados corroboram com estudos anteriores (ZAVAREZE et al., 2014; HOSSEINI, RAMEZANZADE & NIKKHAH, 2017), nos quais não foram verificadas diferenças significativas na atividade antioxidante dos compostos bioativos estudados após sua encapsulação. Trabalhos encontrados na literatura reportam capacidades antioxidantes variáveis para peptídeos. RAMEZANZADE, HOSSEINI & NIKKHAH (2017) produziram lipossomas contendo peptídeos derivados da hidrólise de gelatina de pele de peixe com atividade de captura do ABTS inferior a 40%, enquanto que HOSSEINI, RAMEZANZADE & NIKKHAH (2017) obtiveram atividades variando de 16,4% a 74,7% para peptídeos obtidos da mesma fonte.

Assim como para os peptídeos, a capacidade antioxidante do extrato de pigmento também se manteve com pouca alteração após sua encapsulação, permanecendo entre 13,8% na sua forma livre e 16,0% na forma encapsulada. Esses resultados diferem dos obtidos por DI MARTINO e colaboradores (2018), que demonstraram um aumento considerável na atividade antioxidante de  $\beta$ -caroteno, em termos de captura do radical DPPH, após sua encapsulação em complexos de quitosana/ácido nucleico. Os autores sugerem um aumento na disponibilidade causada por uma melhora na solubilidade do  $\beta$ -caroteno após sua encapsulação como uma possível razão para sua atividade melhorada. Além disso, a estabilização da substância bioativa dentro da estrutura encapsulante pode possuir um papel no melhoramento da sua atividade biológica (OLGA, STYLIANI & IOANNIS, 2015). Um aumento na capacidade de captura de radicais após encapsulação também foi

observado em lipossomas contendo curcumina (NIU et al., 2012) e microcápsulas poliméricas contendo um pigmento do tipo flexirubina (VENIL et al., 2016).

Neste trabalho, foi analisada a atividade antioxidante de dois compostos bioativos com o objetivo de verificar se há um efeito sinérgico entre os dois. Sinergismo pode ser definido como a combinação de dois ou mais agentes de forma que sua ação ou atividade combinada é maior que a soma das atividades de cada agente separadamente (SONAM & GULERIA, 2017). O que foi observado, ao contrário, foi uma aparente interferência na atividade antioxidante dos peptídeos e do extrato de pigmento quando avaliados juntos. A combinação dos peptídeos e do pigmento resultou em uma atividade antioxidante de 45,1%, muito próxima à atividade dos peptídeos sozinhos. A composição de aminoácidos influencia a atividade antioxidante de peptídeos, tendo sido verificado que uma maior quantidade de resíduos hidrofóbicos positivamente influencia a atividade antioxidante (POWNALL, UDENIGWE & ALUKO, 2010; JIANG et al., 2018; MATSUI et al., 2018).

De acordo com informações obtidas previamente (FONTOURA et al., 2019), a hidrólise enzimática de penas por *Chryseobacterium* sp. kr6 gera peptídeos bioativos com uma alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos, variando de 20% a 66,6%. Considerando o caráter hidrofóbico dos peptídeos usados neste trabalho, criamos a hipótese de uma possível interação entre o pigmento e os resíduos hidrofóbicos responsáveis pela atividade antioxidante dos peptídeos. Essa hipótese é apoiada pelo aumento na atividade antioxidante observada pós a coencapsulação dos compostos (57,4%). Este aumento pode ter ocorrido por uma localização diferencial dos compostos dentro dos lipossomas. Pigmentos do tipo flexirubina estão localizados na membrana externa de bactérias (VENIL et al., 2014), sendo, portanto, seguro assumir que o pigmento se localiza principalmente na parede lipídica dos lipossomas após sua encapsulação. Já os peptídeos, por outro lado, apesar de sua alta composição de aminoácidos hidrofóbicos, possuem um caráter mais hidrofílico em comparação ao pigmento em virtude de resíduos hidrofílicos presentes em suas sequências, sendo solúveis em meio aquoso e, conseqüentemente, retidos principalmente dentro do núcleo aquoso dos lipossomas. Dessa forma, esses compostos, em sua maioria, se localizam em compartimentos diferentes dentro do lipossoma, sendo capazes de exercer sua bioatividade sem tanta interferência entre eles. Dito isso, o aumento na atividade observado após a coencapsulação não pode ser considerado como um efeito sinérgico, já que a

atividade dos compostos combinados não é maior que a atividade somada dos compostos separados. CORADINI e colaboradores (2014) verificaram melhora na atividade antioxidante de resveratrol e curcumina após sua coencapsulação em nanocápsulas poliméricas. OLGA, STYLIANIS E IOANNIS (2015) não observaram qualquer efeito sobre a atividade de ácido ferúlico e ácido gálico após a coencapsulação em complexos de ciclodextrina. Esses estudos, somados aos nossos resultados, fornecem evidências de que efeitos sinérgicos para compostos bioativos coencapsulados podem depender das substâncias de interesse, do método e dos materiais usados para a encapsulação.

### 6.2.2 Atividade antibacteriana

A atividade inibitória dos compostos bioativos contra patógenos comuns em alimentos foi avaliada frente a quatro diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Não foi observada inibição pelos peptídeos, tanto na sua forma livre quanto na forma encapsulada, para nenhuma das linhagens. Corrêa e colaboradores (2011) observaram atividade inibitória contra bactérias e fungos filamentosos por caseinato de leite ovino hidrolisado por uma protease produzida pelo *Bacillus* sp. P7. Wang e colaboradores (2018) obtiveram oligopeptídeos da hidrólise de farinha de anchova com proteases comerciais possuindo atividade antibacteriana. Por outro lado, Shavandi e colaboradores (2017) não obtiveram atividade antibacteriana ou antifúngica por hidrolisados proteicos obtidos de efluentes da extração de quitosana de lulas. Informações quanto às atividades biológicas de hidrolisados de queratinas são bastante limitados, uma vez que estudos com esses peptídeos são focados principalmente em aplicações cosmética, e não em tecnologia de alimentos ou saúde humana (Ferraro, Anton & Santé-Lhoutelier, 2016). Mosquera e colaboradores (2016) demonstraram que, de forma similar à atividade antioxidante, a atividade antimicrobiana de peptídeos está fortemente relacionada com a presença de aminoácidos hidrofóbicos, uma vez que essa característica facilita a entrada dos peptídeos na célula microbiana através do domínio hidrofóbico da membrana. Além disso, um alto conteúdo de cisteína e resíduos aromáticos é usualmente associada com maiores atividades antimicrobianas (Liu et al., 2008; Shavandi et al., 2017). Como demonstrado por Fontoura e colaboradores (2019), hidrólise de penas de frango por

*Chryseobacterium* sp. kr6 resulta em peptídeos com um baixo teor de cisteína e aminoácidos aromáticos.

Uma carga líquida positiva também é reconhecida por ser responsável por iniciar a interação entre os peptídeos e a membrana bacteriana negativamente carregada (Ahmed & Chun, 2018), e se considera que uma associação entre uma carga catiônica e a hidrofobicidade dos peptídeos é imperativa para sua atividade antimicrobiana (Pinazo et al., 2016). Nossos resultados sugerem que a composição específica de aminoácidos e a carga líquida neutra dos peptídeos podem explicar a incapacidade de inibição bacteriana dos peptídeos neste trabalho.

Nenhuma atividade antimicrobiana foi observada para o extrato de pigmento na concentração utilizada (300 ng/mL). No entanto, quando testado em uma concentração mais alta (10 mg/mL), foram observados halos de inibição para *L. monocytogenes* ATCC7644. Não obstante, como o método de extração do pigmento empregado não fornece um alto rendimento, optamos pela concentração de 300 ng/mL para as análises.

Pigmentos microbianos são documentados por exercerem atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas em alimentos (Umadevi & Krishnaveni, 2013; Mohana, Thippeswamy & Abhishek, 2013), além de atividade inibitória contra bactérias formadoras de biofilmes (Radhakrishnan et al., 2016) e até mesmo atividade anti-micobactéria (Mojib et al., 2010). A literatura a respeito da elucidação do mecanismo pelo qual pigmentos microbianos interferem com o crescimento bacteriano é bastante escassa, porém, uma interação entre o pigmento e os fosfolípidios da membrana, resultando no rompimento e consequente permeabilização da membrana, é uma explicação plausível (Zhao et al., 2016). O modo de ação do pigmento violeta antimicrobiano produzido por *Chromobacterium violaceum* UTM5 contra duas linhagens de *S. aureus* foi descrito por Aruldass e colaboradores (2018). O acúmulo do pigmento na membrana celular das bactérias resultou no seu rompimento e permeabilização, com consequente perda de íons, ATP e proteínas. Além disso, o pigmento violeta não rompeu a cadeia respiratória das bactérias, não inibindo a respiração celular, sugerindo um efeito mais específico sobre a membrana. Nossos resultados apoiam a hipótese do efeito direcionado à membrana celular, uma vez que a alta EE obtida para o extrato de pigmento sugere uma alta afinidade por membranas lipídicas.

## 7. CONCLUSÃO

Foi demonstrado que é possível fazer a encapsulação dos compostos bioativos em lipossomas, e que esses lipossomas apresentam parâmetros de estabilidade superiores a lipossomas vazios, produzidos pelo mesmo método. Isso sugere que a encapsulação dos compostos é uma alternativa viável para sua aplicação.

O tamanho nanométrico dos lipossomas encapsulando os compostos bioativos, em combinação com o seu potencial altamente negativo, nos permite afirmar que essas vesículas se apresentam homoganeamente distribuídas na solução e apresentam um baixo grau de agregação, o que, conseqüentemente, permite que os lipossomas não sedimentem e permaneçam em suspensão. Em última análise, podemos dizer que obtivemos sucesso em produzir uma solução coloidal com nanopartículas verdadeiramente dispersas.

As análises de espectro de infravermelho demonstraram que a encapsulação dos compostos bioativos ocorre preferencialmente no interior dos lipossomas, em seu núcleo ou em suas paredes, em vez de uma imobilização em sua superfície. Dessa forma, é reduzida a exposição dos compostos a condições ambientais adversas que poderiam levar à sua degradação, uma vez que eles se encontram mais protegidos pela estrutura encapsulantes, o que sugere que os compostos podem exercer suas bioatividades por um período mais prolongado. Ainda, essas análises demonstraram que não há associações entre os compostos e as moléculas de fosfatidilcolina por meio de novas ligações químicas, que poderiam dificultar ou impossibilitar a liberação dos compostos de dentro dos lipossomas.

A eficiência de encapsulação dos peptídeos, apesar de se mostrar ligeiramente reduzida após sua coencapsulação com o pigmento, se manteve em uma faixa considerada adequada para o material encapsulado. Além disso, essa redução não refletiu em uma perda de atividade biológica dos peptídeos encapsulados ou em uma deterioração nos parâmetros de estabilidade desses lipossomas. A eficiência de encapsulação do pigmento, por outro lado, permaneceu alta e inalterada mesmo após sua coencapsulação, demonstrando que sua afinidade pela parede lipídica não é alterada pela presença de outro composto encapsulado.

No tocante à atividade antioxidante, a encapsulação em lipossomas não levou a alterações na capacidade dos peptídeos ou do pigmento de exercer suas



propriedades bioativas, não havendo redução nos valores de atividade antioxidante com os compostos encapsulados isoladamente. Os compostos exerceram uma interferência negativa sobre a atividade um do outro. Com a coencapsulação dos peptídeos e do pigmento em lipossomas, foi possível reduzir essa interferência sobre a atividade antioxidante, demonstrando que a coencapsulação, além de prover proteção aos compostos e aumentar sua solubilidade, também permite evitar interações indesejáveis que poderiam resultar em perda de atividade biológica.

Com o ensaio de atividade antibacteriana, foi observado que o pigmento é capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* apenas em altas concentrações. Isso evidencia a necessidade de desenvolvimento de um método de extração mais eficiente, que permita a obtenção de maiores quantidades de pigmento para que, então, a viabilidade da sua aplicação possa ser reavaliada.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABDALHAMID, B. et al. *Chryseobacterium gleum* pneumonia in an infant with nephrotic syndrome. **IDCases**, v. 5, p. 34–36, 2016.
- ACHENBACH, H. et al. Investigations on the biosynthesis of flexirubin - The origin of benzene ring B and its substituents. **Tetrahedron**, v. 39, p. 175–185, 1983.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science**, London, p. 12-19, 1985.
- AGUILAR, J. G. DOS S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. September 2017, p. 253–262, 2018.
- AHMED, R.; CHUN, B.-S. Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 141, p. 88–96, 2018.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.
- ARROYO, B. J. et al. Bioactive Compounds and Their Potential Use as Ingredients for Food and Its Applications in Food Packaging. In: CAMPOS, M. R. S. (Ed.) **Bioactive Compounds - Health Benefits and Potential Applications**. Elsevier, p. 143-156, 2019.
- ARSHAD, N. et al. Enzyme and Bioactive Peptides - A Strategy for Discovery and Identification of Antihypertensive Peptides. In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**. Elsevier, p. 343-367, 2019.
- ARULDASS, C. A. et al. Utilization of agro-industrial waste for the production of yellowish-orange pigment from *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 342–349, 2016.
- ARULDASS, C. A. et al. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 5164–5180, fev. 2018.
- ARULDASS, C. A.; DUFOSSÉ, L.; AHMAD, W. A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms - A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 168–182, 2018.
- ASIF, A. et al. Therapeutic potentials of bioactive compounds from mango fruit

- wastes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 102–112, 2016.
- BAJERSKI, F. et al. *Chryseobacterium frigidisoli* sp. nov., a psychrotolerant species of the family Flavobacteriaceae isolated from sandy permafrost from a glacier forefield. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 2666–2671, 2013.
- BAJPAI, V. K. et al. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 6, p. 1202–1214, 2018.
- BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96–109, mar. 2016.
- BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: A survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 3, p. 320–338, 14 abr. 2010.
- BERNARDET, J.; HUGO, C.; BRUUN, B. The Genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. In: **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer New York, p. 638–676, 2006.
- BERNARDET J. F., BOWMAN J. 2010. Genus I. *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Hurtoon 1923, 97AL emend. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes (Krieg NR, Ludwig W, Whitman WB, Hedlund BP, Paster BJ, Staley JT, Ward N, Brown D & Parte A, eds), pp. 112–154. Springer, New York.
- BIESALSKI, H. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, n. 11–12, p. 1202–1205, nov. 2009.
- BOOTH, S. J. *Chryseobacterium* Related Genera Infections. In: **The Curated Reference Collection in Biomedical Science**. Elsevier, 4 p, 2014.
- BOWMAN, J. P. Description of *Cellulophaga algicola* sp. nov., isolated from the surfaces of Antarctic algae, and reclassification of *Cytophaga uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Cellulophaga uliginosa* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1861–1868, 2000.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International**

- Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2015.
- BRAGA, M. C.; VIEIRA, E. C. S.; DE OLIVEIRA, T. F. *Curcuma longa* L. leaves: Characterization (bioactive and antinutritional compounds) for use in human food in Brazil. **Food Chemistry**, v. 265, p. 308–315, nov. 2018.
- BRANDELLI, A. Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 731–741, 2012.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1735–1750, fev. 2010.
- BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3–12, jul. 2015.
- BRANDELLI, A., & TAYLOR, T. M. Nanostructured and nanoencapsulated natural antimicrobials for use in food products. In T. M. Taylor (Ed.), **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**, p. 229-257, 2015.
- BRANDELLI, A.; LOPES, N. A.; BOELTER, J. F. Food Applications of Nanostructured Antimicrobials. In: GRUMEZESCU, A. M. **Food Preservation**. Elsevier, p. 35-74, 2017.
- CALLEGARO, K.; WELTER, N.; DAROIT, D. J. Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 75, n. May, p. 1–9, dez. 2018.
- CHATTOPADHYAY, M. K.; JAGANNADHAM, M. V. Maintenance of membrane fluidity in Antarctic bacteria. **Polar Biology**, v. 24, n. 5, p. 386–388, 27 abr. 2001.
- CHAUDHARI, P. N. et al. Characteristics of sulfobacin A from a soil isolate *Chryseobacterium gleum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 1, p. 231–241, 2009.
- CHO, S.-H. et al. Four new species of *Chryseobacterium* from the rhizosphere of coastal sand dune plants, *Chryseobacterium elymi* sp. nov., *Chryseobacterium hagamense* sp. nov., *Chryseobacterium lathyri* sp. nov. and *Chryseobacterium rhizosphaerae* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 122–127, abr. 2010.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food**

- Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 254–262, 2000.
- CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 178–185, set. 2014.
- CORREA-LLANTÉN, D. N.; AMENÁBAR, M. J.; BLAMEY, J. M. Antioxidant capacity of novel pigments from an Antarctic bacterium. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 374–379, 2012.
- CORRÊA, A. P. F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2247–2254, 2011.
- CORRÊA, A. P. F. 2013. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino**. Tese (doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CORRÊA, A. P. F. et al. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48–55, nov. 2014.
- CORRÊA, A. P. F. et al. Characterization of nanoliposomes containing bioactive peptides obtained from sheep whey hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 101, p. 107–112, 2019.
- CUSHEN, M. et al. Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n. 1, p. 30–46, mar. 2012.
- DELGADO, J. M. F. 2013. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa**. Dissertação (mestrado em Tecnologia Médica). Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- DE 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.
- DI MARTINO, A. et al. Enhancement of the antioxidant activity and stability of  $\beta$ -carotene using amphiphilic chitosan/nucleic acid polyplexes. **International**

- Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 773–780, out. 2018.
- DOUVOYIANNIS, M. et al. *Chryseobacterium indologenes* bacteremia in an infant. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 2009–2010, 2010.
- DRUMMOND, D. C. et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 4, p. 691–743, 1999.
- DURAK, A. et al. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2177–2183, 2013.
- ELBATANONY, M. M. et al. Assessment of the antimicrobial activity of the lipoidal and pigment extracts of *Punica granatum* L. leaves. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 1, p. 89–94, fev. 2019.
- FAKHFAKH, N. et al. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1731–1737, 2011.
- FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, jan. 2012.
- FAUTZ, E.; REICHENBACH, H. Biosynthesis of flexirubin: Incorporation of precursors by the bacterium *Flexibacter elegans*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 957–959, 1979.
- FAUTZ, E.; REICHENBACH, H. A simple test for flexirubin-type pigments. **FEMS Microbiology Letters**, v. 8, p. 87–91, 1980.
- FERRARO, V.; ANTON, M.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V. The “sisters”  $\alpha$ -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of application. **Trends in Food Science and Technology**, v. 51, p. 65–75, 2016.
- FONTOURA, R. et al. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. **New Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 506–513, 2014.
- FONTOURA, R. et al. Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. **New Biotechnology**, v. 49, n. September, p. 71–76, mar. 2019.
- FRANCISCO, E.; GARCÍA-ESTEPA, R. M. Nanotechnology in the agrofood industry.

- Journal of Food Engineering**, v. 238, p. 1–11, 2018.
- GIANFRANCESCHI, G. L. et al. Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. **Journal of Functional Foods**, v. 47, p. 252–263, 2018.
- GRAM, L. et al. Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 79–97, 2002.
- GRUSZECKI, W. I.; STRZAŁKA, K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 108–115, maio 2005.
- HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 24–33, maio 2016.
- HASAN, M. et al. Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1–2, p. 519–528, jan. 2014.
- HATAHET, T. et al. Liposomes, lipid nanocapsules and SmartCrystals®: A comparative study for an effective quercetin delivery to the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 542, n. 1–2, p. 176–185, maio 2018.
- HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. et al. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. **Food Bioscience**, v. 7, p. 31–36, 2014.
- HIJAZIN, C. A. H.; SIMÕES, A. T.; SILVEIRA, D. R. Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. **Revista Atitude - Faculdade Dom Bosco de Porto Alegre**, n. 7, p. 89–93, 2010.
- HOLKAR, C. R. et al. Valorization of keratin based waste. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 115, p. 85–98, 2018.
- HOSSEINI, F. S.; RAMEZANZADE, L.; NIKKHAH, M. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1455–1463, 2017.
- HUGO, C. J. et al. *Chryseobacterium joostei* sp. nov., isolated from the dairy environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 771–777, 2003.
- IMRAN, M. et al. Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 341–349, jun. 2015.
- JIANG, Y. et al. Contribution of specific amino acid and secondary structure to the

- antioxidant property of corn gluten proteins. **Food Research International**, v. 105, p. 836–844, 2018.
- JIMÉNEZ, M. E. P. et al. Extraction and partial characterisation of antioxidant pigment produced by *Chryseobacterium* sp. kr6. **Natural Product Research**, v. 6419, p. 1–9, 2018.
- JIMTHA, C. J. et al. Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia* sp. **Rhizosphere**, v. 3, p. 105–108, jun. 2017.
- JOYE, I. J.; DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. **Nanotechnology in Food Processing**. In: The Curated Collection in Food Science. Elsevier, 2016. 7 p.
- KAMPFER, P. et al. *Chryseobacterium gallinarum* sp. nov., isolated from a chicken, and *Chryseobacterium contaminans* sp. nov., isolated as a contaminant from a rhizosphere sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1419–1427, 1 abr. 2014.
- KÄMPFER, P. et al. *Chryseobacterium limigenitum* sp. nov., isolated from dehydrated sludge. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 6, p. 1633–1638, 27 jun. 2015.
- KHORASANI, S.; DANAEI, M.; MOZAFARI, M. R. Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, p. 106–115, 2018.
- KIENZLE, N.; MULLER, M.; PEGG, S. *Chryseobacterium* in burn wounds. **Burns**, v. 27, n. 2, p. 179–182, 2001.
- KIM, H. et al. Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuense* strain KJ9C8 as a biocontrol agent of *Phytophthora blight* of pepper. **Crop Protection**, v. 32, p. 129–137, fev. 2012.
- KIM, S. K. (1. ed.). 2013. **Marine Biomaterials: Characterization, isolation and applications**. CRC Press, Taylor & Francis.
- KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309–1323, 2003.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1297–1308, 2003.
- KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; JUSTYNA, B. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste Management**, v. 31, n. 8, p. 1689–1701,



2011.

- LAMBIASE, A. et al. *Chryseobacterium* respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. **Journal of Infection**, v. 55, n. 6, p. 518–523, dez. 2007.
- LAOUINI, A. et al. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147–168, 1 dez. 2012.
- LARIDI, R. et al. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 325–336, jan. 2003.
- LEE, D.-H. et al. Encapsulation of Bromelain in Liposome. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 81–85, 2000.
- LEE, S. Y.; HUR, S. J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. **Food Chemistry**, v. 228, p. 506–517, 2017.
- LESNIEROWSKI, G.; STANGIERSKI, J. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 46–51, 2018.
- LI, M. et al. Composition design and medical application of liposomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 640–653, fev. 2019.
- LIU, Z. et al. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 231–235, mar. 2008.
- LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.
- LOPES, N. A.; BRANDELLI, A. Nanostructures for delivery of natural antimicrobials in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2202–2212, 2 set. 2018.
- LOPES, N. A.; PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 1–7, set. 2017.
- LORENZO, J. M. et al. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 136–147, set. 2018.
- LOWRY., O. H. et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Analytical**

- Biochemistry**, v. 217, n. 2, p. 220–230, 1994.
- MAHERANI, B. et al. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 3, p. 436–452, 1 jun. 2011.
- MAHERANI, B. et al. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 632–640, set. 2012.
- MAJUMDAR, S. et al. Exploring *Planococcus* sp. TRC1, a bacterial isolate, for carotenoid pigment production and detoxification of paper mill effluent in immobilized fluidized bed reactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1389–1402, fev. 2019.
- MALHEIROS, P. DA S. et al. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1198–1203, 2010.
- MALHEIROS, P. DA S. et al. Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 8, p. 3545–3552, 25 ago. 2011.
- MANN, B. et al. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3235–3241, 2014.
- MANN, B. et al. Bioactive Peptides from Whey Proteins. In: DEETH, H. C.; BANSAL, N. (Eds.). **Whey Proteins - From Milk to Medicine**. Elsevier, p. 519-547, 2019.
- MATSUI, R. et al. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. **Food Chemistry**, v. 245, n. November 2017, p. 750–755, abr. 2018.
- MAZUR, F. et al. Liposomes and lipid bilayers in biosensors. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 88–99, 2017.
- MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, p. 27–53, maio 2015.
- MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Designing food structure and composition to enhance nutraceutical bioactivity to support cancer inhibition. **Seminars in Cancer Biology**, v. 46, p. 215–226, out. 2017.
- MOGHIMIPOUR, E. et al. Folic acid-modified liposomal drug delivery strategy for

- tumor targeting of 5-fluorouracil. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, n. 1, p. 166–174, mar. 2018.
- MOHAN, A. et al. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 97, p. 79270–79278, 2015.
- MOHANA, D.; THIPPESWAMY, S.; ABHISHEK, R. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. **Radiation Protection and Environment**, v. 36, n. 4, p. 168, 2013.
- MOJIB, N. et al. Antimycobacterial activity *in vitro* of pigments isolated from Antarctic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 4, p. 531–540, 17 nov. 2010.
- MOSQUERA, M. et al. Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. **Food Chemistry**, v. 156, p. 144–150, ago. 2014.
- MOSQUERA, M. et al. Antioxidant, ACE-Inhibitory and Antimicrobial Activities of Peptide Fractions Obtained from Dried Giant Squid Tunics. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 156, p. 144–150, 2016.
- MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 63–70, 2002.
- MOZAFARI, M. R. et al. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 13, p. 2038–2045, out. 2006.
- MOZAFARI, M. R. et al. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 4, p. 309–327, 2008.
- NENADIS, N. et al. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS<sup>•+</sup> Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4669–4674, jul. 2004.
- NIGAM, P. S.; LUKE, J. S. Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 93–100, fev. 2016.
- NIU, Y. et al. Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1377–1382, dez. 2012.
- NUMAN, M. et al. Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. **3 Biotech**, v. 8, n. 4, p. 207, 4 abr. 2018a.

- NUMAN, M. et al. Chemical profile and in-vitro pharmacological activities of yellow pigment extracted from *Arthrobacter gandavensis*. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 74–82, dez. 2018b.
- OLGA, G.; STYLIANI, C.; IOANNIS, R. G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp- $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 185, p. 33–40, out. 2015.
- OREN, A. Characterization of Pigments of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy and Classification. In: **Methods in Microbiology**. v. 38, p. 261–282, 2011.
- PAINI, M. et al. An efficient liposome based method for antioxidants encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 1067–1072, dez. 2015.
- PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Marine natural pigments: Chemistry, distribution and analysis. **Dyes and Pigments**, v. 111, p. 124–134, dez. 2014.
- PETERS, R. et al. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 100–112, jan. 2011.
- PINA-PÉREZ, M. C. et al. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. **Food Chemistry**, v. 235, p. 34–44, nov. 2017.
- PINAZO, A. et al. Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, p. 17–39, fev. 2016.
- PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 287–293, 2016.
- PINILLA, C. M. B.; NOREÑA, C. P. Z.; BRANDELLI, A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk. **Food Chemistry**, v. 220, p. 470–476, abr. 2017.
- PIRES, C. et al. *Chryseobacterium palustre* sp. nov. and *Chryseobacterium humi* sp. nov., isolated from industrially contaminated sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 402–407, 1 fev. 2010.
- PISOSCHI, A. M. et al. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922–935, jan. 2018.
- POURJAVAHERI-JAD, F. et al. **Purification and Characterization of Feathers prior to Keratin Extraction**. In: The 8th International Engineering Congress &

- Exhibition, Kish, Irã, 2014.
- POWNALL, T. L.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4712–4718, 28 abr. 2010.
- RADHAKRISHNAN, M. et al. *In vitro* antioxidant activity and antimicrobial activity against biofilm forming bacteria by the pigment from Desert soil *Streptomyces* sp. D25. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 6, p. 148–150, 2016.
- RAMEZANZADE, L.; HOSSEINI, S. F.; NIKKHAH, M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v. 234, p. 220–229, nov. 2017.
- RAO, D. R.; CHAWAN, C. B.; VEERAMACHANENI, R. Liposomas encapsulation of  $\beta$ -galactosidase: Comparison of two methods of encapsulation and *in vitro* lactose digestibility. **Journal of Food Biochemistry**, v. 18, p. 239–251, 1995.
- REICHENBACH, H.; KLEINIG, H.; ACHENBACH, H. The Pigments of *Flexibacter elegans*: **Archives of Microbiology**, v. 101, p. 131–144, 1974.
- RIFFEL, A. et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v. 179, n. 4, p. 258–265, 28 abr. 2003.
- RIFFEL, A. et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 3, p. 693–703, 20 fev. 2007.
- RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, 2018.
- RYDER, K. et al. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. **Food Chemistry**, v. 208, p. 42–50, 2016.
- SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 735–743, 2000.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.
- SCHÖNER, T. A. et al. Initiation of the flexirubin biosynthesis in *Chitinophaga*

- pinensis*. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 232–241, maio 2014.
- SEPÚLVEDA, L. et al. Valorization of pineapple waste for the extraction of bioactive compounds and glycosides using autohydrolysis. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 47, p. 38–45, jun. 2018.
- SHARMA, S. et al. **Extraction and Characterization of Keratin from Chicken Feather Waste Biomass: A Study**. In: The National Conference for Postgraduate Research, Universiti Malaysia Pahang, Pahang, Malásia, 2016.
- SHAVANDI, A. et al. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent. **Food Chemistry**, v. 227, p. 194–201, jul. 2017.
- SHIMOMURA, K.; KAJI, S.; HIRAISHI, A. *Chryseobacterium shigense* sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1903–1906, 1 set. 2005.
- SHINDE, N. et al. Nutraceuticals: A Review on current status. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 7, p. 110–113, 2014.
- SILVA, R. et al. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 3, p. 628–632, mar. 2010.
- SILVEIRA, S. T.; JAEGER, M. K.; BRANDELLI, A. Kinetic data and substrate specificity of a keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 361–366, mar. 2008.
- SINGH, H.; THOMPSON, A.; CORREDIG, M. **Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems**. In: Garti, N., McClements, D. J., editors. Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals. Oxford, U.K. Woodhead Publishing. 287–318, 2012.
- SINGH, A. et al. Lipid membrane modulation and pigmentation: A cryoprotection mechanism in Arctic pigmented bacteria. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 770–780, set. 2017.
- SKARIYACHAN, S.; GOVINDARAJAN, S. Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food samples in comparison with chemical preservatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 189–196, fev. 2019.
- SONAM, K. S.; GULERIA, S. Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products. **Annals Pharmacology and Pharmaceutics**, v. 2, n. 16, p. 1–6, 2017.

- SUN, J.-M. et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by *Monascus* pigment derivatives that interfere with viral RNA polymerase activity and the mevalonate biosynthesis pathway. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 49–58, 1 jan. 2012.
- TALADRID, D. et al. Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol. **Food Research International**, v. 100, p. 541–550, out. 2017.
- TANG, X. et al. PEGylated liposomes as delivery systems for Gambogic acid: Characterization and *in vitro/in vivo* evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 26–36, 2018.
- TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 7–8, p. 587–605, 2005.
- TEIXEIRA, M. L. et al. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 49–53, jan. 2008.
- TOLDRÁ, F. et al. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, v. 267, p. 395–404, 2018.
- TULI, H. S. et al. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015.
- UMADEVI, K.; KRISHNAVENI, M. Antibacterial activity of pigment produced from *Micrococcus luteus* KF532949. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 4, n. 3, p. 149–152, 2013.
- UNGUREANU, C. et al. Method for torularhodin separation and analysis in the yeast *Rhodotorula rubra* aerobically cultivated in lab bioreactor. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 943–948, 2011.
- VANDAMME, P. et al. New Perspectives in the Classification of the Flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 827–831, 1994.
- VENIL, C. K. et al. Isolation and characterization of flexirubin type pigment from *Chryseobacterium* sp. UTM-3<sup>T</sup>. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 103–107, out. 2014.

- VENIL, C. K. et al. Microencapsulation of flexirubin-type pigment by spray drying: Characterization and antioxidant activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 350–356, 2016.
- VENIL, C. K. et al. Safety evaluation of flexirubin from *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497: Acute, sub-acute toxicity and mutagenicity studies. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 112, p. 362–370, 2017.
- VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065–1079, jul. 2013.
- VILJANEN, K. et al. Inhibition of Protein and Lipid Oxidation in Liposomes by Berry Phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7419–7424, dez. 2004.
- WANG, L. et al. Isolation and identification of novel antioxidant and antimicrobial oligopeptides from enzymatically hydrolyzed anchovy fish meal. **Process Biochemistry**, v. 74, n. August, p. 148–155, nov. 2018.
- WEISSMANN, G. et al. A General Method for the Introduction of Enzymes, by Means of Immunoglobulin-Coated Liposomes, into Lysosomes of Deficient Cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 1, p. 88–92, 1975.
- WEN, C. et al. *Chryseobacterium chengduensis* sp. nov. isolated from the air of captive giant panda enclosures in Chengdu, China. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 17, n. 8, p. 610–618, 9 ago. 2016.
- XIA, S. et al. Modulating effect of lipid bilayer–carotenoid interactions on the property of liposome encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 172–180, abr. 2015.
- YEO, I. et al. Low-molecular weight keratins with anti-skin aging activity produced by anaerobic digestion of poultry feathers with *Fervidobacterium islandicum* AW-1. **Journal of Biotechnology**, v. 271, p. 17–25, abr. 2018.
- YUBA, E. et al. Bleomycin-Loaded pH-Sensitive Polymer–Lipid-Incorporated Liposomes for Cancer Chemotherapy. **Polymers**, v. 10, n. 1, p. 74–88, 15 jan. 2018.
- ZAMORA, L. et al. *Chryseobacterium tructae* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 315–319, jul. 2012.
- ZAVAREZE, E. DA R. et al. Production and characterization of encapsulated



antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 841–848, 2014.

ZHAO, G.-P. et al. Antibacterial characteristics of orange pigment extracted from *Monascus* pigments against *Escherichia coli*. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 34, n. No. 3, p. 197–203, 28 jun. 2016.

ZOU, Y. et al. Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 431–443, mar. 2016.

## 9. APÊNDICES

### 9.1 Artigo científico

#### **Production and characterization of liposomes co-encapsulating bioactive compounds obtained from *Chryseobacterium* sp. kr6 culture**

Diego BERTOLINI, Maria Elisa Paillière JIMÉNEZ, Ana Paula Folmer CORRÊA, Adriano BRANDELLI

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author: Dr. A. Brandelli, Av. Bento Gonçalves 9500 ICTA, 91501-970, Porto Alegre, Brazil. Tel.: +55 51 3308 6249; e-mail: [abrand@ufrgs.br](mailto:abrand@ufrgs.br)

## Abstract

Biologically active compounds possess a huge potential for application in various areas, such as food industry, medicine and cosmetics, however, they must be protected from degradation for such applications. The aim of this study was to produce, characterize and assess the antioxidant activity of phosphatidylcholine (PC) liposomes for co-delivery of bioactive peptides obtained from chicken feathers hydrolyzed by *Chryseobacterium* sp. kr6 and a pigment produced by this strain. Control empty liposomes showed mean diameter of 168,5 nm, varying to 185,4, 102,0 and 98,5 nm after the encapsulation of the peptides and the pigment and their co-encapsulation, respectively. All formulations showed relatively narrow and monodisperse size distribution. Control liposomes presented zeta potential of -20,9 mV, while the formulations bearing the bioactive compounds presented potentials of -30 mV or higher in magnitude. Infrared analysis revealed spectra typical for PC, suggesting the incorporation of the compounds within the liposomes. ABTS radical scavenging assay showed that the encapsulation did not reduce the antioxidant activity of the compounds. Thus, we suggest that the encapsulation in liposomes is a promising alternative for application of pigments and bioactive peptides.

**Keywords:** bioactive peptides, pigment, liposomes, encapsulation, feathers

## 1. Introduction

Consumers growing interest in minimally processed foods, in addition to the concern in the use of synthetic and chemical compounds for food conservation, has increased the demand for research and development of safe natural additives with applicability in foods for protection against degradation. Currently, the food industry is heavily based on the use of chemical preservatives, which can be harmful to human health, as well as reduce the nutritional value of food, being evident the need for development of new substances that can substitute chemical preservatives in their role. In more recent years, it has been observed an increasing number of studies regarding natural substances, known as bioactive compounds, that can be used in foodstuffs without the drawbacks brought by the use of chemical preservatives. These substances can play a role in promoting human health by preventing or fighting diseases (Braga, Vieira & Oliveira, 2018), being able to exert various bioactivities in food formulations and even in human organism, such as

antioxidant, antimicrobial, antihypertensive, opioid and immunomodulatory activities (Corrêa et al., 2011; Mann et al., 2015; Elbatanony et al., 2016; Venil et al., 2016).

Bioactive peptides are protein fragments encrypted within the amino acid sequence of native proteins and exert beneficial effects on human health upon being released from their parent sequence by hydrolysis. Besides being a simple form of producing functional foods that positively affect human health, the generation and application of bioactive peptides from various sources is an effective way of handling the surplus of by-products generated by the food industry (Corrêa et al., 2011; Fontoura et al., 2014; Ryder et al., 2016; Halim, Yussof & Sarbon, 2016). In this regard, feathers are a promising source of bioactive peptides, since they are a by-product produced in large amounts in poultry plants and are constituted of approximately 90% of keratins (Korniłłowicz-Kowalska & Justyna, 2011). Also, the use of hydrolytic enzymes obtained from microorganisms as a means of producing bioactive peptides is a rising trend (Corrêa et al., 2014; Brandelli, Sala & Kalil, 2015; Aguilar & Sato, 2018).

Pigments are of great interest to the food, pharmaceutical, cosmetic and textile industries and have been widely used for making products aesthetically more attractive to the consumer. Microbial pigments have been considered more advantageous and beneficial over synthetic and vegetable pigments mainly because of their stability, availability of many environmental sources and being relatively easy to obtain and extract (Aruldass, Dufossé & Ahmad, 2018). Many research studies have been focusing on the bioactivity of bacterial pigments, since they are known for being able to exert many different biological effects, such as antioxidant, antimicrobial and anticancer activities (Correa-Llantén, Amenábar & Blamey, 2012; Venil et al., 2016; Jiménez et al., 2018).

Despite bioactives huge potential for different industrial uses, their applicability is hindered by their unsuitable stability against exposure to adverse environmental conditions such as pH, temperature and humidity. This limitation, however, can be overcome by the use of methods of encapsulation able to protect these compounds and keep them away from degradation (Brandelli, 2012). Liposomes are usually considered more suitable for application in food matrixes, mainly because of their non-toxicity, biocompatibility and amphipathic character (Mozafari et al., 2008; Imran et al., 2015). Liposomes consist of an aqueous core enclosed by one or more phospholipid bilayers, forming spherical vesicles, and, due

to this composition, liposomes are suited for encapsulation of either amphiphilic, hydrophilic, or lipophilic materials (Bozzuto & Molinari, 2015). Thus, the aim of this study was to develop liposomes in order to co-encapsulate a flexirubin-type pigment and bioactive peptides obtained from enzymatic hydrolysis of chicken feather from a culture of *Chryseobacterium* sp. kr6 and to determine the liposomes physicochemical characteristics and their antioxidant activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Bacterial strain and bioactive peptides production

*Chryseobacterium* sp. kr6, isolated from poultry waste (Riffel et al., 2003), was stored at -20°C in 20 % (v/v) glycerol. The strain was weekly streaked in brain-heart infusion (BHI) agar plates at 30°C and then kept in refrigeration at 4°C. For bioactive peptides production, chicken feathers were thoroughly washed in tap water and dried in oven at 40°C. Hydrolysis was performed as described by Fontoura et al. (2014). The strain was cultivated in minimum mineral medium containing chicken feathers (0,5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0,4 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,015 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> and 10 g L<sup>-1</sup> feathers, pH 8,0) for 48 h in rotary shaker at 125 rpm, at 30°C. After incubation, the medium was centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C and the supernatant was subjected to ultrafiltration in 10 kDa cutoff membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). The permeate fraction was used for encapsulation in liposomes and bioactivity assays.

### 2.2 Pigment extraction

For extraction of the yellowish-orange pigment, 1,0 mL of the inoculum, adjusted to an optical density of 1,0 at 600 nm, was spread in BHI agar plates with a Drigalski handle and cultivated at 30°C. After 24 h, the biomass was scraped from the plates, dried in oven at 40°C, macerated with 4 mL acetone to a fine dry powder, resuspended in 2 mL acetone and placed in an ultrasonic bath (Ultrasonic Cleaner USC 700, Unique). After centrifugation at 10 000 g for 5 min at 4°C, the supernatant containing the pigment was transferred to glass tubes and dried with nitrogen. The procedure was repeated until the biomass was bleached.

### 2.3 Encapsulation in liposomes by film hydration

The methodology for production of liposomes was carried out as

previously described (Malheiros et al., 2010), with a few modifications. 85 mg of phosphatidylcholine was dispersed in 15 ml chloroform, in a round bottom flask. To form a thin phosphatidylcholine film in the bottom of the flask, the solvent was evaporated in a rotary evaporator (90 rpm at 40°C). After total evaporation, the flask was stored in a desiccator overnight for elimination of traces of chloroform. For dilution of the film and formation of the liposomes, a 5 mL peptide sample (9,0 mg mL<sup>-1</sup>) was heated to 45°C for 1 min and then transferred to the flask containing the film and stirred for 2 min at 45°C, following a 2 min resting. This step was repeated once and the solution was transferred to a glass tube, which was submitted to 5 cycles of heating to 45°C for 2 min, followed by 1 min under vigorous agitation. The reduction and standardization of the liposomes size was performed by a probe-type ultrasound (Malheiros et al., 2010), with 5 repetitions of sonication (frequency 20 kHz, power 250 W) for 1 min followed by 1 min resting. The solution containing the liposomes was sterile filtered in 0,22 µm for removal of contaminants. For pigment encapsulation, 1,5 mg of pigment extract was dissolved in ethanol and added to the phosphatidylcholine dispersion.

#### 2.4 Liposomes characterization

Mean diameter and polydispersity index (PDI) were measured by dynamic light scattering (DLS) on a Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, England) with a Ne-He laser at  $\lambda$  of 633 nm with a scattering angle of 90°. Zeta ( $\zeta$ ) potential of the liposomes was determined using a Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments, Worcestershire, England). For the analysis, the liposome formulations were diluted in MilliQ water and the measurements were performed at 25°C. FTIR analysis were performed on a Shimadzu IRPrestige-21 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Liposome formulations were freeze-dried prior to the measurements. Measurements were carried out by the KBr disc method (Pinilla, Noreña & Brandelli, 2017). Unencapsulated pigment extract was dissolved in ethanol and placed between two NaCl crystals. The scanning range used was 4000 to 400 cm<sup>-1</sup> with 64 scans and resolution set at 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 2.5 Encapsulation efficiency (EE)

Immediately after preparation, 1,0 mL liposomes solution was separated through 10 kDa cutoff membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). The permeate

fraction was lyophilized and dissolved in 1,0 mL distilled water. Protein concentration was assessed by the Folin phenol method (Lowry et al., 1951), using 1,0 mg mL<sup>-1</sup> bovine albumin serum as standard. EE for the peptides was determined indirectly, subtracting the amount of unencapsulated peptides in the permeate fraction from the initial amount of peptides. EE of the pigment was determined spectrophotometrically. The retentate fraction was lyophilized, resuspended in 1,0 mL ethanol, centrifuged at 5 000 g for 5 min and the supernatant absorbance was measured at 450 nm. EE was calculated as the percentage of the absorbance of the pigment in the retentate fraction compared to the absorbance of the initial amount of pigment.

## 2.6 Antioxidant activity

Antioxidant activity evaluations were performed by ABTS radical [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] scavenging assay (Nenadis et al., 2004). ABTS and potassium persulfate were dissolved in distilled water to a final concentration of 7 mM and 140 mM, respectively. The solutions were mixed and left at room temperature for at least 16 h for generation of the radical chromophore ABTS•<sup>+</sup>. For evaluation of the antioxidant activity of the encapsulated compounds, the radical was diluted in ethanol to an absorbance of  $0,70 \pm 0,02$  at 734 nm, 1 mL of the radical was mixed with 10  $\mu$ L of the samples solution and absorbance was measured at 734 nm after 6 min. Trolox 2,0 mM dissolved in ethanol was used as a standard antioxidant.

## 2.7 Data analysis

All experimental procedures were performed in triplicates and repeated at least three times. Averages were calculated for each treatment. Results for DLS analysis, zeta potential and antioxidant activity were analyzed by one-way ANOVA and Tukey means comparison test, and results for encapsulation efficiency were analyzed by Student's t-test and Tukey means comparison test. Data analysis were performed using the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA) and differences were considered significant at  $P < 0,05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Physicochemical characterization of the liposomes

In this work, we successfully produced phosphatidylcholine (PC) nanoliposomes encapsulating bioactive peptides from the enzymatic hydrolysis of chicken feathers and a yellowish-orange flexirubin-type bacterial pigment. Particles mean diameter, PDI and  $\zeta$ -potential were determined as a means for evaluating the stability of the liposomes in the colloidal suspension and the results for these analysis are presented in Table 1. Liposomes size did not exceed 200 nm. The control empty liposomes had a mean diameter of 168,5 nm, a PDI of 0,226 and the  $\zeta$ -potential was -20,9. It is recognized that the particles size greatly influences the dispersibility and the solubility of the encapsulated bioactive compounds. The smaller the size of the particles, the greater is the solubility and the bioavailability of the compound, since nano-formulations provide a higher surface area in comparison to micro-structures (Mohan et al., 2015). Also, a narrow size distribution, expressed as a low PDI, is reported to influence the stability of colloidal formulations, with values up to 0,3 being expected for systems prepared from biological materials (Malheiros et al., 2011). The encapsulation of the bioactive peptides alone did not result in a change in the size of the vesicles compared to control liposomes, with a mean diameter of 185,4 nm and PDI of 0,224. This relatively small size and monodispersion can be attributed to the use of sonication for reduction and normalization of the size of the liposomes. Silva et al. (2010) evaluated the effect of different sonication amplitudes on the size and polydispersity of empty liposomes and observed that the use of higher amplitudes resulted in smaller liposomes, with sizes around 100 nm or less. The purity of the PC used as encapsulant may also be an important factor, since the entrapment of non-phospholipid compounds on the walls of liposomes made of unpurified soybean lecithin may account for the larger size observed for these vesicles (Taladrid et al., 2017). Similar results were obtained by Malheiros et al. (2011) for liposomes encapsulating an antimicrobial peptide from *Bacillus* sp. P43, with sizes ranging from 144,6 nm to 162,9 nm and PDI not exceeding 0,27. Also approximate sizes were observed for liposomes containing whey peptides, although higher PDI values, above 0,4, were obtained (Corrêa et al., 2019).



**Table 1.** Determination of size, PDI,  $\zeta$  potential and EE of the liposomes. PC: empty liposomes; PC<sub>Pep</sub>: liposomes containing the peptides; PC<sub>Pig</sub>: liposomes containing the pigment; PC<sub>P+P</sub>: co-encapsulated compounds.

	Mean diameter (nm)	PDI	Z potential (mV)	EE peptides (%)	EE pigment (%)
PC	168,5 ± 7,7 <sup>a</sup>	0,226 ± 0,016 <sup>a,b</sup>	-20,9 ± 3,06 <sup>a</sup>	-	-
PC <sub>Pep</sub>	185,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,224 ± 0,022 <sup>a</sup>	-30,0 ± 1,41 <sup>b</sup>	64,98 ± 2,77 <sup>a</sup>	-
PC <sub>Pig</sub>	102,0 ± 8,0 <sup>b</sup>	0,292 ± 0,009 <sup>b,c</sup>	-33,8 ± 0,72 <sup>b,c</sup>	-	89,76 ± 1,65 <sup>a</sup>
PC <sub>P+P</sub>	98,5 ± 7,8 <sup>b</sup>	0,295 ± 0,042 <sup>c</sup>	-38,2 ± 0,36 <sup>c</sup>	53,28 ± 3,42 <sup>b</sup>	92,35 ± 2,24 <sup>a</sup>

Values are the means ± standard deviations of three independent experiments. Different superscript letters within the same column indicate significant differences at  $P < 0.05$

On the other hand, we observed smaller sizes for liposomes encapsulating the pigment extract, with 102 nm and PDI of 0,292, and the mixture of peptides and pigment, with 98,5 nm and PDI of 0,295 (Table 1). The addition of the pigment to the lipid wall of the liposomes seems to be responsible for this decrease in size. To our knowledge, this is the first study on the encapsulation of flexirubin-type pigments on liposomes, so there is little to no information about the effects of this type of pigments on lipid membranes. That being said, it has been documented that the presence of polar carotenoids on bacterial membranes seems to increase their fluidity below their phase transition temperature (Chattopadhyay & Jagannadham, 2001; Gruszecki & Strzałka, 2005). Also, it has been observed that the production of carotenoids by Antarctic bacteria was increased after a freeze-thaw cycle, suggesting the importance of these pigments for the maintenance of the membrane fluidity (Singh et al., 2017). This characteristic was also observed in model membranes, with lycopene concentrations of 1,0% or higher exerting a fluidizing effect of liposome walls, although  $\beta$ -carotene and lutein exerted a rigidifying effect (Xia et al., 2015). Extrapolating the information provided by these findings to flexirubin-type pigments, the reduced size observed for the liposomes encapsulating the pigment extract in our work might be explained by an increase in fluidity caused by the incorporation of this extract to the liposomes, resulting in a more intense effect of the sonication and thus a more efficient reduction on the size of the liposomes. Reduction on the size of liposomes upon pigment encapsulation was also observed by Hasan et al. (2014) for curcumin-loaded liposomes. As suggested by the authors, another explanation for the reduced size observed after encapsulation might be a strong interaction between the pigment and the lipids, resulting a compaction of the vesicles core. Regarding the

PDI, although a broader size distribution was observed, the values remained below 0,3, therefore we can consider these values within the expected range for vesicles loaded with biological material.

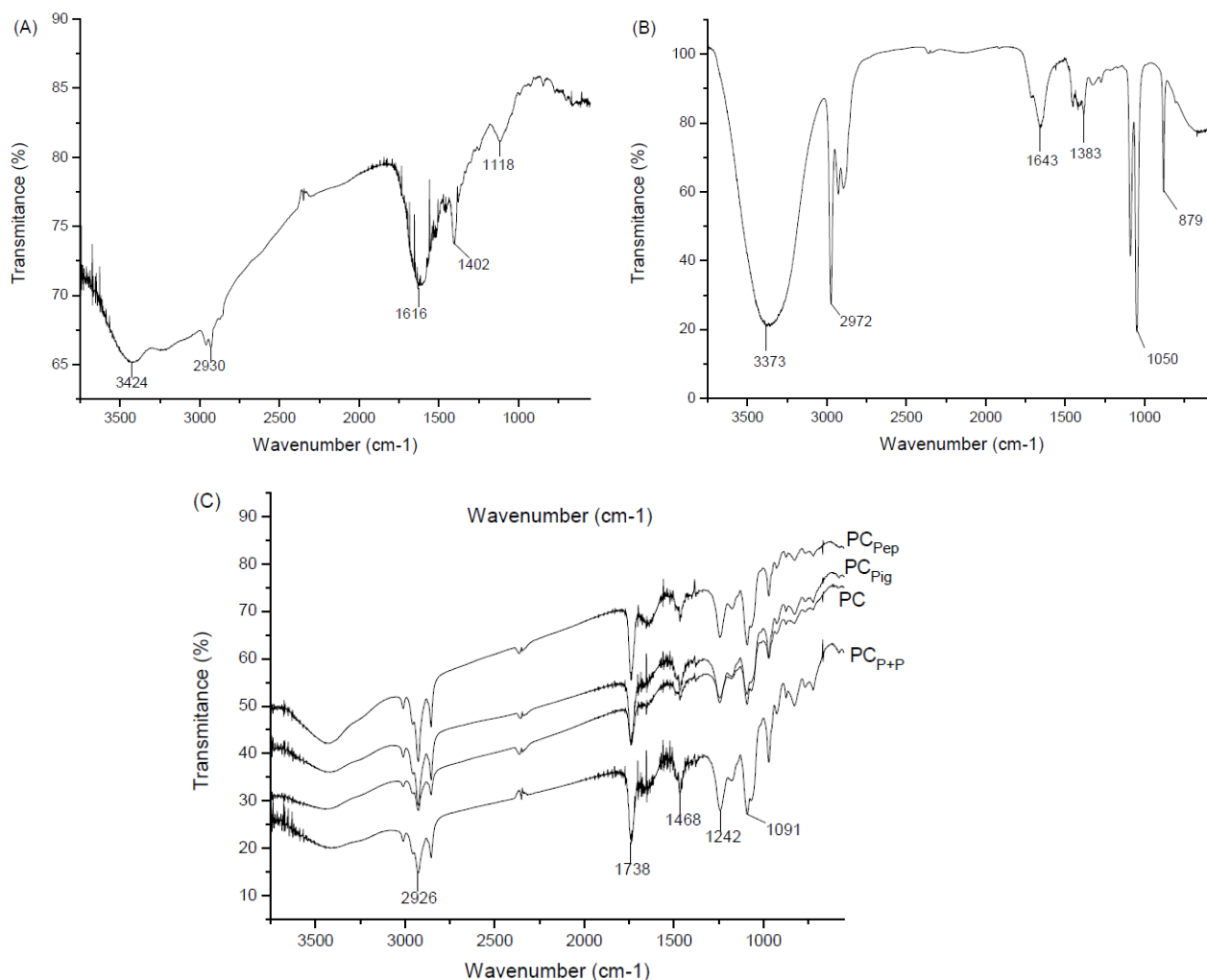
The zeta potential relates to the electric charge over the surface of particles in suspension in aqueous solution. This surface potential strongly affects the stability of colloidal systems, since the higher in magnitude is its value, the stronger the electrostatic repulsion between the particles, which surpasses the natural tendency to aggregate (Brandelli & Taylor, 2005). Conventionally, values below -30 mV and above +30 mV are considered high zeta potentials, indicating colloidal stability. As shown in Table 1, the encapsulation of the bioactive peptides and the pigment extract resulted in a considerable increase in magnitude of the zeta potential of the liposomes compared to control empty liposomes, with -30,0 mV for liposomes containing the peptides, -33,8 mV for pigment and -38,2 mV for liposomes co-encapsulating the peptides and the pigment extract. Also, little sedimentation was observed for liposomes containing the peptides over time, suggesting a low degree of liposome aggregation. As for pigment-bearing liposomes, no sedimentation could be observed at all, which could be result of a highly negative zeta potential combined with a small particle size.

FTIR analysis were performed in order to obtain information about the interactions between the liposomes and the encapsulated bioactive compounds. The spectrum of the peptides shows characteristic peaks of keratins (Fig. 1A). At 3424  $\text{cm}^{-1}$  we observed an area of absorption corresponding to the N-H stretching vibration. The peak at 2930  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the C-H stretching, represent the carbon backbone of the peptides. The peaks observed at 1616 and 1402  $\text{cm}^{-1}$  characterize the amide I and amide II groups of the proteins. At 1118  $\text{cm}^{-1}$  we can observe a peak, corresponding to the stretching vibration of the amine group.

The FTIR spectrum of unencapsulated pigment extract (Fig. 1B) shows peaks at 2972  $\text{cm}^{-1}$ , characterizing the C-H bond present in the polyunsaturated chain and in the aromatic ring. The peak observed at 1643  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to the C=O stretching of the ester linking the phenol and the polyunsaturated chain. The peak at 1383  $\text{cm}^{-1}$  might correspond to the characteristic spectrum of the phenol ring. The peak observed at 879  $\text{cm}^{-1}$  might correspond to the C-Cl bond, suggesting the presence of Cl radical on the resorcinol ring. The partially purified pigment produced by *Chryseobacterium* sp. kr6 has already been characterized by Jiménez et al.

(2018) and FTIR analysis resulted in a similar spectrum. Slight differences in the positions and number of the peaks might be due to the fact that, in our work, no purification procedure was performed. The peaks at  $1050\text{ cm}^{-1}$  might correspond to the C-O bond stretching, also observed by Venil et al. (2014) for the pigment produced by *Chryseobacterium* sp. UTM-3T. The broad area of absorption around  $3373\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the stretching vibration of the O-H group, is due to the ethanol used as solvent for the analysis.

The FTIR spectra obtained for empty and bioactive compounds-loaded liposomes (Fig. 1C) show characteristic peaks of phosphatidylcholine. The peaks at  $2926\text{ cm}^{-1}$  correspond to the C-H stretching of the fatty acids. At  $1738\text{ cm}^{-1}$ , we observed peaks corresponding to the ester linking the glycerol to the fatty acid chains. The peak observed at  $1468\text{ cm}^{-1}$  is characteristic of the amide group. The peaks at  $1242\text{ cm}^{-1}$  correspond to the C-N stretching of the choline group, while the peaks at  $1091\text{ cm}^{-1}$  are characteristic of the phosphate group. Similar spectra, with peaks characteristic of PC, were also observed by Pinilla et al. (2017), who produced liposomes loaded with the garlic extract. The spectra for the liposomes containing both the bioactive peptides alone or in combination with the pigment show a more intense peak corresponding to the amide group at  $1468\text{ cm}^{-1}$  compared to the other formulations. This might be caused by the amide group belonging to the structure of the peptides added to the amide of the PC molecules, resulting in an increase in the intensity of this peak. The spectra of the empty liposomes and the pigment-loaded liposomes is essentially the same, due to the fact that the pigment extract concentration in the formulation does not equal to at least 5% of the PC concentration, not being present in a high enough concentration to be detected by the method. Overall, no spectrum showed new peaks, suggesting that the bioactive compounds did not associate with the liposomes through the formation of new chemical bonds.



**Figure 1.** FTIR spectra of free and encapsulated bioactive compounds. (A) Free peptides; (B) free pigment; (C) liposome formulations.

### 3.2 Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE) can be defined as the amount of the bioactive compound effectively entrapped on the carrier structure, either on its core or on its surface or wall, in relation to the initial amount of the bioactive material (Mohan et al., 2015). EE depends of various aspects, such as the core-to-wall ratio, the conditions in which the process is carried out and the technique selected for encapsulation of the bioactives. The EE obtained for the peptides was 64,98% (Table 1). Malheiros et al. (2011) reported an EE of 100% for partially purified PC liposomes carrying the antimicrobial peptide P34. A similarly high EE (94%) was obtained by Malheiros et al. (2010) for PC liposomes containing the cationic bacteriocin nisin. Such high EE values were attributed to the electrostatic interaction of the peptides with the phospholipids used for liposome production. It is recognized that the lipid

composition and the net charge of the liposomes affect the EE (Laridi et al., 2003). Since PC liposomes do not possess a surface charge at neutral pH, electrostatic interactions between the liposomes bilayer and the peptides can be excluded (Teixeira et al., 2008). Also, the most abundant peptides present in feather hydrolysates produced by *Chryseobacterium* sp. kr6 have negligible net charge at the pH of the formulations (Fontoura et al., 2019). Thus, the insertion of the peptides in the liposomes may happen due to hydrophobic interactions with the PC wall (Teixeira et al., 2008; Maherani et al., 2012). EE of 48% was obtained for liposomes containing sheep whey peptides (Corrêa et al., 2019). The authors suggest an association between the amount of peptides used in the formulation and the EE as one reason for the low value obtained. Similarly, the relatively high peptide concentration used for encapsulation in our work (9,0 mg mL<sup>-1</sup>) might be responsible for the limited EE obtained, with the amount of PC not being enough to encapsulate all the peptides present in the formulation. This is in agreement with Mosquera et al. (2014), who reported that increasing peptides concentrations result in significant decrease in EE. Considering that EE of over 50% is suggested increases the risk of leakage (Fathi, Mozafari & Mohebbi, 2012), at the same time that low EE values would imply an inefficient use of the bioactive compound, the EE achieved for bioactive peptides in our work can be considered satisfactory.

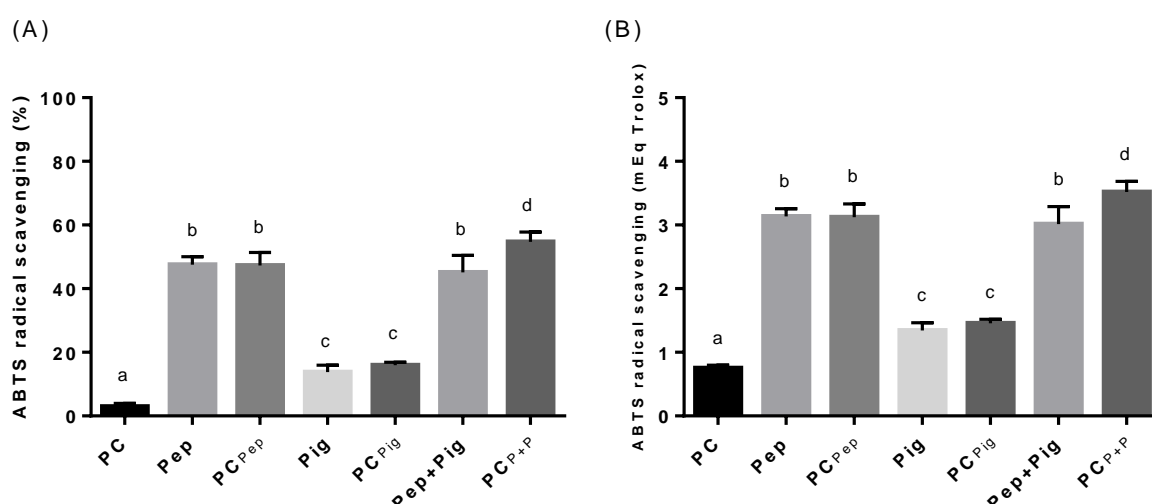
Regarding the pigment, a much higher EE was obtained in comparison to the peptides, with approximately 90% of the pigment extract being successfully incorporated into the liposomes (Table 1). This result was expected for the pigment extract due to the fact that it has a highly lipophilic character, being efficiently entrapped within the hydrophobic portion of the bilayer. Efficient encapsulation into liposomes seems to be a trend for lipophilic pigments, since moderate to high EE is usually achieved for such molecules. For example, EE values ranging from 63,2% to 67,3% were achieved by Hasan et al. (2014) for the encapsulation of curcumin in liposomes produced with soya, rapeseed and salmon lecithin. Similar efficiency was obtained by Hatahet et al. (2018), with 68,2% of the initial amount of quercetin being successfully encapsulated in dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposomes. Paini et al. (2015) obtained a much greater EE (92%) for apigenin-loaded rapeseed lecithin liposomes. The hydrophobicity of the encapsulated compound is cited by all the authors of the aforementioned works as a major reason for such high values.

Upon co-encapsulation of the bioactive compounds, there was no

reduction in the EE of the pigments. However, we observed a significant loss of efficiency in the encapsulation of the peptides, with only 53,28% of the peptides being successfully internalized by the liposomes (Table 1). As mentioned before, the interactions and associations between the hydrophobic amino acids within the peptides sequence and the hydrophobic portion of PC molecules on the liposomes wall might contribute to the insertion of the peptides within the nanovesicles (Teixeira et al., 2008), which means that the hydrophobic portion of the liposome wall must be available for such associations. When the peptides are co-encapsulated with the pigment extract, the latter associates more strongly with this portion of the wall due to its high affinity than the former, resulting in a smaller fraction of the hydrophobic portion of the wall available for interaction with the peptides.

### 3.3 Antioxidant activity

The antioxidant capacity of free and encapsulated bioactive compounds obtained from a *Chryseobacterium* sp. kr6 culture was assessed using the ABTS assay. In the presence of hydrogen-donating or chain-breaking substances, ABTS<sup>•+</sup> is reduced to a colorless product (Nenadis et al., 2004). Therefore, loss of absorbance reflects the antioxidant activity of the subject compound. As shown in Fig. 2, the process of encapsulation into liposomes did not alter the ABTS scavenging capacity of the peptides, being it 3,13 Trolox mEq (47,6% ABTS scavenging) before encapsulation, and 3,12 Trolox mEq (47,3% ABTS scavenging) after encapsulation. These results corroborate with previous studies (Zavareze et al., 2014; Hosseini, Ramezanzade & Nikkhah, 2017), in which no significant difference in antioxidant activity was observed after encapsulation. Studies found in the literature report varying antioxidant capacities for antioxidant peptides. Ramezanzade, Hosseini & Nikkhah (2017) produced nanoliposomes containing peptides derived from fish skin gelatin hydrolysis with ABTS scavenging activity inferior to 40%, while Hosseini, Ramezanzade & Nikkhah (2017) reported ABTS scavenging ranging from 16,4% to 74,7% for peptides obtained from the same source.



**Fig. 2.** Antioxidant activity as % ABTS scavenging (A) and Trolox mEq (B). PC: empty liposomes; Pep: free peptides; PC<sup>Pep</sup>: encapsulated peptides; Pig: free pigment; PC<sup>Pig</sup>: encapsulated pigment; Pep+Pig association of free peptides and pigment; PC<sup>P+P</sup>: co-encapsulated compounds.

Similarly to the peptides, the antioxidant activity of the pigment extract was also kept unaltered after encapsulation into liposomes, staying between 1,34 Trolox mEq (13,8% ABTS scavenging) before encapsulation and 1,46 Trolox mEq (16%) after encapsulation. These results differ from work of di Martino et al. (2018), in which a considerable increase in antioxidant activity of  $\beta$ -carotene, in terms of DPPH radical scavenging, was observed after encapsulation in chitosan/nucleic acid polyplexes. The authors suggest an increase in availability caused by an improvement of the  $\beta$ -carotene solubility after encapsulation as a possible reason for the enhanced antioxidant activity. Also, the stabilization of the bioactive within the encapsulating structure might play a role in enhancing its biological activity (Olga, Stylianis & Ioannis, 2015). An increase in radical scavenging capacity following encapsulation was also reported for curcumin-loaded liposomes (Niu et al., 2012) and flexirubin-loaded polymeric microcapsules (Venil et al., 2016b).

Synergism can be defined as the combination of two or more agents so that the combined action or activity of these agents is greater than the sum of each one separately (Sonam & Guleria, 2017). In this study, we analyzed the antioxidant activity of two bioactive compounds in order to verify if there is a synergistic effect among them. What we observed instead was an apparent interference in the antioxidant activity of the peptides and the pigment extract when assessed together. As shown in Fig. 2, the combination of the peptides and the pigment resulted in an

antioxidant activity of 3,02 Trolox mEq (45,1% ABTS scavenging), very close to the antioxidant activity observed for the peptides separately evaluated. Amino acid composition has been shown to affect antioxidant capacity of peptides and it has been reported that a higher hydrophobic amino acid content positively influences antioxidant activity (Pownall, Udenigwe & Aluko, 2010; Jiang et al., 2018; Matsui et al., 2018). As reported previously by Fontoura et al. (2019), enzymatic hydrolysis of chicken feather by *Chryseobacterium* sp. kr6 generates bioactive peptides with a high hydrophobic amino acid content, ranging from 20% to 66,6%. Considering the hydrophobic character of the pigment used in this study, we hypothesized that there is a possible hydrophobic interaction between the pigment and the hydrophobic residues responsible for the antioxidant activity of the peptides. This hypothesis is supported by the increase in the antioxidant activity observed after co-encapsulating the compounds (3,52 Trolox mEq, or 54,7% ABTS scavenging). This increase might be due to differential localization of the compounds within the liposomes. Flexirubin-type pigments are located in the outer membrane of the bacterium (Venil et al., 2014), therefore it is safe to assume that it localizes mainly in the lipid wall of liposomes after encapsulation. The peptides, on the other hand, despite their high hydrophobic amino acid composition, have a more hydrophilic character compared to the pigment due to the hydrophilic amino acid residues present in their composition, being entrapped mostly within the aqueous core of the liposomes. Thus, these compounds are located in different compartments within the liposomes for the most part, being able to exert their bioactivity without as much interference in each other's. Nevertheless, the increase in antioxidant activity observed for co-encapsulated compounds cannot be considered as synergistic, since it is not greater than the sum of the activities of each compound separately. Coradini et al. (2014) reported improvement in the antioxidant activity of resveratrol and curcumin after co-encapsulation in polymeric nanocapsules, while Olga, Stylianis & Ioannis (2015) observed no effect on the activity of ferulic and gallic acid upon co-encapsulation in cyclodextrin complexes. These studies, in addition to our results, provide evidences that synergistic effect for co-encapsulated bioactive compounds might be dependent on the substances of interest and the method and materials used for encapsulation.

#### 4. Conclusion

The production of bioactive peptides by enzymatic hydrolysis of chicken



feathers is a promising alternative for producing high quality bioactive ingredients for food formulations. Also, using bacterial biomass for extraction of bioactive pigments is a simple and inexpensive process for studying the applicability of these compounds. This study suggests that phosphatidylcholine liposomes can be used for encapsulation of both bioactive peptides from the hydrolysis of chicken feathers and bacterial pigments. We highlight the high zeta potential of the liposomes observed upon encapsulation of the compounds, which indicates stabilization of the vesicles. Our results support the idea of employing liposomes as good encapsulation systems for the delivery of biologically active substances with the maintenance of their bioactivity, which opens up opportunities for the improvement of these systems for further industrial application.

## 5. References

- Aguilar, J. G. Dos S.; Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253–262.
- Aruldass, C. A. et al. (2016). Utilization of agro-industrial waste for the production of yellowish-orange pigment from *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 113, 342–349.
- Aruldass, C. A. et al. (2018). Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 6, 5164–5180.
- Aruldass, C. A.; Dufossé, L.; Ahmad, W. A. (2018). Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. *Journal of Cleaner Production*, 180, 168–182.
- Biesalski, H. et al. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25, 11–12, 1202–1205.
- Braga, M. C.; Vieira, E. C. S.; De Oliveira, T. F. (2018). Curcuma longa L. leaves: Characterization (bioactive and antinutritional compounds) for use in human food in Brazil. *Food Chemistry*, 265, 308–315.
- Brandelli, A.; Sala, L.; Kalil, S. J. (2015). Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73, 3–12.

- Chattopadhyay, M. K.; Jagannadham, M. V. (2001). Maintenance of membrane fluidity in Antarctic bacteria. *Polar Biology*, 24, 5, 386–388.
- Coradini, K. et al. (2014). Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 88, n. 1, p. 178–185, set. 2014.
- Corrêa, A. P. F. et al. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 12, 2247–2254, 2011.
- Corrêa, A. P. F. et al. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48–55.
- Corrêa, A. P. F. et al. (2019). Characterization of nanoliposomes containing bioactive peptides obtained from sheep whey hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 101, 107–112.
- Correa-Llantén, D. N.; Amenábar, M. J.; Blamey, J. M. (2012). Antioxidant capacity of novel pigments from an Antarctic bacterium. *Journal of Microbiology*, 50, 3, 374–379.
- Di Martino, A. et al. (2018). Enhancement of the antioxidant activity and stability of  $\beta$ -carotene using amphiphilic chitosan/nucleic acid polyplexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 773–780.
- Durak, A. et al. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry*, 141, 3, 2177–2183.
- Elbatanony, M. M. et al. (2019). Assessment of the antimicrobial activity of the lipoidal and pigment extracts of *Punica granatum* L. leaves. *Acta Ecologica Sinica*, 39, 1, 89–94.
- Fathi, M.; Mozafari, M. R.; Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23, 1, 13–27.
- Ferraro, V.; Anton, M.; Santé-Lhoutellier, V. (2016). The “sisters”  $\alpha$ -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of application. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 65–75.

- Fontoura, R. et al. (2014). Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. *New Biotechnology*, 31, 5, 506–513.
- Fontoura, R. et al. (2019). Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. *New Biotechnology*, 49, 71–76.
- Gruszecki, W. I.; Strzałka, K. (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1740, 2, 108–115.
- Halim, N. R. A.; Yusof, H. M.; Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24–33.
- Hasan, M. et al. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: Physicochemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, 461, 1–2, 519–528.
- Hatahet, T. et al. (2018). Liposomes, lipid nanocapsules and SmartCrystals®: A comparative study for an effective quercetin delivery to the skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 542, 1–2, 176–185.
- Hijazin, C. A. H.; Simões, A. T.; Silveira, D. R. (2010). Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. *Revista Atitude - Faculdade Dom Bosco de Porto Alegre*, 7, 89–93.
- Hosseini, F. S.; Ramezanzade, L.; Nikkhah, M. (2017). Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1455–1463.
- Imran, M. et al. (2015). Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 1, 341–349.
- Jiang, Y. et al. (2018). Contribution of specific amino acid and secondary structure to the antioxidant property of corn gluten proteins. *Food Research International*, 105, 836–844.
- Jiménez, M. E. P. et al. (2018). Extraction and partial characterisation of antioxidant pigment produced by *Chryseobacterium* sp. kr6. *Natural Product Research*, 6419, 1–9.
- Laridi, R. et al. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and

- release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13, 4, 325–336.
- Lesnierowski, G.; Stangierski, J. (2018). What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 46–51.
- Liu, Z. et al. (2008). Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control*, 19, 3, 231–235.
- Lorenzo, J. M. et al. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 79, 136–147.
- Lowry., O. H. et al. (1994). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Analytical Biochemistry*, 217, 2, 220–230.
- Maherani, B. et al. (2012). Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine. *Food Chemistry*, 134, 2, 632–640.
- Malheiros, P. da S. et al. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43, 4, 1198–1203.
- Malheiros, P. da S. et al. (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 8, 3545–3552.
- Mann, B. et al. (2014). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3235–3241.
- Matsui, R. et al. (2018). Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. *Food Chemistry*, 245, 750–755.
- Mosquera, M. et al. (2016). Antioxidant, ACE-Inhibitory and Antimicrobial Activities of Peptide Fractions Obtained from Dried Giant Squid Tunics. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 156, 144–150.
- Motta, A. S.; Brandelli, A. (2002). Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 63–70.
- Mohan, A. et al. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Advances*, 5, 97, 79270–79278.
- Mohana, D.; Thippeswamy, S.; Abhishek, R. (2013). Antioxidant, antibacterial, and

- ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiation Protection and Environment*, 36, 4, 168.
- Mojib, N. et al. (2010). Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 4, 531–540.
- Mozafari, M. R. et al. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18, 4, 309–327.
- Nenadis, N. et al. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS<sup>•+</sup> Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 15, 4669–4674.
- Niu, Y. et al. (2012). Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0. *Food Chemistry*, 1353, 1377–1382.
- Olga, G.; Styliani, C.; Ioannis, R. G. (2015). Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp- $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 185, 33–40.
- Paini, M. et al. (2015). An efficient liposome based method for antioxidants encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 1067–1072.
- Pinazo, A. et al. (2016). Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Advances in Colloid and Interface Science*, 228, 17–39.
- Pinilla, C. M. B.; Brandelli, A. (2016). Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 287–293.
- Pinilla, C. M. B.; Noreña, C. P. Z.; Brandelli, A. (2017). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk. *Food Chemistry*, 220, 470–476.
- Pourjavaheri-Jad, F. et al. (2014). Purification and Characterization of Feathers prior to Keratin Extraction. In: The 8th International Chemical Engineering Congress & Exhibition, Kish, Iran.
- Pownall, T. L.; Udenigwe, C. C.; Aluko, R. E. (2010). Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8, 4712–4718.
- Radhakrishnan, M. et al. (2016). In vitro antioxidant activity and antimicrobial activity

against biofilm forming bacteria by the pigment from desert soil *Streptomyces* sp. D25. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6, 6, 148–150.

Ramezanzade, L.; Hosseini, S. F.; Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 234, 220–229.

Riffel, A. et al. (2003). Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology*, 179, 4, 258–265.

Ryder, K. et al. (2016). Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food Chemistry*, 208, 42–50.

Sharma, S. et al. (2016). Extraction and Characterization of Keratin from Chicken Feather Waste Biomass: A Study. In: The National Conference for Postgraduate Research, Universiti Malaysia Pahang, Pahang, Malaysia.

Shavandi, A. et al. (2017). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent. *Food Chemistry*, 227, 194–201.

Silva, R. et al. (2010). Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 3, 628–632.

Singh, A. et al. (2017). Lipid membrane modulation and pigmentation: A cryoprotection mechanism in Arctic pigmented bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 57, 9, 770–780.

Sonam, K. S.; Guleria, S. (2017). Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products. *Annals Pharmacology and Pharmaceutics*, 2, 16, 1–6.

Taladrid, D. et al. (2017). Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol. *Food Research International*, 100, 541–550.

Taylor, T. M. et al. (2005). Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 7–8, 587–605.

Teixeira, M. L. et al. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 1, 49–53.

- Umadevi, K.; Krishnaveni, M. (2013). Antibacterial activity of pigment produced from *Micrococcus luteus* KF532949. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 4, 3, 149–152.
- Venil, C. K. et al. (2014). Isolation and characterization of flexirubin type pigment from *Chryseobacterium* sp. UTM-3<sup>T</sup>. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 4, 103–107.
- Venil, C. K. et al. (2016). Microencapsulation of flexirubin-type pigment by spray drying: Characterization and antioxidant activity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 113, 350–356.
- Wang, L. et al. (2018). Isolation and identification of novel antioxidant and antimicrobial oligopeptides from enzymatically hydrolyzed anchovy fish meal. *Process Biochemistry*, 74, 148–155.
- Xia, S. et al. (2015). Modulating effect of lipid bilayer–carotenoid interactions on the property of liposome encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 172–180.
- Zavareze, E. da R. et al. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 2, 841–848.
- Zhao, G.-P. et al. (2016). Antibacterial characteristics of orange pigment extracted from *Monascus* pigments against *Escherichia coli*. *Czech Journal of Food Sciences*, 34, 3, 197–203.
- Zou, Y. et al. (2016). Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing. *Process Biochemistry*, 51, 3, 431–443.