



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS**

**NANOFIBRAS DE ISOLADO PROTEICO DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*):  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.**

**SABRINA BACELO DE LA ROCHA**

**Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Engenharia e Ciência de  
Alimentos**

**Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA  
Orientador**

**Prof. Dr. CARLOS PRENTICE- HERNÁNDEZ  
Co- orientador**

**Rio Grande, RS**

**2014**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Valores médios para a composição química proximal da carne mecanicamente separada de bijupirá (CMSB) e isolado proteico de bijupirá (IPB).....	33
<b>Tabela 2</b> - Dados do espectro de FTIR do IPB.....	38
<b>Tabela 3</b> - Diâmetro das fibras formadas, e resposta de viscosidade e condutividade das soluções utilizadas no desenvolvimento de nanofibras.....	51
Tabela 4 - Propriedades térmicas apresentadas pelas nanofibras desenvolvidas com IPB/PEO e PEO (controle).....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Bijupirá ( <i>Rachycentron canadum</i> ) .....	6
<b>Figura 2</b> - Diagrama esquemático do equipamento de electrospinning. ....	15
<b>Figura 3</b> - Fluxograma do processo usando mudança de pH para obtenção de isolado proteico de bijupirá (adaptado de FREITAS, 2011). ....	21
<b>Figura 4</b> - Isolado Proteico de Bijupirá (IPB) .....	22
<b>Figura 5</b> - Equipamento de electrospinning com sistema de injeção (a), placa coletora (b) e fonte de alta voltagem (c). ....	25
<b>Figura 6</b> - Capilar (a) e coletor (b) do sistema de electrospinning. ....	25
<b>Figura 1 - 1</b> - Curva de solubilidade do IPB .....	34
<b>Figura 1- 2</b> - Separação por eletroforese com marcadores de padrão de proteína (M1) e (M2). Amostras (1), (2) e (3) de 1mg/mL de IPB, e amostras (11) $2 \cdot 10^{-2}$ mg/mL de IPB, (22) $1 \cdot 10^{-2}$ mg/mL de IPB e (33) $5 \cdot 10^{-3}$ mg/mL de IPB. ....	36
<b>Figura 1- 3</b> - Análise de Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) do Isolado Proteico de Bijupirá (IPB) .....	37
<b>Figura 1- 4</b> - Determinação de temperaturas de transição e entalpias de fusão do isolado proteico de bijupirá (IPB) por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). ....	39
<b>Figura 1- 5</b> - Análise termogravimétrica do isolado proteico de bijupirá (IPB). ....	41
<b>Figura 2- 1-</b> (a) Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB: PEO (4:1) com aumento de 5000x. (b) e (c) Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB:PEO (4:1) com aumento de 10000x.....	54
<b>Figura 2- 3</b> - Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB: PEO (5:1) com aumento de 65000x. (b) - Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB:PEO (5:1) com aumento de 6000x.....	55
<b>Figura 2 - 2</b> - Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB: PEO (5:1) com aumento de 14000x. (b) Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB:PEO (5:1) com aumento de 15000x.....	55
<b>Figura 2- 4</b> - Análise qualitativa por FTIR de (a) Nanofibras de IPB 5% (p/v) e (b) Nanofibras de PEO 1% (p/v) .....	56

<b>Figura 2- 5</b> - Determinação de temperaturas de transição e entalpias de fusão das nanofibras de IPB 5%, PEO 1% por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). ....	58
<b>Figura 2- 6</b> - Análise da degradação térmica das nanofibras desenvolvidas com IPB 5%(p/v) e com PEO 1% (p/v). .....	59

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO, ABSTRACT,</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2.OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>3</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
<b>2.1 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1.1 PESCADO	4
2.1.2 COMPOSIÇÃO DO PESCADO	5
2.1.3 BIJUPIRÁ ( <i>RACHYCENTRON CANADUM</i> )	6
2.1.4 PROTEÍNAS DE PESCADO	8
2.1.5 ISOLADO PROTEICO DE PESCADO	9
2.1.6 NANOTECNOLOGIA	12
2.1.7 NANOFIBRAS	13
2.1.8 APLICAÇÃO DAS NANOFIBRAS	16
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>19</b>
<b>PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE BIJUPIRÁ (<i>RACHYCENTRON CANADUM</i>)</b>	<b>19</b>
<b>3.1. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1.1 PROCESSO TECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADO PROTEICO DE BIJUPIRÁ (IPB)	20
3.1.2 CARACTERIZAÇÃO DO IPB	22

3.1.2.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL	22
3.1.2.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS	22
3.1.2.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR ELETROFORESE (SDS-PAGE)	23
3.1.2.4 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	23
3.1.2.5 ANÁLISES TÉRMICAS	24
<b>3.1.3 DESENVOLVIMENTO DAS NANOFIBRAS</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>26</b>
<b>DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO</b>	<b>26</b>
<b>RESUMO</b>	<b>28</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>29</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>2.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE BIJUPIRÁ</b>	<b>30</b>
<b>2.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO IPB</b>	<b>30</b>
2.2.1 PROPRIEDADES FUNCIONAIS	30
2.2.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL (SDS-PAGE)	31
2.2.3 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	31
2.2.4 ANÁLISES TÉRMICAS	32
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
<b>3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA PROXIMAL DO IPB</b>	<b>32</b>
<b>3.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS</b>	<b>33</b>
3.2.1. SOLUBILIDADE E CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA)	33
3.2.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DO IPB ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL (SDS-PAGE)	35
3.2.3 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	37
3.2.4 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	39
3.2.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA- TGA	40
<b>4 CONCLUSÃO</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>42</b>

<b>RESUMO</b>	<b>47</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>48</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<b>2.1 MATERIAL</b>	<b>49</b>
<b>2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS</b>	<b>49</b>
2.2.1 ANÁLISE DE CONDUTIVIDADE	49
2.2.2 ANÁLISE DE VISCOSIDADE	50
<b>2.3 PROCESSO DE <i>ELECTROSPINNING</i></b>	<b>50</b>
<b>2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS</b>	<b>50</b>
2.4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR	50
2.4.4 ANÁLISE CALORIMÉTRICA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL–DSC	50
2.4.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA–TGA	51
2.4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	51
<b>3.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS</b>	<b>54</b>
3.1.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	54
3.1.2 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	55
3.1.3 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	57
3.1.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA- TGA	58
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>60</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>

# **Capítulo I**

**RESUMO, ABSTRACT,  
INTRODUÇÃO GERAL**

## RESUMO

As nanofibras produzidas através de biopolímeros oriundos de materiais biológicos têm tomado espaço no âmbito mundial, estes podem ter sua origem em compostos como a proteína animal, por exemplo, as proteínas de pescado. O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver nanofibras de isolado proteico de Bijupirá (*Rachycentron canadum*). O isolado proteico de bijupirá (IPB) foi obtido utilizando processo de variação de pH para solubilizar e isolar proteínas. O IPB obtido foi caracterizado quanto sua composição química proximal e suas propriedades físico-químicas, estruturais e funcionais. O rendimento do IPB foi de 98,17% de proteína, em base seca. A maior solubilidade e a maior capacidade de retenção de água (CRA) do IPB foram obtidas em pH 11 e 21,9 mL.g<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente. Os perfis eletroforéticos revelaram massas moleculares características de proteínas miofibrilares (miosina e actina). Os principais picos identificados pelas análises de Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) são provenientes de ligações peptídicas (ligações amida), como Amida I e II. Os maiores pontos de fusão e de degradação do IPB foram de 259,1°C e 378°C, respectivamente, obtendo assim, um isolado proteico com elevada estabilidade térmica. As nanofibras foram desenvolvidas pela técnica de *electrospinnig*. Foram preparadas soluções poliméricas utilizando 1% (p/v) de óxido de polietileno (PEO) e 1, 2, 3, 4, 5 e 6% (p/v) de IPB. Os parâmetros utilizados no processo de *electrospinning* como: potencial elétrico, distância da ponta do coletor a agulha e a taxa de fluxo da solução foram fixados em 16,7 kV, 15 cm, e 150 µL.h<sup>-1</sup>, respectivamente. Os efeitos do solvente e a adição de um biopolímero comercial na capacidade de formação e morfologia das nanofibras foram estudados. Em relação ao efeito do solvente na solubilização das proteínas, o processo de *electrospinning* foi favorecido quando utilizado o ácido fórmico 85% (v/v), como este solvente orgânico promove a formação de estruturas helicoidais aleatórias e, conseqüentemente, um aumento no emaranhado de biopolímeros. A adição do biopolímero PEO proporcionou melhor viscosidade às soluções de IPB e o desenvolvimento das nanofibras. A morfologia analisada por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) das nanofibras obtidas com 5 e 4% (p/v) de IPB e 1% (v) de PEO foi de 205 ± 82 nm e 476 ± 107, respectivamente.

## ABSTRACT

## 1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem se destacando devido à versatilidade em suas aplicações (AGARWAL et al. 2008). Nos últimos anos, esta área vem se expandindo, com o uso de compostos nanoestruturados desenvolvidos a partir de biopolímeros biodegradáveis, biofuncionais e biocompatíveis.

Os biopolímeros oriundos de fontes proteicas podem ser utilizados como soluções poliméricas para a fabricação de fibras em escala manométrica, através da técnica de *electrospinnig*. As nanofibras desenvolvidas por esta técnica possuem características únicas, tais como grande relação área superfície por volume, alta porosidade e estrutura microporosa, características excelentes para o uso em engenharia de tecidos, bioengenharia, engenharia de alimentos, biotecnologia ambiental, bioenergia, engenharia eletrônica e segurança (RAMAKRISHNA et al. 2006). A morfologia das nanofibras pode ser variada ajustando os parâmetros do processo de *electrospinning*, sendo os principais fatores as propriedades da solução polimérica utilizada e os parâmetros do processo (CHAKRABORTY et al. 2009).

Por outro lado, proteínas ricas em músculo escuro de pescado têm seu uso limitado devido a alta probabilidade à oxidação e de *off - flavor*. Os pescados com esta característica são em sua maioria transformados em produtos de baixo valor no mercado. Portanto, a conversão destes materiais ricos em proteína podem produzir produtos de alto valor agregado, bem como a utilização de blendas poliméricas, utilizando proteínas naturais com polímeros orgânicos sintéticos é uma alternativa para a produção de nanomateriais, como as nanofibras (HSU, 2010).

Assim, aliando as propriedades estruturais e funcionais das proteínas, e sua biocompatibilidade a vários biopolímeros orgânicos sintéticos, aprovados pelos EUA Food and Drug Administration, pode-se desenvolver biomateriais feitos à base de proteínas fibrosas formando principalmente nanofibras com função estrutural e/ou mecânica. Os atributos estrutural e funcional das proteínas fibrosas, como por exemplo, a actina e a miosina são cada vez mais exploradas para melhorar o desempenho dos materiais sintéticos. Estas propriedades podem ser exploradas aplicando nanotecnologia (PAIVA et al. 2006).

As nanofibras de proteínas podem servir como estruturas celulares, permitindo, estabilização, proteção, elasticidade e motilidade de células..

Assim, o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a obtenção de bioprodutos de origem animal, como o pescado, é uma alternativa em processos biotecnológicos.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Desenvolver nanofibras de isolado proteico de bijupirá (*Rachycentron canadum*).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Extrair e isolar a proteína de bijupirá (*Rachycentron canadum*);
- Caracterizar a composição química proximal do IPB;
- Caracterizar as massas moleculares presentes no IPB;
- Avaliar as propriedades funcionais do IPB;
- Avaliar as propriedades físico-químicas do IPB;
- Desenvolver nanofibras de IPB;
- Avaliar as características morfológicas das nanofibras de IPB;
- Avaliar as estruturas moleculares das nanofibras de IPB;
- Avaliar as propriedades térmicas das nanofibras de IPB;
- Avaliar a toxicidade das nanofibras de IPB.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISÃO DA LITERATURA**

## **2.1 REVISÃO DA LITERATURA**

Este capítulo faz uma descrição geral da matéria-prima, do isolado proteico de pescado, nanotecnologia, técnica de elaboração de nanofibras, nanofibras e suas aplicações.

### **2.1.1 Pescado**

A indústria de pescado é uma fonte econômica importante para um grande número de países do mundo. A proteína de pescado é uma fonte essencial de nutrientes para muitas pessoas, especialmente nos países em desenvolvimento. Estima-se que em todo o mundo, um bilhão de pessoas dependem da produção, do processamento e do comércio do pescado para a sua subsistência. (Chalamaiah et al. 2012).

A produção de pescado varia entre 2,5 e 3 milhões de toneladas por ano, em particular, os peixes marinhos cultivados representaram cerca de 7% da produção total de pescado, embora representem apenas uma pequena fração do total da produção de pescado, eles são uma das principais fontes de produtos como sushi e sashimi. (Cho et al. 2014)

De acordo com a FAO, a produção da pesca e da aquicultura mundial totalizou 158 milhões de toneladas em 2012, cerca de 10 milhões de toneladas a mais do que 2010. A piscicultura tem uma grande promessa na resposta à crescente demanda por alimentos que está ocorrendo devido ao crescimento da população mundial. Ao mesmo tempo, o consumo per capita de pescado aumentou a partir de 10 kg em 1960 para mais de 19 kg em 2012. O novo relatório também diz que o pescado já responde por quase 17 por cento do consumo da população global de proteína - em alguns países costeiros e insulares que pode cobrir 70 por cento. O papel do pescado está em um lugar de destaque na Segunda Conferência Internacional sobre Nutrição organizado conjuntamente pela FAO e da Organização Mundial da Saúde (OMS).(FAO, 2014).

A indústria de alimentos e a aquicultura têm sido confrontadas com o desafio de encontrar ingredientes de proteína nutricionalmente adequados e economicamente viáveis. A produção de alimentos provenientes da maricultura requer formulações à base de ingredientes e aditivos com rápida absorção para substituir as matérias-

primas escassas como as de pescado, bem como outras fontes escassas sujeitas a flutuações no custo e disponibilidade (TACON, et al. 2011).

O pescado é conhecido por ser uma fonte de proteína rica em aminoácidos essenciais (lisina, metionina, cistina, treonina e triptofano), micro e macro elementos (cálcio, fósforo, flúor, iodo), e gorduras que são fontes valiosas de energia, vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos insaturados que, entre outras vantagens, tem um efeito hipocolesterolêmico (USYDUS et al., 2009). Entretanto, é um dos produtos de origem animal com maior suscetibilidade aos processos de deterioração, devido à ação de enzimas autolíticas, pH próximo à neutralidade e à elevada atividade de água nos tecidos (64 a 90%), favorecendo o crescimento microbiano e elevada insaturação dos lipídios favorecendo a deterioração pela rancidez.

### **2.1.2 Composição do pescado**

A composição da carne de pescado é muito variável. Espécie, sexo, idade, *status* nutricional e nível de atividade do animal são fatores que afetam sua composição (LAWRIE, 1998). Além disso, e um único animal, a composição da carne pode mudar de acordo com a área anatômica do corte, com o processo de pós-abate, com o armazenamento e, é claro, com a forma de cocção.

Segundo Damodaran et al. 2010, a quantidade de proteínas encontrada na carne pescado é medida por meio da análise total do conteúdo de nitrogênio multiplicado por 6,25, um fato baseado na média de nitrogênio encontrado na proteína da carne. As proteínas presentes na carne de pescado são ricas em aminoácidos essenciais (lisina, metionina, cistina, treonina e triptofano).

A composição lipídica varia de acordo com a espécie e também, com o músculo em uma mesma espécie, especialmente quando se comparam músculos nos quais a maioria das fibras depende do metabolismo oxidativo (músculos vermelhos) com músculos que costumam depender do metabolismo glicolítico (músculos brancos). Os pescados gordos apresentam elevado nível de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente os da família ômega-3, destacando-se o eicosapentaenóico 20:5 e o docosahexaenóico 22:6 e estes são considerados benéficos para saúde humana, na prevenção de trombose e arteriosclerose, melhoria de hiperlipidemia, redução da pressão arterial (JAYASINGLHE et al., 2003).

Os carboidratos são uma parte muito pequena da composição da carne fresca (< 1%). A principal fonte de carboidrato do músculo é o glicogênio, com pequenas quantidades de monossacarídeos e metabólitos glicolíticos.

O conhecimento da composição do pescado tem importância fundamental na aplicação de diferentes processos tecnológicos, influenciando no aspecto de qualidade da matéria-prima, bem como nos atributos sensoriais e na estabilidade do armazenamento do produto (YEANNES e ALMANDOS, 2003).

### 2.1.3 Bijupirá (*Rachycentron canadum*)

Bijupirá ou cobia (*Rachycentron canadum*), como mostra a Figura 1, pertence à família da *Rachycentridae*. O bijupirá é uma espécie de peixe pelágico, migratório, encontrado em mares tropicais e sub-tropicais de todo o mundo, com exceção do Pacífico oriental (SHAFFER E NAKAMURA, 1998). No Atlântico ocidental é encontrada do sul da Nova Scotia (Canadá) a Argentina. No Brasil se distribui por toda costa litorânea (do Amapá ao Rio Grande do Sul), sendo mais comum na região nordeste.

Figura 1 - Bijupirá (*Rachycentron canadum*)



O bijupirá ganhou popularidade na maricultura devido ao seu rápido crescimento e carne branca de uso versátil (SHIAU, 2007).

A pesquisa sobre as populações naturais de bijupirá começaram na década de 1960 nos Estados Unidos da América (FRANKS et al, 1999;. JOSEPH et al, 1964.). O potencial do bijupirá na aquicultura foi proposto pela primeira vez por HASSLER e RAINVILLE (1975). No entanto, já durante a década de 1970 a agricultura do bijupirá tinha começado em uma pequena escala em Taiwan. Durante os anos de 1993-1995 a

produção aquícola anual estava estagnada em torno de 200 toneladas com base em capturas selvagens de alevinos (SVENNEVIG, Pers. Comm.). A primeira reprodução de bijupirá ocorreu em Taiwan em 1994 e a reprodução em massa foi obtida a partir de 1997 (LIAO et al., 2004).

Devido ao rápido crescimento do bijupirá e sua adequação para produção comercial, a aquicultura dessa espécie tem se tornado cada vez mais popular. A pesquisa e o desenvolvimento na aquicultura de bijupirá têm sido realizados em mais de 23 países e territórios, a metade na Região da Ásia-Pacífico.

Esta espécie tem preferência por temperaturas de água entre 20 e 30° C; migrando para o sul em busca de águas mais quentes durante o outono e o inverno do hemisfério norte. Na natureza pode tolerar salinidades que variam de 8 a 44,5‰. Em condições experimentais, as larvas podem suportar salinidade próxima de 19‰ e existem evidências que os adultos conseguem se adaptar a salinidades abaixo de 22,5‰ (SHAFFER e NAKAMURA, 1998).

Em pisciculturas comerciais, as fêmeas podem alcançar peso acima de 8 kg em um ano e meio e normalmente todas já estão sexualmente maduras. Segundo Su et al. (2000), fêmeas provenientes do cultivo comercial em Taiwan atingem a maturidade sexual com 15 meses. Já os machos normalmente apresentam maturidade, quando atingem 7 kg e geralmente isso ocorre no período de um ano.

O bijupirá não possui diferenças morfológicas externas evidentes entre machos e fêmeas. No período de maturidade sexual as fêmeas ficam com as listras brancas mais pronunciadas; já os machos maduros possuem normalmente o corpo mais delgado que auxiliam na diferenciação sexual (SU et al. 2000). Brown-Peterson, et al. (2001), verificaram o desenvolvimento gonadal e períodos de desova do bijupirá coletado em diferentes locais no Golfo do México e concluíram que esta espécie apresenta similaridade para os períodos de reprodução.

Em relação ao hábito alimentar, o bijupirá é considerado uma espécie carnívora e na fase larval se alimenta principalmente de copépodos. Na natureza os adultos se alimentam de uma variedade de espécies de peixes, crustáceos e organismos bentônicos (SHAFFER E NAKAMURA, 1998). São peixes que se adaptam facilmente a dieta artificial e possuem características zootécnicas interessantes para o cultivo intensivo. De acordo com Liao et al. (2004), as rações comerciais utilizadas em Taiwan possuem de 42 a 45% de proteína bruta e 15 a 16% de lipídio total, variando de acordo com o estágio de desenvolvimento e do fabricante da ração. No entanto, Chou et al. (2001) destaca que as dietas disponíveis para bijupirá são originalmente

formuladas para outras espécies marinhas, como garoupa e “seabass” e que existem poucas informações sobre exigências nutricionais e carência de estudos básicos de nutrição.

Em termos produtivos, são grandes as chances do bijupirá se tornar tão importante para o Brasil quanto o salmão é para o Chile. Ele atinge seis quilos no primeiro ano e até 15 no segundo. Em comparação com o salmão, é um peixe com produtividade quatro vezes maior e com possibilidades de mercado muito maiores, já que hoje existe uma demanda mundial por peixes de carne branca de qualidade, principalmente para animais que produzem grandes filés (acima de 1 Kg de filé), como é o caso do bijupirá.

Os principais mercados para a comercialização são o norte-americano, já que os EUA são os maiores compradores de pescado brasileiro, e a Europa, que convive com uma grande demanda por carne branca de qualidade. Outro mercado desejado por todos é o mercado japonês, que conhece e aprecia a qualidade do bijupirá produzido na China. Outro mercado potencial é o brasileiro, hoje em ascensão no consumo de pescados e na busca por qualidade e sabor. Além disso, sua textura elástica, cor branca e sabor suave fazem do bijupirá um dos melhores peixes para sashimi e outros pratos. O peixe vem sendo comercializado hoje a US\$ 9/kg inteiro fresco ou US\$ 18 para o quilo de filé. No Brasil, o bijupirá é comercializado por R\$13/kg inteiro fresco ou posta na Bahia e por R\$ 18 no litoral norte do Rio de Janeiro (<http://jobagola.wordpress.com>).

O bijupirá é uma espécie de pescado com potencial global emergente para a aquicultura marinha, devido às vantagens de rápido crescimento, menos doenças e de alto valor nutricional (HOLTA, FAULKA, E SCHWARZ, 2007).

#### **2.1.4 Proteínas de pescado**

Segundo Gómez-Estaca et al. (2014) as proteínas musculares do pescado são classificadas em três grandes grupos: proteínas miofibrilares, sarcoplasmáticas e estromais.

As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem elevado valor biológico, decorrente da alta sensibilidade à hidrólise e composição balanceada em aminoácidos, principalmente os limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína (NEVES et al. 2004).

As proteínas miofibrilares constituem de 66 a 77% das proteínas do músculo de pescado. Nesse grupo, as principais são: miosina (200 kDa) e actina (42 kDa), não somente pela quantidade, mas também por suas propriedades funcionais. Estas apresentam grande influência sobre a textura, suculência, capacidade de retenção de água, capacidade emulsificante, entre outras (AYALA, 2001).

A miosina constitui de 50 a 60 % da fração miofibrilar e a actina, 15 a 20%. Essas proteínas complexam-se, formando a actomiosina, no momento do “rigor mortis”. São também responsáveis pela capacidade do pescado em reter água, pelas propriedades sensoriais e pela capacidade de formação de gel (OETTERER 2005).

Do ponto de vista alimentar, as proteínas miofibrilares são as principais proteínas do músculo de pescado, medindo cada fibra 0,01 a 0,1 mm de comprimento por 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. São proteínas solúveis em soluções salinas de alta força iônica ( $i \geq 0,5$ ) (OGAWA, 1999).

A propriedade funcional de gelificação das proteínas miofibrilares está intimamente ligada à taxa de miosina livre encontrada no músculo, influenciando na estabilidade térmica do gel (BENJAKUL, 2001).

As proteínas sarcoplasmáticas constituem cerca de 35% das proteínas totais do músculo e são solúveis em água independente da força iônica, facilitando a interação de seus sítios ativos com as moléculas de água (REN et al., 2008).

Em menores proporções, seguem as proteínas reguladoras como a tropomiosina e troponina, actinas, proteínas M, C, F, I e as proteínas de suporte (conectivas, proteína – Z) (OGAWA, 1999).

### **2.1.5 Isolado proteico de pescado**

O isolamento de proteína é basicamente um processo de extração o qual visa obter um produto livre de interferentes. Isolados e hidrolisados proteicos de pescado, geralmente são obtidos pela metodologia de solubilização química, ácida ou alcalina, ou por via enzimática, a partir de resíduos ou de pescados inteiros. Os isolados proteicos de pescado podem ser utilizados como ingredientes funcionais em uma ampla e crescente faixa de aplicação em alimentos e outros produtos (MARTINS, 2009).

Há várias pesquisas com desenvolvimento de isolados proteicos de pescado, por solubilização proteica via ácida ou alcalina. O processo de solubilização ácida ou alcalina foi desenvolvido na Estação Marinha da Universidade de Massachusetts,

E.U.A. O processo utiliza o princípio de que a solubilidade de um material proteico homogeneizado em água é afetada pelo pH da mistura. Nas condições extremas ácidas ou alcalinas, ocorrem fortes variações positivas e negativas, respectivamente, sobre as proteínas miofibrilares e o citoesqueleto que conduz à repulsão, e interação com a água ocorrendo a solubilização (NOLSOE e UNDELAND, 2009). Isto tem demonstrado um potencial significativo como um método para a máxima recuperação de proteínas e as proteínas recuperadas por este processo apresentam boa funcionalidade (RAWDKUEN et al., 2009)

Kristinsson et al. (2005), relataram resultados sobre os processos ácido e alcalino de músculo de bagre, e obtiveram recuperações da proteína mais elevadas quando comparados com o processo convencional de obtenção de surimi.

Segundo Gómez-Estaca et al. (2014), o processo de isolar proteínas miofibrilares, inicia com uma prévia lavagem do músculo de pescado com água ou soluções salinas muito diluídas para remover as proteínas sarcoplasmáticas, em seguida, solubilizadas em condições ácidas ou básicas e centrifugada para remover as proteínas do estroma.

O processo de extração por solubilização ácida ou alcalina é realizada por solubilização das proteínas em valores de pH extremos. A proteína pode ser precipitada no ponto isoelétrico, que rende uma suspensão heterogênea, com um rendimento de proteína bruta próximo a 200g/L (BRENNER et al. 2009).

O ponto isoelétrico é o pH onde as cargas positivas e negativas se equivalem, ou seja, quando as moléculas não possuem cargas positivas nem negativas em excesso. Nesse pH a proteína não migra para um pólo quando colocada em campo elétrico. O pH em que isso ocorre depende dos pKs dos grupos ionizáveis e será mais alto quanto mais resíduos básicos houver e mais baixo quanto mais resíduos ácidos presentes, sendo que a maioria das proteínas apresenta ponto isoelétrico na faixa de 4,5 a 6,5 (SGARBIERI, 1996).

A solubilidade de uma proteína é mínima no ponto isoelétrico, pois sua carga é zero, e desaparece qualquer força de repulsão eletrostática que poderia dificultar a formação de precipitados (PARDI et al. 2001), as moléculas não se repelem, elas se atraem formando agregados. O pH afeta a densidade de cargas e o balanço eletrostático intra e intermolecular, modificando a habilidade da proteína em participar

das interações hidro e lipofílicas. O aumento da densidade de cargas na proteína em pH afastados da região do ponto isoelétrico favorece a repulsão eletrostática e as interações proteína-água, resultando num aumento da solubilidade (FONTANARI et al. 2007).

Uma característica interessante dos processos de extração por solubilização ácida ou alcalina, é que quando o músculo é submetido a valores de pH extremos, as proteínas são parcialmente desdobradas. Este desdobramento parcial leva a mudanças substanciais na parte estrutural e conformacional das proteínas, as quais conduzem a diferentes propriedades quando são recuperadas (KRISTINSSON e HULTIN, 2003).

Batista et al. (2007), relataram que os rendimentos de isolado proteico de músculo de sardinha obtidos por solubilização ácida e alcalina foram de 73% e 77%, respectivamente.

Kristinsson e Ingadottir, (2006) investigaram os rendimentos de proteína de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e encontraram rendimento de 56% a 61% com o processo ácido e de 61% a 68% com o processo alcalino.

Costa et al (2003), desenvolveu isolado proteico da matriz dos exoesqueletos de camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) empregando processo de extração alcalina, utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) como agente de solubilização. Esse autor obteve um produto com 89,02% de proteínas e rendimento de 69%.

Yongsawatdigul e Park (2004), realizaram experimentos de solubilização ácida e alcalina das proteínas de músculos de peixe-escorpião, empregando soluções de ácido clorídrico (HCl) e de hidróxido de sódio (NaOH) como agentes acidificante e alcalinizante, respectivamente. Os maiores percentuais de solubilidade (aproximadamente 60%) foram obtidos nos pHs 2 a 3 e nos valores de pH de 11 a 12 e valores mínimos de solubilidade no pH 5. Esses autores reportaram que os processos ácido e alcalino são capazes de extrair tanto proteínas sarcoplasmáticas como miofibrilares.

Fontana (2007) desenvolveu isolados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*), sendo empregada a solubilização ácida e alcalina, e constatou que o rendimento do processo alcalino (55,35%) foi maior que do processo ácido (46,6%).

Freitas (2011) produziu isolados protéicos de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*) empregando os dois processos (alcalino e ácido) e obteve um maior teor protéico (93,11%) quando utilizado o processo alcalino.

Vega (2011) conseguiu recuperar 97,87% das proteínas de corvina (*Micropogonias furnieri*) através de do método de solubilização alcalina e precipitação isoelétrica das proteínas.

## 2.1.6 Nanotecnologia

O prefixo nano é derivado da palavra grega nanos que significa “anão”. Na acepção moderna desta palavra, nano é um termo técnico usado em qualquer unidade de medida, significando um bilionésimo dessa unidade, por exemplo, um nanômetro equivale a um bilionésimo de um metro ( $1\text{nm} = 1/1.000.000.000 \text{ m}$ ) ou aproximadamente a distância ocupada por cerca de 5 a 10 átomos, empilhados de maneira a formar uma linha. (FISHBINE, 2002). Quando o tamanho das partículas é reduzido abaixo deste limiar, o material resultante apresenta propriedades físicas e químicas que são significativamente diferentes quando comparados com as propriedades de materiais de macroescala compostos pela mesma substância.

A nanotecnologia é claramente uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar uma vez que se baseia em diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais), estruturados em escala nanométrica como nanopartículas, nanotubos e nanofibras, que por sua vez são formados a partir de átomos ou moléculas.

Dessa forma, a síntese controlada desses nanocompostos e seu subsequente arranjo para formar materiais e/ou dispositivos nanoestruturados constituem os objetivos centrais da nanotecnologia. Essa ciência promete revolucionar a indústria de alimentos, desde a produção até o processamento, armazenamento e desenvolvimento de novos materiais, produtos e aplicações.

Essas nanoestruturas já foram avaliadas e aplicadas em uma série de setores da nanobiotecnologia, incluindo transporte de fármacos, formação de emulsões, imagiologia, biomateriais, segurança alimentar, ótica e eletrônica, patógenos, biossensores, diagnóstico *in vitro*, engenharia de tecidos e terapia genética (MORAIS et al., 2014).

### 2.1.7 Nanofibras

Nanoestruturas unidimensionais (possuem uma dimensão de tamanho nanométrico) tem sido alvo de pesquisas devido a suas propriedades únicas (LI; XIA, 2004). Nanofibras podem ser produzidas a partir de uma ampla variedade de polímeros. Estas fibras possuem uma área superficial específica extremamente elevada devido a seu pequeno diâmetro, e podem ser altamente porosas com excelente interligação dos poros. Essas características, mais as funcionalidades dos próprios polímeros possibilitam que as nanofibras apresentem diversas propriedades desejáveis para aplicações avançadas (FANG et al., 2008).

A produção das nanofibras relaciona-se diretamente com a Nanotecnologia, diversificando as suas opções e promovendo o seu desenvolvimento em diferentes frentes.

As nanofibras são também interessantes pelo destaque na comunicação entre o mundo da nano e o de macro escala, uma vez que os diâmetros são observados na gama dos nanômetros. As nanofibras produzidas a partir de polímeros sintéticos e naturais têm recebido maior atenção devido à sua facilidade de fabricação e capacidade de controlar sua composição estrutural e propriedades funcionais.

As técnicas comumente utilizadas para a produção de nanofibras são automontagem (*self-assembly*), molde estrutural (*template synthesis*), separação de fase (*phase separation*) e deposição eletrostática (*electrospinning*) (HUANG, et al. 2003). Dentre estas técnicas, o *electrospinning* mostra-se a escolha mais adequada para a produção de nanofibras de composição polimérica diversificada, com interiores sólidos ou ocos, excepcionalmente longas em comprimento, uniformes no diâmetro, variando no intervalo de nanômetros à vários micrômetros (YARIN, KOOMBHONGSE, RENEKER, 2004).

O *electrospinning* foi descoberto em 1934 por Formhals, que publicou uma série de patentes nos Estados Unidos, uma delas descrevia uma montagem experimental para a produção de filamentos de polímero utilizando uma força eletrostática. Mais tarde, o foco mudou para estudar a morfologia estrutural das nanofibras com base numa grande variedade de sistemas poliméricos. Apesar destas primeiras descobertas, o *electrospinning* quase foi esquecido até a década de 1990. A técnica de *electrospinning* recuperou atenção substancial desencadeada por um interesse crescente no desenvolvimento de fibras ultrafinas ou estruturas fibrosas de

vários polímeros com diâmetros abaixo de submicrons ou nanômetros que podiam ser fabricadas com este processo (WANG et al. 2013)

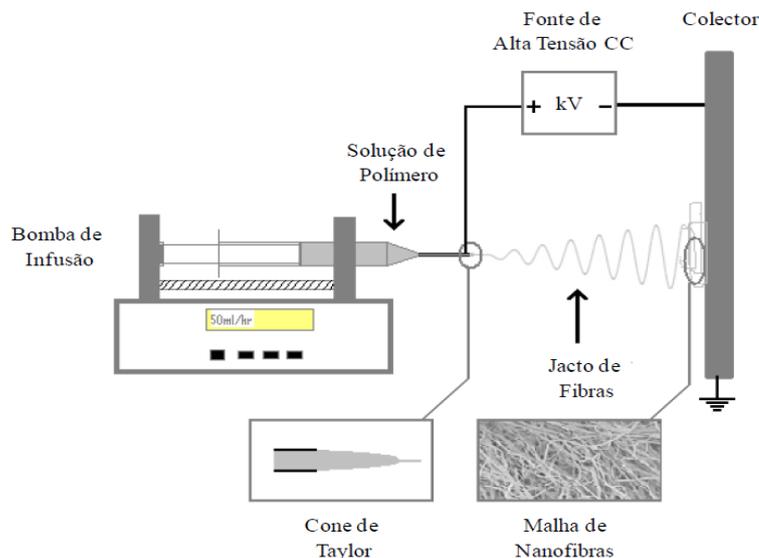
Em geral, o sistema de *electrospinning* consiste em três componentes básicos: uma fonte de alta tensão em Corrente Contínua (CC) ligada eletricamente a um fluido (polímero diluído ou fundido), um coletor (onde podem ser adicionados substratos) e um dispositivo de infusão (“bomba”) para realizar a injeção do fluido armazenado numa seringa convencional dotada de uma agulha. Na grande maioria das experiências, o desempenho é considerável, usando uma agulha metálica e uma folha de alumínio revestindo o coletor, o eletrodo da fonte de tensão pode ser imerso no fluido ou acoplado diretamente na agulha metálica. Este processo utiliza campos elétricos de alta tensão (5-60 kV) e baixa corrente (0,1-1 $\mu$ A) para produção de fibras de diâmetro reduzido. Quando o campo elétrico é suficientemente intenso para superar a tensão superficial da gota que se encontra suspensa na sua extremidade do capilar, esta se torna fortemente eletrificada, deformando-se numa forma cônica (Cone de Taylor). Sempre que a tensão ultrapassa um valor crítico, as forças eletrostáticas priorizam a tensão superficial do fluido e forçam a injeção deste a partir do cone. Este é o resultado das repulsões eletrostáticas entre as cargas do mesmo sinal na superfície do fluido, assim como das atrações perante as cargas de sinal oposto, localizadas no coletor. Como o solvente evapora rapidamente durante o processo, o diâmetro do jato é constantemente reduzido, conduzindo à formação de fibras ultrafinas. Dependendo das propriedades reológicas da solução e dos outros parâmetros de processamento, o diâmetro das fibras resultantes pode ser ajustado. (PORTELA, 2011).

Segundo Okutan et al. (2014), o *electrospinning* tem sido um dos processos mais simples, versáteis e promissores para a produção de nanofibras contínuas de polímeros sintéticos e naturais devido a manutenção da integridade estrutural e arranjos das fibras.

As nanofibras formadas por *electrospinning* possuem uma série de características interessantes, tais como alta porosidade, grande massa por unidade de área de superfície, alta permeabilidade e pequeno tamanho dos poros (SAEED e PARK, 2010).

A Figura 2 mostra uma descrição gráfica do princípio de funcionamento do processo de *electrospinnig*.

Figura 2 - Diagrama esquemático do equipamento de electrospinning.



Fonte: Adaptado de PORTELA (2011)

Muitos parâmetros podem influenciar o processo de *electrospinning*, incluindo propriedades da solução (por exemplo, concentração, viscosidade, condutividade elétrica, tensão superficial, propriedades dielétricas), que regem as variáveis (por exemplo, campo elétrico, taxa de fluxo, taxa de fluido, distância da placa coletora) e parâmetros ambientais, tais como umidade e temperatura. A concentração de polímero numa solução determina se ele pode ser utilizado na formação de nanofibras por *electrospinning*, além de possuir importante influência na morfologia da fibra (BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

Geralmente, uma aumento na concentração da solução aumenta o diâmetro da fibra e uniformidade (DEITZEL et al., 2001). O processo de *electrospinning* requer transferência de cargas elétricas do eletrodo para a gota da solução. Portanto, uma condutividade elétrica mínima é essencial para a formação de nanofibras. Soluções com zero de condutividade não podem formar nanofibras. A condutividade elétrica é afetada pelo tipo de polímero e solvente, concentração de polímero e temperatura. Quando o polímero tem funcionalidade iônica, a condutividade da solução é dependente da concentração (ANDRADY, 2008).

A tensão superficial é uma função da solução e desempenha um papel fundamental no processo de *electrospinning* (BHARDWAJ e KUNDU, 2010). É a principal força opondo-se a tensão aplicada durante o processo e determina a formação das nanofibras (ANDRADY, 2008). As soluções com alimentação de baixa

tensão superficial produzem fibras sem gotas. No entanto, isso não significa que todas as soluções com baixa tensão superficial possam formar fibras por *electrospinnig* (BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

A tensão mínima para produzir nanofibras aumenta com a tensão de superfície da solução, mas não sempre linearmente. Tensões superficiais de soluções de polímeros mudam com a concentração, composição química e temperatura (ANDRADY, 2008).

Propriedades reológicas, especialmente viscosidade influenciam o processo de formação das nanofibras. Soluções com alta viscosidade não podem ser ejetadas do capilar enquanto as soluções com baixa viscosidade não produzem fibras (BHARDWAJ e KUNDU, 2010). A força viscoelástica dentro do jato do polímero carregado é a força fundamental para agir contra a Repulsão de Coulomb, que é a principal força de alongamento depois do Cone de Taylor. Numerosos estudos têm mostrado o efeito da viscosidade da solução com o tamanho da fibra, e, geralmente, uma maior viscosidade significa maior tamanho da fibra (OKUTAN et al. 2014).

A tensão aplicada é o elemento crítico do processo de *electrospinning* porque fornece carga de superfície e afeta diâmetro das nanofibras. Geralmente o aumento de tensão pode levar à diminuição nos diâmetros de nanofibras (BHARDWAJ e KUNDU, 2010). No entanto, tensões muito altas podem facilitar a formação de nanofibras com diâmetros maiores (ZHANG et al. 2005).

A taxa de alimentação da solução influencia a velocidade do jato e a taxa de transferência da solução. Taxas baixas de alimentação podem inibir o processo de *electrospinnig* e altas taxas de alimentação podem resultar fibras com gotas e diâmetro maiores, devido à indisponibilidade de evaporação adequada do solvente antes de alcançar o coletor (BHARDWAJ E KUNDU, 2010).

### **2.1.8 Aplicação das nanofibras**

Nanofibras têm sido amplamente estudadas para diversas aplicações, tais como filtração cicatrização de feridas, andaimes em engenharia de tecidos, a entrega de medicamentos, imobilização de enzimas, biossensores, geração de energia, vestuário de proteção, a membrana de afinidade e cosmético. As aplicações das nanofibras para as indústrias agrícolas e alimentares são relativamente recentes em comparação com os seus usos em outros setores (OKUTAN et al. 2014).

A elevada relação de área por volume, a flexibilidade das estruturas e o desempenho mecânico superior (por exemplo, rigidez e resistência à tração), em comparação com outros materiais conhecidos (HUANG, 2003), fazem desta técnica e das estruturas resultantes, atrativas para um amplo número de aplicações.

O desenvolvimento no conhecimento da produção de nanofibras tem sido potencializado às aplicações dessas nanofibras. Sua aplicação tem tomado espaço nas áreas de engenharias de alimentos, farmacêutica, biomédica, eletrônica, entre outras. Em todas as áreas, a demanda de novos materiais tem sido desejada, e as nanofibras podem abrir novos caminhos de pesquisas (TEO e RAMAKRISHNA, 2006).

Na área alimentícia, por exemplo, a nanotecnologia tem impacto em praticamente todos os setores, incluindo alimentos, materiais de embalagens que possuem barreiras de gás extremamente altas, propriedades antimicrobianas e nanosensores que podem detectar microrganismos ou contaminantes químicos em surpreendentemente baixos níveis. Outros usos potenciais da nanotecnologia em alimentos incluem: nanoencapsulantes para o fornecimento de nutrientes, sabores, aromas ou pesticidas mais potentes tintas de segurança ou nanobarcodes para proteger contra a falsificação ou preservar a identidade do produto. e nanopartículas que podem ser utilizadas em engenharia genética de agricultura-pecuária. (HUANG et. al., 2009).

Outro uso adotado na nanotecnologia é o desenvolvimento da camada “embalagem bioativa e inteligente”. As embalagens bioativas desempenham função após o conteúdo ser embalado, interagindo com o alimento para aumentar sua vida de prateleira, segurança e utilização. Já as embalagens inteligentes monitoram, indicam ou testam informação dos produtos ou as condições do ambiente que afetam a qualidade do produto, tempo de prateleira ou qualidade.

Na área farmacêutica, a libertação de substâncias através de nanofibras é baseada no princípio do aumento da taxa de dissolução das partículas com a área superficial do medicamento e seu portador. Mesmo que a libertação controlada de fármacos em forma de nanofibras permaneça ainda em estágio inicial, investigações são frequentemente operadas com o objetivo de otimizar a eficiência do processo (PORTELA, 2010). Face às propriedades funcionais manifestadas pela morfologia das nanofibras de polímero, as composições farmacêuticas podem ser concebidas para proporcionar a libertação ou dissolução de forma rápida ou mais lenta, sustentada ou pulsada. Uma vez que o medicamento e o material transportador podem ser misturados entre si, os modos de associação destes produtos nanoestruturados

podem ser: as substâncias são ligadas ou suspensas na superfície transportadora, as substâncias e o portador em forma de nanofibras são entrelaçados entre si, a fusão do medicamento e o material de transporte integrado num único tipo de fibras e o material de suporte é produzido em forma tubular na qual as substâncias são encapsuladas.

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que contém os princípios da engenharia e Ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos e também para a restauração, manutenção ou melhoria da função do tecido. Tecidos e órgãos-alvo incluindo pele, ossos, cartilagens, artérias, músculos, bem como coração, pulmão, fígado e tecido. A nanofibra é um material emergente, que desempenha um papel fundamental na engenharia de tecidos, servindo como matrizes para o crescimento celular, proliferação, diferenciação, e a formação de tecido novo, em três dimensões, devido à sua área de superfície elevada para razões de volume e de elevada porosidade das fibras. Uma característica inerente das nanofibras é que elas imitam as matrizes extracelulares (ECM) (isto é um composto complexo de fibroso de proteínas, tais como o colágeno e a fibronectina, e glicoproteínas) dos tecidos e órgãos. A técnica de *electrospinning* permite a preparação de nanofibras e nano-redes em dimensões que se assemelham às do citoesqueleto celular ou o diâmetro das fibras de colágeno dentro do ECM. Durante os últimos anos, o campo de aplicação tem grande potencial na engenharia de tecidos, enzimas imobilizadas, cicatrização de feridas, vasos sanguíneos artificiais, a entrega de medicamentos, e assim por diante (WANG et al. 2013).

Polímeros naturais (por exemplo, colágeno, alginato, proteína de seda, o ácido hialurônico, o fibrinogénio, são muitas vezes utilizados para a preparação de entrelaçamentos de nanofibras por causa de sua maior biocompatibilidade e bio-funcionalidade, bem como a sua mistura com polímeros sintéticos podem melhorar a citocompatibilidade global do entrelaçamento. O colágeno, por exemplo, é geralmente utilizado como um “andaime” para as células, uma vez que torna-as um componente importante da ECM (PHAM, SHARMA e MIKOS, 2006).

A gelatina é um polímero natural, que é derivada a partir do colágeno por controlada hidrólise, e é comumente usada para aplicações farmacêuticas e médicas por causa de sua biodegradabilidade e biocompatibilidade em ambientes fisiológicos (KUIJPERS et al. 2005).

## **CAPÍTULO III**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO  
PROTEICO DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*)**

### **3.1. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1.1 Processo tecnológico para obtenção de isolado proteico de bijupirá (IPB)**

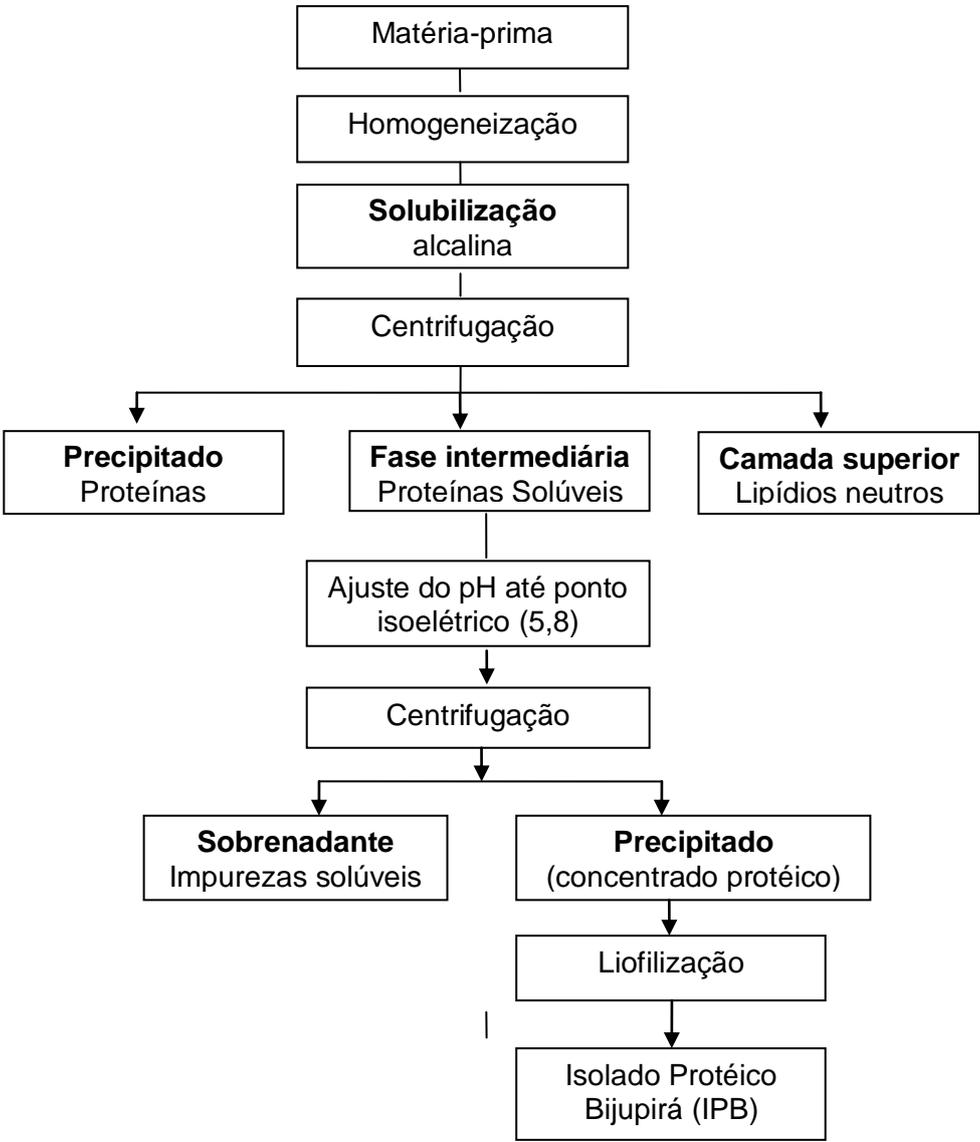
Para a obtenção do IPB foram feitas extrações química da proteína por mudança de pH (ou *pH shifting process*), aplicando solubilização alcalina.

O pescado foi limpo e eviscerado, logo após, foi processado em separador de carnes (High Tech, Santa Catarina, Brasil) e homogeneizado com água destilada na proporção de 1:9 (p/v) à temperatura constante de 4°C durante 60 s utilizando agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil). Após a etapa de homogeneização foi realizado o processo de solubilização alcalina, utilizando NaOH 1 M, onde o pH de solubilização total foi de 10,8 à temperatura de 4°C controlada por banho termostático (QUIMIS, modelo 214 D2, São Paulo, Brasil) durante 20 min sob agitação constante. Após essa etapa foi realizada centrifugação a 1524,96 x g por 20 min (HITACHI, High - Speed Refrigerated Centrifuge CR 22 GIII).

O precipitado foi descartado e o sobrenadante submetido à precipitação com HCl 1 M até atingir o pH 5,8 (ponto isoelétrico) à 4°C sob agitação durante 20 min. Logo após, foi realizada nova centrifugação a 15240,96 x g por 20 min.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido considerado o isolado proteico de bijupirá (IPB), este foi submetido à congelamento em ultrafreezer (Indrel, Paraná, Brasil) e posteriormente liofilizado (Liotop, L108, São Paulo).

**Figura 3** - Fluxograma do processo usando mudança de pH para obtenção de isolado proteico de bijupirá (adaptado de FREITAS, 2011).



**Figura 4** - Isolado Proteico de Bijupirá (IPB)



### **3.1.2 Caracterização do IPB**

#### **3.1.2.1 Composição Proximal**

A composição química do IPB foi realizada segundo metodologia oficial (AOAC 2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.1.2.2 Propriedades Funcionais**

##### **3.1.2.2.1 Solubilidade**

A solubilidade do isolado proteico de bijupirá foi determinada de acordo com o método adaptado de Chalamaiah et al. (2010) e Tadpitchayangkoon et al. (2010) com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Pesou-se 0,5g de amostra em um béquer de 50 mL, adicionou-se 2mL de cloreto de sódio 0,1M e 40 mL de água destilada. O pH foi ajustado com ácido clorídrico 1N e hidróxido de sódio 1N. A dispersão foi mantida sob agitação por 30min em agitador magnético (QUIMIS, modelo 261-2), em seguida centrifugou-se a dispersão a 8667xg por 20min em centrífuga de tubos (Biosystems, modelo: MPW-

350R). O teor de proteína solúvel no sobrenadante foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Lowry et al. (1951)

#### **3.1.2.2.2 Determinação de capacidade de retenção de água (CRA)**

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com o método utilizado por Regenstein et al., (1984). Dispersões proteicas de 1% (p/v) foram preparadas com variações de pH (3, 5, 7, 9, 11). À dispersão foi adicionado 2 mL de NaCl 0,1M para obtenção de uma pasta homogênea, em seguida foi adicionada solução tampão correspondente à variação de valor de pH até atingir volume de 40 mL. A dispersão foi mantida sob agitação por 15 minutos e logo após, centrifugada a 9000xg por 20 minutos. As proteínas solúveis presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), e descontadas do total de proteínas da amostra original.

#### **3.1.2.3 Determinação da massa molecular por eletroforese (SDS-PAGE)**

A determinação das frações de proteínas foi realizada por massa molecular. O IPB obtido foi caracterizado com base no perfil de proteína usando gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida eletroforese (SDS-PAGE), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

#### **3.1.2.4 Análise de Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros da amostra foram determinados utilizando o método qualitativo por espectroscopia no infravermelho conforme ASTM E 1252, os espectros foram registrados numa faixa de absorção de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , 32 scans e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  (Spectrum 1000 Perkin Elmer, Laboratório de Materiais Poliméricos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS).

### **3.1.2.5 Análises Térmicas**

#### **3.1.2.5.1 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial por Fluxo de Calor (DSC)**

A análise de DSC foi utilizada para determinar a temperatura de desnaturação das proteínas presentes no IPB, utilizando o método de determinação de Temperaturas de Transição e Entalpias de Fusão e Cristalização de Polímeros por Calorimetria diferencial de Varredura conforme ASTM D 3418. A temperatura no processo variou de 20 a 300°C com vazão de 10°C/min (DSC Q20-TA Instruments, Laboratório de Materiais Poliméricos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS).

#### **3.1.2.5.2 Análise Termogravimétrica (TGA)**

A degradação térmica e o grau de impureza do IPB, em atmosfera inerte, foram verificados utilizando o método TA 60 WS. A amostra de aproximadamente 5 mg foi aquecida de 25 a 500°C com aumento de 10°C/min, o gás de arraste foi nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>). Foram determinadas temperatura inicial de decomposição (T<sub>di</sub>), temperatura máxima de decomposição, perda de massa e massa residual do IPB (DTA-TG Apparatus Shimadzu, Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS).

### **3.1.3 Desenvolvimento das Nanofibras**

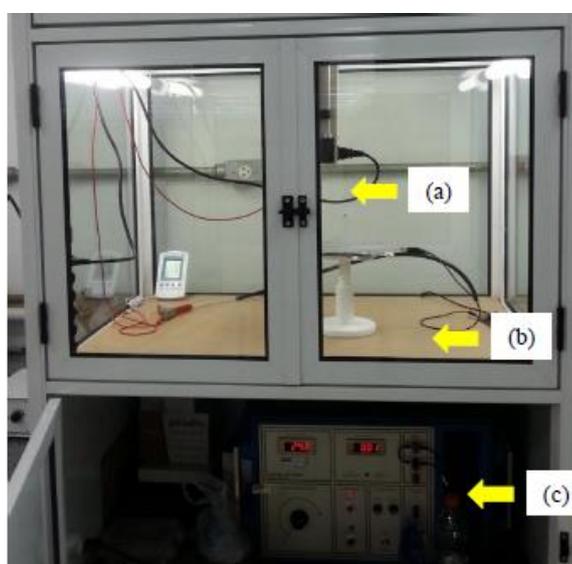
O desenvolvimento de nanofibras de IPB foi realizado pelo processo de *electrospinning*, (Eletric Test Sert, Modelo: ET 5000 CC, Brasil), equipado com energia de alta tensão (0 a 30 kV), como mostra a Figura 5. A solução preparada a partir de IPB foi introduzida em seringa plástica de 1 mL com capilar de aço inoxidável de 0,45 mm de diâmetro interno, estes foram dispostos na posição vertical, dirigidos ao coletor e controlados digitalmente. O capilar foi conectado ao eletrodo de polaridade positiva e o coletor (formado por uma placa de alumínio) conectado ao eletrodo de polaridade negativa da fonte de alimentação de alta tensão.

Devido à existência de atração eletrostática entre os eletrodos, o jato da solução polimérica se deposita no coletor na forma de fibras.

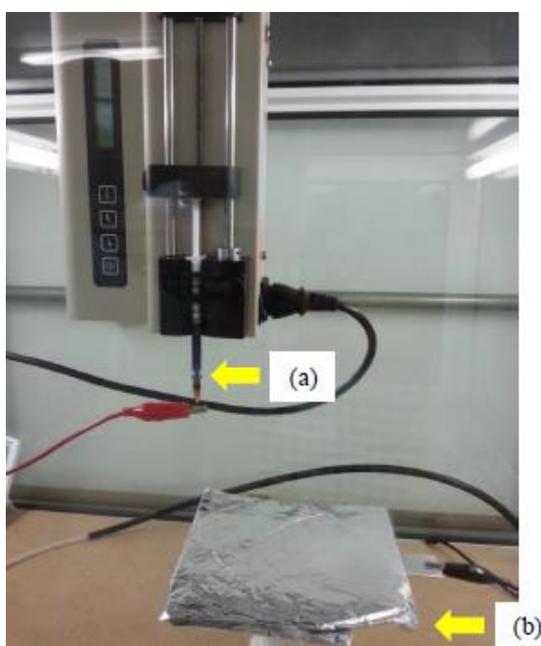
As condições ambientais do processo de *electrospinning* foram mantidas estáveis em 21°C e 60% de temperatura e umidade relativa, respectivamente.

Os parâmetros como, potencial elétrico, distância da ponta do coletor ao capilar e vazão da solução foram fixados em 16,7 kV, 15 cm, e 150  $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente, após estudos preliminares.

**Figura 5** - Equipamento de *electrospinning* com sistema de injeção (a), placa coletora (b) e fonte de alta voltagem (c).



**Figura 6** - Capilar (a) e coletor (b) do sistema de *electrospinning*.



## **CAPÍTULO IV**

### **DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

# **ARTIGO 1**

**EXTRAÇÃO ALCALINA DE PROTEÍNAS DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*):  
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, PROPRIEDADES FUNCIONAIS E  
TÉRMICAS DA PROTEÍNA RECUPERADA.**

## **EXTRAÇÃO ALCALINA DE PROTEÍNAS DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*): CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, PROPRIEDADES FUNCIONAIS E TÉRMICAS DA PROTEÍNA RECUPERADA.**

### **RESUMO**

O bijupirá (*Rachycentron canadum*) é uma importante espécie emergente na maricultura brasileira. Essa espécie apresenta rápido crescimento (podendo alcançar de 6 a 8 kg em um ano de cativeiro), boa resistência ao manejo e eficiente conversão alimentar, além da grande demanda de mercado. O objetivo do estudo foi obter e caracterizar um isolado proteico de carne mecanicamente separada (CMS) de bijupirá utilizando o processo de extração química por solubilização alcalina e precipitação isoelétrica. O rendimento do isolado proteico de bijupirá (IPB) foi de 98,17% de proteína e 0,42% de lipídios, em base seca. A maior solubilidade e a maior capacidade de retenção de água (CRA) do IPB foram obtidas em pH 11 e 21,9 mL de água por grama de proteína, respectivamente. Os perfis eletroforéticos revelaram massas moleculares características de proteínas miofibrilares (miosina e actina). Os principais picos identificados pelas análises de Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) são provenientes de ligações peptídicas (ligações amida), como Amida I e II. Os maiores pontos de fusão e de degradação do IPB foram de 259,1°C e 378°C, respectivamente, obtendo assim, um isolado proteico estável. O grau de pureza foi de aproximadamente 67% (p/p). Os resultados obtidos mostram que o IPB tem grande valor biotecnológico para diversas áreas industriais que requerem um produto com alto nível proteico.

**Palavras-chave:** Bijupirá- isolado proteico - Solubilização alcalina.

## 1 INTRODUÇÃO

O bijupirá (*Rachycentron canadum*) pertencente à família da Rachycentridae é uma espécie pelágica, migratória, encontrada em mares tropicais e sub-tropicais de todo o mundo, com exceção do Pacífico Oriental (Shaffer e Nakamura, 1998). No Atlântico Ocidental é encontrada do sul da Nova Scotia (Canadá) à Argentina. No Brasil se distribui por toda costa litorânea (do Amapá ao Rio Grande do Sul), sendo mais comum na região nordeste. Possui altas taxas de crescimento, alta eficiência de conversão alimentar, carne de boa qualidade e uma resistência geral em cativeiro. Os bijupirás são cultivados em toda a Ásia usando uma combinação de métodos de cultura de lagoa e gaiola (LIAO et al., 2004; SUN et al., 2006). Possui emergente potencial global para a aquicultura marinha, devido às vantagens de rápido crescimento e alto valor nutricional (HOLTA, FAULKA, & SCHWARZ, 2007).

Os isolados proteicos de pescado são obtidos através de solubilização química e precipitação isoelétrica da proteína, a partir de resíduos ou pescados inteiros, que podem ser utilizados como ingredientes funcionais, podendo ser aplicado em diversos alimentos. As proteínas do músculo de pescado podem ser isoladas por solubilização em valores de pH extremos. A precipitação da proteína se dá no ponto isoelétrico, o que rende uma suspensão heterogênea, com um teor de proteína próximo a 200g/L (BRENNER, et al. 2009).

Entretanto, não foram encontrados dados sobre a extração proteica de carne mecanicamente separada de bijupirá para a obtenção de um isolado proteico e suas características físico-químicas. Portanto, dentro desse contexto o objetivo deste trabalho foi obter um isolado proteico de bijupirá (IPB) e estudar suas características físico-químicas, estruturais e funcionais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a extração das proteínas foi utilizado o pescado bijupirá (*Rachycentron canadum*). Os espécimes, de aproximadamente 4 kg, foram fornecidos de criadouros NearShore de Angra dos Reis, litoral do Rio de Janeiro, Brasil. Os pescados foram transportados vivos até a Estação Marinha de Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande/RS.

## **2.1 Extração das proteínas de bijupirá**

A extração das proteínas de bijupirá foi realizada utilizando processo de solubilização alcalina e precipitação isoelétrica das proteínas (adaptado por FREITAS, 2011).

O pescado depois de abatido foi limpo e eviscerado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, logo após, processado em separador de carnes (High Tech, HT250 Santa Catarina, Brasil) para retirada de ossos e pele. Este primeiro processo gerou uma biomassa que foi homogeneizada com água destilada na proporção de 1:9 (p/v) em agitador do tipo eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil). Todo processo foi realizado à temperatura constante de 4°C durante 60 s. A solução resultante foi homogeneizada por 20 min com hidróxido de sódio (NaOH) 1M até atingir pH de 10,8, após, foi realizada centrifugação a 1524,96 x g por 20 min (HITACHI, High - Speed Refrigerated Centrifuge CR 22 GIII). O precipitado e o sobrenadante (lipídios neutros) resultantes da centrifugação foram descartados, enquanto as proteínas solúveis foram submetidas à precipitação com ácido clorídrico (HCl) 1M até atingir o pH isoelétrico (5,8) das proteínas, estudados anteriormente. Logo após, foi realizada nova centrifugação a 15240,96 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado congelado em ultrafreezer (Indrel, Paraná, Brasil) e posteriormente liofilizado (Liotop, L108, São Paulo).

## **2.2 Caracterização química do IPB**

A composição proximal química do IPB foi realizada segundo metodologia oficial (AOAC, 2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **2.2.1 Propriedades funcionais**

#### **2.2.1.1 Solubilidade**

A solubilidade do isolado proteico de bijupirá foi determinada de acordo com o método adaptado de Chalamaiah et al. (2010) e Tadpitchayangkoon et al. (2010) com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Pesou-se 0,5g de amostra em um béquer de 50 mL, adicionou-se 2mL de cloreto de sódio 0,1M e 40 mL de água destilada. O pH foi ajustado com ácido clorídrico 1N e hidróxido de sódio 1N. A dispersão foi mantida sob

agitação por 30min em agitador magnético (QUIMIS, modelo 261-2), em seguida centrifugou-se a dispersão a 8667xg por 20min em centrífuga de tubos (Biosystems, modelo: MPW-350R). O teor de proteína solúvel no sobrenadante foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Lowry et al. (1951).

#### **2.2.1.2 Capacidade de retenção de água (CRA)**

A CRA do isolado proteico de bijupirá foi determinada de acordo com o método de Regenstein et al. (1984), adaptado. Foram preparadas dispersões proteicas de 1% com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Adicionou-se à dispersão 2mL de cloreto de sódio 0,1M para obtenção de uma pasta homogênea, em seguida adicionou-se a solução tampão correspondente de acordo com o pH correspondente até volume de 40mL, a dispersão foi mantida sob agitação por 15 min e centrifugados a 8667xg por 20min. As proteínas solúveis no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), e descontadas do total de proteína da amostra original.

#### **2.2.2 Determinação da massa molecular através de eletroforese em gel (SDS-PAGE)**

A determinação das frações de proteínas foi realizada por peso molecular, utilizando uma mistura de proteínas padrão (BenchMarke Ladder Proteína, Califórnia, EUA), que variaram em massa molecular, de 10 a 220 kDa.

O IPB foi caracterizado com base no perfil de proteína, utilizando 10 % de gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida eletroforese (SDS-PAGE), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

#### **2.2.3 Análise de Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros da amostra foram determinados utilizando o método qualitativo por espectroscopia no infravermelho conforme metodologia ASTM E 1252, os espectros foram registrados numa faixa de absorção de 4000 – 500  $\text{cm}^{-1}$ , 32 scans e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  (Spectrum 1000 Perkin Elmer, no Laboratório de Materiais Poliméricos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS).

## **2.2.4 Análises Térmicas**

### **2.2.4.1 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial por fluxo de calor (DSC)**

A análise de DSC foi utilizada para determinar a temperatura de desnaturação das proteínas presentes no IPB, utilizando o método de determinação de Temperaturas de Transição e Entalpias de Fusão e Cristalização de Polímeros por Calorimetria Diferencial de Varredura conforme ASTM D 3418. A variação de temperatura no processo variou de 20°C a 300°C com uma vazão de 10°C/min (DSC Q20-TA Instruments, Laboratório de Materiais Poliméricos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS).

### **2.2.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)**

A degradação térmica e o grau de impureza do IPB, em atmosfera inerte, foram verificados por meio de análise termogravimétrica utilizando o método TA 60 WS. A amostra de aproximadamente 5 mg foi aquecida de 25 a 500°C com aumento de 10°C/min, tendo como gás de arraste nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>). Foram determinadas a temperatura inicial de decomposição (T<sub>di</sub>), a temperatura máxima de decomposição, a perda de massa e a massa residual do IPB (DTA-TG Apparatus Shimadzu, Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Composição química proximal do IPB**

Os resultados da composição química proximal do bijupirá e do IPB obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios para a composição química proximal da carne mecanicamente separada de bijupirá (CMSB) e isolado proteico de bijupirá (IPB).

<b>Componente</b>	<b>CMS (%)*</b>	<b>CMS (%)**</b>	<b>IPB (%)*</b>	<b>IPB (%)**</b>
Proteínas	16,8 ± 0,80	59,4 ± 0,80	86,60 ± 2,40	98,17 ± 2,40
Lipídios	25,5 ± 0,04	40,5 ± 0,04	0,40 ± 0,03	0,42 ± 0,03
Cinzas	0,9 ± 0,10	2,7 ± 0,10	0,80 ± 0,10	0,85 ± 0,10
Umidade	66,7 ± 1,20	N.D	12,20 ± 0,10	N.D

%; (p/p); \*base úmida; \*\*base seca, N.D: Não detectado

Observando a Tabela 1, se percebe que o IPB apresentou rendimento de 98% (p/p) de proteína em base seca. Os resultados da composição química proximal do IPB mostram que o método de extração alcalina promoveu uma redução também no conteúdo lipídico (98%).

Segundo, Kristinsson (2005) a redução dos lipídios acontece porque esses componentes são separados na centrifugação, associados com a temperatura de solubilização de 4°C o que contribui para a separação da gordura durante a centrifugação. A diminuição do conteúdo lipídico no IPB pode contribuir significativamente na redução da oxidação lipídica, aumentando a estabilidade do produto (MARTIN, 1997).

Marquez, Mira e Neves (2004), demonstraram que uma alta concentração de cinzas possa ser derivada do acúmulo de NaCl (cloreto de sódio) utilizado no processo de extração das proteínas. Segundo, Kristinsson e Rasco (2000), o conteúdo de cinzas normalmente é superior a 3% nos isolados proteicos, no entanto, isso não foi observado no isolado proteico estudado (0,85%).

### **3.2 Propriedades Funcionais**

#### **3.2.1. Solubilidade e Capacidade de retenção de água (CRA)**

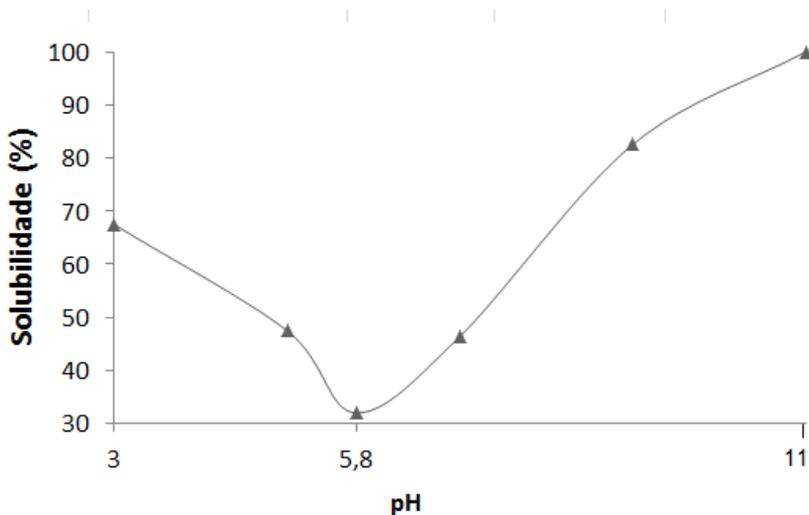
O gráfico abaixo mostra que a solubilidade diminuiu em valores de pH 5,0 e 7,0, provavelmente as proteínas apresentaram interações hidrofóbicas, promovendo assim ligações proteína-proteína, resultando na diminuição da solubilidade, enquanto

o aumento da solubilidade das proteínas foi observado em valores de pH 3,0, 9,0 e 11,0, pois as interações iônicas promoveram ligações proteína-água.

Segundo, Damodaran (2010) a solubilidade das proteínas é uma manifestação termodinâmica do equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente. As principais interações que influenciam a solubilidade das proteínas são de natureza hidrofóbica e iônica. A baixa solubilidade observada próximo ao pH isoeletrico (5,8) do IPB deve-se, principalmente, à falta de repulsão eletrostática, ocasionando a agregação e a precipitação por meio de interações hidrofóbicas das proteínas. Nos valores de pH 9,0 e 11,0 se observou maior solubilidade das proteínas (82,57% e 100%, respectivamente), isto acontece devido à estes valores de pH estarem afastados do ponto isoeletrico da proteína (pH 5,8), ocorrendo o efeito da variação do balanço iônico das proteínas em função do pH (MEINKE et al.1972). No entanto, vale ressaltar que a liofilização também, teve papel decisivo, pois a desnaturação pelo calor muda o perfil da solubilidade em função do pH das proteínas.

Os valores de solubilidade estão apresentados na Figura 1.

**Figura 1- 1** -Curva de solubilidade do IPB



Com relação aos valores de CRA do IPB foram observados maiores retenções de água pelas proteínas em valores de pH extremos (3,0 e 11,0), com 21,9 e 19,1 mL.g<sup>-1</sup>, respectivamente. No presente estudo, o fator pH, teve influência na capacidade das proteínas se ligarem às moléculas de água, pois os valores de pH 3,0

e 11,0 estão afastados do pH isoelétrico do IPB onde há predominância de cargas de mesmo sinal provocando repulsão e afastamento entre as moléculas, deixando maior espaço para ser preenchido pelas moléculas de água, conseqüentemente aumentando a CRA.

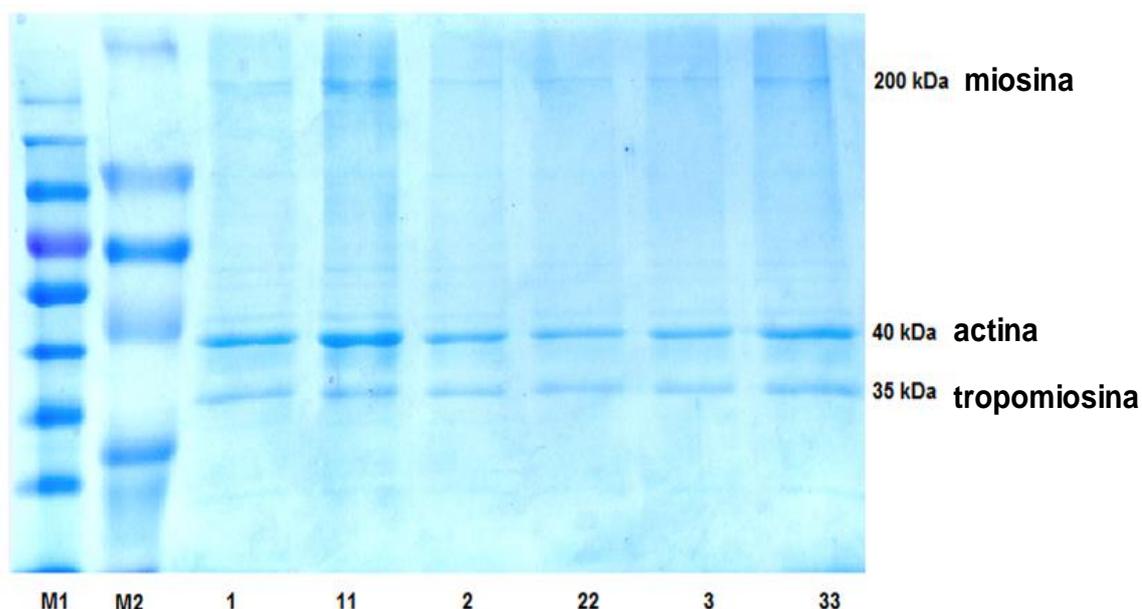
Este fenômeno acontece porque em valores de pH abaixo de 5,0 e acima de 7,0, as moléculas de água se combinam com os grupos polares das proteínas e a CRA tende a aumentar. Um fenômeno contrário acontece nos valores próximos do pH isoelétrico (pH 5,0 e 7,0), as proteínas são menos hidratadas, pois há aumento das interações proteína-proteína resultando em interação mínima com as moléculas de água (PACHECO e SGARBIERI, 2005).

### **3.2.2 Determinação da massa molecular do IPB através de eletroforese em gel (SDS-PAGE)**

No pescado, 66 a 77 % do total de proteínas do músculo são miofibrilares e 20 a 25 % são proteínas sarcoplasmáticas. As proteínas miofibrilares possuem importância principalmente pelas suas propriedades funcionais, representadas principalmente pela miosina e actina (GUND et al., 2005).

A Figura 2 mostra as bandas e suas respectivas massas moleculares das amostras de IPB. As amostras com concentração 1mg/mL (1, 2 e 3) e as amostras 11, 22 e 33 com diluições de  $2 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/mL, respectivamente, foram misturadas com 5 $\mu$ L de tampão e corridas em gel, contendo SDS (10 mL/100 mL). Os marcadores utilizados foram Page Ruler Prestained Protein Ladder (M1) e Color Burst (M2).

**Figura 1- 2** -Separação por eletroforese com marcadores de padrão de proteína (M1) e (M2). Amostras (1), (2) e (3) de 1mg/mL de IPB, e amostras (11)  $2 \cdot 10^{-2}$  mg/mL de IPB, (22)  $1 \cdot 10^{-2}$  mg/mL de IPB e (33)  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/mL de IPB.



As bandas identificadas são características de proteínas miofibrilares do tipo miosina (200 kDa), actina (35kDa) e  $\beta$ -tropomiosina (40 kDa), comprovando a remoção das proteínas sarcoplasmáticas durante o método de isolamento .

A banda proteica de massa molecular 200 kDa observada no presente estudo é a principal proteína miofibrilar presente no músculo de pescado. Essa proteína é constituída por dois polipeptídeos, um de cadeia pesada de 200 kDa e outro de cadeia leve (40 kDa) (Kristinsson, 2001). Li et al. (2014), observaram massas moleculares semelhantes de miosina, actina e tropomiosina em músculo de corvina (*Pseudosciaena crocea*).

Zavarese (2012) trabalhando com isolado proteico de corvina identificou proteínas de peso molecular, próximo a 220 kDa (miosina), e algumas bandas entre 20 e 50 kDa, representando as frações proteicas  $\beta$ -Tropomiosina e Troponina. Tongnuanchan et al. (2011) relataram que as cadeias de miosina e troponina de alto peso molecular são as proteínas dominantes no perfil eletroforético de músculo de Tilápia do Nilo. ,

Segundo Pires, (2008) essas proteínas têm importante aplicação na indústria alimentícia, pois são responsáveis na formação de géis, os quais conferem estrutura e estabilidade a diversos alimentos.

As proteínas miofibrilares são responsáveis pelas propriedades de gelificação, de retenção de água e de emulsificação. As proteínas sarcoplasmáticas possuem

como uma das principais características a capacidade de adesão às proteínas miofibrilares, impedindo a formação de gel de alta elasticidade, baixa viscosidade, baixa capacidade de retenção de água e baixa capacidade de absorção de sabores e corantes. Artharn et al. (2008) estudaram o efeito da proporção de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas sobre as propriedades de filmes elaborados com proteínas de músculo de cavalinha e relataram que o aumento no teor das proteínas sarcoplasmáticas reduziu a resistência à tração e aumentou a permeabilidade ao vapor de água.

### 3.2.3 Análise de Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR estão mostrados na Figura 3. Os principais picos de absorção mostram que as variações na estrutura da amostra de IPB são diferenciadas pela localização do pico de absorção na banda do comprimento de onda característico e pela intensidade da absorção da energia.

**Figura 1- 3** -Análise de Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) do Isolado Proteico de Bijupirá (IPB)

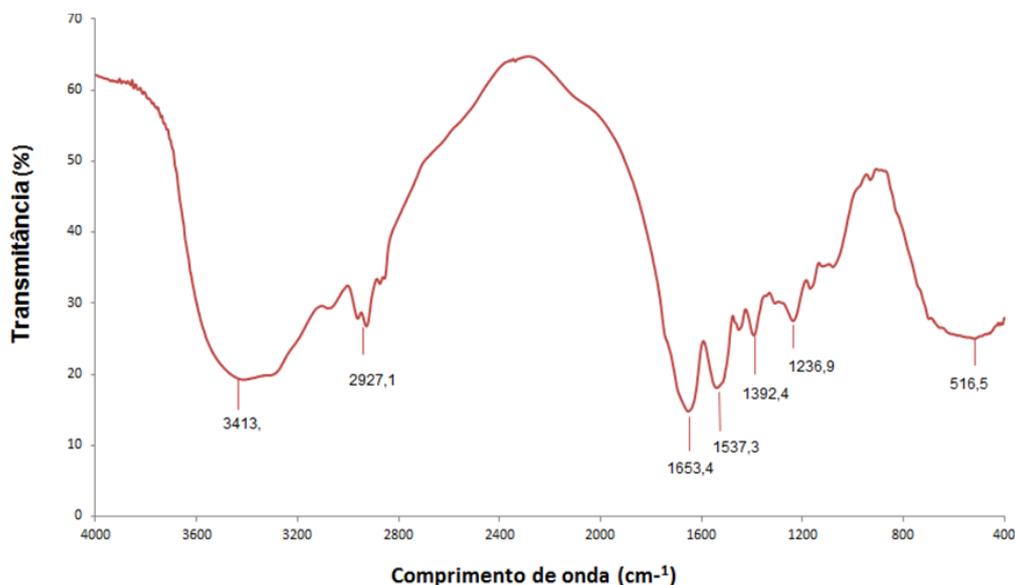


Tabela 2 - Dados do espectro de FTIR do IPB.

<b>Tipo de Estiramento</b>	<b>Comprimento de Onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Transmitância (%)</b>
N-H e O-H	3413,2	19,26
C - H	2927,1	26,77
C=O	1653,4	14,809
NH <sub>3</sub>	1537,3	18,115
C-H	1392,4	25,513
C-H	1236,9	27,570
N-H e C-N	516,5	25,016

Os picos principais apresentaram absorções de grupo amina (NH<sub>2</sub>) e hidroxilas OH nos comprimentos de onda entre 3600 a 3100 cm<sup>-1</sup>, provenientes de ligações peptídicas que parecem sobrepor grupos carboxilas de aminoácidos, além de outras não totalmente identificadas. Pois, no comprimento de onda 3413,2 cm<sup>-1</sup>, observa-se estiramentos axiais O-H e N-H presentes em proteínas, como citado por Araújo (2001), que em 3413,2 cm<sup>-1</sup> podem ser identificadas a primeira harmônica de estiramentos C=O. O pico na região de 2927,1 cm<sup>-1</sup> é relativo à deformação axial C-H de grupos alifáticos (CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>) que podem ser de Amida B (Oujifard, 2013). As bandas 1653,4 cm<sup>-1</sup> compreendem as vibrações de estiramentos C=O, característico de Amida I (Böcker et al., 2007 e Oujifard et al., 2013), com estruturas do tipo α-helicoidal, indicando estruturas compactas (Ju e Kilara, 1998), que foram semelhantes aos relatados anteriormente por Bertram, Kohler, Böcker, Ofstad e Andersen (2006), enquanto o comprimento de onda de 1537,3 cm<sup>-1</sup> é característico de Amida II com deformação angular de grupos NH<sub>3</sub> (Ramos, 2013). As regiões entre 1392,4 cm<sup>-1</sup> e 1236,9 cm<sup>-1</sup> indicam deformação angular simétrica e vibrações de ligações C-H, com estiramento simétrico sem alteração no momento de dipolo da molécula características de Amida III. Nagarajan et al., (2012) obtiveram Amida I, II, III nos comprimentos de onda 1632 cm<sup>-1</sup>, 1541 cm<sup>-1</sup> e 1236 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, concordando com os espectros encontrados no nosso trabalho.

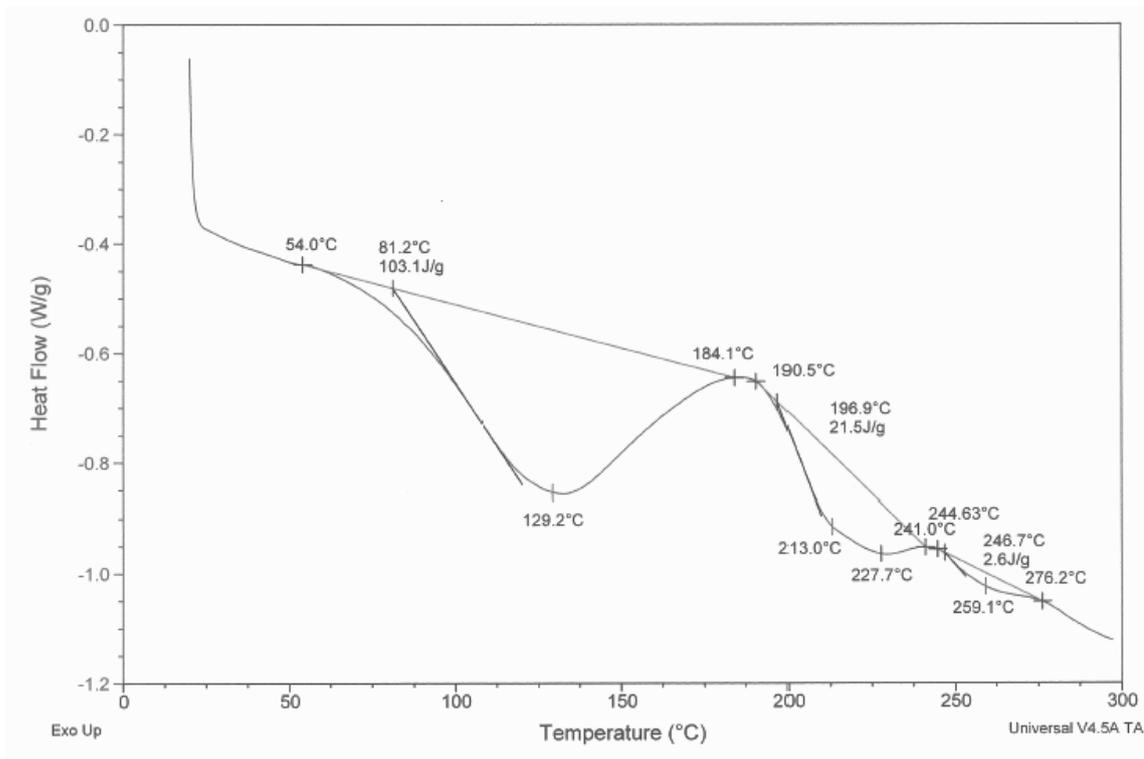
Ahmad e Benjakul (2011) e Muyonga et al., (2004) encontraram espectros semelhantes em isolados proteicos de peixes na gama de 1800 e 600 cm<sup>-1</sup>, característicos de amida I, II e III. Com relação ao pico de absorção de 516,5 cm<sup>-1</sup>,

observa-se deformação angular de N-H e C-N, concordando com os espectros encontrados por Silverstein et al. (2005).

### 3.2.4 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 4 mostra a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e os eventos endotérmicos que estão relacionados com processos de ruptura de ligações, fusão, depolimerização e volatilização do polímero. Através da Figura 4 é possível perceber que a passagem do estado vítreo para o estado amorfo inicia-se a temperatura de 81,2°C, portanto, um processo acompanhado de variação de capacidade calorífica da amostra.

**Figura 1- 4** - Determinação de temperaturas de transição e entalpias de fusão do isolado proteico de bijupirá (IPB) por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).



Os eventos endotérmicos em 129,2, 227,7 e 259,1°C são processos de fusão, característicos de polímeros semicristalinos. Devido à distribuição de tamanho das regiões cristalinas presentes em macromoléculas, como as proteínas, a fusão de um polímero semicristalino ocorre sempre em uma faixa de temperatura e não em um ponto propriamente dito. Os cristais menores fundem primeiro, logo após, a

temperatura, na qual desaparece totalmente a cristalinidade (fusão do último cristal) é considerado o ponto de fusão do polímero (259,1°C) e corresponde ao máximo pico de fusão na curva de DSC.

Os resultados do IPB mostram temperaturas de transição mais altas quando comparadas com proteínas de espécies estudadas por Monterrey-Quintero et al. (2000) e Dergez et al. (2006) que encontraram temperaturas de transição das frações proteicas em 55,6, 71,1, 53,3 e 57,8 e 65°C, respectivamente.

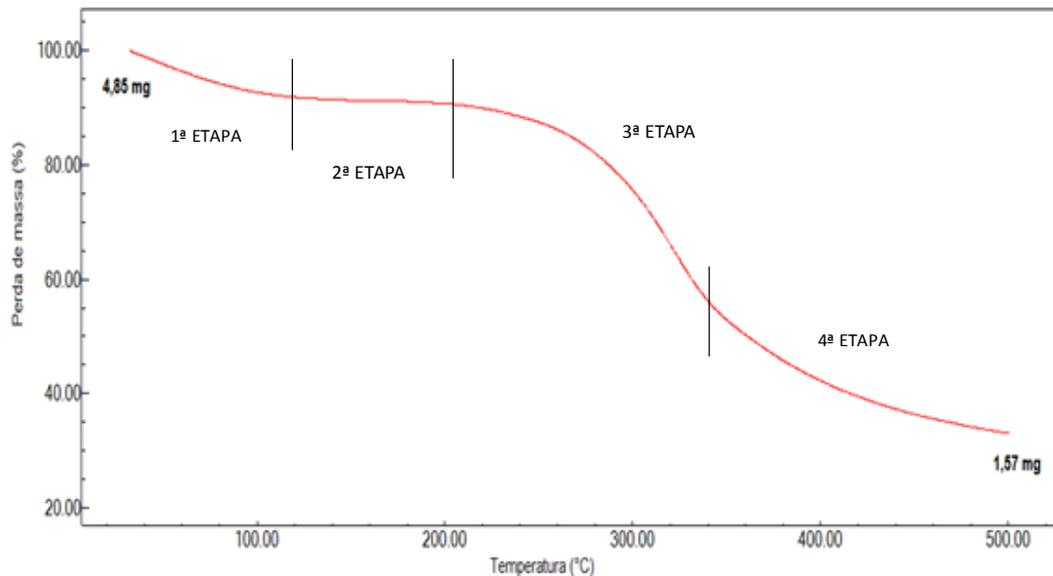
Park e Lanier (1989), estudando uma espécie de tilápia (*Oreochromis aureus*), determinaram que a miosina desnatura a 58,3°C e a actina a 78,6°C, demonstrando a maior estabilidade térmica das proteínas presentes no IPB.

Esses fenômenos citados ainda são difíceis de serem explicados, mas devem ser consequências da destruição de certas interações entre as miofibrilas, que tornavam essas proteínas mais estáveis termicamente. No entanto, com as análises de DSC foi possível determinar o grau de cristalinidade da amostra (88,43%), sugerindo um composto do tipo semicristalino e de maior resistência térmica.

### **3.2.5 Análise Termogravimétrica- TGA**

O comportamento térmico do IPB está apresentado na Figura 5, onde o termograma mostra as temperaturas inicial e final de degradação térmica ( $T_d$ ) e a variação de perda de massa ( $\Delta_w$ ) do IPB. Sendo observadas 4 etapas no processo de degradação.

**Figura 1- 5** -Análise termogravimétrica do isolado proteico de bijupirá (IPB).



A primeira fase de perda de massa ( $\Delta_{w1}=8,55\%$ ) foi observada sobre a temperatura ( $T_{d1}$ ) variando de 43,64 a 95,58°C até aproximadamente 204°C, possivelmente associada com a perda de água livre. A segunda etapa de perda de massa ( $\Delta_{w2}=1,38\%$ ) ocorreu a  $T_{d2}$  (204-220°C), provavelmente devido à degradação ou decomposição das frações proteicas de menor peso molecular. Na terceira fase a perda de massa ( $\Delta_{w3}=32,70\%$ ) ocorreu a  $T_{d3}$  (285,32–330,04°C). Este evento ocorreu possivelmente devido à decomposição de maiores frações proteicas. A última fase de perda de massa ( $\Delta_{w4}=23,57\%$ ) aconteceu a  $T_{d4}$  (333,69-377,97°C).

Diante das informações do termograma pôde-se observar uma alta resistência térmica do IPB (~300°C) e um grau de impurezas de 32,37 %.

#### 4 CONCLUSÃO

A recuperação proteica foi realizada com sucesso por solubilização alcalina e sua posterior liofilização levou a obtenção de proteínas recuperadas de bijupirá com elevada concentração proteica (98% p/p), basicamente miosina e actina e redução de lipídios.

As características estudadas do IPB obtido mostraram que se trata de um produto proteico estável termicamente (259°C) e com elevada funcionalidade que pode ser utilizado como matéria-prima na produção de géis e emulsões de elevada qualidade.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e ao Projeto Bijupiráplus pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, M., & BENJAKUL, S., Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. **Food Hydrocolloids**, 25, 381 e 388, 2011

ARAÚJO, S., KAWANO, Y. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 11, nº 4, p. 213-221, 2001.

ARTHARN, A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. The effect of myofibrillar/sarcoplasmic protein ratios on the properties of round scad muscle protein based film. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 215-222, 2008.

ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of materials. **American Society for Testing and Materials**, E 96-95, 1995.

BERTRAM, H. C., KOHLER, A., BÖCKER, U., OFSTAD, R., & ANDERSEN, H. J. Heatinduced changes in myofibrillar protein structures and myowater of two pork qualities. A combined FT-IR spectroscopy and low-field NMR relaxometry study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(5), 1740 e 1746, 2006.

BÖCKER, U., OFSTAD, R., WU Z., BERTRAM, H.C., SOCKALINGUM, G. D., MANFAIT, M. Revealing Coriance strutures in Fourier transform infrared and raman microspectroscopy spectra: a study on pork muscle fiber tissue subject to different processing parameters. **Applies Spectroscopy**, 61 (10), 1032 – 1039, 2007.

BRENNER, T.; NICOLI, T.; JOHANNSSON, R.; Rheolgt of thermo-reversible fish protein isolate gels. **Food Research International**, v.42, p.915-924, 2009.

CAO, M.J., JIANG, X. J., ZHONG, H. C., ZHANG, Z. J., SU, W. J. Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carasius auratus*). **Food Chemistry**, 94, 7–13, 2006.

CHALAMIAH, M.; RAO, G. N.; RAO, D. G.; JYOTHIRMAYI, T. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, v. 120, p.652-657, 2010.

DAMODARAN, S., PARKIN, L. K., FENNEMA, R. O., **Química dos alimentos**, 4. Ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.

FOOD INGREDIENTS BRASIL, nº 9, 2009.< [www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com) >

\*FREITAS, I. R. Recuperação das proteínas provenientes de pescado utilizando o processo de variação de pH. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, 2011.

GUND, J. Avaliação Sensorial do comportamento da proteína do soro de leite bovino, como emulsificante em embutido de pescado. In: 3º Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos- Simpocal. Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

HULTIN, H. O.; KELLEHER, S. D. Process for Isolating a Protein Composition from a Muscle Source and Protein Composition. **Rockport, MA: Advanced Protein Technologies**, 1999.

JU, Z. Y., & KILARA, A. Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46(5), 1830 e 1835, 1998.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Hydrolyzates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

\* KRISTINSSON, H. G. Conformational and functional changes of hemoglobin and myosin induced by pH: functional role in fish quality. **Ph.D. Thesis. University of Massachusetts**, Amherst, MA, USA., 2001.

KRISTINSSON, H. G. et al. A Comparative Study between Acid and Alkali-aided Processing for the Recovery of Proteins from Channel Catfish Muscle. **Journal of Food Biomolecular**, 2005.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227. 680-685, 1970.

Li, T., Li, J., Hu, W., Chen, J., Li, H.. Protein changes in post mortem large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) monitored by SDS-PAGE and proteome analysis. **Food Control**, 41. 49-55. 2014.

MARQUEZ, U. M. L.; MIRA N. V. M.; NEVES R. A. M. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 101, 2004.

MUYONGA, J. H., COLE, C. G. B., & DUODU, K. G.. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, 85, 81-89, 2004.

NAGARAJAN, M., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T., & SONGTIPYA, H. K. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperature. **Food Hydrocolloids**, 29, 389-397, 2012.

NOLSOE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. **Food Bioprocess Technology**, 2, 621-627, 2009.

OUJIFARD. A., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T., SEYFABADI, J., Properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein based film as affected by cryoprotectants. **Food Hydrocolloids**, 32, 245-251, 2013.

PACHECO, M. T. B., SGARBIERI. V. C. **Ciênc. Tecnol. Alimentos. Campinas**, 25(2): 333-338, abr.- jun., 2005.

PIRES, C. M. F. Recuperação, caracterização e aplicações de proteínas recuperadas de subprodutos e espécies subaproveitadas. Dissertação para provas de acesso à categoria de investigador auxiliar – Unidade de valorização dos produtos da pesca e da aquicultura. Instituto de investigação das pescas e do mar, Lisboa, 2008.

RAMOS, Ó., L, REINAS, I, SILVA, S.I., FERNANDES J.C., CERQUEIRA M.A., PEREIRA R.N., VICENTE, A. A., POÇAS M. F., PINTADO M. E., MALCATA, F. X. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, 30, 110-12, 2013.

REGENSTEIN, J. M.; JAUREGUI, C. A.; BAKER, R. The effect of pH, polyphosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscle. **Journal of food Biochemistry**. 8, 123-131, 1984.

SILVERSTEIN, M. R., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. Spectrometric Identification of **Organic Compounds**, 7th ed., Chap. 2, New York: Wiley, 2005.

THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruads*). **Food Chemistry**, 103, 1385-1394, 2007.

TADPITCHAYANGKOON, P.; PARK, J. W.; YONGSAWATDIGUL, J.; Conformational changes and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs. **Food Chemistry**, v. 121, p.1046-1052, 2010.

TONGNUANCHAN, P., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T., & SONGTIPYA, P. Characteristics of film based on protein isolate from red tilapia muscle with negligible yellow discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, 48, 758 e 767, 2011.

## **ARTIGO 2**

**NANOFIBRAS DE ISOLADO PROTEICO DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*): DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO**

## **NANOFIBRAS DE ISOLADO PROTEICO DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*): DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO**

### **RESUMO**

Nanofibras de isolado proteico de bijupirá (IPB) foram desenvolvidas utilizando a técnica de *electrospinnig*. O IPB foi obtido através de extração por solubilização alcalina da proteína. Para o desenvolvimento foram preparadas soluções poliméricas em diferentes concentrações de IPB (p/v) (1, 2, 3, 4, 5 e 6%). O biopolímero comercial PEO foi adicionado à todas as amostras para proporcionar melhor viscosidade. As nanofibras desenvolvidas foram analisadas em relação à morfologia, estruturas moleculares e propriedades térmicas. A morfologia das nanofibras obtidas variou de  $476 \pm 107$  nm e  $205 \pm 82$  nm. Os espectros mostraram que as nanofibras de IPB/PEO mantiveram os grupos funcionais das proteínas (amina e amida), assim como a temperatura de fusão ( $73,29^{\circ}\text{C}$ ) foi muito próxima da temperatura de fusão do biopolímero comercial controle, PEO ( $73,19^{\circ}\text{C}$ ), no entanto apresentaram menor entalpia de fusão e perda de massa total quando comparadas com as nanofibras controle. O processo foi desenvolvido com sucesso o na elaboração de nanofibras de soluções aquosas de proteínas.

## 1.Introdução

A nanotecnologia vem ganhando espaço nas áreas de engenharia de materiais, de alimentos e medicina, visto que, busca-se a obtenção de materiais biodegradáveis, biofuncionais e biocompatíveis. Materiais nanoestruturados podem melhorar o desempenho e a capacidade de inúmeros produtos que vêm ganhando espaço em nossa vida diária.

As nanofibras têm atraído à atenção nos últimos anos, por causa de sua forma original, propriedades funcionais e potenciais aplicações em muitas áreas diferentes.

A pesquisa e o desenvolvimento de nanofibras a partir de biopolímeros têm ganhado proeminência nos últimos anos devido à versatilidade em suas aplicações nas mais diversas áreas (AGARWAL et al. 2001).

A produção de nanofibras pode ser realizada utilizando combinações de polímeros, comumente chamadas de blendas poliméricas, estas podem ser formadas pela junção de proteínas naturais e biopolímeros sintéticos. Fibras de proteínas em escala nanométrica têm sido utilizadas em processos biológicos, servindo de suporte para o crescimento celular, devido a sua capacidade de imitar a matriz celular (EMC), visando a estabilização, proteção, elasticidade e a motilidade das células.

As nanofibras produzidas por *electrospinnig* possuem propriedades únicas, tais como grande relação área superfície por volume, alta porosidade e estrutura microporosa, conferindo a estas estruturas características excelentes para uso de entrelaçamento em engenharia de tecidos, bioengenharia, engenharia de alimentos, biotecnologia ambiental, bioenergia, engenharia eletrônica e de segurança (RAMAKRISHNA et al. 2006).

As proteínas como actina e miosina estão presentes em proteínas musculares de peixe (GRAFAHREND et al. 2010). Por outro lado, proteínas ricas em músculo escuro de peixe têm seu uso limitado devido a alta probabilidade à oxidação e de *off - flavor*. Os peixes com esta característica são em sua maioria transformados em produtos de baixo valor no mercado. Portanto, uma alternativa para o desenvolvimento desses biocompostos seria a utilização de biopolímeros oriundos de fonte proteica, como o músculo de peixe escuro, visando a conversão destes materiais ricos em proteínas em produtos de alto valor biológico (HSU, 2010).

Assim, aliando as propriedades estruturais e funcionais das proteínas, e sua biocompatibilidade a vários biopolímeros orgânicos sintéticos, aprovados pelo Food

and Drug Administration (FDA), pode-se desenvolver biomateriais feitos à base de proteínas fibrosas formando principalmente um papel estrutural e/ou mecânico. Estas propriedades podem ser exploradas aplicando nanotecnologia (PAIVA et al. 2006).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar as propriedades das proteínas miofibrilares do pescado de bijupirá e desenvolver nanofibras de proteínas.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material**

Os pescados de bijupirá (*Rachycentron canadum*) utilizados para obtenção do isolado proteico foram obtidos da Estação Marinha de Aquacultura, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande/RS. O isolado proteico de bijupirá (IPB) foi obtido através da extração proteica do pescado de bijupirá por solubilização alcalina e precipitação isoelétrica.

### **2.2 Preparação das soluções poliméricas**

As soluções poliméricas foram preparadas em diferentes concentrações de IPB (2, 3, 4, 5 e 6% (p/v)), em todas as amostras foi adicionado 1% (p/v) do biopolímero de óxido de polietileno (PEO) de massa molecular de  $900.000 \text{ g.mol}^{-1}$  para proporcionar maior viscosidade à solução. O solvente orgânico utilizado foi o ácido fórmico 85% (v/v).

As amostras foram homogeneizadas sob agitação constante de 12h e temperatura ambiente de 25°C.

#### **2.2.1 Análise de Condutividade**

A condutividade das soluções foi medida por condutivímetro digital (MCA – 150 TECNOPON).

## **2.2.2 Análise de Viscosidade**

A viscosidade das amostras foram medidas utilizando um reômetro (RVDV – II ULTRA Rheometer Brookfield). Todas as amostras foram analisadas à temperatura constante de 25°C, utilizando taxa de cisalhamento de 10 velocidades.

## **2.3 Processo de *electrospinnig***

Para o desenvolvimento das nanofibras foi utilizado um ES - Eletric Test Serta (Modelo: ET 5000 CC, Brasil), equipado com energia de alta tensão variável de 0 a 30 kV.

A solução polimérica foi introduzida em uma seringa plástica de 1 mL com capilar de aço inoxidável de 0,45 mm de diâmetro interno, dispostos na posição vertical e controladas digitalmente até o coletor. O capilar foi conectado ao eletrodo de polaridade positiva da fonte de alimentação de alta tensão (DE MORAIS et al, 2010). Devido a forças eletrostáticas, o jato da solução polimérica, carregada positivamente, se depositou no coletor (formado por uma placa de alumínio) na forma de fibras.

As condições ambientais do *electrospinning* foram mantidas estáveis em 24°C e 60% de temperatura e umidade relativa, respectivamente. Os parâmetros do *electrospinning* como: potencial elétrico, distância da ponta do coletor ao capilar e a taxa de fluxo da solução foram fixados em 16,7 kV, 15 cm, e 150  $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente.

## **2.4 Caracterização das nanofibras**

### **2.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR**

Os espectros das nanofibras desenvolvidas foram determinados por Transformada de Fourier com Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) ver modelo LACOM

### **2.4.4 Análise Calorimétrica Exploratória Diferencial–DSC**

A análise de DSC foi utilizada para determinar a temperatura de desnaturação das nanofibras, para tanto, foi empregado um DSC Q20-TA Instruments. A determinação

das temperaturas de transição e das entalpias de fusão e cristalização, com variação de temperatura de 20 a 300°C, foi realizada conforme o método ASTM D 3418 (Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS).

#### **2.4.5 Análise Termogravimétrica–TGA**

Para medir as propriedades térmicas das nanofibras, a estabilidade térmica foi analisada em analisador termogravimétrico (TGA) (DTG-60H, Shimadzu), Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS.

Os ensaios foram realizados no intervalo de temperatura de 30-550°C a uma velocidade constante de aumento de temperatura de 10°C min<sup>-1</sup> com um fluxo contínuo de gás nitrogênio. A perda de massa, seguindo-se a decomposição foi medida durante o intervalo de aquecimento. As taxas de perda foram determinadas para comparar a massa inicial com a perda de massa.

#### **2.4.6 Caracterização Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As nanofibras formadas foram analisadas quanto a sua morfologia e tamanho por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura–MEV– (JSM – 6610LV – Scanning Electron Microscope). As análises de MEV foram realizadas no Centro de Microscopia CEMESUL da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS.

O preparo das amostras foi feito a vácuo com pulverização de ouro (Denton Vacum Deskv). Todas as amostras analisadas no MEV foram realizadas com uma tensão de aceleração de 20 kV. Os diâmetros das fibras foram medidos por meio Adobe Software Photoshop 7.0 a partir das micrografias em seu formato original. Pelo menos, 40 estruturas de cada amostra, foram consideradas para se obter o diâmetro médio.

### 3. Resultados e Discussão

Para a preparação das soluções poliméricas foi utilizado isolado proteico de bijupirá (*Rachycentron canadum*) liofilizado com teor de proteína de 98% (p/p). Para o desenvolvimento das nanofibras a partir da técnica de *electrospinning*, foram preparadas soluções com diferentes concentrações de IPB, onde foram determinadas a condutividade elétrica e viscosidade.

A proteína é um composto com forte polaridade. Existem solventes orgânicos com alta polaridade disponíveis para a dissolução destes tipos de compostos. Solventes orgânicos são uma alternativa para desempenhar esse papel chave no sucesso do desenvolvimento de nanofibras por *electrospinnig* de biopolímeros como as proteínas.

Em nosso estudo, o ácido fórmico 85% (v/v) foi eficaz para a solubilização do IPB, pois proporcionou a capacidade de dissolver e formar nanofibras. É conhecido que ácidos, como ácido fórmico e ácido acético são bons solventes para proteínas como miosina e actina. Segundo Wang et al. (2013), o ácido fórmico foi considerado um bom solvente pra a fabricação de nano-redes.

Wongsasulak et al. (2007, 2010), estudaram o ácido fórmico como solvente orgânico para solubilizar polímeros à base de polipeptídios. Segundo Van der Leeden et al. (2000), o ácido fórmico tem a capacidade de provocar um “inchaço” na estrutura globular das proteínas, favorecendo sua dispersão no meio líquido. As amins e os grupos funcionais carboxílicos presentes no IPB estudado podem ter sofrido uma ionização pelo ácido fórmico.

Às soluções poliméricas foi adicionado o PEO com o intuito de proporcionar maior viscosidade à solução, já que a viscosidade é um parâmetro chave no *electrospinning*, pois está relacionada com a extensão do emaranhamento das moléculas na cadeia do polímero no interior da solução (RAMAKRISHNA et al, 2005). Alguns compostos não têm capacidade suficiente para formar fibras, nesse caso recorre-se a outros polímeros sintéticos que são adicionados para melhorar essa capacidade.

Segundo Agarwal et al (2009), esta combinação entre as propriedades estruturais de polímeros sintéticos e as biofuncionalidades dos polímeros naturais são convenientes para o desenvolvimento de nanofibras por *electrospinnig*.

Não foi observada formação de nanofibras com as soluções de IPB de 1,2 e 3% (p/v). A obtenção de nanofibras aconteceu com o aumento gradual na

concentração de IPB, de 4 e 5% (p/v). Segundo Eda, Liu e Shivkumar (2007) durante o processo de *electrospinning* de soluções de polímero, a certo peso molecular, o efeito da concentração sobre o processo de *electrospinning* pode ser observado por duas concentrações críticas,  $C_i$  (concentração de transição entre a estrutura somente para estrutura fibras com gotas) e  $C_f$  (concentração de transição da estrutura fibras com gotas para estrutura fibras sem gotas). Abaixo de  $C_i$ , somente gotas são obtidas devido à formação insuficiente de cadeias com emaranhados moleculares. Acima de  $C_i$ , uma combinação de gotas e fibras é observada e quando a concentração é aumentada acima de  $C_f$  fibras completas são produzidas. A alta importância da formação de emaranhamento das cadeias moleculares para produção eficiente de nanofibras a partir de *electrospinning* foi demonstrado por Shenoy et al.(2005).

Nos ensaios com as amostras D (Figura 2-1) e E (Figuras 2-2 e 2-3) foram desenvolvidas nanofibras sem gotas e uniformes com diâmetros médios de  $205 \pm 82$  e  $476 \pm 107$  nm, respectivamente. Presumisse que essas concentrações estão acima de  $C_i$  e abaixo de  $C_f$ .

A amostra F apresentou ressecamento na ponta do capilar, impedindo a ejeção do jato da solução. Segundo Zhong et al. (2002), concentrações elevadas provocam secagem da solução polimérica na ponta do capilar, ocorrendo a formação de um gel localizado, impedindo assim a formação de nanofibras.

**Tabela 3-** Diâmetro das fibras formadas, e resposta de viscosidade e condutividade das soluções utilizadas no desenvolvimento de nanofibras.

Amostra	Concentração da solução de IPB (%)	Característica das fibras	Diâmetro (nm)	Condutividade ( $mS.cm^{-1}$ )	Viscosidade (Pa s)
A	1	*N.D	*N.D	2,76	$0,88 \pm 0,07$
B	2	*N.D	*N.D	3,40	$1,15 \pm 0,05$
C	3	*N.D	*N.D	3,62	$0,90 \pm 0,04$
D	4	Fibras uniformes	$476 \pm 107$	3,67	$2,74 \pm 0,06$
E	5	Fibras não uniformes	$205 \pm 82$	5,20	$1,88 \pm 0,01$
F	6	*N.D	*N.D	4,65	**N.A

\*Não detectado

\*\*Não analisado

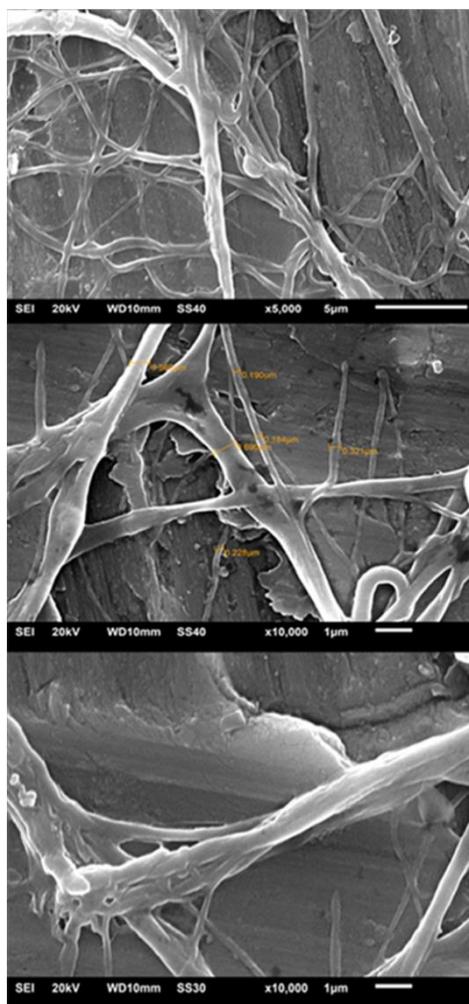
O desenvolvimento de nanofibras foi possível a partir das soluções D e E, estas apresentaram maior viscosidade,  $2,744 \pm 0,06$  e  $1,88 \pm 0,01$ , respectivamente. Em nosso estudo as nanofibras desenvolvidas apresentaram diâmetros maiores com o aumento da viscosidade.

Segundo Ramakrishna et al. (2005), com o aumento da viscosidade, o diâmetro das fibras também irá aumentar, devido à maior resistência da solução ao alongamento. A viscosidade pode ser incrementada pelo aumento da concentração do polímero, resultando em ligações da cadeia de polímeros dentro da solução, o que proporciona a continuidade do jato durante o *electrospinnig* (RAMAKRISHNA et al. 2005).

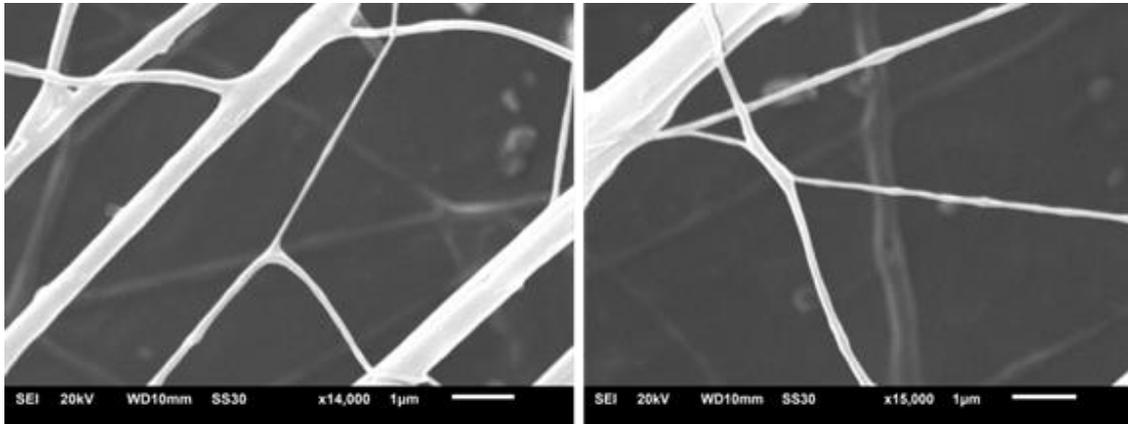
### 3.1 Caracterização das Nanofibras

#### 3.1.1 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

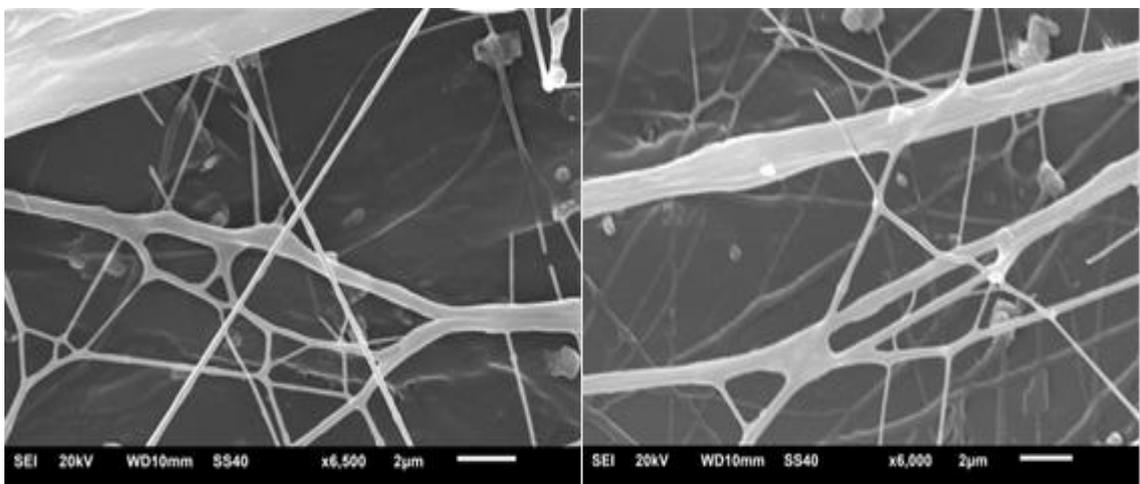
**Figura 2- 1-** (a) Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB: PEO (4:1) com aumento de 5000x. (b) e (c) Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB:PEO (4:1) com aumento de 10000x.



**Figura 2 - 3** - Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB: PEO (5:1) com aumento de 14000x. (b) Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB:PEO (5:1) com aumento de 15000x.



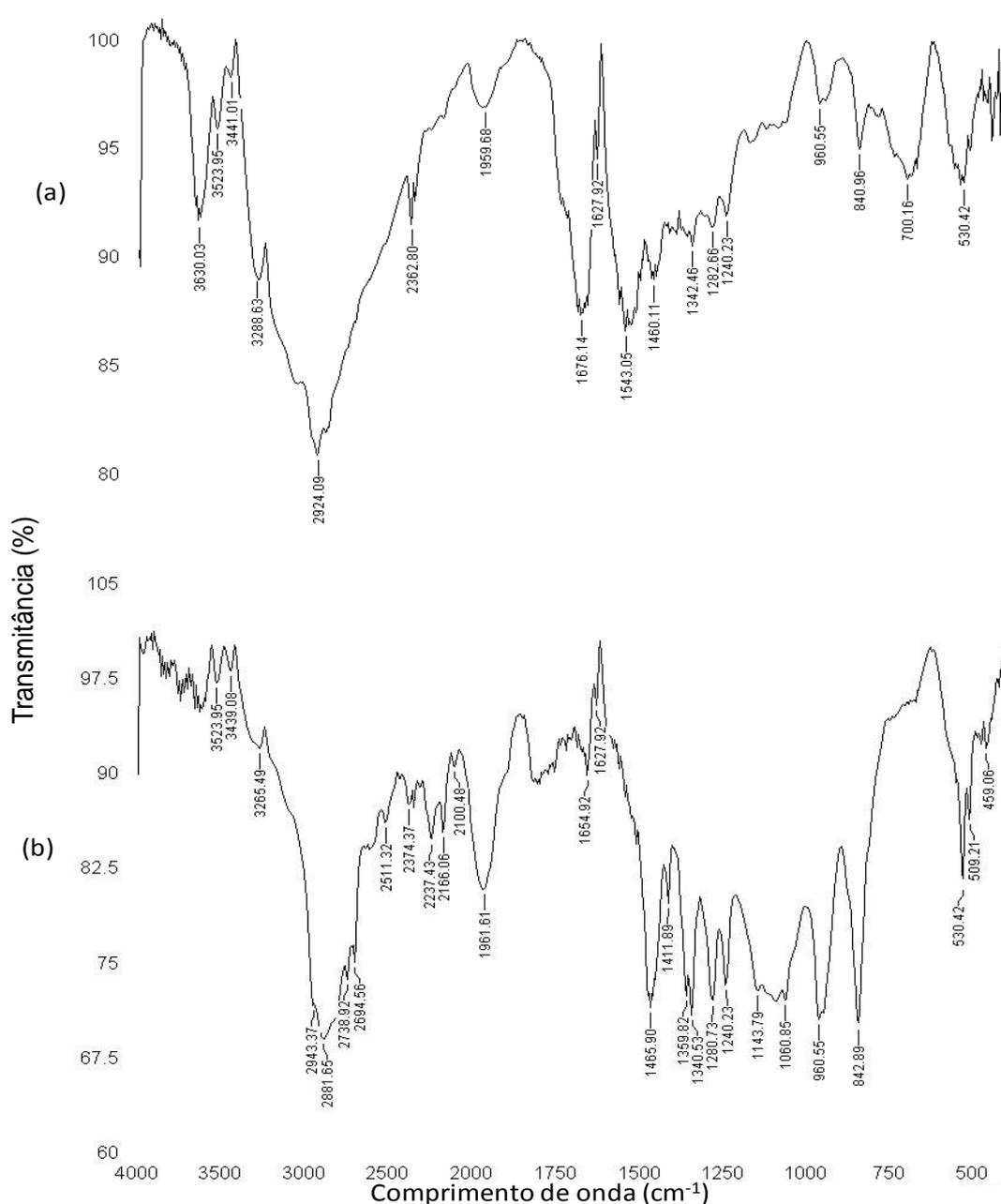
**Figura 2- 2** - Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB: PEO (5:1) com aumento de 65000x. (b) - Imagens das nanofibras desenvolvidas com IPB:PEO (5:1) com aumento de 6000x.



### 3.1.2 Análise de Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das nanofibras de IPB:PEO, 5:1 e das nanofibras de 1% PEO estão mostrados na Figura 2.

**Figura 2- 4 - Análise qualitativa por FTIR de (a) Nanofibras de IPB 5% (p/v) e (b) Nanofibras de PEO 1% (p/v)**



Na Figura 5 apresentam-se os espectros de absorção comparativos das nanofibras, na faixa de 4000-500 cm<sup>-1</sup>. Nesta região, as variações na estrutura das amostras são diferenciadas pela localização do pico de absorção na banda do comprimento de onda característico e pela intensidade da absorção de energia.

Neste estudo os espectros de absorção foram utilizados para análise qualitativa e comparativa das estruturas dos nanomateriais. Foram comparados os espectros das

nanofibras desenvolvidas com IPB 5% (p/v) e PEO 1% (p/v) e das nanofibras desenvolvidas com PEO 1% (p/v).

Comparando os espectros obtidos das nanofibras em relação às frequências características dos grupos funcionais, estas podem variar muito devido às interações complexas, intermoleculares e intramoleculares.

Pode-se observar que os espectros de infravermelho médio das nanofibras possuem bandas entre 3523 e 3441  $\text{cm}^{-1}$  características de grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) e hidroxilas OH, provenientes de ligações peptídicas. Em 1627  $\text{cm}^{-1}$  caracteriza vibrações de estiramentos C=C, C=N, NH de grupos aminoácidos (amina e amida), o comprimento de onda de 1460  $\text{cm}^{-1}$  é característico de compostos  $\text{NO}_2$ . As regiões entre 1280 a 1240  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de grupos éter (C-O-C e C-OH). Os comprimentos de onda de 960, 842 e 530  $\text{cm}^{-1}$  são característicos de compostos fosfóricos, halogenados e aromáticos, respectivamente. Os espectros mostraram que as nanofibras de IPB/PEO mantiveram os grupos funcionais das proteínas, como os grupos amina e grupos aminoácidos (amina e amida).

### 3.1.3 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises térmicas de DSC são importantes na caracterização física dos compostos, pois fornece informações sobre a cristalinidade dos mesmos. As curvas geradas fornecem temperatura e entalpia de fusão dos compostos analisados.

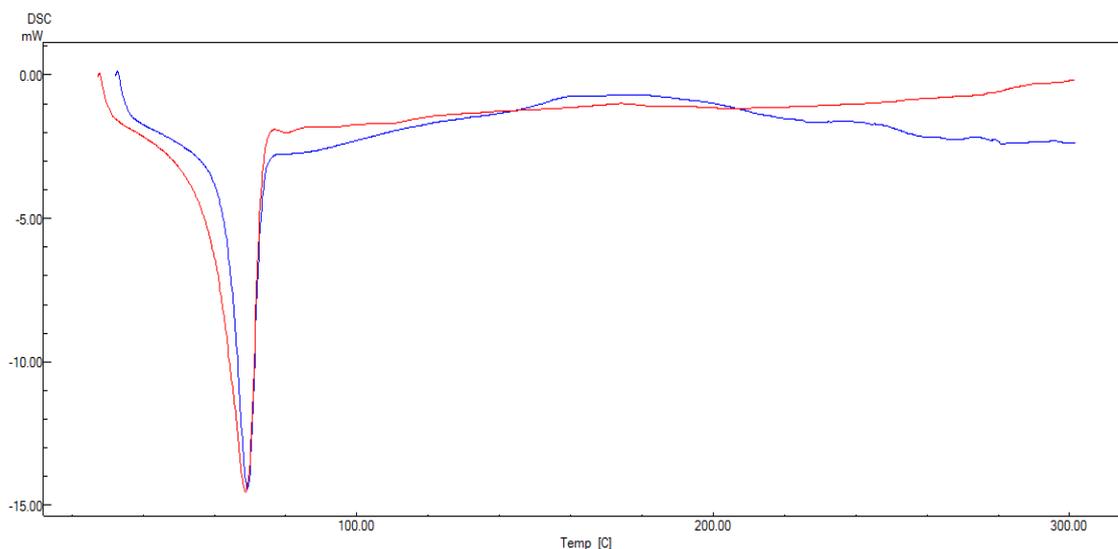
Os valores das temperaturas e das variações de entalpia do nosso estudo estão apresentados na Tabela 4. As curvas termoanalíticas obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) das nanofibras mostraram eventos exotérmicos (Figura 2-5)

Tabela 4 - Propriedades térmicas apresentadas pelas nanofibras desenvolvidas com IPB/PEO e PEO (controle).

Amostra	$T_i$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta T$ ( $T_f - T_i$ )	$\Delta H$ (J/g)
IPB/PEO	63,58	69,26	73,29	4,06	-101,03
PEO	59,59	68,83	73,19		-177,98

$T_i$ : temperatura inicial;  $T_p$ : temperatura de pico;  $T_f$ : temperatura final;  $\Delta T$ : faixa de temperatura;  $\Delta H$ : entalpia

**Figura 2- 5** – Curvas de temperaturas de transição e entalpias de fusão das nanofibras de (---) IPB:PEO (5:1) e (- - -) PEO 1% por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).



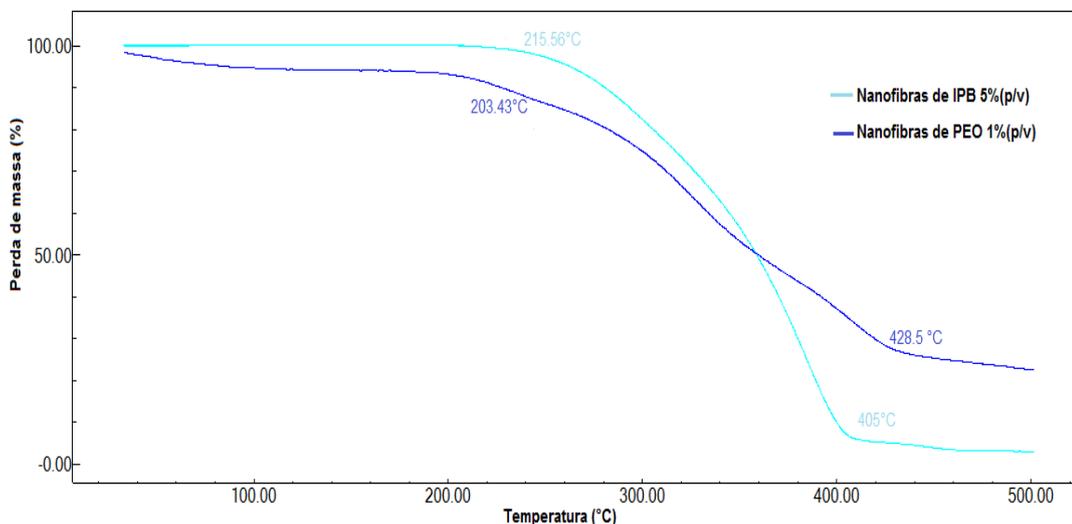
As nanofibras desenvolvidas apresentaram altos valores de entalpia (Tabela 4). De acordo com Attama et al. (2006), um valor alto de entalpia de fusão sugere alta organização no retículo cristalino, isto porque a fusão de um cristal altamente organizado requer mais energia para superar as forças de coesão do retículo cristalino do que um cristal pouco ordenado ou amorfo.

As nanofibras com o IPB apresentaram temperatura de fusão (73,29°C) muito próxima da temperatura de fusão do biopolímero comercial controle, PEO (73,19°C), no entanto apresentaram menor entalpia de fusão quando comparadas com as nanofibras controle (Tabela 4).

#### **3.1.4 Análise Termogravimétrica- TGA**

As curvas de degradação térmica das nanofibras estão ilustradas na Figura 2-6.

**Figura 2- 6** - Análise da degradação térmica das nanofibras desenvolvidas com IPB:PEO (5:1) e PEO (controle).



Pode-se observar perda de massa nas nanofibras de IPB/PEO entre 215,56 a 405°C, que podem estar associadas à degradação proteica e redução na estabilidade térmica causada pela ruptura das ligações intermoleculares de baixa energia que mantém a conformação da proteína, conforme foi observado por Brahatheeswaran et al. (2012), ao desenvolverem nanofibras de zeína contendo curcumina.

As nanofibras desenvolvidas somente com o PEO apresentaram decomposição entre 203 e 428,5°C. As nanofibras com IPB/PEO apresentaram perda de massa total menor que o PEO puro, demonstrando que a hidratação do polímero torna a sua estrutura mais termoestável.

#### 4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se como inovadores no desenvolvimento de nanofibras de isolado proteico de bijupirá. O processo foi desenvolvido com sucesso o na elaboração de nanofibras de soluções aquosas de proteínas. Os parâmetros de *electrospinning* foram ajustados para que fosse possível obter um processo contínuo. As soluções de IPB incorporadas com bioplímero comercial, o óxido de polietileno (PEO) atingiram viscosidade suficiente para serem utilizadas como soluções poliméricas para a elaboração de nanofibras pela técnica de *electrospinnig*.

As nanofibras desenvolvidas apresentaram tamanho médio de 205 nm, bem como altos valores de entalpia, caracterizando um composto cristalino (organizado) e com boa estabilidade térmica (405°C).

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Capes/Bijupiráplus: Rede de Cooperação para o Aproveitamento Integral do Bijupirá, pelo apoio financeiro.

### **REFERÊNCIAS**

AGARWAL, S., GREINER, A., WENDORFF, J. H. **Chem. Ing. Tech.** 80, 1671, 2001.

AGARWAL, B.S, WENDORFF, J.H., and GREINER, A., "Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications," **Advanced Materials**. pp. 3343-3351, 2009.

ATTAMA, A. A.; SCHICKE, B. C.; MULLER-GOYMANN, C. C.; Further characterization of theobroma oil beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 294-306, 2006.

BHATTARAI, N., ZHANG, M. Q. Controlled synthesis and structural stability of alginate-based nanofibers. **Nanotechnology**. 18, 45, 2007.

BRAHATHEESWARAN, D.; MATHEW, A.; ASWATHY, R. G.; NAGAOKA, Y.; VENUGOPAL, K.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; SAKTHIKUMAR, D. Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. **Biomedical Materials**, v. 7, n. 4, Aug 2012.

DE MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (Arthrospira). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872-2876, 2010.

GRAFAHREND D, HEFFELS KH, Moller M, KLEE D, GROLL J. Electrospun, biofunctionalized fibers as tailored in vitro substrates for keratinocyte cell culture. **Macromol Biosci.**10:1022 - 7, 2010.

HSU, K. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. **Food Chemistry.** 122, 42–48, 2010.

JIANG, H. L., FANG, D. F., HSIAO, B. S., CHU, B., and Chen, W. L. Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. **Biomacromolecules.** 5(2): 326, 2004.

RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W.-E., LIM, T.-C., & MA, Z. NA: introduction to electrospinning and nanofibres. **World Scientific Publishing**, 2005.

VAN DER LEEDEN, M. C., RUTTEN, A. A. C. M., & FRENS, G. How to develop globular proteins into adhesives. **Journal of Biotechnology.** 79, 211- 221, 2000.

WANG XF, DING B, YU JY, YANG JM. Large-scale fabrication of two-dimensional spider-web-like gelatin nano-nets via electro-netting. **Colloids Surf,** 86:345–52, 2011.

ZHONG, X. H., KIM, K., FANG, D. F., RAN, S. F., HSIAO, B. S., AND CHU, B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. **Polymer.** 43(16), 4403, 2002.

# **ARTIGO 3**

**TOXICIDADE DE NANOFIBRAS DESENVOLVIDAS A PARTIR DE ISOLADO  
PROTEICO DE BIJUPIRÁ (IPB)**

(FALTA, ANÁLISES SENDO REALIZADAS)

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSÃO GERAL**

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

**(FALTA)**



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN FILTRATION & SEPARATIONS SOCIETY, "Educating and Networking Industry Professionals": <http://www.afssociety.org/>.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. ALKALINEVPROTEASES: a review. **Bioresource Technology**. 64, 175-183, 1998.

ANDRADY, A. L. Science and technology of polymer nanofibers (1st ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2008.

.ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: Teoria e Prática. Viscosa: UFV, 335p, 1995.

AYLA, M. E G Estrutura e composição química Del pescado. In: Curso de Capacitación, surimi, Callao: **Instituto tecnológico Pesquero Del Peru**, 2001.

BHARDWAJ, N., & KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28, 325 e 347, 2010.

BRENNER, T.; NICOLI, T.; JOHANNSSON, R.; Rheology of thermo-reversible fish protein isolate gels. **Food Research International**, 42, 915–924, 2009.

CHALAMAIAH, M., DINESH KUMAR, B., HEMALATHA, R., JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**. 135, 3020-3028, 2012.

CHEFTEL, J. C., LORIENT, D.,. Las proteínas de soja. In: proteínas alimentares proteicas – propriedades, degradações e modificações. São Paulo: Livraria Varela, p.227-230, 1990.

CHENG, G. X.; LIU, J.; ZHAO, R. Z.; YAO, K. D. Studies on dynamic behavior of water cross Anked chitosan hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**. 67, 983-988, 1998.

CHO, J-K., JIN, Y-G, RHA S-J, KIM S-J, HWANG J-H. Biochemical characteristics of four marine fish skins in Korea. **Food Chemistry**. 159, 200-207, 2014.

CRAIG, S. R., SCHWARZ, M. H., & MCLEAN, E. Juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. **Aquaculture**. 261, 384–391, 2006.

GIBSON P.W. and RIVIN D., "Electrospun Fiber Mats : Transport Properties," **AICHE Journal**, vol. 45, 1999.

COSTA, M. R.; ARAÚJO, F. Use of a tropical bay in southeastern Brazil by juvenile and subadult (*Micropogonias furnieri*, *Perciformes sciaenidae*). **Journal of Marine Science**. 60, 268-277, 2003.

FISHBINE G., The investor's guide to nanotechnology micromachines. John Wiley & sons, Inc.: New York, 2002.

FORMHALS, A. (1934). Apparatus for producing artificial filaments from materials such as cellulose acetate. U.S. Patent 1975504.

FONTANARI, G. G. Isolado proteico de semente de goiaba (*Psidium guajava*): caracterização sw propriedades funcionais. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, v. 27, p.73-79, 2007.

FRANKS, J.S., WARRN, J.R., BUCHANAN, M.V.,. Age and growth of cobia, (*Rachycentron canadum*), from the northeastern Gulf of Mexico. **Fishery Bulletin**, 97, 459–471, 1999.

GÓMEZ-ESTACA, J., MONTERO, P., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle proteins as source to develop edible films. **Food Hydrocolloids**, 41. 86-94, 2014.

GRAFAHREND D, HEFFELS KH, MOLLER M, KLEE D, Groll J. Electrospun, biofunctionalized fibers as tailored in vitro substrates for keratinocyte cell culture. **Macromol Biosci.**, 10:1022-7, 2010.

GUPTA P. AND WILKES G.L., "Some investigations on the fiber formation by utilizing a side-by-side bicomponent electrospinning approach." **Polymer**, vol. 44, pp. 6353-6359, 2003.

HASSLER, W.W., RAINVILLE, R.V. Techniques for hatching and rearing cobia (*Rachycentron canadum*) through larval and juvenile stages. **University of North Carolina, Sea Grant Program**, 1235 Burlington Laboratories, UNC-SG-75-30, Raleigh, North Carolina USA. 26 pp, 1975.

HOLTA, G. J., FAULKA, C. K., & SCHWARZ, M. H. A review of the larviculture of cobia (*Rachycentron canadum*), a warm water marine fish. **Aquaculture**, 268, 181–187, 2007.

HUANG Z., "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," **Composites Science and Technology**, vol. 63, pp. 2223-2253. 2003.

HUANG, P. GIVEN, M. QIAN, Micro/Nano-encapsulation of Active Food Ingredients, vol. 1007, **American Chemical Society**, Washington, DC, , p.314, 2009.

IANNACE, S.; NICOLAIS, L.; Water sorption of glycol-modified cross-linked gelatin-based hydrogels. **Journal of Materials Science**. 32, 1405-1408, 1997.

JOSEPH, E.B., NORCROSS, J.J., MASSMANN, W.H., Spawning of the cobia, *Rachycentron canadum*, in the Chesapeake Bay area, with observations of juvenile specimens. **Chesapeake Science**. 5, 67–71, 1964.

KOTAKI, S. H. Utilização da carne mecanicamente separada (CMS) da carcaça de tilápia (*Oreochromis niloticus*) para a elaboração de linguiça de peixe. 2005. 94p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Pesca) Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca. Fortaleza, 2005.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 657-666, 2000.

KRISTINSSON, H.; DEMIR, N. Functional fish protein ingredients from fish species of warm and temperate Waters: comparasion of acid- and alkali-aided processing VS. Conventional surimi processing. In P. J. Bechtel (Ed.), advances in **Seafood Byproducts 2002 Conference Proceedings** (pp. 277-295). Anchorage: Alaska Sea Grant College Program University of Alaska, 2003.

KRISTINSSON, H. G.; THEODORE, A. E; DEMIR, N.; INGADOTTIR, B. A comparative study between acid-and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 70, n°. 4, p. C298 - C 306, 2005.

KRISTINSSON, H.; INGADOTTIR, B. Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. **Journal of food Science**. 71, E132-E141, 2006.

LIAO, I.C., SU, H.M., CHANG, E.Y,. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. **Aquaculture**. 200, 1–31, 2001.

LIAO, I.C., HUANG, T.-S., TSAI, W.-S., HSUEH, C.-M., CHANG, S.-L., LEAÑO, E.M.,.Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**. 237, 155-165, 2004.

LIASET, B.; ESPE, M. nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. **Process Biochemistry**. 43, 42-48, 2008.

LIM, F. **Biomedical Application of Microencapsulation**, CRC Press, Inc.: Boca Raton, USA, 1985.

LEUNG W.W. and HUNG C., "Investigation on pressure drop evolution of fibrous filter operating in aerodynamic slip regime under continuous loading of sub-micron aerosols". **Separation and Purification Technology**, vol. 63, pp. 691-700, 2008.

LIASET, B.; ESPE, M. Nutritional Composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. **Process Biochemistry**. 43, 42-48, 2008.

LIU J., SHEN Z., LEE S., MARQUEZ M., AND MCHUGH M.A., "Electrospinning in compressed carbon dioxide: Hollow or open-cell fiber formation with a single nozzle configuration". **The Journal of Supercritical Fluids**, vol. 53, pp. 142-150, 2010.

LOSCERTALES I.G., BARRERO A., MÁRQUEZ M., SPRETZ R., VELARDE-ORTIZ R., and LARSEN G., "Electrically Forced Coaxial Nanojets for One-Step Hollow Nanofiber Design". **JACS Comunications**, pp. 5376-5377, 2004.

MACKIE, I. M. Fish protein hydrolysates. **Process biochemistry**. 17, 26 -28, 1982.

METALPLAN ENERGY SOLUTIONS, "Elementos Filtrantes Hi-Flux". **Disponível em:** <[http://www.metalplan.com.br/filtros\\_coalescentes.asp](http://www.metalplan.com.br/filtros_coalescentes.asp)>.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. "Sustainable bio-composites from renewable resources: Opportunities and challenges in the green materials world", **J. Polym. Environ.**, 10, 19–26, 2002.

NAKANO K. and KAMEOKA J., "Self-cleaning filtration nanofiber membrane," **US Patent**, 2007.

NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. **Food Bioprocess Technology**, v.2, p.1–627, 2009.

OETTERER, M.; ESPINDOLA FILHO, A.; MORALES – ULLOA, D. F.; ARRUDA, L. F.; GORGHESI, R. Bioconservação de resíduos do pescado para obtenção de subprodutos, In: **Workshop Brasileiro em aproveitamento de subprodutos do pescado**. ITAJAÍ-SC, 2003, Universidade do Vale do Itajaí, 2003. **Disponível em:** <[http://siaiacad04.univali.br/index\\_spp.php?id=9Acesso](http://siaiacad04.univali.br/index_spp.php?id=9Acesso)>

ORDOÑEZ, P. Juan, A., **Tecnologia de alimentos: Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OGAWA, M. Química do pescado. Umidade e Proteína. In: Ogawa, M e Maia, E.L. (Eds), **Manual de Pesca, V.I: Ciência e Tecnologia**. São Paulo, livraria varela, cap. 4, p:29-48,1999.

OGAWA, M.; MAIA E. L. **Manual de Pesca**. São Paulo. Livraria Varela, 1999.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia**: Editora UFG, 2001.

OKUTAN, N; TERZI, P; ALTAY, F. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. **Food Hydrocolloids**, 39, 19 e 26, 2014.

ORDOÑEZ, J.A. et al., **Tecnologia de alimentos**, Porto Alegre: Artmed, V.2. p.279, 2002.

PHAM Q.P; SHARMA U, MIKOS AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: **A Review Tissue Eng**;12:1197–211, 2006.

PARDI, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas aplicações nas propriedades funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n2, p.83-94, 2002.

PARK, J. W. Fish Protein Isolate and Its Superior Functionality. 62<sup>nd</sup>. Annual Reciprocal Meat Conference. **American Meat Science Association**. p 1-8, 2009.

PORTELA, D. M. P., **Montagem e Automatização de um Sistema de Electrospinning**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Electrónica Industrial e Computadores), Universidade do Minho, Lisboa, Portugal, 2010.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Conformational and rheological changes in catfish myosin during alkali-induced unfolding and refolding. **Food Chemistry**, 107, 385-398, 2008.

RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W.E., LIM, T. C., MA, Z. Na introduction to eletrospinning and nanofibers. Danvers, USA. ISBN 981-256-415-2. **World Scientific Publishing Co.Pte. Ltd.** 2005.

RAWDKUEN, S.; SAI-UT, S.; KHAMSORN, S.; CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S. Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. **Food Chemistry**, 112, 112–119, 2009.

ROCO. M. C, C.A. MIRKIN, M.C. HERSAM (Eds), **Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020: Restrospective and Outlook, World Technology Evaluation Center (WTEC) and the National Science Foundation (NSF)**, Springer, 2010.

SAEED, K., & PARK, S. Preparation and characterization of multiwalled carbon anotubes/polyacrylonitrile nanofibers. **Journal of Polymer Research**, 17, 535 e 540, 2010.

SALAS, A. B. Gelificación de lãs proteínas do pescado. In: **curso de Capacitação, Surimi. Callao: Instituto tecnológico Pesquero del Peru**, 2001.

SATHIVEL, S. Functional and nutritional-enhancing protein isolates from Arrow Tooth Flounder. **Annual Meeting-Chicago**. University of Alaska, Chicago, 2003.

SCARBIERI, V.C.; **Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedade, Degradações, Modificações**. São Paulo: Ed. Varela, 1996.

SCHEIBEL, T. “Proteins fibers as performance proteins. New technologies and applications”, **Curr. Opin. Biotechnol.**, 16, 427-433, 2005.

SCHREUDER-GIBSO, N B.H. and GIBSON P., "Cooperative Charging Effects of Fibers from Electrospinning of Electrically Dissimilar Polymers". **Department of Chemical Engineering**, 2004.

SERUM B., KOWALCZYK T., and NOWICKA A., "Electrospinning of Bovine Serum Albumin. Optimization and the Use for Production of Biosensors," **Biomacromolecules**, vol. 9, pp. 2087-2090, 2008.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades, Degradações e Moificações**. Ed. Varela. São Paulo, 1996.

SHAFFER, R.V., NAKAMURA, E.L., Synopsis of biological data on the cobia, (*Rachycentron canadum*) (Pisces:Rachycentridae). NOAA Technical Report NMFS 82, **FAO Fisheries Synopsis**, 153, 21 p., 1989.

SHIAU, C.-Y., Biochemical composition and utilization of cultured cobia (*Rachycentron canadum*). In: Liao, I.C., Leano, E.M. (Eds.), *Cobia Aquaculture: Research, Development and Commercial Production*: Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, World Aquaculture Society, Louisiana, USA, The Fisheries Society of Taiwan, Keelung, Taiwan, and National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, pp. 147–156. 2007

STITZEL J., LIU J., JIN S., KOMURA M., BERRY J., SOKER S., LIM G., DYKE M.V., CZERW R, YOO J.J., and ATALA. A., "Controlled fabrication of a biological vascular substitute," **Cell Proliferation**, vol. 27, pp. 1088-1094, 2006.

SUZUKI, T. **Tecnologia de lãs proteínas de pescados y krill**. Zaragoza; Acribia, 1987.

TACON, A.G.J., HASAN, M.R., METIAN, M., Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. Rome, Italy. **FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper** 564, 87 p.,2011

TAN E.P., NG S.Y., LIM and C.T., "Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber," **Biomaterials**, vol. 26, 1453-1456. 2005

TASKAYA, L.; CHEN, Y.C.; JACZYNSKI, J. Functional properties of proteins recovered from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by isoelectric solubilization/precipitation. **LWT- Food Science and Technology**, 42, 1082-1089, 2009.

TEO, W.E., RAMAKRISHNA, S. A. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. **Nanotechnology**. 17: 89-106, 2006.

TONGNUANCHAN, P., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T., & SONGTIPYA, P. Characteristics of film based on protein isolate from red tilapia muscle with negligible yellow discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, 48, 758 e 767, 2011.

TSAI P.P., H. SCHREUDER-GIBSON, and GIBSON P., "Different electrostatic methods for making electret filters". **Journal of Electrostatics**, vol. 54, pp. 333-341, 2002.

VIEILLE, L.; MARRALE, D.; MORENO, P.; FABIANO, M. sediment organic matter and mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular and Biology Reviews**. 65, 1-43, 2001.

XIE, J., HSIEH, Y.-L. "Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: Casein and lipase enzyme. **J. Mater. Sci.**, 38, 2125-2133, 2003.

YANNES, M. I.; ALMANDOSS, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water conten. **Journal of food Composition and Analysis**, 16, 81-92, 2003.

WANG X., KIM Y., DREW C., KU B., KUMAR J., AND SAMUELSON L.A., "Electrostatic Assembly of Conjugated Polymer Thin Layers on Electrospun Nanofibrous Membranes for Biosensors," **Nano Letters**, vol. 4, pp. 331-334, 2004.

WANG M., YU J.H., KAPLAN D.L., and RUTLEDGE G.C., "Production of Submicron Diameter Silk Fibers under Benign Processing Conditions by Two-Fluid Electrospinning," **Society**, pp. 1102-1107, 2006.

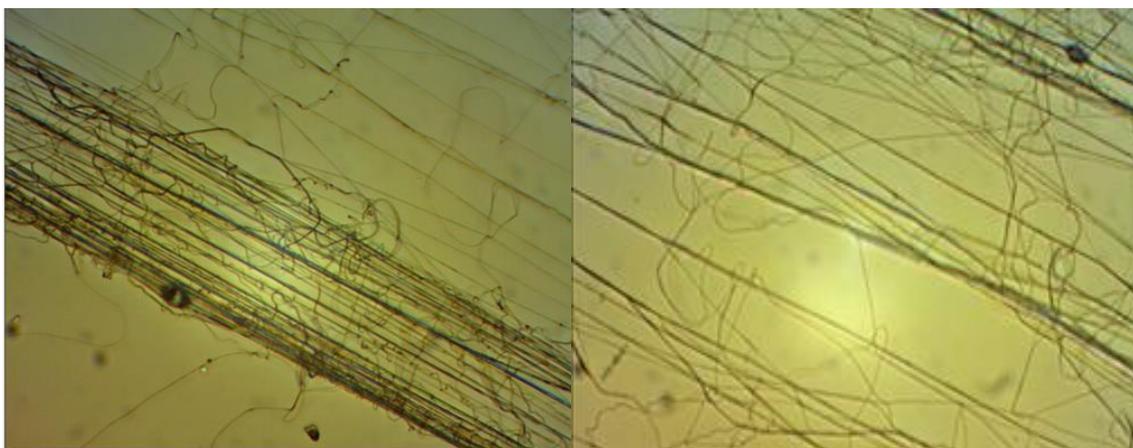
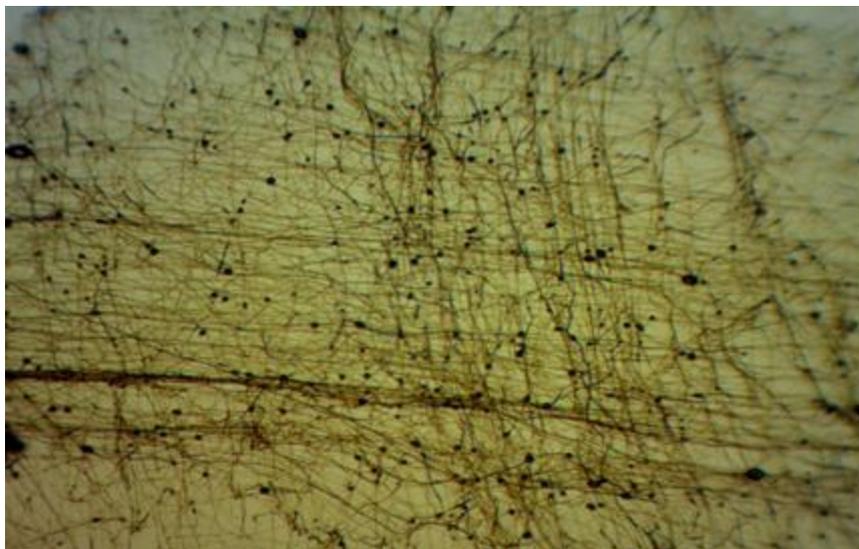
WATANABE, K., Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 63, 520-526, 2004.

WILSON M., KANNANGARA K., SMITH G., SIMMONS M., RAGUSE B.  
**Nanotechnology: basic science and emerging technologies.** UNSW press: Sidney,  
2002.

YANNES, M. I; ALMANDOS, M.E. Estimation of fish proximate composition satarting  
from water content. **Journal of food Compositon and Analysis.** 16, 81-92, 2003.

## **APÉNDICE**

## Fotos de Microscopia óptica



**Figura ??(a) Imagens em microscopia óptica, sob aumento de 10 vezes e (b) 40 vezes, das fibras desenvolvidas com soluções contendo 5,0% IPB + 1,0% PEO.**

