

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Diego Bertolini

**CARACTERIZAÇÃO DE NANOVESÍCULAS CONTENDO PEPTÍDEOS
BIOATIVOS OBTIDOS DO SORO DE LEITE OVINO**

Porto Alegre

2016

Diego Bertolini

**CARACTERIZAÇÃO DE NANOVESÍCULAS CONTENDO PEPTÍDEOS
BIOATIVOS OBTIDOS DO SORO DE LEITE OVINO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli
Coorientadora: Dra. Ana Paula Folmer Corrêa

Porto Alegre

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Bertolini, Diego
Caracterização de nanovesículas contendo peptídeos bioativos obtidos do soro de leite ovino / Diego Bertolini. -- 2016.
47 f.

Orientador: Adriano Brandelli.
Coorientadora: Ana Paula Folmer Corrêa.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Microencapsulação. 2. Peptídeos bioativos. 3. Lipossomas. 4. Soro de leite. I. Brandelli, Adriano, orient. II. Folmer Corrêa, Ana Paula, coorient. III. Título.

Diego Bertolini

**CARACTERIZAÇÃO DE NENOVESÍCULAS CONTENDO PEPTÍDEOS
BIOATIVOS OBTIDOS DO SORO DE LEITE OVINO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Mercedes Passos Geimba - UFRGS

Dra. Ana Carolina Ritter - UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli - UFRGS (orientador)

Dra. Ana Paula Folmer Corrêa – UFRGS (coorientadora)

AGRADECIMENTOS

À minha família, por ter estado sempre presente, mesmo nos momentos de dificuldade, me apoiando e oferecendo suporte. Por terem estado comigo durante todos os altos e baixos da graduação. Por toda a dedicação e amor. Por terem sempre acreditado em mim.

Ao professor Adriano, pela oportunidade e pela confiança durante o tempo que passei desenvolvendo esse trabalho. Por ter, tão prontamente, me aceitado no laboratório, me orientando durante essa fase da minha formação.

À Ana Paula, por ter sido sempre tão presente, em todas as etapas do trabalho, sempre disposta a ajudar. Por ter colaborado de forma tão grande nessa fase, sempre com muita paciência e bom humor. Por todo o conhecimento transmitido, pela orientação e pela amizade.

Ao pessoal do laboratório 218 do ICTA, por terem me recebido de forma tão calorosa e terem se colocado à disposição sempre que eu necessitava de ajuda.

Aos companheiros da turma 9, por terem sido parte da minha vida nesses anos de graduação. Por toda a troca de conhecimentos, experiências e emoções. Por terem compartilhado comigo todos os dramas da faculdade e por terem sido grandes responsáveis por tornar a graduação uma experiência tão positiva.

A todos os professores e pessoas que contribuíram na minha formação científica, por terem contribuído tanto no meu aprendizado e na minha formação como biomédico.

A todos vocês, muito obrigado!

Sumário

RESUMO	6
I. INTRODUÇÃO	7
II. JUSTIFICATIVA	12
III. OBJETIVOS	13
<i>III.1 Objetivo geral</i>	<i>13</i>
<i>III.2 Objetivos específicos</i>	<i>13</i>
IV. ARTIGO CIENTÍFICO	14
Resumo	16
1 Introdução	17
2 Metodologias	19
2.1 <i>Microrganismo e produção da enzima</i>	<i>19</i>
2.2 <i>Purificação parcial da enzima</i>	<i>19</i>
2.3 <i>Ensaio de atividade proteolítica</i>	<i>19</i>
2.4 <i>Hidrólise enzimática</i>	<i>20</i>
2.5 <i>Purificação parcial dos peptídeos bioativos</i>	<i>20</i>
2.6 <i>Determinação da atividade antioxidante</i>	<i>20</i>
2.7 <i>Determinação da atividade anti-hipertensiva</i>	<i>21</i>
2.8 <i>Encapsulação</i>	<i>21</i>
2.9 <i>Medidas de espalhamento de luz (DLS)</i>	<i>22</i>
2.10 <i>Potencial zeta (ζ)</i>	<i>22</i>
2.11 <i>Análise estatística</i>	<i>23</i>
3 Resultados e discussão	23
3.1 <i>Purificação parcial da enzima</i>	<i>23</i>
3.2 <i>Purificação parcial dos peptídeos bioativos</i>	<i>24</i>
3.3 <i>Caracterização das vesículas</i>	<i>25</i>
3.4 <i>Atividade antioxidante</i>	<i>27</i>
4 Conclusões	28
Referências	29
Legendas das figuras	33
Figuras	34
V. PERSPECTIVAS	36
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES	37
ANEXOS	40

RESUMO

O soro de leite é um subproduto formado durante a produção de leite e da caseína. Esse subproduto compõe a fração aquosa do leite, além de conter cerca de metade de seus componentes solúveis. O soro de leite possui um valor nutricional considerável, principalmente por causa de suas proteínas, que possuem excelentes qualidades nutricionais e funcionais. Em contrapartida, a produção de soro causa um grande impacto ambiental, em função do grande volume de rejeitos gerados, os quais possuem uma elevada carga orgânica. Desse modo, é de grande interesse o desenvolvimento de novas alternativas para seu manejo e melhor aproveitamento. Atualmente, os consumidores estão interessados em alimentos minimamente processados ou que possuem características funcionais e que possuam um tempo prolongado de prateleira, mas sem adição de conservantes químicos. Uma alternativa promissora para esse fim é a bioconservação por meio do uso de peptídeos bioativos, os quais podem ser obtidos através da hidrólise de proteínas do soro do leite. A aplicação desses peptídeos, no entanto, é dificultada por sua baixa resistência à degradação e hidrólise. Uma forma de proteger os peptídeos bioativos de degradação é sua encapsulação em vesículas lipídicas, denominadas lipossomas. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar, ao longo de 1 mês, lipossomas contendo peptídeos bioativos parcialmente purificados obtidos da hidrólise enzimática do soro de queijo ovino, utilizando uma preparação enzimática bacteriana. Os lipossomas foram avaliados quanto a seu diâmetro médio, polidispersividade e potencial zeta (ζ), que foram utilizados como parâmetros de estabilidade. Os peptídeos encapsulados foram comparados com peptídeos não encapsulados quanto a sua atividade biológica, que foi avaliada pela atividade antioxidante, avaliada pela capacidade de captura do radical ABTS, e anti-hipertensiva, avaliada pela capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA). O diâmetro médio dos lipossomas se apresentou na escala nanométrica. A polidispersividade se apresentou superior ao ideal, ao mesmo tempo em que os valores observados para o potencial ζ foram ligeiramente inferiores aos valores que caracterizam boa estabilidade. Os três parâmetros, no entanto, se mantiveram constantes no decorrer de 1 mês. As atividades antioxidante e anti-hipertensiva dos peptídeos sofreram reduções após a encapsulação. Não obstante, a encapsulação foi capaz de tornar menos expressiva a perda de atividade dos peptídeos encapsulados, quando comparados aos não encapsulados. Conclui-se que a encapsulação de peptídeos bioativos em lipossomas é capaz de protegê-los de degradação por condições ambientais adversas, sem causar perda demasiada de sua atividade.

I. INTRODUÇÃO

O leite é uma das principais fontes de proteína na dieta, tanto de animais jovens quanto de humanos, adultos ou crianças, sendo considerado um dos alimentos mais completos encontrados na natureza por sua composição e por ser o único que satisfaz as necessidades de recém-nascidos, além de possuir papel chave na nutrição em países em desenvolvimento, particularmente (ROMAN & SGARBIERI, 2005; SABAHELKHIER et al, 2012). A produção de leite possui grande importância no cenário econômico e social mundial, se destacando a produção, principalmente, de rebanhos bovinos, caprinos, bubalinos e ovinos (MENDONÇA et al, 2010). Apesar da distribuição da produção mundial de leite ovino ser pequena quando comparada às demais espécies, tal produção é importante em diversos países, como Grécia, França, Itália e Espanha, em especial no tocante à produção de queijos, iogurtes e leite fermentado (RIBEIRO et al, 2007, MENDONÇA et al, 2010).

O leite ovino é um produto bastante valorizado, não apenas por suas qualidades nutritivas, mas também por seu alto conteúdo graxo, seu extrato seco e seu rendimento industrial (SUÁRES & BUSETTI, 2006). Este leite difere das demais espécies principalmente pela riqueza de seus constituintes (BRITO et al, 2006; RIBEIRO et al, 2007). Sua composição diferenciada, com altos teores de sólidos totais, gorduras e caseínas, torna o leite ovino mais indicado para a fabricação de queijos com sabores e aromas especiais e com alto valor comercial, podendo aumentar o retorno financeiro para o ovinocultor (SUÁRES & BUSETTI, 2006; RIBEIRO et al, 2007).

Tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo, as proteínas do leite constituem sua fração mais importante, podendo ser encontrados dois tipos de proteínas: as caseínas e as proteínas do soro.

As caseínas são as principais proteínas presentes no leite. Elas são fosfoproteínas sintetizadas pelas glândulas mamárias e secretadas como grandes agregados coloidais, chamados micelas, sendo responsáveis por várias das propriedades físicas do leite (GINGER & GRIGOR, 1999; PITKOWSKI et al, 2008; CHEEMA et al, 2015) e compõem cerca de 80% do total de proteínas lácteas (CHEEMA et al, 2015).

Caseínas e caseinatos são extensivamente utilizados na indústria alimentícia devido a suas propriedades físico-químicas, nutricionais e funcionais (ALVAREZ et al, 2007; PITKOWSKI, DURAND & NICOLAI, 2008), sendo utilizados na formulação de produtos cárneos e lácteos, na panificação, na produção de chocolates e confeitos, coberturas comestíveis, bebidas lácteas e achocolatados, filmes comestíveis, impermeabilizantes e como

coagulante na produção de queijos e iogurtes (ROMAN & SGARBIERI, 2005; ALVARES et al, 2007; RUIS, VENEMA & VAN DER LINDEN, 2007). Os métodos tradicionais de fabricação de caseína promovem alterações químicas irreversíveis na estrutura da micela de caseína, por meio de acidificação ou modificação enzimática, a fim de facilitar a separação dessas proteínas dos constituintes do soro (ROMAN & SGARBIERI, 2005).

O soro é a porção aquosa do leite, que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína (BALDASSO, 2008). Ele se constitui, principalmente, por proteínas, lactose, sais minerais e traços de gorduras, além de conter cerca de metade de todos os componentes solúveis do leite, porém, sua composição precisa varia de acordo com os processos tecnológicos empregados na produção de produtos lácteos e durante o período no qual ocorre a produção do leite (MAWSON, 1994). O soro pode ser produzido pela ação de microrganismos, de ácidos ou de enzimas, sendo chamado de soro ácido, ou azedo, quando produzido pela adição de ácidos, e soro doce quando produzido pelos demais métodos (MAWSON, 1994; YADA, 2004). Em virtude do aumento do consumo mundial de leite e de seus derivados, tem sido observado um aumento expressivo na produção de soro (CARMINATTI, 2001).

O soro do leite possui diversos componentes que, além de seu alto valor nutritivo, também possuem atividade biológica, ou seja, capacidade de modular processos fisiológicos (SCHANBACHER, TALHOUK & MURRAY, 1997; CLARE & SWAISGOOD, 2000; DELBONI & SILVA, 2016). Dentre essas substâncias bioativas, podemos citar β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, imunoglobulinas, lactoferrina, transferrina, albumina, entre diversos outros (CLARE & SWAISGOOD, 2000). No entanto, as funcionalidades do soro do leite se estendem além de apenas o valor nutricional dos componentes naturalmente nele encontrados.

A produção mundial de soro possui, principalmente, três destinos: o processamento até produtos diversos, a utilização na alimentação animal e o tratamento para posterior despejo em esgotos (BALDASSO, 2008; YADAV et al, 2015).

Em virtude das diversas propriedades funcionais das proteínas do soro, esse subproduto pode ser empregado na indústria alimentícia de diversas formas. Tais propriedades são, em suma (YADA, 2004):

- Sua solubilidade em uma larga gama de valores de pH, que tornam essas proteínas, desde que em sua forma nativa, facilmente aplicáveis em bebidas.

- Sua capacidade de retenção de água e formação de géis, especialmente quando desnaturadas, pois ao serem expostas, as cadeias laterais de aminoácidos dessas proteínas podem interagir com moléculas de água, retendo-as. Essa característica torna as proteínas do soro úteis como espessantes de alimentos.
- Capacidade emulsificante, por possuírem tanto regiões hidrofílicas quanto regiões hidrofóbicas.
- Capacidade de formação de espumas, principalmente quando desnaturadas.

Apesar de diversas tecnologias terem sido desenvolvidas nos últimos anos para solucionar o problema do gerenciamento do excedente da produção de soro, e ainda que uma grande fração desse excedente já seja utilizada na produção de produtos de valor agregado, uma parcela considerável da produção mundial de soro ainda é descartada (YADAV et al, 2015), tanto sendo utilizada como adubo diretamente no solo, quanto sendo eliminada como efluente hídrico (MARWAHA & KENNEDY, 1988; BALDASSO, 2008). Além disso, o grande volume gerado na produção de soro cria um impacto significativo no ambiente e na saúde da população em função de seu alto teor de componentes orgânicos, principalmente nutrientes residuais do leite, como lactose, proteínas, lipídeos e vitaminas, o que eleva sua demanda bioquímica de oxigênio e leva o soro a ser considerado um potente poluente ambiental (PINTADO, PINTADO & MALCATA, 1999; TAVARES & MALCATA, 2013; YADAV et al, 2015). Surge, desse modo, a necessidade de encontrar novas alternativas para a utilização do excedente da produção desse subproduto.

Nas últimas décadas, têm sido realizados diversos estudos relacionados a peptídeos criptografados nas sequências de aminoácidos de proteínas específicas (KORHONEN, 2009). Esses peptídeos podem possuir atividade biológica, como, por exemplo, atividade anti-hipertensiva, antioxidante, opioide, antimicrobiana, antitrombótica e imunomodulatória (YADA, 2004; NAGPAL et al, 2010; CORRÊA et al, 2011; MANN et al, 2015; NONGONIERMA & FITZGERALD, 2015; PARK & NAM, 2015), mas se mantêm latentes até que sejam liberados de suas proteínas precursoras por meio de hidrólise (MEISEL & BOCKELMANN, 1999; PIHLANTO-LEPÄLLÄ, 2001; YADA, 2004). Essa hidrólise pode ocorrer *in vivo*, durante a passagem pelo trato gastrointestinal, ou *in vitro*, durante o processamento dos alimentos ou por bactérias hidrolíticas (MEISEL & BOCKELMANN, 1999; CLARE & SWAISGOOD, 2000; KORHONEN, 2009). Adicionar compostos bioativos a sistemas alimentícios é uma forma simples de desenvolver alimentos funcionais que

promovam benefícios fisiológicos ou reduzam o risco do surgimento de doenças (TAVARES et al, 2014).

As proteínas lácteas têm sido consideradas uma das principais fontes de peptídeos bioativos (MEISEL & BOCKELMANN, 1999; KORHONEN, 2009; YADAV et al, 2015). A maioria dos peptídeos já conhecidos e caracterizados foi gerada através de hidrólise por enzimas do trato gastrointestinal, particularmente a tripsina (MEISEL & BOCKELMANN, 1999). No entanto, outras enzimas também podem ser utilizadas na produção desses peptídeos, como a pepsina e a quimotripsina, além de enzimas de origem animal, bacteriana, fúngica e vegetal (MEISEL & BOCKELMAN, 1999; KILARA & PANYAM, 2007).

A hidrólise das proteínas pode ser realizada com o uso de ácidos, bases ou enzimas. A hidrólise química tende a ser um processo de mais difícil controle, sendo totalmente inespecífica, além de formar produtos de reduzido valor nutricional, podendo destruir aminoácidos, causar sua racemização ou formar substâncias tóxicas (CLEMENTE, 2000). A hidrólise enzimática, por outro lado, é preferível à hidrólise química por ocorrer em condições mais brandas de pH e temperatura, possuir alta especificidade, fácil controle de reação e formação mínima de subprodutos indesejados (MANNHEIM & CHERYAN, 1992; CLEMENTE, 2000).

Com o crescente interesse na utilização de produtos derivados do soro lácteo, além do desenvolvimento de aditivos e suplementos dietéticos minimamente processados, a utilização de peptídeos bioativos derivados do leite tem se mostrado uma opção promissora para aplicação em alimentos e na saúde humana.

Uma grande dificuldade da aplicação de peptídeos bioativos é a sua baixa estabilidade a hidrólise e proteólise e a perda de sua atividade (BRANDELLI, 2012; SILVA, 2013). Dessa forma, se faz necessário o emprego de métodos que sejam capazes de manter esses peptídeos íntegros e protegidos de degradação para desempenharem suas atividades. Nesse âmbito, a microencapsulação surge como um meio promissor para possibilitar a aplicação de peptídeos bioativos.

A microencapsulação é um processo que consiste na imobilização de partículas de uma substância ativa sólida, líquida ou gasosa em cápsulas comestíveis, que fornecem uma barreira física entre a substância internalizada e o meio externo, protegendo o composto encapsulado de condições ambientais adversas (AZEREDO, 2005; POSHADRI & KUNA, 2010; ONWULATA, 2012).

Com relação a sua arquitetura, as microcápsulas podem ser divididas em duas categorias (AZEREDO, 2005; SUAVE et al, 2006): microesferas e microcápsulas. As

microesferas se constituem por uma matriz na qual a substância de interesse se encontra uniformemente dispersa. No entanto, parte dessa substância permanece exposta à superfície, não existindo uma barreira definida entre a matriz interna e o meio externo. Essa técnica de encapsulação também pode ser chamada de imobilização e pode, muitas vezes, não ser suficiente para proteger a substância de interesse de condições ambientais adversas (DE VOS et al, 2010). Já as microcápsulas, que são consideradas a verdadeira encapsulação, são formadas por uma membrana polimérica contínua que forma uma parede ao redor de um núcleo interno, no qual se encontra contida a substância encapsulada.

Existem diversos motivos para a aplicação da microencapsulação na indústria de alimentos, sendo que os principais são (SHAHIDI & HAN, 1993; AZEREDO, 2005; MOZAFARI et al, 2006; BOZZUTO & MOLINARI, 2015):

- Reduzir a reatividade da substância internalizada com o exterior;
- Reduzir a evaporação ou perda da matriz interna para o ambiente;
- Facilitar a manipulação do material;
- Promover uma liberação controlada da substância;
- Mascaram sabores ou odores desagradáveis do componente;
- Permitir uma dispersão homogênea da substância em uma formulação alimentícia;
- Proteger a substância encapsulada de condições adversas e de degradação ou inativação precoce após sua administração.

Além de suas diversas aplicações na indústria alimentícia, a microencapsulação também oferece vantagens quando comparada a métodos convencionais de administração de substâncias de interesse na saúde humana, como melhora na eficácia, toxicidade reduzida e uma maior aceitação pelos pacientes à administração de uma droga, além de ser um método mais conveniente aos pacientes (SINGH et al, 2010; BOZZUTO & MOLINARI, 2015). Além disso, a encapsulação pode reduzir significativamente a quantidade de material necessária para exercer um efeito específico (MOZAFARI et al, 2006).

Diversas técnicas de encapsulação têm sido desenvolvidas, porém não existe uma única técnica aplicável à encapsulação de todas as substâncias bioativas (DE VOS et al, 2010; TAVARES et al, 2014). A escolha da técnica a ser utilizada depende da natureza da substância a ser encapsulada e do material que irá compor seu revestimento (TAVARES et al, 2014). Por sua característica anfipática, ou seja, sua capacidade de comportar tanto substâncias hidrofílicas como hidrofóbicas, em adição à sua versatilidade, capacidade de deformação de sua superfície e o fato de não serem tóxicos, tornam os lipossomas populares

em estudos de encapsulação de compostos bioativos para aplicação na indústria alimentícia (MOZAFARI et al, 2006; DATE, JOSHI & PATRAVALE, 2007)

Os lipossomas são vesículas lipídicas que consistem uma ou mais camadas concêntricas, envolvendo um compartimento aquoso (MOZAFARI et al, 2006; DATE, JOSHI & PATRAVALE, 2007; BOZZUTO & MOLINARI, 2015). Eles são formados pela agregação de moléculas de fosfolipídeos quando colocadas em meio aquoso, em função de seu comportamento anfipático, e, caso seja fornecida uma quantidade suficiente de energia a esses agregados, eles podem se organizar em camadas vesiculares fechadas, formando uma ou mais camadas concêntricas (DATE, JOSHI & PATRAVALE, 2007; SILVA, 2013; BOZZUTO & MOLINARI, 2015).

A característica anfipática dos lipossomas, em adição à possibilidade de serem produzidos com ingredientes naturais em escala industrial e de poderem ser direcionados a sítios específicos no organismo, confere aos lipossomas vantagens em relação à encapsulação utilizando outros materiais, como quitosana e alginato (MOZAFARI et al, 2006).

Apesar dos lipossomas serem amplamente utilizados como objeto de estudos de carreadores de agentes terapêuticos, como ferramenta analítica, assim como modelo de membranas biológicas (SILVA, 2013), o estudo da microencapsulação de compostos bioativos com aplicação na saúde humana é relativamente recente (MOZAFARI et al, 2006).

II. JUSTIFICATIVA

O aumento no consumo mundial de leite e de seus derivados, que vem ocorrendo nos últimos anos, traz junto consigo o problema do gerenciamento do grande excedente gerado da produção de soro na indústria de laticínios. Uma vez que grande parte desse excedente é descartada, causando um grande impacto ambiental, existe a necessidade de encontrar novas alternativas que possibilitem a redução desse desperdício. Uma alternativa promissora é a utilização de peptídeos bioativos que podem ser gerados a partir de proteínas do soro. No entanto, a aplicação desses peptídeos se torna problemática, uma vez que estes são facilmente degradados por condições ambientais adversas. Surge, então, a microencapsulação como uma alternativa simples para contornar essa dificuldade. A motivação para esse trabalho foi contribuir com o estabelecimento de técnicas facilmente aplicáveis para a encapsulação de peptídeos bioativos provenientes do soro de leite.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo geral

Avaliar a encapsulação em lipossomas de peptídeos bioativos gerados por hidrólise enzimática de soro de leite ovino.

III.2 Objetivos específicos

- Desenvolver lipossomas contendo os peptídeos bioativos;
- Testar atividades antioxidante e anti-hipertensiva dos peptídeos livres e encapsulados;
- Caracterizar os lipossomas contendo peptídeos bioativos através da determinação do tamanho das partículas, sua polidispersividade e seu potencial zeta.

IV. ARTIGO CIENTÍFICO

Carta de submissão no formato exigido pelo periódico “*Food Chemistry*”
(<http://www.journals.elsevier.com/food-chemistry/>)

Diego Bertolini¹, Ana Paula F. Corrêa², Nathalie A. Lopes³, Flávio F. Veras⁴, Cristian M. B. Pimilla⁵, Adriano Brandelli⁶

¹ diego.bertolini1@gmail.com

² folmercorrea@gmail.com

³ nathalie.lopes@hotmail.com

⁴ ffveras@yahoo.com.br

⁵ christian_mao@hotmail.com

⁶ abrand@ufrgs.br

1 **Caracterização de nanovesículas contendo peptídeos bioativos obtidos do soro de leite**
2 **ovino**

3 Diego Bertolini^{a*}, Ana Paula F. Corrêa^a, Nathalie A. Lopes^a, Flávio F. Veras^a, Cristian M. B.
4 Pimilla^a, Adriano Brandelli^a

5

6 ^a Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciência e Tecnologia dos
7 Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Fone + 55 51 3308 6681

8 * Endereço para correspondência: Diego Bertolini (diego.bertolini1@gmail.com),
9 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos,
10 Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

11 **Resumo**

12 O soro de leite é um subproduto formado na produção de leite e caseína. Esse
13 subproduto compõe a fração aquosa do leite, além de conter cerca de metade de seus
14 componentes solúveis. Apesar de possuir excelentes qualidades nutricionais, os rejeitos de sua
15 produção causam grande impacto ambiental. A produção de peptídeos bioativos de suas
16 proteínas é uma alternativa viável para solucionar esse problema, além de esses peptídeos
17 possuírem aplicabilidade na bioconservação de alimentos. Essa aplicabilidade, no entanto, só
18 é possível com métodos de microencapsulação que os protejam de degradação. Nesse
19 trabalho, peptídeos bioativos do soro de leite ovino foram encapsulados em lipossomas, que
20 foram caracterizados quanto a sua estabilidade e avaliados quanto à sua capacidade de
21 permitir que os peptídeos encapsulados exerçam suas atividades biológicas. Mesmo
22 ligeiramente instáveis, os lipossomas se mantiveram com parâmetros constantes ao longo de
23 um mês, além de impedirem perda exacerbada de atividade biológica dos peptídeos.

24

25 **Palavras-chave:** peptídeos bioativos, microencapsulação, lipossomas, soro de leite

26

27 **Destaques**

28 Peptídeos bioativos são capazes de exercer funções biológicas no organismo.

29 Proteínas do soro de leite são importantes fontes de peptídeos bioativos.

30 A microencapsulação é capaz de proteger peptídeos bioativos de degradação.

31 Lipossomas contendo esses peptídeos são relativamente estáveis.

32 A encapsulação em lipossomas reduziu perda de atividade dos peptídeos em 1 mês.

33 **1 Introdução**

34 O leite é uma das principais fontes de proteína na dieta, tanto de animais jovens quanto
35 de humanos, sendo considerado um dos alimentos mais completos encontrados na natureza
36 (Roman & Sgarbieri, 2005; Sabahelkhier, Faten & Omer, 2012). Sua produção possui grande
37 importância no cenário econômico e social mundial, se destacando a produção,
38 principalmente, de rebanhos bovinos, caprinos, bubalinos e ovinos (Mendonça, Sá, Carvalho
39 & Melo, 2010). O leite ovino difere do leite das demais espécies principalmente pela riqueza
40 de seus constituintes (Brito et al, 2006; Ribeiro et al, 2007) e é um produto bastante
41 valorizado por suas características químicas diferenciadas (Suárez & Buseti, 2006), o que o
42 torna bastante popular como ingrediente na fabricação de queijos (Suárez & Buseti, 2006;
43 Ribeiro et al, 2007).

44 As proteínas lácteas se dividem em duas principais frações: as caseínas, que
45 representam cerca de 80% das proteínas totais do leite, e as proteínas do soro, que se
46 encontram em solução (Roman & Sgarbieri, 2005). As caseínas são largamente utilizadas na
47 indústria alimentícia em virtude de suas características físico-químicas, nutricionais e
48 funcionais, podendo tanto ser adicionadas como ingredientes diretamente em formulações
49 alimentícias, quanto sendo aplicadas para aumentar o valor agregado do alimento (Roman &
50 Sgarbieri, 2005; Alvares, Risso, Gatti, Burgo & Sala, 2007). Já o soro constitui a fração
51 aquosa do leite e possui cerca da metade de seus componentes solúveis (Mawson, 1994).

52 Em adição a suas propriedades nutricionais, as proteínas do soro do leite também são
53 importantes fontes de peptídeos capazes de exercer atividades biológicas sobre o organismo
54 humano, conhecidos como peptídeos bioativos (Meisel & Bockelmann, 1999; Korhonen,
55 2009). Esses peptídeos encontram-se criptografados nas sequências primárias de proteínas e
56 são liberados por meio de hidrólise (Meisel & Bockelmann, 1999; Pihlanto-Lepällä, 2001).

57 Tais componentes podem ser adicionados a formulações alimentícias com o intuito de
58 desenvolver alimentos funcionais que tragam benefícios à saúde da população (Tavares,
59 Croguennec, Carvalho & Bouhallab, 2014).

60 No entanto, a aplicabilidade de peptídeos bioativos é limitada por sua baixa
61 estabilidade a degradação, com conseqüente perda de sua atividade (Brandelli, 2012), sendo
62 necessário o emprego de métodos que permitam contornar esse problema. Uma possível
63 solução é a microencapsulação, ou seja, o empacotamento dos peptídeos em cápsulas
64 comestíveis, que constituem uma barreira protetora entre o composto encapsulado e o meio
65 externo (Azeredo, 2005). Apesar de existirem diversas técnicas diferentes de encapsulação, os
66 lipossomas são os mais indicados para a encapsulação de peptídeos, em especial por sua
67 característica anfipática e por não apresentarem toxicidade (Mozafari et al, 2006; Date, Joshi
68 & Petravale, 2007; Tavares et al, 2014). Os lipossomas são formados por moléculas de
69 fosfolipídios que, quando colocadas em ambiente aquoso, se agregam formando vesículas
70 fechadas que envolvem um compartimento aquoso, onde são confinados os peptídeos de
71 interesse (Date et al, 2007; Bozzuto & Molinari, 2015). Apesar de os lipossomas já serem
72 utilizados como carreadores de substâncias de importância médica, o estudo da sua aplicação
73 em alimentos é relativamente recente (Mozafari et al, 2006).

74 Nesse trabalho, foram produzidos lipossomas contendo peptídeos bioativos obtidos a
75 partir da hidrólise de soro liofilizado de queijo ovino, realizada por uma preparação
76 enzimática bacteriana (Corrêa, Daroit & Brandelli, 2010). Os lipossomas produzidos foram
77 caracterizados quanto seu diâmetro médio, polidispersividade e potencial zeta e os peptídeos
78 encapsulados foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante e anti-hipertensiva,
79 objetivando avaliar a potencial aplicabilidade desses peptídeos encapsulados na indústria
80 alimentícia.

81

82 **2 Metodologias**

83 ***2.1 Microrganismo e produção da enzima bacteriana***

84 Bactérias do gênero *Bacillus* sp. P7 foram utilizadas para produção da enzima
85 proteolítica. A manutenção das bactérias foi realizada em ágar Brain-Heart Infusion (BHI).
86 Para produção da enzima, as bactérias foram incubadas em meio mineral contendo farinha de
87 pena (NaCl a 0,5 g/L, KH₂PO₄ a 0,4 g/L, K₂HPO₄ a 0,3 g/L, farinha de pena a 10 g/L) por 48
88 horas em agitador rotativo a 125 rpm à temperatura de 37 °C.

89 ***2.2 Purificação parcial da enzima bacteriana***

90 Após a incubação, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o
91 sobrenadante foi reservado para precipitação das proteínas com sulfato de amônio a 390 g/L
92 (taxa de saturação de 60%). A solução contendo as enzimas precipitadas foi, então,
93 centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o pellet foi ressuspenso em tampão Tris-
94 HCl 20 mM pH 8,0. Em seguida, a amostra contendo as enzimas concentradas foi aplicada em
95 coluna cromatográfica de gel-filtração Sephadex G-100 previamente equilibrada com tampão
96 Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Foram coletadas 15 frações de 1 mL, que foram testadas quanto a
97 sua atividade proteolítica. Frações apresentando maior atividade foram reunidas em um *pool* e
98 utilizadas na hidrólise enzimática.

99 ***2.3 Ensaio de atividade proteolítica***

100 A atividade proteolítica das frações coletadas após passagem pela coluna
101 cromatográfica Sephadex G-100 foi avaliada utilizando azocaseína como substrato. A reação
102 continha 100 µL da preparação enzimática, 100 µL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e 100
103 µL de azocaseína 10 mg/mL. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e a reação foi

104 encerrada com a adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). Após
105 centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e misturado a 200 µL
106 de NaOH 1,8 N para leitura de absorbância a 420 nm.

107 **2.4 Hidrólise enzimática**

108 Para realização da hidrólise, soro liofilizado de leite ovino foi dissolvido em tampão
109 Tris-HCl 20 mM pH 8,0 a uma concentração de 10 g/L. A solução foi incubada com a pool
110 das proteases bacterianas P7 (2% v/v) a 45°C por 4 horas. A reação foi encerrada por
111 aquecimento. O hidrolisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante
112 foi submetido a liofilização.

113 **2.5 Purificação parcial dos peptídeos bioativos**

114 Após liofilização, o hidrolisado foi diluído em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, a uma
115 concentração de 200 mg/mL. Após, foi aplicado em coluna cromatográfica de gel-filtração
116 Sephadex G-25 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Foram
117 coletadas 36 frações de 1 mL. Foram selecionadas as frações que apresentaram considerável
118 atividade antioxidante, que foram reunidas em um *pool* e submetidos a ultrafiltração por
119 membrana com *cutoff* de 3 kDa.

120 **2.6 Determinação da atividade antioxidante**

121 A avaliação da atividade antioxidante dos peptídeosantes e após encapsulação a foi
122 realizada pelo ensaio de captura do radical ABTS [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino)-6-
123 ácido sulfônico], que envolve a geração do radical cromóforo ABTS^{•+} por oxidação do
124 composto ABTS por persulfato de potássio. O radical foi produzido pela reação entre as
125 soluções ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM. A mistura foi deixada em repouso no
126 escuro à temperatura ambiente *overnight*. Para o experimento, o radical ABTS^{•+} foi diluído

127 em PBS 5 mM pH 7,4 até alcançar absorvância de 0,7 (\pm 0,02) a 734 nm. Amostras de 10 μ L
128 foram misturadas com 1 mL da solução diluída de ABTS^{•+} e a absorvância foi medida após 6
129 minutos.

130 **2.7 Determinação da atividade anti-hipertensiva**

131 A atividade anti-hipertensiva dos peptídeos foi avaliada pela inibição da enzima
132 conversora de angiotensina I (ECA). Amostras de 20 μ L foram incubada com 100 μ L de
133 solução tamponada contendo o substrato (hipuril-histidil-leucina 5 mM em tampão HEPES-
134 HCl 50 mM) e 40 μ L de ECA, a 37°C por 30 minutos. A reação foi finalizada com a adição de
135 150 μ L de HCl 1 M. Em seguida, o ácido hipúrico liberado foi extraído com 1 mL de acetato
136 de etila e a fase orgânica foi transferida para um tubo de ensaio para evaporação do solvente
137 por calor. O resíduo foi suspenso em 800 μ L de água destilada e sua absorvância a 228 nm
138 foi medida. A atividade de inibição da ECA foi expressa como uma porcentagem de acordo
139 com a fórmula:

140
$$\text{Atividade inibitória (\%)} = \left[1 - \frac{(A-C)}{(B-D)} \right] \times 100$$
, na qual A é a absorvância do
141 substrato somada à da amostra e da ECA, B é a absorvância na ausência da amostra, C é a
142 absorvância na ausência da ECA e D, a absorvância na ausência da amostra e da ECA.

143 **2.8 Encapsulação**

144 A metodologia utilizada para desenvolver os lipossomas foi realizada de acordo com
145 Malheiros et al (2010), com algumas adaptações. Foi feita a dissolução de 7,6 mg de
146 fosfatidilcolina em 15 mL de clorofórmio, em balão com fundo redondo. Para formação de
147 um filme de fosfatidilcolina no fundo do balão, o clorofórmio foi evaporado com o uso de
148 rotoevaporador (90 rpm a 40°C). Após evaporação total do solvente, o balão contendo o filme
149 de fosfatidilcolina foi armazenado em dessecador *overnight*. Para diluição do filme e

150 formação dos lipossomas, primeiramente 2 mL da solução de peptídeo foram aquecidos a
151 60°C durante 1 minuto, junto com 3 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0, sendo, em seguida,
152 transferida para o balão contendo o filme e homogeneizada sob leve agitação, em
153 aquecimento a 60°C, durante 2 minutos, seguidos por 2 minutos de descanso. Esse processo
154 foi repetido mais 1 vez e a solução foi transferida para um tubo de ensaio. O tubo foi
155 submetido a 5 ciclos de aquecido a 60°C por 2 minutos seguidos de 1 minuto em agitação
156 vigorosa em vórtex. A diminuição e uniformização do tamanho dos lipossomas foi feita com
157 o uso de sonicador, com 5 repetições de 1 minuto a potência de 50%, com 1 minuto de
158 descanso entre as repetições. Em seguida, a solução contendo os lipossomas foi filtrada em
159 filtro de 0,22 μm , em tubos eppendorf estéreis, para eliminar possíveis contaminações.

160 **2.9 Medidas de espalhamento de luz (DLS)**

161 O tamanho médio das partículas e sua polidispersividade (PDI), ou seja, sua
162 distribuição de tamanho, foram determinados pelo equipamento de espalhamento de luz
163 dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS) Brookhaven com configurações padrão (BI-200
164 M goniômetro, correlator digital BI-9000AT), utilizando laser He-Ne de 35 mV e
165 comprimento de onda de 632,8 nm como fonte de luz, com ângulo de incidência de 90°. O
166 equipamento pertence ao Departamento de Química da UFRGS. As análises foram feitas no
167 dia seguinte à encapsulação, após 15 dias e ao final de 1 mês.

168 **2.10 Potencial zeta (ζ)**

169 A determinação do potencial ζ dos lipossomas foi feita utilizando o equipamento
170 ZetaPALS Brookhaven. Para a análise, os lipossomas foram diluídos em tampão fosfato 10
171 mM pH 7,0. O equipamento pertence ao Departamento de Química da UFRGS. As medições
172 do potencial foram feitas no dia seguinte à encapsulação, após 15 dias e ao final de 1 mês.

174 **2.11 Análise estatística**

175 Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram
176 analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Valores p
177 $<0,05$ foram considerados como indicativos de significância. Todos os experimentos foram
178 realizados em triplicatas.

179

180 **3 Resultados e discussão**

181 **3.1 Purificação parcial da enzima bacteriana**

182 O objetivo geral de um processo de purificação de proteínas não é apenas a remoção
183 de contaminantes indesejados, mas também a concentração da proteína de interesse e sua
184 transferência para um ambiente onde esta apresenta-se estável e adequada para a aplicação
185 pretendida. A pureza de proteínas é pré-requisito para o estudo de suas estruturas e funções,
186 ou para suas aplicações potenciais, sendo que o nível de purificação requerido depende do uso
187 final da proteína (Queiroz et al, 2001).

188 Após precipitação, centrifugação e ressuspensão, a preparação enzimática foi aplicada
189 em coluna cromatográfica Sephadex G-100 para separação em 15 frações de 1 mL, sendo, em
190 seguida, realizado o ensaio de atividade proteolítica com azocaseína com todas as frações. Foi
191 verificado que a atividade enzimática se concentrava entre as frações 7 e 10, sendo observado
192 o mesmo nas passagens seguintes da amostra de enzima pela coluna. Todas as frações
193 apresentando atividade proteolítica considerável foram reunidas em um *pool*, utilizado na
194 hidrólise do soro de queijo ovino liofilizado.

195 A cromatografia líquida de gel-filtração separa moléculas basicamente por tamanho e
196 massa molecular, sendo que moléculas maiores são eluidas da coluna antes das moléculas

197 menores. Assim, moléculas menores têm acesso a uma maior porção dos poros da resina na
198 coluna e, com isso, a migração através da mesma ocorre em menor velocidade (Popovici &
199 Schoenmarkers, 2005; Yu et al., 2006).

200 **3.2 Purificação parcial dos peptídeos bioativos**

201 Os hidrolisados liofilizados de soro de leite ovino no tempo de 4 horas foram
202 utilizados neste trabalho, pois esse período de hidrólise gerou hidrolisados com melhores
203 atividades antioxidante e anti-hipertensiva em um trabalho anterior (Corrêa et al, 2011).

204 Depois de realizada a hidrólise enzimática utilizando preparação enzimática
205 bacteriana, a solução contendo os peptídeos foi aplicada em coluna cromatográfica Sephadex
206 G-25 e foram coletadas 36 frações de 1 mL. Foi medida a atividade antioxidante, pelo método
207 ABTS, de todas as frações para identificar em quais se concentrava a atividade biológica.
208 Também foi medida a absorbância a 280 nm para acompanhamento do perfil proteico das
209 frações. O perfil de absorbância é apresentado na figura 1. Verificou-se que a atividade
210 antioxidante se concentrava nas frações 7 e 8. Nas passagens seguintes da amostra de
211 peptídeos pela coluna, foram coletadas apenas 15 frações, das quais também foram
212 selecionadas aquelas com atividade antioxidante considerável. As frações selecionadas foram
213 reunidas em um *pool* e submetidas a ultrafiltração por membrana de 3 kDa.

214 Após ultrafiltração, a solução contendo os peptídeos já parcialmente purificados foi
215 separada em 2 frações: uma filtrada e uma retida pelo filtro. Ambas as frações foram
216 submetidas a avaliações de atividades biológicas, pelos ensaios de atividade antioxidante e
217 atividade anti-hipertensiva. As atividades biológicas de ambas as frações são apresentadas na
218 figura 2.

219 A fração retida, quando avaliada pelo método ABTS, apresentou atividade superior à
220 fração filtrada. Assim, pode-se inferir que estes peptídeos podem ser empregados pela

221 indústria de alimentos na prevenção de reações de oxidação (como peroxidação lipídica) que
 222 levam à diminuição da vida de prateleira e deterioração da qualidade nutricional e sensorial de
 223 alimentos. Atividade antioxidante, mensurada pelo método ABTS, também foi observada em
 224 queijos ovinos e caprinos (Silva et al., 2006).

225 A capacidade de inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA)
 226 da fração retida também apresentou atividade superior à fração filtrada. Em estudo realizado
 227 anteriormente, caseinatos de sódio de leites bovino, ovino, suíno, caprino, humano ou
 228 bubalino, hidrolisados com uma protease parcialmente purificada de *Lactobacillus helveticus*
 229 PR4, mostraram atividade inibitória da ECA de 2 a 43% (Minervini et al., 2003).

230 Sendo assim, a fração retida foi selecionada para seguir com o processo de
 231 encapsulação em lipossomas.

232 **3.3 Caracterização dos lipossomas**

233 No dia seguinte à encapsulação dos peptídeos, foram feitas as análises de diâmetro
 234 médio e polidispersividade, ou distribuição de tamanho, dos lipossomas, com o aparelho DLS.
 235 Também foi realizada a medição do potencial zeta dos lipossomas. A tabela 1 apresenta os
 236 valores obtidos.

237 **Tabela 1:** Medidas de espalhamento de luz e de potencial ζ . Os lipossomas
 238 apresentaram diâmetro médio dentro da escala nanométrica. A PDI e o potencial ζ se
 239 apresentaram fora da faixa de estabilidade proposta por outros autores, porém, todos os
 240 parâmetros se mantiveram constantes ao longo de 1 mês.

	Dias após encapsulação		
	1	15	30
Diâmetro (nm)	166,667 ± 1,385 ^a	163,867 ± 7,215 ^a	250,733 ± 56,358 ^a
PDI	0,446 ± 0,027 ^a	0,430 ± 0,036 ^a	0,199 ± 0,190 ^a
Potencial ζ	-16,70 ± 7,06 ^a	-17,61 ± 9,11 ^a	-13,20 ± 9,39 ^a

241 Ao longo de 1 mês, o diâmetro dos lipossomas se manteve relativamente constante,
242 por volta de 160 nm. Esses valores são semelhantes aos encontrados por Malheiros et al.
243 (2011) e Taylor et al. (2007), que desenvolveram lipossomas com diâmetro médio por volta
244 de 150 nm. Os lipossomas apresentaram uma PDI por volta de 0,440, valores maiores do que
245 os encontrados na literatura, como 0,240, em Malheiros et al. (2011). Valores de PDI até 0,3
246 são considerados aceitáveis para lipossomas contendo materiais biológicos, sendo
247 considerados muito polidispersos lipossomas com valores de PDI superiores.

248 O potencial zeta mede a carga que se forma na superfície de partículas quando
249 colocadas em solução aquosa. Essa carga possui uma forte influência sobre a estabilidade de
250 soluções coloidais, uma vez que, quanto maior o valor em módulo do potencial zeta, maior
251 será a repulsão eletrostática das partículas em solução, dificultando sua agregação. Cargas
252 entre -20 mV e +20 mV caracterizam lipossomas menos estáveis, sendo que valores fora
253 dessa faixa indicam uma maior estabilidade. Os valores que encontramos são, em módulo,
254 menores que 20 mV, valores diferentes dos considerados ideais em trabalhos já descritos. No
255 entanto, esses valores se mantiveram negativos ao longo de um mês, além de não terem
256 sofrido uma diminuição acentuada nesse período. Taylor et al. (2007) obtiveram valores de
257 potencial zeta por volta de -8,30 mV para lipossomas vazios, enquanto que Malheiros et al.
258 (2011) obtiveram potenciais por volta de -25 mV para lipossomas contendo peptídeos
259 antimicrobianos, que se mantiveram relativamente constantes ao longo de 24 dias. Diferentes
260 materiais incorporados em lipossomas podem causar diferentes efeitos no tamanho das
261 vesículas, na variação de tamanho e no potencial zeta (Silva et al, 2008), também podendo,
262 portanto, afetar sua estabilidade.

263

264 **3.4 Atividade antioxidante**

265 Também foi feita a análise da atividade antioxidante dos peptídeos livres e
266 encapsulados ao longo de 1 mês, a fim de verificar se essa atividade se mantém mesmo após a
267 encapsulação em lipossomas, e também com o passar do tempo. A atividade antioxidante dos
268 peptídeos foi avaliada pelo ensaio de captura do radical ABTS. A redução desse composto
269 leva à sua conversão a um composto sem cor na presença de antioxidantes. Os peptídeos
270 livres apresentavam, em princípio, uma atividade de aproximadamente 79% (figura 3). Essa
271 atividade é inferior à obtida por Corrêa et al. (2011), utilizando os mesmos materiais e
272 metodologias, possivelmente indicando uma menor eficiência na hidrólise do soro. Conforme
273 demonstrado na figura 3, a encapsulação causou uma diminuição da atividade antioxidante
274 quando comparada aos peptídeos não encapsulados, resultando em uma atividade,
275 inicialmente, de aproximadamente 54%. Além disso, percebe-se que a atividade foi sendo
276 gradualmente perdida ao longo de 1 mês, tanto dos peptídeos livres quanto dos encapsulados,
277 sendo que essa perda de atividade após 1 mês foi mais acentuada nos peptídeos livres. Uma
278 possível causa para a perda de atividade causada pela encapsulação poderia ser uma baixa
279 eficiência de encapsulação, ou seja, durante o processo de formação dos lipossomas, uma
280 quantidade inferior à desejável pode ter sido internalizada. No entanto, essa análise ainda
281 deverá ser realizada para sua confirmação. A sonicação, utilizada para diminuição e
282 uniformização do tamanho das vesículas, também é um fator que pode ter influência na perda
283 de atividade dos peptídeos encapsulados. De acordo com Taylor et al. (2005), sonicadores do
284 tipo sonda, como o utilizado neste trabalho, são mais destrutivos que sonicadores tipo banho,
285 por causarem superaquecimento localizado gerado pela alta intensidade da sonicação, levando
286 à desnaturação dos peptídeos.

287

288 **4 Conclusões**

289 A indústria de alimentos é continuamente confrontada com desafios tecnológicos para
290 a produção de alimentos seguros e de alta qualidade e, para atender às demandas dos
291 consumidores, no aumento do consumo de alimentos naturais e funcionais e/ou de
292 ingredientes alimentares.

293 Com esse estudo, demonstramos ser possível desenvolver lipossomas capazes de
294 conter peptídeos bioativos provenientes do soro de leite ovino. Pelas análises de espalhamento
295 de luz dinâmico e potencial zeta, observamos que os lipossomas apresentam parâmetros de
296 estabilidade, de certo modo, inferiores ao desejável, apesar de terem se mantido
297 satisfatoriamente estáveis ao longo de 1 mês. Já as análises de atividade antioxidante
298 demonstraram que a encapsulação dos peptídeos em lipossomas é eficaz em reduzir a perda
299 de sua atividade biológica, mesmo causando, por si própria, certa diminuição nessa atividade.

300 **Referências**

- 301 Alvarez, E. M., Risso, P. H., Gatti, C. A., Burgos, M. & Sala, V. S. (2007). Calcium-induced
302 aggregation of bovine caseins: Effect of phosphate and citrate. *Colloid and Polymer Science*,
303 285, 507–514.
- 304 Azeredo, H. M. C. (2005). Encapsulação: Aplicação À Tecnologia De Alimentos. *Alimentos e*
305 *Nutrição*, 16, 89–97.
- 306 Bozzuto, G. & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International journal*
307 *of nanomedicine*, 10, 975–999.
- 308 Brandelli, A. (2012). Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial
309 Peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 731–741.
- 310 Brito, M. A. et al. (2006). Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do
311 Brasil: variações na gestação e na lactação. *Ciência Rural*, 36, 942–948.
- 312 Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J. & Brandelli, A. (2010). Characterization of a keratinase
313 produced by *Bacillus* sp . P7 isolated from an Amazonian environment. *International*
314 *Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 1–6.
- 315 Corrêa, A. P. F. et al. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of
316 ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food*
317 *and Agriculture*, 91, 2247–2254.
- 318 Date, A. A., Joshi, M. D. & Patravale, V. B. (2007). Parasitic diseases: Liposomes and
319 polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59,
320 505–521.

- 321 Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal*
322 *of Functional Foods*, 1, 177–187.
- 323 Malheiros, P. S., Micheletto, Y. M. S., Silveira, N. P. & Brandelli, A. (2010). Development
324 and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide
325 nisin. *Food Research International*, 43, 1198–1203.
- 326 Malheiros, P. S. Sant’Anna, V., Micheletto, Y. M. S., Silveira, N. P. & Brandelli, A. (2011).
327 Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization
328 and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 3545–
329 3552.
- 330 Mawson, A. J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource*
331 *Technology*, 47, 195–203.
- 332 Meisel, H. & Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins:
333 Proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek*,
334 *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 207–215.
- 335 Mendonça, J. F. P., Sá, C. V. G. C, Carvalho, L. B. & Melo, C. B. (2010). Composição físico-
336 química do leite de ovelhas e principais fatores que interferem na sua qualidade. *Ciências*
337 *Veterinárias nos Trópicos*, 13, 38–44.
- 338 Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., & Gobbetti, M. (2003).
339 Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus*
340 *helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and*
341 *Environmental Microbiology*, 69, 5297-5305.

- 342 Mozafari, M. R. et al. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of
343 antioxidants and their role in food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 13, 125–
344 135.
- 345 Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins. *Trends*
346 *in Food Science & Technology*, 11, 347–356.
- 347 Popovici, S. T.; Schoenmakers, P. J. (2005). Fast size-exclusion chromatography –
348 Theoretical and practical considerations. *Journal of Chromatography A*, 1099, 92-102.
- 349 Queiroz, J. A.; Tomaz, C. T.; Cabral, J. M. S. (2001). Hydrophobic interaction
350 chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, 87, 143-159.
- 351 Ribeiro, L. C. et al. (2007). Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas
352 Santa Inês tratadas com ocitocina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 438–444.
- 353 Roman, J. A. & Sgarbieri, V. C. (2005). Obtenção e caracterização química e nutricional de
354 diferentes concentrados de caseína. *Revista de Nutrição*, 18, 75–83.
- 355 Sabahelkhier, M. K., Faten, M. M. & Omer, F. I. (2012). Comparative determination of
356 biochemical constituents between animals (goat, sheep, cow and camel) milk with human
357 milk. *Research Journal of Recent Sciences*, 1, 69–71.
- 358 Silva, S. V., Pihlanto, A., & Malcata, F. X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine
359 cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy*
360 *Science*, 89, 3336-3344.
- 361 Silva, R., Little, C., Ferreira, H. & Cavaco-Paulo, A. (2008). Incorporation of peptides in
362 phospholipid aggregates using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 1026–1032.

- 363 Suárez, V. H. & Busetti, M. R. (2006). Lechería ovina en la Argentina. *Boletín de*
364 *Divulgación Técnica INTA*, 90, 195-204.
- 365 Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F. & Bouhallab, S. (2014). Milk proteins as
366 encapsulation devices and delivery vehicles: applications and trends. *Trends in Food Science*
367 *and Technology*, 37, 5–20.
- 368 Taylor, T. M. & Davidson, P. M. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and
369 agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587–605.
- 370 Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D. & Weiss, J. (2007).
371 Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size, and
372 encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2, 1–9.
- 373 Yu, C. M.; Mun, S.; Wang, N. H. L. (2006). Theoretical analysis of the effects of reversible
374 dimerization in size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1132, 99-108.

Legendas das figuras

Figura 1: *Perfil de absorvância dos peptídeos bioativos após passagem pela coluna Sephadex G-25.* A quantidade de proteína de cada fração é representada pela sua absorvância a um comprimento de onda de 280 nm. Essa quantidade está correlacionada com a atividade antioxidante da fração.

Figura 2: *Atividade biológica das frações filtrada e retida, formadas após ultrafiltração dos peptídeos bioativos.* Atividade biológica foi caracterizada pelas atividades antioxidante (A) e anti-hipertensiva (B). A fração retida apresentou atividades mais altas.

Figura 3: *Atividade antioxidante dos peptídeos parcialmente purificados encapsulados e não encapsulados.* A atividade dos peptídeos se apresentou reduzida pela encapsulação. Ambos os peptídeos, encapsulados e não encapsulados, apresentaram redução de atividade ao longo de 1 mês. A perda de atividade dos peptídeos encapsulados foi estatisticamente significativa em todos os dias de análise, enquanto que a perda dos peptídeos livres só foi significativa do segundo para o terceiro dia de análise. No entanto, a perda de atividade ao longo de um mês foi mais acentuada nos peptídeos livres em relação aos encapsulados.

Figuras

Figura 1

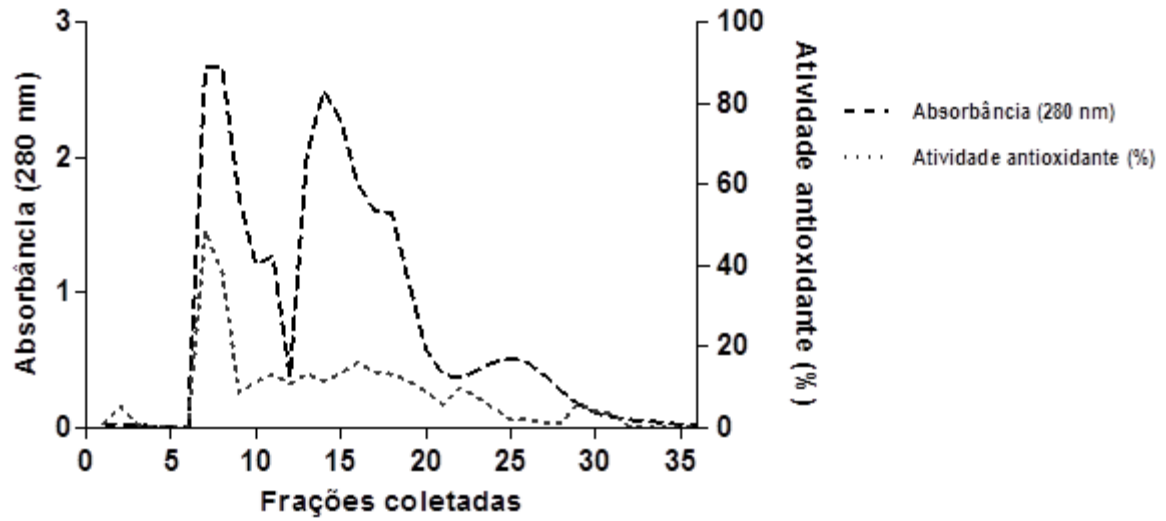


Figura 2

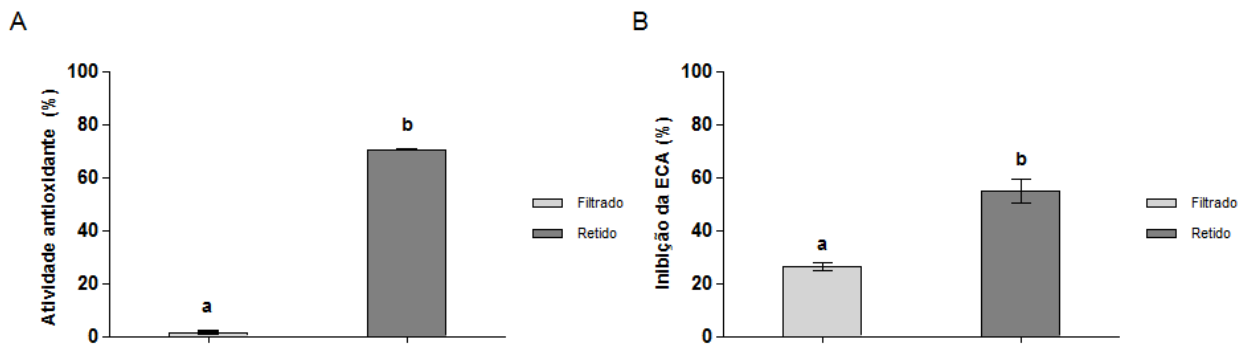
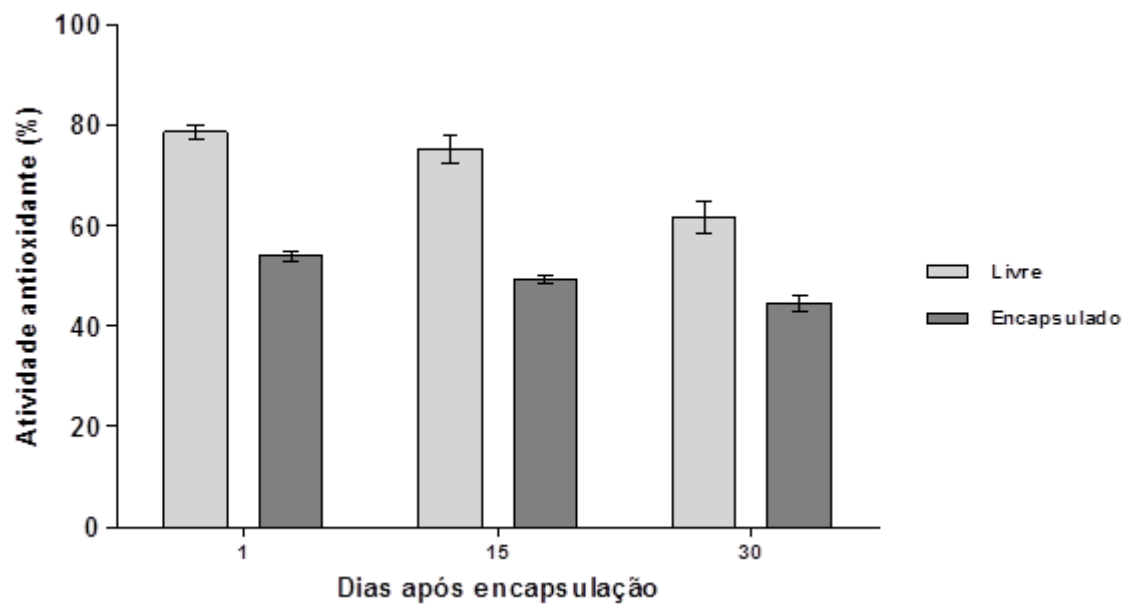


Figura 3



V. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este trabalho, pretendemos repetir a encapsulação para analisar a eficiência com que os peptídeos são encapsulados nos lipossomas, a fim de verificar se a diminuição na atividade biológica dos peptídeos, observada após sua encapsulação, ocorre em virtude de uma baixa eficiência nesse processo. Também deverão ser feitas novas análises da atividade anti-hipertensiva dos peptídeos, a fim de verificar se a microencapsulação é capaz de preservar também essa atividade, sem que cause, por si só, uma perda consideravelmente grande.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 179 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromices lactis***. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- CHEEMA, M. et al. The association of low-molecular-weight hydrophobic compounds with native caseins micelles in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 4, p. 389–400, 2015.
- CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H. E. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 6, p. 1187–1195, 2000.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 254–262, 2001.
- DE VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food component. **International Journal of ChemTech Research**, v. 8, n. 11, p. 587–598, 2015.
- DELBONI, L. A.; SILVA, F. L. B. On the complexation of whey proteins. **Food hydrocolloids**, v. 55, p. 89-99, 2009.
- GINGER, M. R.; GRIGOR, M. R. Comparative aspects of milk proteins. **The Journal of dairy research**, v. 46, n. 2, p. 197–210, 1999.
- KILARA, A.; PANYAM, D. Peptides from milk proteins and their properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 43, n. 6, p. 607–633, 2003.
- MANN, B. et al. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3235–3241, 2014.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: Preparation and functional properties. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 69, n. 12, p. 1163–1169, 1992.

MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. Whey - pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 23, n. 4, p. 323–336, 1988.

NAGPAL, R. et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. **Food & Function**, v. 2, n. 1, p. 18–27, 2010.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Bioactive properties of milk proteins in humans: A review. **Peptides**, v. 73, p. 20–34, 2015.

ONWULATA, C. I. Encapsulation of new active ingredients. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 183–202, 2012.

PARK, Y. W.; NAM, M. S. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 6, p. 831–840, 2015.

PINTADO, M. E.; PINTADO, A. E.; MALCATA, F. X. Controlled whey protein hydrolysis using two alternative proteases. **Journal of Food Engineering**, v. 42, n. 1, p. 1–13, 1999.

PITKOWSKI, A.; DURAND, D.; NICOLAI, T. Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 326, n. 1, p. 96–102, 2008.

POSHADRI, A.; KUNA, A. Microencapsulation technology: A review. **The Journal of Research ANGRAU**, v. 38, n. 1, p. 86–102, 2010.

RUIS, H. G. M.; VENEMA, P.; VAN DER LINDEN, E. Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 4, p. 545–554, 2007.

SCHANBACHER, F. L.; TALHOUK, R. S.; MURRAY, F. A. Biology and origin of bioactive peptides in milk. **Livestock Production Science**, v. 50, n. 1-2, p. 105–123, 1997.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993.

SILVA, I. M. **Desenvolvimento de nanovesículas fosfolipídicas com incorporação de polissacarídeos para encapsulação de peptídeos antimicrobianos**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SINGH, M. N. et al. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 65-77, 2010.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação - Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12–20, 2006.

TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Whey proteins as source of bioactive peptides against hypertension. In: Blanca Hernandez-Ledesma (Ed). **Bioactive Food Peptides in Health and Disease**. InTech, 2013. p. 75–114.

YADA, R. Y. Protein in Food Processing. **England: Woodhear Publishing**, 2004.

YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 2015.

ANEXOS

ANEXO A – Normas de publicação da revista *Food Chemistry*

Use of wordprocessing software

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal and email addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text, figures and tables should be submitted as separate files. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect.

You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below: Chemical compounds studied in this article Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of

whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, Data in Brief. Please note an open access fee is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use to write your Data in Brief.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database:

xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). More information and a full list of supported databases.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file.

Additional information

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.