

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ANNE LUIZE LUPATINI

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE
Spirulina platensis E CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2016

ANNE LUIZE LUPATINI

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE
Spirulina platensis E CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Colla
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Canan

MEDIANEIRA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L965e Lupatini, Anne Luize

Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de spirulina platensis e caracterização da fração proteica / Anne Luize Lupatini – 2016.

118 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Eliane Colla.

Coorientadora: Cristiane Canan.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Proteínas na nutrição humana. 2. Alga como alimento. 3. Alimentos – Dissertações. I. Colla, Eliane, orient. II. Canan, Cristiane, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219



TERMO DE APROVAÇÃO

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE SPIRULINA PLATENSIS E CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO PREOTEICA

Por

ANNE LUIZE LUPATINI

Essa dissertação foi apresentada às catorze horas, do dia vinte e oito de março de dois mil e dezesseis, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelas professoras abaixo assinadas. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Eliane Colla (Orientadora – PPGTA)

Profa. Dra. Elizandra Sehn (Membro Externo – UTFPR)

Profa. Dra. Luciane Maria Colla (Membro Externo – UPF - Passo Fundo/RS)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

***Aos meus pais Luiz e Mirian
Ao meu irmão Júnior
Ao meu noivo Rafael***

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que tem me proporcionado, permitindo-me arriscar, dando-me força e confortando-me nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Mirian e Luiz, que em muitos momentos deixaram de realizar seus sonhos para realizar os meus, além de todo o carinho e apoio. Aos demais familiares que sempre me incentivaram e me compreenderam.

Ao meu querido Rafael, pelo companheirismo em todos os momentos.

À UTFPR/MD, pela oportunidade para o meu desenvolvimento profissional e, as agências de fomento a pesquisa, em especial ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

À FURG e a UPF pela doação da biomassa de *Spirulina platensis*, especialmente ao Prof. Dr. Jorge A. V. Costa e Prof^a. Dr^a. Luciane M. Colla.

À Prof^a. Dr^a. Eliane Colla, que foi além de uma orientadora, foi uma amiga, conselheira, confiou e acreditou em mim. Sua orientação foi um privilégio.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Canan por toda a atenção e ensinamento.

Aos professores do Departamento Acadêmico de Alimentos (DAALM) da UTFPR/MD e do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) pelos ensinamentos e acolhida durante esta jornada. Agradeço de forma especial à disponibilidade dos professores: Dr^a. Deisy A. Drunkler, Dr. Ilton Baraldi e Dr^a. Nádia C. Stenmacher.

Aos componentes da banca de avaliação deste trabalho, Prof^a. Dr^a. Luciane M. Colla e Prof^a. Dr^a. Elizandra Sehn, por aceitarem compor a banca examinadora, pelas correções e sugestões pertinentes ao aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas que fiz durante esta jornada pela companhia, auxílio e trocas de experiências vivenciadas no laboratório, em especial à Larissa, Lizana, Diego e Rosana.

Às amigas que vou levar para vida toda, Ana Paula, Catiussa, Júlia e Tânia pela companhia, companheirismo, amizade, além dos diversos conselhos.

Finalmente, obrigada a todos que de alguma forma me auxiliaram e torceram para que eu alcançasse esta vitória.

RESUMO

LUPATINI, Anne Luize. Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* e caracterização da fração proteica. 2016. 118f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2016.

A *Spirulina platensis* é reconhecida como uma fonte não convencional de proteínas, em função da sua constituição favorável deste nutriente (46 a 63%), possuindo concentração superior a das carnes e da soja. Além disso, apresenta potencial como matéria-prima para a produção de bioetanol, podendo acumular entre 8,0 e 14,0% de carboidratos. A fim de abranger o conceito de Biorrefinarias Integradas, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a extração conjunta de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* utilizando tratamento ultrassônico e agitação em meio alcalino, e a posterior produção e caracterização do concentrado proteico. Na primeira etapa do trabalho, aplicou-se uma estratégia sequencial de planejamento experimental (Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) seguido de Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR)) para seleção e maximização das variáveis com influência significativa sobre o processo de extração. Com as condições de extração otimizadas, foi possível atingir recuperação final de 75,85% e de 41,54% de proteínas e carboidratos, respectivamente. Na segunda etapa do trabalho foi realizada a precipitação de proteínas, para a separação da fase líquida contendo os carboidratos e obtenção do concentrado proteico, o qual foi caracterizado quimicamente e de acordo com sua funcionalidade tecnológica. O concentrado proteico apresentou coloração verde azulada com 75,97% de proteínas (b.s.), concentrações apreciáveis de aminoácidos, sendo o que o triptofano apresentou o maior escore químico (1,71) e o aminoácido limitante foi a histidina; na análise da estrutura secundária das proteínas, as conformações mais abundantes foram β -folha e α -hélice. Na etapa de avaliação da funcionalidade tecnológica observou-se que o pH apresentou influência nas propriedades de capacidade de absorção de água, capacidade de formação e estabilidade de espuma e emulsão, e capacidade de formação de gel, o que pode ser justificado pela solubilidade desta proteína, que é mínima em pH 3,0 e máxima em 9,0. A concentração de concentrado proteico também interferiu no desempenho destas propriedades; melhores resultados foram obtidos em maiores níveis de concentração, exceto para a capacidade de absorção de água e de óleo. Desta forma foi possível determinar que as proteínas de *Spirulina platensis* podem contribuir na formulação de alimentos, possuindo características eficazes de formação de emulsões, espumas ou géis, bem como pode ser utilizada como fonte suplementar de proteínas.

Palavras-chave: Potencial Microalgal. Biorrefinarias Integradas. Estratégia Sequencial de Planejamento Experimental. Rompimento Celular. Funcionalidade de proteínas.

ABSTRACT

LUPATINI, Anne Luize. Protein and carbohydrates extraction from *Spirulina platensis* biomass and characterization of protein fraction. 2016. 118f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2016.

Spirulina platensis is considered an unconventional source of protein, because its favorably constitution on this component (46 to 63%), which is higher than the meat and soy. Furthermore, it has potential as a feedstock for bioethanol production and can accumulate between 8.0 to 14.0% of carbohydrate. In order to cover the concept of Integrated Biorefineries, the aim of this study was to evaluate the combined extraction of proteins and carbohydrates from *Spirulina platensis* biomass using sonication and agitation, under alkaline conditions, and the subsequent production and characterization of protein concentrate. The first stage of this work consisted of applying a sequential strategy of experimental design (Fractional Factorial Design (FFD) and Central Composite Rotatable Design (CCRD)) by selecting and maximizing variables with significant influence on the protein and carbohydrates extraction. With the extraction conditions established, a final yield of 75.85% and 41.54% from protein and carbohydrate, respectively, was reached. In the second step, the protein concentrate obtained by precipitation was submitted to chemical and technological functionality analyzes. The protein concentrate showed blue-green color with 75.97% of proteins (dry weight), appreciable concentrations of amino acids, where tryptophan had the highest chemical score (1.71) and the limiting amino acid was histidine; the secondary structure of proteins showed that the most abundant conformations present were β -sheet and α -helice. At the step of technological functionality evaluation it was observed that the pH influenced on the properties of water absorption capacity, foaming and emulsion capacity and stability, and gelation capacity; it can be justified by the solubility of this protein which is minimal at pH 3.0 and maximum at 9.0. The level of addition of protein concentrate also interfered on the performance of these properties; better results have been obtained at higher concentrations levels, except for water and oil absorption capacity. Thus, it was confirmed that the *Spirulina platensis* proteins may contribute in different formulations of foods, having effective characteristics to form emulsions, foams or gels, and can be used as a supplemental source of protein.

Keywords: Microalgal Potential. Integrated Biorefineries. Sequential Strategy of Experimental Design. Cell Disruption. Functionality Technology of proteins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 – FOTO MICROSCÓPICA DA MICROALGA <i>Spirulina platensis</i>	20
FIGURA 4.1 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	45
FIGURA 5.1 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTORNO (B) PARA PROTEÍNAS TOTAIS (%) EXTRAÍDAS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	69
FIGURA 5.2 – CONCENTRADO PROTEICO OBTIDO A PARTIR DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	74
FIGURA 5.3 – ESPECTRO FTIR DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	77
FIGURA 5.4 – CURVE-FITTING POR MEIO DA SEGUNDA DERIVATIVA DA REGIÃO AMIDA I (1580-1740 CM ⁻¹) DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	79
FIGURA 5.5 – SOLUBILIDADE EM FUNÇÃO DO PH DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	81
FIGURA 5.6 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTORNO (B) PARA CA _{ÁGUA} (%) DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	90
FIGURA 5.7 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTORNO (B) PARA CF _{ESPUMA} (%) DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	90
FIGURA 5.8 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTORNO (B) PARA E _{ESPUMA} (%) DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	91
FIGURA 5.9 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTORNO (B) PARA E _{EMULSÃO} (%) DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	91
FIGURA 5.10 – FOTOS MICROSCÓPICAS DOS ENSAIOS 2 (PH 7,0 E 0,9% DE CONCENTRADO PROTEICO) (A) E 7 (PH 5,0 E 0,4% DE CONCENTRADO PROTEICO) (B) DA CF _{EMULSÃO} E DOS ENSAIOS 4 (PH 7,0 E 3,5% DE CONCENTRADO PROTEICO) (C) E 7 (PH 5,0 E 0,4% DE CONCENTRADO PROTEICO) (D) DA E _{EMULSÃO} A UM AUMENTO DE 20X.	92
FIGURA 5.11 – COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO GEL DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	96
FIGURA 5.12 – VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE (CP) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (°C) DO GEL DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	98
FIGURA 5.13 – CA _{ÓLEO} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE DIFERENTES MICROALGAS (% PESO SECO).....	22
TABELA 3.2 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	24
TABELA 3.3 – VALORES DIÁRIOS RECOMENDADOS PARA INGESTÃO DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS (CRIANÇAS DE 1 A 2 ANOS).	28
TABELA 3.4 – CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS PRESENTE NA <i>Spirulina platensis</i> CONFORME CAMPANELLA, GRESCENTINI E AVINO (1999), HABIB et al. (2008) E SAFI et al. (2013).....	29
TABELA 3.5 – DIVERGÊNCIAS EM METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA DETERMINAÇÃO DE $CA_{\text{ÁGUA}}$, CF_{ESPUMA} , E_{ESPUMA} , $CF_{\text{EMULSÃO}}$ E $E_{\text{EMULSÃO}}$ EM PROTEÍNAS.....	33
TABELA 3.6 – ESTUDOS COM APLICAÇÕES DE DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MICROALGAS.	38
TABELA 4.1 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PFF.....	43
TABELA 4.2 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO DCCR 2^2 PARA ANÁLISE DAS PROPRIEDADES DE $CA_{\text{ÁGUA}}$, CF_{ESPUMA} , E_{ESPUMA} , $CF_{\text{EMULSÃO}}$ E $E_{\text{EMULSÃO}}$ DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	50
TABELA 4.3 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PFF 2^{4-1} PARA ANÁLISE DAS CF_{GEL} DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	54
TABELA 5.1 – MATRIZ DO PFF 2^{7-3} COM NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E DEPENDENTES PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	58
TABELA 5.2 – EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PFF 2^{7-3} SOBRE OS PERCENTUAIS DE PROTEÍNAS TOTAIS (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa) E CARBOIDRATOS TOTAIS (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa).....	59
TABELA 5.3 – MATRIZ DO DCCR 2^3 COM NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E DEPENDENTES PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	62
TABELA 5.4 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO DCCR 2^3 PARA AS RESPOSTAS DE PROTEÍNAS TOTAIS (%) (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa) E CARBOIDRATOS TOTAIS (%) (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa) EXTRAÍDAS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	63
TABELA 5.5 – ANOVA DOS MODELOS QUADRÁTICOS DO DCCR 2^3 PARA O PERCENTUAL DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	64

TABELA 5.6 – AVALIAÇÃO DOS PERCENTUAIS DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS EXTRAÍDOS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i> AO AUMENTAR SOMENTE A VARIÁVEL TEMPO DE AGITAÇÃO.....	65
TABELA 5.7 – MATRIZ DO DCCR 2 ² COM NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	66
TABELA 5.8 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO DCCR 2 ² PARA AS RESPOSTAS DE PROTEÍNAS TOTAIS (%) (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa) E CARBOIDRATOS TOTAIS (%) (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa) EXTRAÍDAS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	67
TABELA 5.9 – ANOVA DOS MODELOS QUADRÁTICOS DO DCCR 2 ² PARA O PERCENTUAL DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	68
TABELA 5.10 – VALIDAÇÃO DO ESTUDO REALIZADO PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i> UTILIZANDO UMA ESTRATÉGIA SEQUENCIAL DE PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS.	70
TABELA 5.11 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DESENGORDURADA DE <i>Spirulina platensis</i> E DO CONCENTRADO PROTEICO OBTIDO (BASE SECA).....	73
TABELA 5.12 – PERFIL DE AMINOÁCIDOS TOTAIS DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i> , COMPARADO COM VALORES ENCONTRADOS PARA ALBUMINA SÉRICA BOVINA, AO PADRÃO DE REFERÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS E ESCORES QUÍMICOS.....	76
TABELA 5.13 – ANÁLISE DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PRESENTES NO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	79
TABELA 5.14 – MATRIZ DO DCCR 2 ² COM NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E DEPENDENTES PARA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE CA _{ÁGUA} , CF _{ESPUMA} , E _{ESPUMA} , CF _{EMULSÃO} E E _{EMULSÃO} DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	83
TABELA 5.15 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO DCCR 2 ² PARA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE CA _{ÁGUA} , CF _{ESPUMA} , E _{ESPUMA} , CF _{EMULSÃO} E E _{EMULSÃO} DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	84
TABELA 5.16 – ANOVA PARA OS MODELOS QUADRÁTICOS PARA PREDIÇÃO DAS RESPOSTAS DE CA _{ÁGUA} , CF _{ESPUMA} , E _{ESPUMA} , CF _{EMULSÃO} E E _{EMULSÃO} (%).	88
TABELA 5.17 – MATRIZ DO PFF 2 ⁴⁻¹ COM NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS PARA AVALIAÇÃO DA CF _{GEL} DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	93
TABELA 5.18 – EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PFF 2 ⁴⁻¹ SOBRE OS RESULTADOS DE FORÇA (g) E DEFORMAÇÃO (mm) DOS GÉIS ELABORADOS COM CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	94
TABELA 5.19 – VALORES DOS COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO (R ²) E QUI-QUADRADO (X ²) DOS MODELOS DE BINGHAM, CASSON, HERSCH-BULKLEY E	

LEI DA POTÊNCIA AVALIADOS PARA O GEL DO CONCENTRADO PROTEICO DE <i>Spirulina platensis</i>	97
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
	2.1 OBJETIVO GERAL	19
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
	3.1 Classificação e Morfologia da <i>Spirulina platensis</i>	20
	3.2 Histórico de utilização da <i>Spirulina platensis</i>	21
	3.3 Composição Química da <i>Spirulina platensis</i>	22
	3.3.1 Influência do Meio de Cultivo na Composição Química	23
	3.4 PROTEÍNAS DE <i>Spirulina platensis</i>	26
	3.4.1 Composição em Aminoácidos	27
	3.4.2 Funcionalidade Tecnológica	30
	3.5 APLICAÇÕES DA <i>Spirulina platensis</i>	34
	3.6 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MICROALGAS	36
	3.6.1 Uso de Ultrassom para Extração de Proteínas de Microalgas	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
	4.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES	41
	4.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS	41
	4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DESENGORDURADA DE <i>Spirulina platensis</i>	42
	4.4 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO	43
	4.4.1 Rendimento Global e Proteico	46
	4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTEICO	47
	4.5.1 Composição Centesimal	47
	4.5.2 Análise de Cor	47
	4.5.3 Perfil de Aminoácidos	48
	4.5.4 Identificação de Parâmetros Espectrais	48
	4.6 FUNCIONALIDADE TECNOLÓGICA DO CONCENTRADO PROTEICO	49
	4.6.1 Solubilidade	49

4.6.2	Capacidade de Absorção de Água ($CA_{\text{água}}$), Capacidade de Formação de Espuma (CF_{espuma}), Estabilidade de Espuma (E_{espuma}), Capacidade de Formação de Emulsão ($CF_{\text{emulsão}}$) e Estabilidade de Emulsão ($E_{\text{emulsão}}$)	50
4.6.3	Capacidade de Formação de Gel (CF_{gel})	53
4.6.4	Capacidade de Absorção de Óleo ($CA_{\text{óleo}}$)	55
4.7	TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DESENGORDURADA DE <i>Spirulina platensis</i>	57
5.1.1	Planejamento Fatorial Fracionário (PFF)	57
5.1.2	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3	61
5.1.3	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2	65
5.2	OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO	71
5.2.1	Rendimentos Global e Proteico	71
5.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTEICO	72
5.3.1	Composição Centesimal	72
5.3.2	Análise de Cor	74
5.3.3	Perfil de Aminoácidos	75
5.3.4	Identificação de Parâmetros Espectrais	77
5.4	FUNCIONALIDADE TECNOLÓGICA DO CONCENTRADO PROTEICO	80
5.4.1	Solubilidade	80
5.4.2	Capacidade de Absorção de Água ($CA_{\text{água}}$), Capacidade de Formação de Espuma (CF_{espuma}), Estabilidade de Espuma (E_{espuma}), Capacidade de Formação de Emulsão ($CF_{\text{emulsão}}$) e Estabilidade de Emulsão ($E_{\text{emulsão}}$)	82
5.4.3	Capacidade de Formação de Gel (CF_{gel})	92
5.4.4	Capacidade de Absorção de Óleo ($CA_{\text{óleo}}$)	98
6	CONCLUSÕES	101
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
8	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

A utilização de microalgas na alimentação humana ocorre há séculos, sendo que se relata que tribos indígenas já consumiam espécies de microalgas como *Spirulina platensis*, *Nostoc* e *Aphanizomenon*. Por outro lado, o cultivo de microalgas iniciou há poucas décadas (BOROWITZKA, 1999; SPOLAORE et al., 2006; PRIYADARSHANI; RATH, 2012), com a justificativa principal de utilização como fonte de proteína unicelular, ou *single cell protein (SCP)*, devido ao fato de pesquisadores, nas décadas de 60 e 70, haverem mencionado a possibilidade de falta de alimento devido ao crescimento exponencial da população da terra (UGALDE; CASTRILLO, 2002).

A insuficiência proteica na alimentação humana é um dos principais problemas dos países subdesenvolvidos, deste modo surge a necessidade em suprir a falta deste nutriente, diversificando e aumentando as fontes de proteínas e desenvolvendo novas fontes não convencionais (CHEL-GUERRERO et al., 2002). A elevada concentração de proteínas de várias espécies de microalgas é uma das principais razões que as tornam uma fonte alternativa no aporte deste nutriente (SOLETTO et al., 2005).

Além da sua importância nutricional, as microalgas podem compor formulações de alimentos apresentando propriedades de funcionalidade tecnológica, tais como propriedades espumantes, emulsificantes, gelificantes, entre outras (BENELHADJ et al., 2016). Contudo, ainda existe a necessidade do aprimoramento do estudo destas propriedades funcionais, apresentadas, principalmente, pela fração proteica das microalgas.

Os primeiros estudos envolvendo microalgas se referiam, principalmente, a sua capacidade em acumular proteínas, contudo, ao longo do tempo, o interesse por essa biomassa tomou uma nova direção, levando em consideração a demanda por energia sustentável (SAFI et al., 2014).

Nos últimos anos, devido a sua composição favorável, as microalgas têm sido consideradas como uma matéria-prima versátil para produção de biocombustíveis, como biodiesel, bioetanol, biogás, bio-hidrogênio, entre outros (ZHU et al., 2014). Isto

também é refletido pelo número de publicações e/ou artigos científicos sobre o assunto, sendo que no site de base de dados *ScienceDirect*, em 2015 existem mais de 1000 publicações relacionadas a este assunto, enquanto que entre os anos 2000 e 2010 o total de publicações não ultrapassa 500. Entretanto, os custos de obtenção dessa fonte de energia ainda necessitam de aperfeiçoamentos para torná-la competitiva com os combustíveis fósseis (WU et al., 2012; RAWAT et al., 2013). Com isso, atualmente os pesquisadores estão voltando a valorizar os demais componentes presentes na biomassa das microalgas, tais como proteínas, pigmentos, corantes, entre outros (SAFI et al., 2014).

As microalgas possuem composição química contendo 7 a 23% de lipídios, 5 a 23% de carboidratos e 6 a 52% de proteínas (BROWN et al., 1997), podendo haver variação neste conteúdo em função de gênero, espécie e devido às variações nas condições de cultivo para uma mesma espécie. Diversos estudos comprovam que a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH e a intensidade de luz podem afetar a composição centesimal da microalga cultivada (COLLA et al., 2007; MATSUDO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; COCA et al., 2015).

As condições de cultivo de microalgas podem ser alteradas a fim de induzir a produção de um componente específico tais como, proteínas e/ou carboidratos (ROMERO GARCÍA; ACIÉN FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ SEVILLA, 2012). Desta forma, é possível conduzir cultivos específicos a fim de produzir microalgas com elevada concentração em certo componente. Além disso, ao verificar a composição centesimal das microalgas, verifica-se que os percentuais de proteínas e carboidratos são inversamente proporcionais (SALLA et al., 2016).

Desta forma, a necessidade da exploração adequada da biomassa de microalga é a forma mais indicada para melhorar a economia global da aplicação de microalgas na produção de biocombustíveis, visto que a biomassa residual ainda contém concentrações apreciáveis de proteínas e outros produtos, podendo-se obter subprodutos com aplicações em distintas áreas (RASHID; REHMAN; HAN, 2013; ROMERO GARCÍA; ACIÉN FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ SEVILLA, 2012). Assim, surge

o conceito de Biorrefinarias Integradas, resultando em uma combinação de tecnologias explorando todos os componentes da biomassa microalgal (RAWAT et al., 2013).

Entre as microalgas, a *Spirulina* tem recebido maior atenção pelos pesquisadores, principalmente pelo seu teor proteico e pigmentos de interesse para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos (DERNER, 2006). Existem 15 classificações desta microalga, sendo uma delas a *Spirulina platensis* (HABIB et al., 2008), destacada devido ao grande interesse mundial por ser um organismo fotossintético adequado para produção em escala industrial (DEMIR; TÜKEL, 2010). É uma cianobactéria filamentosa (algas azuis), que possui um elevado teor de proteínas (60 – 70%) em seu peso seco, cujo valor nutritivo está relacionado com a qualidade dos aminoácidos presentes, além de alta concentração de vitaminas, ácidos graxos essenciais e minerais (COLLA; BERTOLIN; COSTA, 2004). Além disso, esta microalga possui potencial para o tratamento de algumas doenças, sendo uma alternativa para a elaboração de produtos nutracêuticos e funcionais (AMBROSI et al., 2008).

A etapa de extração dos compostos de interesse a partir de microalgas representa um dos principais limitantes para a produção de biocompostos em larga escala, como lipídios, carboidratos e proteínas, bem como a conversão de macromoléculas em moléculas menores (RASHID; REHMAN; HAN, 2013; LUO; FANG; SMITH, 2014). A partir deste contexto, muitas técnicas de rompimento celular vêm sendo testadas, entre elas a utilização de ultrassom (GERDE et al., 2012). Entre as técnicas convencionais de rompimento celular, destaca-se a agitação mecânica. Além disso, Wang e Zhang (2012) citam que combinações entre diferentes técnicas de rompimento celular, podem favorecer a eficiência do processo de extração.

Estas evidências, aliadas a simplicidade nas técnicas de cultivo, tornam as microalgas um dos objetos de pesquisa prioritários das mais modernas áreas de investigação científica, visto que, a efetiva utilização dos recursos da biomassa microalgal ainda é uma tecnologia nova, em pleno desenvolvimento e, portanto, ainda repleta de incertezas (LUO; FANG; SMITH, 2014). Desta forma, em função das qualidades da fração proteica desta microalga e da necessidade de aprimorar o

aproveitamento total dos seus componentes, é incontestável a necessidade de novas pesquisas a respeito deste assunto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estudo foi avaliar a extração conjunta de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* no conceito de Biorrefinarias Integradas, visando à produção e caracterização do concentrado proteico da biomassa de *Spirulina platensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Aplicar uma estratégia sequencial de planejamento experimental para estudar as variáveis significativas no processo de extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* pela associação de tratamento ultrassônico e agitação;
- b) Obter o concentrado proteico da biomassa de *Spirulina platensis*;
- c) Caracterizar quimicamente o concentrado proteico da biomassa de *Spirulina platensis*;
- d) Determinar as propriedades funcionais tecnológicas do concentrado proteico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CLASSIFICAÇÃO E MORFOLOGIA DA *Spirulina platensis*

A microalga *Spirulina*, também chamada de *Arthrospira*, pertence ao reino Bactéria, divisão Cianobactéria, da classe Cianofíceas e da família *Oscillatoriaceae* e, neste gênero a espécie em maior destaque é a *Spirulina platensis* (Figura 3.1), seguida pela *Spirulina fusiformes* e *Spirulina máxima*. Possuem filamentos helicoidais com comprimento entre 200-300 μm e 5-10 μm de largura, tem alta tolerância para pH alcalino, é de fácil cultivo, e a sua parede celular é facilmente rompida (CHRONAKIS et al., 2000; RANGEL-YAGUI et al., 2004). Além disso, possui estrutura multicelular e filamentosa, podendo ser cultivada facilmente em água, crescendo vigorosamente em luz solar, altas temperaturas e condições alcalinas (HABIB et al., 2008).

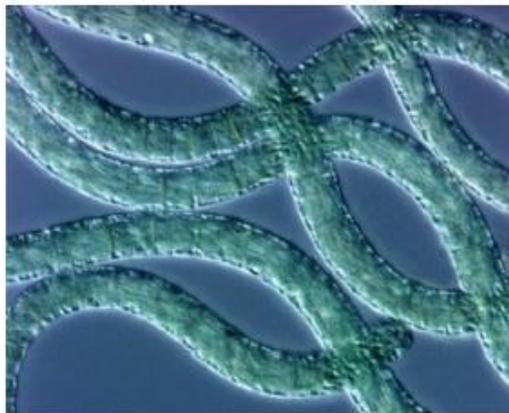


Figura 3.1 – Foto microscópica da microalga *Spirulina platensis*

Fonte: Mazokopakis et al. (2008).

A reprodução desse microrganismo ocorre por fissão transversal binária, originando o hormogônio tricoma que promove a produção de um novo filamento. Sua célula possui uma membrana plasmática cercada por multicamadas da parede celular,

a qual é coberta por uma cápsula formada de polissacarídeos, não apresentando celulose, o que possibilita a assimilação e digestão da *Spirulina* (BLINKOVA; GOROBETS; BATURO, 2001, apud BABADZHANOV et al., 2004; VONSHAK; TOMASELLI, 2000).

3.2 HISTÓRICO DE UTILIZAÇÃO DA *Spirulina platensis*

Originalmente é procedente de lagoas da África e da América Latina, contudo, tem se estendido em outras zonas quentes do mundo, usufruindo da sua capacidade de adaptação em lugares onde não é possível o crescimento de outros organismos. Sua melhor condição de habitat envolve meios alcalinos (pH entre 8,5 a 11,0), salinos (> 30 g/L), com alta luminosidade e temperaturas entre 35 a 40°C; contudo, a disponibilidade de diferentes nutrientes pode afetar sua taxa de crescimento (HABIB et al., 2008).

Essa microalga vem sendo utilizada na alimentação há muitos anos, devido seu alto conteúdo proteico, alta digestibilidade e sua composição de aminoácidos essenciais (DEMIR; TÜKEL, 2010). Refeições contendo *Spirulina* ocorrem há séculos, índios como Kanembous (África) e Astecas (México) preparavam misturas com esta microalga, consumindo habitualmente. Os Kanembous colhiam esta microalga quando as mesmas se aglomeravam nas margens dos lagos, as secando ao sol e, moldando-as em pequenos tabletes (BERTOLDI; SANT'ANA; OLIVEIRA, 2008); da mesma forma, os Astecas as secavam em camadas finas para consumi-las (PIÑERO ESTRADA; BERMEJO BESCÓS; VILLAR DEL FRESNO, 2001; SPOLAORE et al., 2006).

Entretanto, somente em 1967 a *Spirulina* é estabelecida como uma “futura fonte de alimento” pela Associação Internacional de Microbiologia Aplicada, na qual a análise de suas propriedades nutricionais se mostrou excepcional, dando origem a muitos projetos de investigação deste microrganismo para fins industriais. Ao mesmo tempo, no México, uma empresa chamada *Sosa-Textcoco LTDA* emitiu um pedido para estudar as algas ocorrentes nas lagoas de evaporação de suas instalações. Desta forma, foi

realizado o primeiro estudo detalhado das necessidades de crescimento e fisiologia da microalga *Spirulina* (HABIB et al., 2008).

O uso de microalgas, assim como a *Spirulina*, é legalmente autorizado como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sem efeitos tóxicos ao organismo (BELAY et al., 1993; VON DER WEID; DILLON; FALQUET, 2000). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) permite a comercialização de *Spirulina* desde que o produto final no qual a microalga tenha sido adicionada, seja isolada ou em mistura, esteja devidamente registrado e se enquadre nas categorias de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde ou substâncias bioativas, além disso, deve apresentar especificações do ingredientes, incluindo a identificação da espécie de alga e seu local de cultivo (BRASIL, 2009).

3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA *Spirulina platensis*

A *Spirulina platensis* possui uma composição centesimal variável, com grande percentual de proteínas. A Tabela 3.1 apresenta uma visão geral dos principais constituintes de diferentes espécies de microalgas.

Tabela 3.1 – Composição química de diferentes microalgas (% peso seco).

Microalgas	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	6-7
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9

Fonte: Becker, 2007

Além disso, de acordo com Souza et al. (2012), a *Spirulina*, entre outras microalgas como *Chlorella* e *Duanaliella*, se destacam por apresentarem altas concentrações de amidos e glicogênio em sua composição de carboidratos. O gênero *Spirulina* pode conter entre 15 a 20% de carboidratos, sendo a grande maioria representada por polissacarídeos (Chaiklahan et al. 2013).

Ainda, a *Spirulina platensis* apresenta elevado conteúdo proteico e é considerada uma das fontes mais ricas em pró-vitamina A (beta-caroteno) e ferro absorvível, além de apresentar altos níveis de vitaminas (tais como as do complexo B, C, D e E) e outros minerais (potássio, cálcio, cobre, magnésio, manganês, fósforo, sódio e zinco), compostos fenólicos, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais, destacando-se os ácidos graxos poli-insaturados, como o γ -linolênico, docasahexaenóico, estearidônico e araquidônico (BELAY et al., 1993; VON DER WEID; DILLON; FALQUET, 2000; HABIB et al., 2008). Também é destacada por possuir pigmentos fotossintéticos, incluindo clorofila A, luteína, β -caroteno, ficocianina e aloficocianina, sendo classificada como uma microalga verde-azulada (CHEN; ZHANG; GUO 1996).

De tal modo, esse microrganismo pode ser considerado de grande importância nutricional, determinada pela sua variedade de composição em nutrientes, tanto macro como micro, contendo certos componentes que não são sintetizados pelo organismo humano, sendo considerado um alimento completo (PHANG et al., 2000).

3.3.1 Influência do Meio de Cultivo na Composição Química

A composição química da *Spirulina platensis*, assim como das demais microalgas, é facilmente influenciada pela forma de cultivo; quando cultivadas em meios adequados, as culturas de microalgas podem alcançar altas taxas de crescimento, com altas produtividades em termos de biomassa, sendo que a fração proteica é o componente mais abundante (ROMERO GARCÍA; ACIÉN FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ

SEVILLA, 2012). Na Tabela 3.2 destaca-se a influência de distintos meios de cultivo no percentual de proteínas da biomassa de *Spirulina platensis*.

Tabela 3.2 – Influência de diferentes meios de cultivo na composição química da biomassa de *Spirulina platensis*.

Composição e Condições de Cultivo	Composição Química	Autor
Diferentes concentrações de nitrogênio e temperaturas de cultivo	57,36 a 70,15% de proteínas e 6,69 a 10,37% de lipídios	Colla et al. (2007)
Ureia como fonte alternativa de nitrogênio	45,01 a 62,22% de proteínas e 10,00 a 21,90% de lipídios	Matsudo et al. (2009)
Variações no tempo de alimentação por amônio e com e sem controle de pH pela adição de CO ₂	22 a 38% de proteínas, 14 a 30% de lipídios e 35 a 50% de carboidratos	Rodrigues et al. (2011)
Utilização de CO ₂ produzido pela fermentação de etanol e mistura de duas fontes de nitrogênio (NaNO ₃ e (NH ₄) ₂ SO ₄) em um fotobiorreator	17,1 a 32,0% de proteínas e 7,34 a 10,40% de lipídios	Ferreira et al. (2012)
Diferentes percentuais de vinhaça de beterraba, tempos de cultivo, intensidade de luz e composição do meio de cultura padrão.	26 a 72% de proteínas	Coca et al. (2015)
Utilização de resíduos resultantes da obtenção de proteínas do soro de leite como fonte de carbono.	22,30 a 50,70% de proteínas e 58,17 a 14,94% de carboidratos.	Salla et al. (2016)

Apresentando a interferência do meio de cultivo no teor de proteínas de *Spirulina platensis*, o estudo de Colla et al. (2007) destaca a avaliação da concentração de nitrogênio e temperatura de cultivo sobre a taxa de crescimento, produtividade, teor de proteínas, lipídios e compostos fenólicos na biomassa da microalga em questão; os autores destacam que a temperatura possui uma importante influência no percentual de proteína da biomassa contudo, a concentração de nitrogênio não apresenta efeito significativo.

Matsudo et al. (2009) estudou a influência dos parâmetros de fração de corte, tempo de alimentação de uréia e ciclos de cultivo no processo descontínuo de produção da *Spirulina platensis*, tendo como variáveis dependentes a concentração celular máxima, a produtividade em células, composição proteica e lipídica da biomassa.

Rodrigues et al. (2011) estudaram os efeitos do tempo de alimentação por amônio com e sem controle de pH pela adição de CO₂ no cultivo de *Spirulina platensis*, determinando seu crescimento e a composição de sua biomassa. Ferreira et al. (2012) investigaram a utilização de CO₂ produzido pela fermentação de etanol e mistura de duas diferentes fontes de nitrogênio (NaNO₃ e (NH₄)₂SO₄) para o cultivo de *Spirulina platensis* em um fotobiorreator, sendo os resultados avaliados em termos de concentração máxima de células obtidas, produtividade celular e composição da biomassa em relação à proteínas e lipídios.

Coca et al. (2015), avaliaram a produção de *Spirulina platensis* em um meio mineral suplementado com diferentes teores de vinhaça de beterraba, tempos de cultivo, intensidade de luz e composição do meio de cultura padrão (composto por NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂HPO₄, NaNO₃, K₂SO₄, NaCl, MgSO₄ e CaCl₂), assim obtiveram informações sobre a interferência deste meio de cultivo na sua concentração de proteínas e na produtividade em relação a biomassa.

Salla et al. (2016), estudaram condições para aumentar o percentual de carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* com a utilização de resíduos da extração de proteínas de soro de leite o qual apresenta alto conteúdo de lactose e baixo de proteínas; este processo possibilitou um acréscimo na produtividade de carboidratos da biomassa para 60 mg.L⁻¹.d⁻¹, contudo reduziu o percentual de proteínas da biomassa.

3.4 PROTEÍNAS DE *Spirulina platensis*

As diversas funções biológicas desempenhadas pelas proteínas não seriam possíveis sem a complexidade de sua composição, resultando em diferentes formas estruturais tridimensionais, com diferentes funções (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A maior parte das proteínas consumidas pelos seres humanos é de origem animal e vegetal, sendo o restante destacadas como fontes proteicas não convencionais, as quais podem ser obtidas de microrganismos cultivados em meios de cultivo variados (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

A *Spirulina platensis* é uma das mais ricas fontes proteicas de origem microbiana (46 a 63%) (BECKER, 2007), com concentração superior à das carnes (16 a 22%) e da soja (cerca de 30%) (ORDÓÑEZ et al., 2005; JUNG et al., 2003). Somado a isto, este microrganismo apresenta conteúdo balanceado de aminoácidos, contendo inclusive metionina, aminoácido ausente na maioria das outras microalgas (ROMERO GARCÍA; ACIÉN FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ SEVILLA, 2012).

Além das proteínas convencionais, a *Spirulina platensis* também contém percentuais de ficobiliproteínas, que são pigmentos coloridos os quais funcionam como um receptor de luz para a fotossíntese, sendo sua estrutura constituída por cromóforos ligados a resíduos de cisteína de uma apoenzima; as ficobiliproteínas de microalgas são classificadas em três grupos: ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina (SANTIAGO-SANTOS et al. 2004).

A ficocianina é comumente aplicada na indústria de alimentos e de cosméticos como um corante natural, devido a sua coloração azulada, sendo que tem sido observado que este biopigmento também pode apresentar atividade anti-inflamatória, antioxidante e propriedades contra cânceres (VONSHAK, 1997; REDDY et al., 2003; SOUZA et al., 2006); a *Spirulina platensis* é uma excelente fonte deste pigmento, onde sua fração proteica podendo conter cerca de 20% de ficocianina (SU et al., 2014).

Além disso, as proteínas de *Spirulina platensis* podem ser hidrolisadas a peptídeos bioativos que tem recebido muita atenção devido aos seus benefícios na área de saúde e sua atividade biológica (VO; RYU; KIM, 2013), podendo apresentar atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), antiproliferativo, anticoagulante, anti-diabética e antiobesidade (BETORET et al., 2011; RAJANBABU; CHEN, 2011; NAJAFIAN; BABJI, 2012). Assim, estes peptídeos podem atuar como uma valiosa fonte para o desenvolvimento de produtos alimentícios e farmacêuticos (NGO et al., 2012).

As proteínas de *Spirulina platensis* apresentam avaliações nutricionais que revelam alta qualidade, comparável às proteínas vegetais, sendo uma fonte promissora de proteínas; no entanto, devido ao alto custo de produção, além de dificuldades referentes às suas características sensoriais, atualmente sua maior aplicação é em cosméticos ou alimentação animal (BECKER, 2007).

Conseqüentemente, nos últimos anos foram poucos os estudos referentes à caracterização da fração proteica total desta microalga, podendo-se destacar a pesquisa de Chronakis et al. (2000) que ao obterem o concentrado proteico de *Spirulina platensis strain Pacifica*, determinaram seu conteúdo proteico (67,9%) e de acordo com a análise de eletroforese, conseguiram determinar o seu peso molecular que variou entre 14,4 a 116 kDa, sendo que a banda com maior evidência foi observada entre 20,1 a 43 kDa.

3.4.1 Composição em Aminoácidos

Todas as proteínas são constituídas pelos mesmos 21 aminoácidos primários, contudo, algumas proteínas podem carecer de um ou mais destes aminoácidos. As diferenças estruturais e funcionais das proteínas são determinadas, principalmente, pela sequência de aminoácidos, que se unem através de ligações amida, para formar sua molécula (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Além disso, a presença e a

quantidade de aminoácidos representam um fator de qualidade das proteínas (MISURCOVÁ et al., 2014).

Estudos comprovam que a *Spirulina platensis* contém alguns aminoácidos essenciais nas proporções recomendadas pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) (BECKER, 2007), podendo ser comparada com proteínas padrões como as da carne, ovos ou leite e, muitas vezes podendo conter qualidade superior às proteínas vegetais (HABBIB, 2008). Na Tabela 3.3 estão apresentados os padrões ideais de aminoácidos essenciais em proteínas (proteína de referência) para faixa etária de 1 a 2 anos (WHO; FAO; UNU, 2007), sendo este o padrão para todos os grupos etários, exceto para bebês (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Tabela 3.3 – Valores diários recomendados para ingestão de aminoácidos essenciais (crianças de 1 a 2 anos).

Aminoácidos	mg . g ⁻¹ de proteína
Lisina (Lys)	52,0
Leucina (Leu)	63,0
Isoleucina (Ile)	31,0
Valina (Val)	42,0
Treonina (Thr)	27,0
Histidina (His)	18,0
Fenilalanina (Phe) + Tirosina (Tyr)	46,0
Triptofano (Trp)	7,4
Metionina (Met) + Cisteína (Cys)	26,0

Fonte: WHO; FAO; UNU, 2007.

A Tabela 3.4 apresenta diferentes estudos, nos quais os autores avaliaram os valores individuais dos aminoácidos essenciais e não essenciais na biomassa e no extrato proteico de *Spirulina platensis*. Os autores indicados destacam que as proteínas de *Spirulina platensis* possuem uma composição balanceada de aminoácidos, com concentrações próximas às requeridas pela FAO; sendo que a quantidade de

aminoácidos em microalgas pode ser afetada pela sua forma de cultivo (CAMPANELLA; GRESCENTINI; AVINO, 1999; HABIB et al., 2008; SAFI et al., 2013).

Tabela 3.4 – Conteúdo de aminoácidos presente na *Spirulina platensis* conforme Campanella, Grescentini e Avino (1999), Habib et al. (2008) e Safi et al. (2013).

Aminoácidos	Teor de aminoácidos (mg . g ⁻¹ de proteína)*			
	Campanella, Grescentini e Avino (1999) ¹	Habib et al. (2008) ²	Safi et al. (2013) ²	Safi et al. (2013) ⁴
Lisina (Lys)	35,0 ± 3,0	46,0 ± 0,7	51,0 ± 6,2	53,9 ± 0,1
Leucina (Leu)	56,0 ± 5,0	84,0 ± 1,3	70,2 ± 0,2	80,2 ± 0,2
Isoleucina (Ile)	41,0 ± 1,0	39,0 ± 1,0	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Valina (Val)	54,0 ± 3,0	40,0 ± 0,6	28,6 ± 0,2	36,6 ± 1,5
Treonina (Thr)	30,0 ± 3,0	34,0 ± 0,6	61,6 ± 1,0	55,4 ± 0,4
Histidina (His)	6,0 ± 1,0	28,0 ± 0,6	9,0 ± 0,1	7,3 ± 0,1
Fenilalanina (Phe)	29,0 ± 2,0	41,0 ± 0,8	48,2 ± 0,4	42,6 ± 0,1
Triptofano (Trp)	10,0 ± 1,0	20,0 ± 0,5	12,2 ± 0,1	10,7 ± 0,1
Metionina (Met)	16,0 ± 1,0	28,0 ± 0,5	17,2 ± 0,2	1718 ± 0,1
Cisteína (Cys)	5,0 ± 0,0	6,0 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,1
Ácido Aspártico (Asp)	64,0 ± 5,0	54,0 ± 1,1	118,2 ± 1,1	97,0 ± 0,2
Ácido Glutâmico (Glu)	89,0 ± 7,0	70,0 ± 1,4	105,0 ± 0,9	116,5 ± 0,2
Serina (Ser)	23,0 ± 2,0	38,0 ± 0,6	68,5 ± 0,2	72,5 ± 0,3
Prolina (Pro)	22,0 ± 2,0	41,0 ± 0,5	19,5 ± 0,5	18,6 ± 0,8
Glicina (Gly)	39,0 ± 1,0	67,0 ± 1,0	77,6 ± 0,1	84,2 ± 0,2
Alanina (Ala)	51,0 ± 1,0	108,0 ± 1,4	99,1 ± 0,8	109,4 ± 0,2
Tirosina (Tyr)	30,0 ± 1,0	34,0 ± 1,0	48,3 ± 0,5	43,3 ± 0,1
Arginina (Arg)	4,0 ± 1,0	49,0 ± 0,7	76,9 ± 0,7	68,4 ± 0,1

*Médias ± erro padrão.

¹ pílulas de *Spirulina platensis* originárias de Cuba.

² biomassa de *Spirulina platensis*.

³ extrato proteico de *Spirulina platensis*.

3.4.2 Funcionalidade Tecnológica

A funcionalidade de proteínas está relacionada, geralmente, com as propriedades físico-químicas deste nutriente, que podem afetar o processamento e a qualidade de produtos alimentícios, influenciando na sua aceitação. Entre as propriedades funcionais tecnológicas das proteínas se destacam a solubilidade, gelificação, propriedades espumantes e emulsificantes, capacidade de absorção de água e de óleo, entre outras (KINSELLA; MELACHOURIS, 1976; SGARBIERI, 1996). Estas propriedades dependem da interação da água com os outros constituintes, em especial com a proteína (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A capacidade espumante de uma proteína está relacionada com a habilidade de formar uma fina e resistente película na interface gás-líquido, possibilitando que bolhas de gás sejam incorporadas e estabilizadas nesta interface; já a sua estabilidade refere-se a competência da proteína em estabilizar a espuma contra as tensões mecânicas e gravitacionais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A habilidade da proteína em formar e estabilizar emulsões é incontestável em muitas aplicações na indústria de alimentos (massas de bolos, maionese, molhos para salada, sobremesas geladas, etc.), sendo necessária, principalmente, devido as diferentes formulações e condições de produção as quais os alimentos são submetidos (KINSELLA, 1979).

Neste contexto, a escolha alimentar dos seres humanos está relacionada com os atributos sensoriais dos alimentos, a citar a textura, sabor, cor e aparência, os quais podem ser afetados pelas proteínas dos alimentos, mais especificamente pelas suas propriedades funcionais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). No entanto, as propriedades funcionais das proteínas de *Spirulina platensis* ainda são pouco estudadas. Anusuya Devi e Vankataraman (1984) determinaram algumas propriedades funcionais da biomassa e do concentrado proteico de *Spirulina platensis*, comparando-as com proteína de soja; destacaram que tanto a biomassa como o concentrado apresentaram valores inferiores de capacidade de absorção de água e superiores de capacidade de absorção de óleo ao comparar com a proteína de soja.

Nirmala, Prakash e Venkararaman (1992), destacam que a solubilidade máxima de proteínas de *Spirulina platensis* ocorre em intervalos de pH entre 8 a 10. Benelhadj et al. (2016), avaliaram um isolado proteico *Spirulina platensis* e, também encontraram maior solubilidade em pH 10, sendo a solubilidade mínima encontrada em pH 3, o qual corresponde ao ponto isoelétrico da proteína avaliada (CHRONAKIS et al., 2000).

Chronakis (2001) menciona sobre o efeito da temperatura e do pH na viscosidade do concentrado proteico obtido a partir de *Spirulina platensis*; o autor observa que viscosidades menores ocorrem em suspensões do concentrado proteico em pH próximo a 9,0, devido ao aumento da solubilidade desta proteína. Ainda, o autor destaca que o concentrado proteico pode formar géis durante o aquecimento a 90°C, subsequente ao resfriamento em temperatura ambiente o que proporciona o aumento na rede elástica do gel.

Da mesma forma, capacidades emulsificantes e espumantes das proteínas de *Spirulina platensis* também estão relacionadas com a sua solubilidade. Ao estudar a capacidade emulsificante do isolado proteico de *Spirulina platensis*, Benelhadj et al. (2016) verificaram que em pH próximo ao ponto isoelétrico, ocorreu uma menor solubilidade das proteínas, com a redução da formação da interface óleo/água com a rede proteica, diminuindo a capacidade de formação de emulsão. Além disso, os mesmos autores observaram que a capacidade de formação de espuma também depende do pH, sendo que o valor máximo desta propriedade ocorreu em pH 10, resultante, principalmente, pelo aumento da carga líquida das proteínas que reduz as interações hidrofóbicas permitindo uma maior flexibilidade da proteína.

Conforme os estudos citados torna-se evidente que as propriedades funcionais das proteínas de *Spirulina platensis* são importantes do ponto de vista tecnológico podendo ser aplicada como ingredientes alimentares, contribuindo com o processamento e características funcionais de diferentes alimentos.

Entretanto, como não existem metodologias oficiais para determinação das propriedades funcionais de proteínas, existem algumas divergências nos procedimentos analíticos. Na Tabela 3.5 estão descritos alguns trabalhos que apresentam variações nas metodologias utilizadas para as análises de Capacidade de Absorção de Água

($CA_{\text{água}}$), Capacidade de Formação de Espuma (CF_{espuma}), Estabilidade de Espuma (E_{espuma}), Capacidade de Formação de Emulsão ($CF_{\text{emulsão}}$) e Estabilidade de Emulsão ($E_{\text{emulsão}}$) em proteínas de *Spirulina platensis*, de soro de leite e semente de gergelim.

Tabela 3.5 – Divergências em metodologias utilizadas para determinação de $CA_{\text{água}}$, CF_{espuma} , E_{espuma} , $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$ em proteínas.

Funcionalidade Tecnológica	Metodologias			
	Anusuya Devi e Venkataraman, 1984.	Patel e Kilara, 1990.	Cano-Medina et al., 2011.	Benelhadj et al., 2016.
$CA_{\text{água}}$	16,7% de concentrado proteico obtido da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> sem controle de pH.	Não Avaliado.	Não Avaliado.	1,0% de isolado proteico obtido da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em pH ajustado para 3, 7 e 10.
CF_{espuma}	3,0% de biomassa desengordurada de <i>Spirulina platensis</i> em pH ajustado para 2 a 10.	5,0% de proteína de soro de leite em pH ajustado para 7.	0,5, 2,0, 3,0 e 4,5% de concentrado proteico de semente de gergelim em pH ajustado para 2,0, 5,0, 7,0, 8,5e 10,0	1,0% de isolado proteico obtido da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em pH ajustado para 2 a 10.
E_{espuma}	3,0% de biomassa desengordurada de <i>Spirulina platensis</i> sem controle de pH.	5,0% de proteína de soro de leite em pH ajustado para 7.	0,5, 2,0, 3,0 e 4,5% de concentrado proteico de semente de gergelim em pH ajustado para 2,0, 5,0, 7,0, 8,5e 10,0	1,0% de isolado proteico obtido da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em pH ajustado para 3, 7 e 10.
$CF_{\text{emulsão}}$	5,2% de isolado proteico obtido da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em pH ajustado para 2 a 10.	2,0% de proteína de soro de leite em pH ajustado para 7.	2,5, 5,0 e 7,5% de concentrado proteico de semente de gergelim em pH ajustado para 4,5, 7,0 e 9,5.	11,1% de isolado proteico obtido da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em pH ajustado para 2 a 10.
$E_{\text{emulsão}}$	Não avaliado.	2,0% de proteína de soro de leite em pH ajustado para 7.	2,5, 5,0 e 7,5% de concentrado proteico de semente de gergelim em pH ajustado para 4,5, 7,0 e 9,5.	11,1% de isolado proteico obtido da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em pH ajustado para 3, 7 e 10.

3.5 APLICAÇÕES DA *Spirulina platensis*

O uso de *Spirulina* fornece benefícios à saúde humana devido a sua composição química (LEÓN, 2010). Neste contexto, existem muitas empresas que estão produzindo *Spirulina* como suplemento alimentar, sendo vendidos em lojas de alimentos naturais em todo o mundo (BELAY et al., 1993). O uso de cápsulas desta microalga pode promover benefícios como a melhora da constipação gastrointestinal, auxiliar no emagrecimento (causando a redução da absorção e do armazenamento de gordura, além de acelerar a taxa metabólica da gordura no organismo humano) e auxiliar a circulação sanguínea (EL-TANTAWY, 2015).

Desta forma, a *Spirulina platensis* é comercializada como um alimento natural ou suplemento alimentar, sendo disponibilizada em pó, tabletes, extratos ou cápsulas. Também pode ser adicionadas em doces, massas, bebidas, entre outros alimentos, como suplemento nutricional ou como corante natural (SOLETTO et al., 2005; DERNER, 2006).

A ficocianina, uma ficobiliproteína, é o principal pigmento da *Spirulina platensis*, podendo ser utilizada como corante natural em indústrias de alimentos e cosméticos, produzindo uma coloração azulada (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004). Sua aplicação na indústria farmacêutica também se deve a sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória, atividade hepatoprotetora e eliminação de radicais livres (XIE et al., 2015). A capacidade antioxidante da ficocianina está relacionada também com os demais pigmentos presentes na *Spirulina platensis*, entre eles, carotenóides e xantofila (BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008).

A *Spirulina platensis* pode produzir um grande número de compostos com valor agregado, tais como os ácidos graxos essenciais, linoleico e γ -linolênico, presentes na fração lipídica desta microalga (CHAIKLAHAN et al., 2008). Desta forma, os ácidos graxos poli-insaturados obtidos a partir da *Spirulina* podem ser adicionados a alimentos para crianças e lactentes, suplementos alimentares e cosméticos (SPOLAORE et al., 2006).

Ao tratar de cosméticos, algumas espécies de microalgas são destacadas no mercado, sendo as principais *Spirulina* e *Chlorella*; extratos destas microalgas podem ser encontrados em produtos para cuidados de rosto e pele, por exemplo,

cremes anti-idade e rejuvenescedores, também são aplicados em protetores solares e produtos para o cabelo (SPOLAORE et al., 2006; STOLZ; OBERMAYER, 2005). Um exemplo de um produto obtido a partir de *Spirulina* comercialmente disponível com suas propriedades destacadas pela empresa produtora é o *Protulines* da *Exymol SAM* (Mônaco) que é produzido a partir de proteínas de *Spirulina* (*S. platensis* ou *S. maxima*) (SPOLAORE et al., 2006).

Além da aplicação no consumo e uso humano, vários trabalhos indicam a aplicabilidade de *Spirulina platensis* na área ambiental, incluindo remoção da matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, produção de biocombustíveis, biofixação de CO₂ entre outros (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012). Mezzomo et al. (2010), avaliaram o cultivo de *Spirulina platensis* em efluente de suíno e verificaram a remoção de DQO (Demanda Química de Oxigênio) e fósforo, sendo destacado como uma solução para o impacto ambiental gerado pela descarga de efluentes em fontes naturais; o mesmo estudo também indica o uso da biomassa produzida em rações animais. Al-Homaidan et al. (2014) estudaram a importância de *Spirulina platensis* quando utilizada como biossorvente para remoção de cobre a partir de soluções aquosas, ao expor a cianobactéria sob diferentes condições, envolvendo variações nas concentrações de cobre, pH, tempo de contato, temperatura e concentração de biomassa seca, conseguiram remover cerca de 90,6% dos íons de cobre em solução.

Ainda no contexto ambiental, Radmann et al. (2011) observaram que o uso do gás de combustão proveniente de uma usina termoelétrica incrementa a produção de biomassa no cultivo de *Spirulina platensis* e diminui a concentração de CO₂ no gás de combustão.

De acordo com Zhu et al. (2014), as microalgas apresentam grande potencial como matéria-prima para a produção de bioetanol, embora haja limitada literatura relacionada ao assunto. Na obtenção de bioetanol a partir de biomassa microalgal, os carboidratos são hidrolisados enzimaticamente para conversão em carboidratos simples e posteriormente fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* ou outras leveduras alcooleiras (VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011). De acordo com Becker (2007), a microalga *Spirulina platensis* pode acumular entre 8,0 e 14,0% de carboidratos (base seca), com rendimento teórico em etanol de 40 – 70 g/Kg de biomassa.

3.6 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MICROALGAS

A etapa de extração dos compostos de interesse a partir de microalgas representa um dos principais limitantes para a produção de biocompostos em larga escala (RASHID; REHMAN; HAN, 2013). Além disso, sua exploração adequada permite viabilizar a sua aplicação no conceito de Biorrefinarias Integradas.

Neste contexto, para que seja possível acessar esses componentes, métodos como dissolução da célula em meio alcalino, uso de solventes orgânicos para extração, técnicas de choque térmico (congelamento-descongelamento) ou aplicação de ondas ultrassônicas tem se mostrado eficientes (SCHWENZFEIER; WIERENGA; GRUPPEN, 2011). Além disso, líquidos iônicos, representados por sais líquidos a temperatura ambiente, de baixo ponto de fusão (abaixo de 100°C) tem recebido bastante atenção nos processos de separação de materiais bioativos de plantas, incluindo proteínas (TANG et al., 2012). Contudo, a aplicação desta ferramenta para extração de componentes ainda possui controvérsias, sendo que sua elevada viscosidade pode afetar negativamente no processo de transferência de massa e energia (MARSH; BOXALL; LICHTENTHALER, 2004).

Outras formas de promover a ruptura da parede celular de microalgas, anteriormente a extração de proteínas, envolvem técnicas utilizando ação mecânica (como alta pressão, homogeneizadores, agitadores, etc.), tratamentos químicos e/ou enzimáticos (SARI; BRUINS; SANDERS, 2013); extrações por fluídos supercríticos, também, têm recebido maiores atenções como uma forma alternativa de extração, sendo que esta técnica é responsável por promover alta velocidade e eficiência de extração, onde o meio extrator é um gás (MENDIOLA et al., 2007).

Além disso, tecnologias de campo elétrico pulsado são reconhecidas como uma ferramenta eficiente para extração de proteínas citoplasmáticas, não afetando sua integridade. Esta técnica proporciona o aumento na permeabilidade da membrana celular causado pela aplicação de pulsos elétricos curtos, sem utilizar altas temperaturas (COUSTETS et al., 2015).

Após a ruptura da célula é necessário à concentração da fração proteica, que na maioria das vezes é realizada baseada no ponto isoelétrico das proteínas, porém, igualmente, isto pode ocorrer de maneira distinta, como a aplicação de ultrafiltração

tangencial (URSU et al., 2014). Chronakis et al. (2000) sugere que a precipitação das proteínas extraídas de *Spirulina platensis* seja realizada através do ajuste do pH para o ponto isoelétrico das proteínas desta microalga (3,0), seguindo por centrifugação e neutralização. A Tabela 3.6 descreve alguns estudos de extração de proteínas de microalgas por meio da aplicação de técnicas distintas de extração.

Tabela 3.6 – Estudos com aplicações de diferentes técnicas de extração de proteínas de microalgas.

Microalga	Técnicas de extração	Performance	Autor
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Líquido Iônico; Congelamento-Descongelamento; Ultrassom; Combinação de Congelamento-Descongelamento e Ultrassom; Baixa Temperatura com Alta Pressão.	12,1% de proteínas extraídas pelo método Líquido Iônico; 3,2% pelo método Congelamento-Descongelamento; 16% através do uso de ondas ultrassônicas; 22,9% pela combinação dos métodos Congelamento-Descongelamento e ultrassom; 45,8% pelo método de baixa temperatura com alta pressão.	Wang e Zhang, 2012
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Aquecimento; Agitação mecânica; Hidrólise enzimática.	A agitação (35 min) aumentou a hidrólise de 13 a 50%; O aquecimento (80°C por 12 min) resultou em 30% de hidrólise; A combinação dos dois métodos resultou em 50% de hidrólise, portanto, o tratamento térmico foi descartado; O rendimento de aminoácidos obtido foi de 60%.	Romero Garcia, Acién Fernández e Fernández Sevilla, 2012
<i>Palmaria palmata</i>	Choque osmótico; Agitação mecânica; Tratamento com Enzima Polisacaridase.	Dos três métodos avaliados, a extração enzimática foi a mais promissora (11,57%), recuperando 67% das proteínas totais; Choque osmótico e agitação extraíram 6,77 e 6,92%, respectivamente.	Harnedy e Fitzgerald, 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alta pressão Hidrostática (pH 7,0 e 12,0) com duas técnicas de precipitação das proteínas: Ponto Isoelétrico e Ultrafiltração Tangencial.	Ponto Isoelétrico: 76,0 e 57,0% de rendimento de extração de proteína, nos pHs 12,0 e 7,0, respectivamente; Ultrafiltração Tangencial: 87,0 e 95,0% conforme os pHs 12,0 e 7,0.	Ursu et al., 2014
<i>Spirulina platensis</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Haematococcus pluvialis</i> ; <i>Rhodophyta Porphyridium cruentum</i> ; <i>Nannochloropsis oculata</i> .	Alta pressão Hidrostática; Ultrassom; Agitação mecânica; Tratamento químico.	A técnica de alta pressão hidrostática foi a que apresentou maiores percentuais de recuperação de proteínas das microalgas avaliadas, sendo a agitação mecânica a que promoveu menor recuperação; Da mesma forma, para a <i>S. platensis</i> , a alta pressão hidrostática obteve maior recuperação (78%), seguindo para o método químico (53,4%), ultrassom (47,1%) e, com menor percentual agitação mecânica (35%).	Safi et al, 2014

3.6.1 Uso de Ultrassom para Extração de Proteínas de Microalgas

Entre as técnicas de extração de compostos de interesse, o uso de ondas ultrassônicas oferece diversos benefícios, sendo uma eficiente alternativa para técnicas convencionais (HOSSAIN et al., 2012). Esta técnica de extração é aplicada há anos, principalmente nas áreas médicas e químicas. Contudo, sua utilização como ferramenta para extração de componentes importantes para indústria de alimentos é consideravelmente nova (VILKHU et al., 2008).

Em processos de extração de compostos de microalgas, a irradiação ultrassônica é responsável por auxiliar na ruptura celular e na redução do tamanho das partículas da microalga para melhor liberação do conteúdo celular; além disso, o tratamento ultrassônico também pode melhorar a eficiência dos processos de extração de proteínas posteriores à lise celular (LUO; FANG; SMITH, 2014).

O aprimoramento obtido por meio do ultrassom é atribuído principalmente para o efeito de cavitação acústica produzida no solvente pela passagem de uma onda ultrassom. O ultrassom também oferece um efeito mecânico que permite uma maior penetração do solvente na matriz de amostra, aumentando a área de superfície de contato entre a fase sólida e líquida, e como resultado, o soluto mais rapidamente difunde a partir da fase sólida no solvente (HOSSAIN et al., 2012).

Como vantagens desta técnica, pode-se destacar a possibilidade de redução do tempo de trabalho, aumento da segurança do processo, sendo que a extração pode ser realizada a temperatura ambiente, suprimindo a necessidade de aquecimento de solventes (GOGATE; KABADI, 2009). Do mesmo modo, o uso de ondas ultrassônicas permite a redução do volume de solventes utilizados, obtenção de uma mistura mais homogênea, emprego de equipamentos menores e maior controle do processo (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). Esta técnica também possui potencial para alcançar, simultaneamente, a extração de determinada substância e a sua encapsulação com um material encapsulante disperso no fluido de extração contendo

radicais hidroxilas que irão iniciar a ligação covalente e a formação de microesferas. (VILKHU et al., 2008).

Os efeitos mecânicos do ultrassom proporcionam maior penetração do solvente nos materiais celulares e melhoram a transferência de massa, devido aos efeitos de *microstreaming* (GOGATE; KABADI, 2009) causado por cavitação simétrica que cria ondas de choque que se propagam ao circundante sólido causando turbulência microscópica e/ou afinamento da película de sólido-líquido (HAGENSON; DORAISWAMY, 1998).

A aplicação desta técnica de extração em larga escala pode atingir ganhos em taxa e eficiência de extração, representando benefícios econômicos. Além disso, outras vantagens de aplicação do ultrassom na indústria incluem: possibilidade de extração de componentes sem a utilização de solventes, ou seja, oportunidade de extração em produtos onde não podem ser adicionados solventes químicos (exemplo: processo de produção de sucos concentrados) (VILKHU et al., 2008).

Por outro lado, algumas desvantagens da utilização de ondas ultrassônicas nos processos de extração estão relacionadas com a dificuldade de renovação do solvente durante o processo e a necessidade de separação e lavagem após a extração, o que pode promover perda e/ou contaminação do extrato (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003), e pelo fato do tamanho das partículas ser um fator crítico, interferindo na eficiência da técnica (FILGUEIRAS et al., 2000). Além disso, ao se tratar do uso de banhos de ultrassom, se destacam duas principais desvantagens: falta de uniformidade na distribuição de energia e redução de energia com o tempo, de modo que a energia fornecida para o banho pode ser desperdiçada (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

A biomassa inativa da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 (COSTA et al., 2000) foi obtida a partir de cultivos realizados em planta piloto localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar - RS, em tanques abertos de 12.000 L do tipo *raceways*, cedidas pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Todos os reagentes utilizados possuíam pureza analítica, sendo de procedências comerciais distintas.

4.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

Primeiramente, a biomassa foi submetida à extração de lipídios, visto que estes podem ser utilizados como fontes de ácidos graxos poli-insaturados (indústria farmacêutica, cosméticos e alimentos), para posterior extração de proteínas e carboidratos. Sendo assim, a biomassa foi desengordurada em um sistema de extração tipo *Soxhlet* (AOAC, 1998) utilizando como solvente o hexano (50-60°C), sendo o mesmo recuperado em rota- evaporador sob vácuo a 65°C (Fisatom, 802, São Paulo, Brasil).

4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DESENGORDURADA DE *Spirulina platensis*

Para maximizar as condições de extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis*, aplicou-se tratamento ultrassônico associado ao método físico de agitação, em meio alcalino, a fim de proporcionar a ruptura da parede celular, visto que estudos recentes consideram o rompimento celular como um dos principais limitantes para extração de um componente específico (RASHID; REHMAN; HAN, 2013; SAFI et al., 2014). Além disso, de acordo com Chronakis et al. (2000), as proteínas de *Spirulina* podem ser extraídas pela dissolução da biomassa em pH alcalino com solução de NaOH, sendo que a partir desta solução as proteínas podem ser facilmente separadas dos carboidratos por precipitação ácida.

Inicialmente foi aplicado um PFF 2^{7-3} (3 pontos centrais, total de 19 ensaios), para a avaliação do efeito de 7 variáveis sobre o processo de extração de proteínas e carboidratos, a citar: razão biomassa/água (g.L^{-1}); pH do meio de extração; temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$); tempo de exposição ao tratamento ultrassônico (min); amplitude de frequência do tratamento ultrassônico (%); velocidade de agitação mecânica (rpm); tempo de agitação mecânica (min). Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no PFF estão apresentados na Tabela 4.1.

Os ensaios foram conduzidos em béqueres de 100 mL com volume total de 60 mL. O procedimento de extração foi iniciado pela suspensão da biomassa em água purificada e a correção do pH da suspensão com solução de NaOH $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, de acordo com os níveis propostos (Tabela 4.1). Posteriormente, a suspensão foi submetida ao tratamento ultrassônico em banho de ultrassom (Elmasonic, P60H, Alemanha) na frequência de 37 kHz, pelo tempo, temperatura e amplitude de frequência propostos no delineamento. Por fim, a suspensão foi submetida à agitação mecânica, realizada em banho-maria (Novatécnica, NT 245, São Paulo, Brasil) com uso de agitador mecânico (Fisatom, 713 D, São Paulo, Brasil), nas velocidades e tempos também indicados pelo planejamento. A separação das fases foi realizada por

centrifugação a 7493 x *g* a 25°C durante 15 min (Centrifuga Hettich Rotina, 420 R, Alemanha).

Tabela 4.1 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no PFF.

Variáveis / Níveis	Biomassa/ Água (g.L ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Tempo de Ultrassom (min)	Amplitude de Frequência (%)	Velocidade agitação (rpm)	Tempo de agitação (min)
-1	100	8,0	25,0	5,0	40	80	10
0	150	9,0	37,5	17,5	70	100	35
+1	200	10,0	50,0	30,0	100	120	60

A realização do PFF permitiu a seleção das variáveis estatisticamente significativas em relação ao processo de extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis*. Com estas variáveis, foram realizados DCCRs sequenciais objetivando-se a otimização do processo de extração de proteínas e carboidratos através da metodologia de superfície de resposta.

Do sobrenadante coletado nos planejamentos, o teor de proteínas totais foi avaliado pelo método de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1998); o fator de conversão de nitrogênio utilizado foi 6,25 (CHRONAKIS et al., 2000). O percentual de carboidratos foi mensurado pelo método de Antrona (OSBORNE, 1986), utilizando como padrão solução de sacarose 0,10 g.L⁻¹ sendo que as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PerkinElmer, UV-Vis Lambda XLS HP9 2FX, Estados Unidos) a 600 nm.

4.4 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO

Ao definir a melhor condição de extração de proteínas e carboidratos, foi realizada a etapa de precipitação de proteínas, para a separação da fase líquida contendo os carboidratos. Para tal, os sobrenadantes coletados que apresentaram os melhores conteúdos de proteínas e carboidratos, de acordo com os resultados dos planejamentos experimentais (Item 4.3), tiveram seu pH ajustado para 3,0 com HCl 2,0

mol.L⁻¹, considerado como o ponto isoelétrico das proteínas de *Spirulina* (CHRONAKIS et al., 2000), e a solução foi deixada em repouso por 30 a 60 min em 10°C para precipitação, seguida de centrifugação a 7493 x g (25°C) por 15 min (Centrifuga Hettich Rotina, 420 R, Alemanha). O precipitado obtido (concentrado proteico) foi lavado três vezes com água purificada e neutralizado (ajuste do pH para 7,0) com NaOH 2,0 mol.L⁻¹. Por fim, a amostra foi congelada a -22°C e submetida a secagem em Liofilizador (Labconco, FreeZone, Estados Unidos) em pressão absoluta menor que 0,8 mBar, temperatura de aquecimento de 40°C por 48 h, condições definidas a partir de testes preliminares em diferentes condições de temperatura e tempo. A Figura 4.1 apresenta o fluxograma para a obtenção do concentrado proteico obtido a partir da biomassa de *Spirulina platensis*.

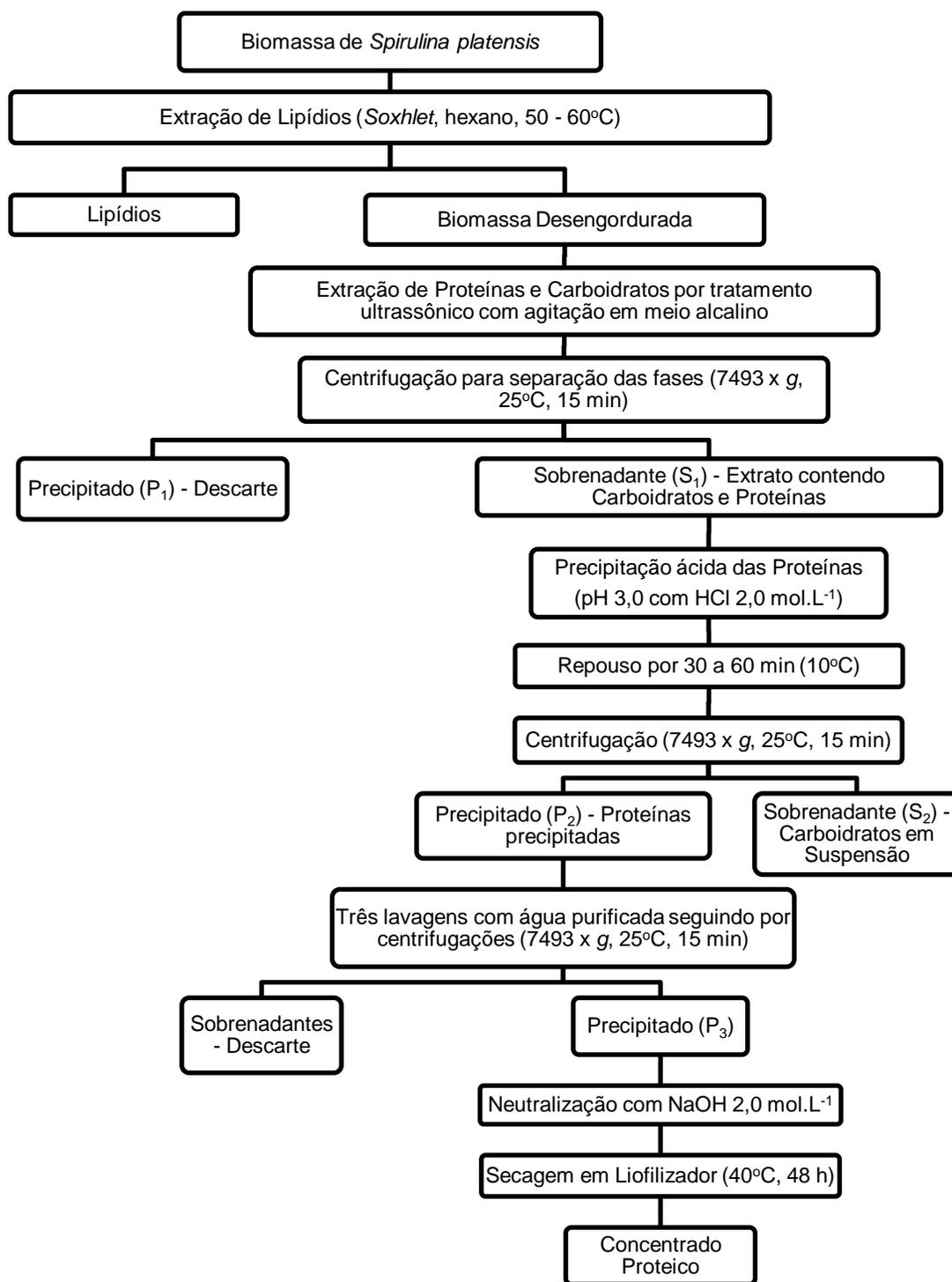


Figura 4.1 – Fluxograma do processo de extração e obtenção do concentrado proteico da biomassa de *Spirulina platensis*.

4.4.1 Rendimento Global e Proteico

O rendimento global do processo de obtenção do concentrado proteico obtido a partir da biomassa de *Spirulina platensis* foi determinado conforme a Equação 4.1. A pesagem das massas foi realizada em balança analítica (Marte, AW220, São Paulo, Brasil).

$$\text{Rendimento Global (\%)} = \frac{\text{Massa}_{CP}}{\text{Massa}_{BD}} \times 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde:

Massa_{CP} : Massa do Concentrado Proteico de *Spirulina platensis* (g)

Massa_{BD} : Massa da Biomassa Desengordurada de *Spirulina platensis* (g)

O rendimento proteico do concentrado obtido a partir da biomassa de *Spirulina platensis* foi determinado conforme Selling et al. (2013) (Equação 4.2). A pesagem das massas foi realizada em balança analítica (Marte, AW220, São Paulo, Brasil) e o percentual de proteínas foi determinado conforme o método de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1998).

$$\text{Rendimento Proteico (\%)} = \frac{(\text{Massa}_{CP} \times \text{PT}_{CP})}{(\text{Massa}_{BD} \times \text{PT}_{BD})} \times 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde:

Massa_{CP} : Massa do Concentrado Proteico de *Spirulina platensis* (g)

Massa_{BD} : Massa da Biomassa Desengordurada de *Spirulina platensis* (g)

PT_{CP} : Proteína Total no Concentrado Proteico de *Spirulina platensis* (%) (bs)

PT_{BD} : Proteína Total na Biomassa Desengordurada de *Spirulina platensis* (%) (bs)

4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTEICO

4.5.1 Composição Centesimal

O concentrado proteico e a biomassa de *Spirulina platensis* foram submetidos às análises de composição centesimal. O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1998), utilizando o fator de 6,25 para converter o teor de nitrogênio em proteínas totais (CHRONAKIS et al., 2000). Além disso, foram determinados os percentuais de umidade (Método 925.45b), cinzas (Método 923.03) e extrato etéreo (Método 920.39) de acordo com os procedimentos e normas da AOAC (1998); o teor de carboidratos totais foi obtido por diferença conforme a Equação 4.3.

$$\%Carb. = 100 - (\% Umidade + \%Proteínas + \%Lipídios + \%Cinzas) \quad \text{Equação 4.3}$$

4.5.2 Análise de Cor

Os parâmetros de cor do concentrado proteico foram determinados por medida instrumental utilizando o colorímetro Minolta® (Chroma Meter, CR400, Japão), com esfera de integração e ângulo de visão de 45°, ou seja, iluminação d/45 e iluminante D; os valores de luminosidade L*, a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema de cor CIELAB (*Commission International for Illumination*). As medidas de cor foram realizadas na superfície da amostra do concentrado proteico de *Spirulina platensis*, tomando três pontos diferentes de leitura.

4.5.3 Perfil de Aminoácidos

A composição de aminoácidos totais foi realizada conforme os métodos de White, Hart e Fry (1986) e Hagen, Frost e Augustin (1989), por cromatografia líquida de alto desempenho com coluna de fase reversa. O triptofano foi determinado segundo a metodologia de Spies (1967) utilizando o método enzimático-espectrofotométrico. As análises foram realizadas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Centro de Ciências e Qualidade de Alimentos.

O *escore químico* foi calculado para cada aminoácido essencial do concentrado proteico conforme a Equação 4.4 (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

$$\text{escore químico} = \frac{\text{mg de aminoácido} \cdot \text{g de proteína teste}^{-1}}{\text{mg do mesmo aminoácido} \cdot \text{g de proteína de referência}^{-1}} \quad \text{Equação 4.4}$$

4.5.4 Identificação de Parâmetros Espectrais

A análise da estrutura proteica do concentrado proteico de *Spirulina platensis* foi realizada pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). O concentrado proteico liofilizado foi submetido à análise em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (PerkinElmer, FT-IR Spectrum 100S, Estados Unidos), acoplado com o acessório de reflexão total atenuada (ATR), no intervalo de número de onda de 600-4000 cm^{-1} .

As estruturas secundárias das proteínas de *Spirulina platensis* foram avaliadas por meio da deconvolução da região de interesse (1800–1500 cm^{-1} , correspondente à região da amida I), por meio da segunda derivativa e do *curve-fitting* (ajuste das curvas por deconvolução espectral). Os picos foram ajustados e a área medida por funções gaussianas tendo sido observados os centros e áreas dos mesmos.

4.6 FUNCIONALIDADE TECNOLÓGICA DO CONCENTRADO PROTEICO

4.6.1 Solubilidade

O teor de proteínas solúveis foi determinado conforme Glória e Regitano-d'Arce (2000) e Morr et al. (1985), com modificações. Foram dispersos 0,2 g do concentrado proteico em 40 mL de água destilada (m/v) e agitados em agitador magnético (Fisatom, 752A, São Paulo, Brasil) por 10 min. Em seguida, o pH foi ajustado em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, adicionando-se HCl 2,0 mol.L⁻¹ ou NaOH 2,0 mol.L⁻¹. Posteriormente, a amostra foi transferida para tubos graduados tipo Falcon de 50 mL e centrifugada a 4097 x g (25°C) por 15 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil). Da mesma forma, foi elaborada uma amostra controle a qual não foi submetida ao ajuste de pH nem a centrifugação. Os conteúdos de proteínas dos sobrenadantes obtidos durante a centrifugação e da solução controle foram determinados de acordo com Lowry et al. (1951) utilizando como padrão solução de albumina 1,5 g.L⁻¹ sendo que as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PerkinElmer, UV-Vis Lambda XLS HP9 2FX, Estados Unidos) a 730 nm. Os resultados foram expressos pelo percentual de proteínas solúveis (PS) contido nas amostras (Equação 4.5).

$$PS (\%) = \frac{\text{Proteína solúvel no sobrenadante (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Proteína solúvel na solução controle (g.L}^{-1}\text{)}} \times 100$$

Equação 4.5

4.6.2 Capacidade de Absorção de Água ($CA_{\text{água}}$), Capacidade de Formação de Espuma (CF_{espuma}), Estabilidade de Espuma (E_{espuma}), Capacidade de Formação de Emulsão ($CF_{\text{emulsão}}$) e Estabilidade de Emulsão ($E_{\text{emulsão}}$)

Com o intuito de otimizar as propriedades funcionais tecnológicas ($CA_{\text{água}}$, CF_{espuma} , E_{espuma} , $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$) do concentrado proteico da biomassa de *Spirulina platensis*, foi aplicado um DCCR 2^2 (3 pontos centrais, total de 11 ensaios), para a avaliação de duas variáveis, a citar: pH e concentração de concentrado proteico (p/v) (%). Esta estratégia foi utilizada devido às variações nas metodologias científicas com relação, principalmente, a concentração de concentrado proteico e, pelo fato do pH interferir diretamente nas características de funcionalidade tecnológica das proteínas devido a repulsão eletrostática e hidratação dos resíduos carregados das proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Além disso, a técnica permitiu avaliar estas propriedades em diferentes condições, não estudando somente um valor pontual e possibilitando a avaliação de uma faixa mais ampla das variáveis que podem interferir no processamento de alimentos. Os níveis reais e codificados das variáveis independentes estudadas no DCCR estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no DCCR 2^2 para análise das propriedades de $CA_{\text{água}}$, CF_{espuma} , E_{espuma} , $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$ do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Variáveis / Níveis	pH	Concentrado Proteico (%)
-1,41	2,0	0,4
-1	3,0	0,9
0	5,0	2,2
+1	7,0	3,5
+1,41	8,0	4,0

4.6.2.1 Capacidade de Absorção de Água

A $CA_{\text{água}}$ foi determinada de acordo com a metodologia de Köhn et al. (2015), com modificações. Os ensaios foram conduzidos em tubos graduados tipo Falcon de 15 mL com volume total de 5,0 mL de solução tampão fosfato de sódio $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ conforme os níveis de concentração de concentrado proteico e pH descritos na Tabela 4.2. Em seguida, foi realizada a agitação das amostras em Vortex (Logen, LSM56-4, São Paulo, Brasil) seguido pelo repouso por 30 min e centrifugação a $1775 \times g$ (25°C) por 15 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil). O sobrenadante obtido foi escorrido cuidadosamente sobre vidro relógio por 20 min. Por fim, pesou-se o tubo com o resíduo em balança analítica (Marte, AW220, São Paulo, Brasil). Os resultados foram determinados conforme a Equação 4.6 e expressos em g de água absorvido por 100 g (%) de concentrado proteico.

$$CA_{\text{água}}(\%) = \frac{\text{Água absorvida}}{\text{Peso inicial da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 4.6}$$

4.6.2.2 Capacidade de Formação e Estabilidade de Espuma

A CF_{espuma} foi determinada segundo a metodologia de Mohanty, Mulvihill e Fox (1998), com algumas adaptações. As dispersões foram preparadas em tubos graduados tipo Falcon de 50 mL com volume total de 5,0 mL de solução tampão fosfato de sódio $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ conforme os níveis de concentração de concentrado proteico e pH descritos na Tabela 4.2. Posteriormente, os ensaios foram mantidos sob agitação em Vortex (Logen, LSM56-4, São Paulo, Brasil) por 10 min e agitados por 1 min com mixer com batedor espiral (Britânia, BMM2, China). Para a determinação da CF_{espuma} o volume da espuma aumentado pelo batimento foi medido imediatamente (Equação 4.7).

$$CF_{espuma}(\%) = \frac{\text{Volume final de espuma (mL)}}{\text{Volume inicial da dispersão (mL)}} \times 100 \quad \text{Equação 4.7}$$

Para determinação da E_{espuma} levou-se em consideração o método proposto por Ahmed e Schmidt (1979) e modificações, onde a espuma formada para determinação da CF_{espuma} foi deixada em repouso por 60 min a 30°C e em seguida foi mensurado o volume da espuma (Equação 4.8).

$$E_{espuma}(\%) = \frac{\text{Volume de espuma após 60 min(mL)}}{\text{Volume inicial da dispersão (mL)}} \times 100 \quad \text{Equação 4.8}$$

4.6.2.3 Capacidade de Formação e Estabilidade de Emulsão

A capacidade de formação e a estabilidade de emulsão foram determinadas segundo metodologias de Cano-Medina et al. (2011), com modificações. Os ensaios para determinação da $CF_{emulsão}$ foram realizados em béqueres de 50 mL adicionando-se o concentrado proteico e 5,0 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol.L⁻¹ conforme os níveis de concentração de concentrado proteico e pH descritos na Tabela 4.2. O processo de emulsificação ocorreu sob agitação mecânica contínua (Fisatom, 713 D, São Paulo, Brasil) a 2500 rpm e adição, lentamente, de gotas de óleo de milho. O ponto de emulsão foi verificado visualmente pela fase formação da fase homogênea (creme). O volume total da emulsão obtida foi transferido para um tubo graduado tipo Falcon de 50 mL e centrifugado a 3414 x g (25°C) por 5 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil). Pelo volume da camada emulsionada após a centrifugação, foi determinada a porcentagem de $CF_{emulsão}$ (Equação 4.9).

$$CF_{emulsão}(\%) = \frac{\text{Volume da camada emulsionada(mL)}}{\text{Volume total antes da centrifugação (mL)}} \times 100 \quad \text{Equação 4.9}$$

Para determinar a $E_{emulsão}$ foi realizado o mesmo procedimento para obtenção da emulsão e após isto, a amostra foi submetida em tubo graduado tipo Falcon de 50 mL e conduzida ao aquecimento a 80°C em banho-maria (Novatécnica, NT245, São Paulo, Brasil) por 30 min. Por fim, o volume total da emulsão foi centrifugado a 3414 x g (25°C) por 5 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil). Pelo volume da camada emulsionada após a centrifugação, foi determinada a porcentagem de $E_{emulsão}$ (Equação 4.10).

$$E_{emulsão}(\%) = \frac{\text{Volume da camada emulsionada (mL)}}{\text{Volume total antes da centrifugação (mL)}} \times 100 \quad \text{Equação 4.10}$$

A fim de avaliar a estrutura microscópica da emulsão formada, utilizou-se microscópio ótico (Olympus, BX51, Japão) acoplado com uma câmera (Olympus, DP25, Japão). A montagem foi focalizada e avaliada com aumentos de 10, 20 e 40x, sendo que as estruturas das emulsões foram melhor visualizadas com aumento de 20x.

4.6.3 Capacidade de Formação de Gel (CF_{gel})

Para determinação da CF_{gel} foi levado em consideração que em geral a formação de géis proteicos são provenientes do aquecimento de uma solução proteica moderadamente concentrada e, que alguns fatores ambientais, entre eles, o pH, também, podem afetar na sua formação (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010); além disso, o tempo de aquecimento muitas vezes contribui para o desenvolvimento da rede de gel, garantindo sua formação. Neste contexto, para a CF_{gel} do concentrado proteico de *Spirulina platensis* foi realizada uma estratégia de estudo diferente da aplicada no Item 4.6.1, aplicando um PFF 2^{4-1} (3 pontos centrais, total de 11 ensaios), para a avaliação do efeito de quatro variáveis, a citar: concentrado proteico (p/v) (%), pH, temperatura (°C) e tempo (h). Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no PFF estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no PFF 2⁴⁻¹ para análise das CF_{gel} do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Variáveis / Níveis	Percentual de Concentrado Proteico (%)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)
-1	4,0	2,0	70,0	1,0
0	8,0	5,0	80,0	2,5
+1	12,0	8,0	90,0	4,0

A análise da CF_{gel} foi realizada considerando o estudo de Benelhadj (2016) com algumas modificações. Os ensaios foram conduzidos em frascos âmbar de 15 mL com volume total de 7,0 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol.L⁻¹ conforme os níveis de pH e de concentração de concentrado proteico propostos na Tabela 4.3. Em seguida, as amostras foram conduzidas ao aquecimento em banho-maria (Novatécnica, NT245, São Paulo, Brasil) de acordo com os intervalos de temperatura e tempo, também indicados no delineamento. Posteriormente, as amostras foram deixadas em repouso por 1 h em 10°C. Por fim, os ensaios foram submetidos à análise de textura realizada em texturômetro (Stable Micro Systems, TA.HDPlus Texture Analyser, Inglaterra) utilizando *probe* P/6, com compressão da amostra de 5,0 mm, velocidades de pré-teste e pós-teste de 60,0 mm.min⁻¹, velocidade de teste de 30,0 mm.min⁻¹, e força do *trigger* de 0,1 g. Desta forma, foi possível determinar os parâmetros de força de quebra do gel (g) e de deformação (mm), sendo as respostas do PFF.

4.6.3.1 Viscosidade do gel

Ao definir a melhor condição de formação de gel do concentrado proteico de *Spirulina platensis* (12,0% de concentrado proteico e pH 8,0), foi realizada a determinação da viscosidade em função da temperatura. As amostras foram conduzidas a um reômetro rotativo de cilindros concêntricos digital (Brookfield, LVDV-III Ultra, Estados Unidos) acoplado com banho termostático (Brookfield, TC-602D, Estados

Unidos) com temperatura controlada, utilizando-se *spindle* tipo LV-4, velocidade de 30 rpm, sendo estudado o intervalo de temperatura entre 30 a 90°C. Além disso, verificou-se no mesmo equipamento o comportamento reológico do gel formado utilizando o *spindle* tipo SC4-34, temperatura de 30°C, realizando-se uma rampa de velocidade entre 0 a 30 rpm. Os dados experimentais foram ajustados de acordo com os modelos de Bingham, Casson, Hersch-Bulkley e Lei da Potência, descritos nas Equações 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14, respectivamente (STEFFE, 1996).

$$\tau = \tau_o + \mu \cdot \gamma \quad \text{Equação 4.11}$$

$$\tau^{0,5} = K_1 + K_2 \cdot \gamma^{0,5} \quad \text{Equação 4.12}$$

$$\tau = \tau_o + K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação 4.13}$$

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação 4.14}$$

Onde:

τ : Tensão de Cisalhamento (Pa)

τ_o : Tensão de Cisalhamento inicial (Pa)

μ : Viscosidade plástica (Pa.s)

γ : Taxa de Deformação (s^{-1})

K : Índice de Consistência (Pa.sⁿ)

n : Índice de Comportamento

4.6.4 Capacidade de Absorção de Óleo ($CA_{\text{óleo}}$)

Para a análise de $CA_{\text{óleo}}$ não houve necessidade da aplicação de estratégias utilizando planejamentos experimentais, visto que foi avaliado o efeito de uma única variável sobre a resposta de $CA_{\text{óleo}}$ (concentração de concentrado proteico). Foi utilizada a metodologia de Lin, Humbert e Sosulski (1974), com algumas adaptações. Foram avaliados diferentes concentrações de concentrado proteico em óleo de milho (0,4, 0,9, 2,2, 3,5 e 4,0%, p/v), sendo os ensaios conduzidos em tubos graduados tipo Falcon de 15 mL com volume total de 5,0 mL. Primeiramente, foi realizada a agitação

da amostra em Vortex (Logen, LSM56-4, São Paulo, Brasil) seguido pelo repouso por 30 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1775 x g (25°C) por 15 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil) e, o sobrenadante foi escorrido cuidadosamente sobre vidro relógio por 20 min. Por fim, pesou-se o tubo com o resíduo em balança analítica (Marte, AW220, São Paulo, Brasil). Os resultados foram determinados conforme a Equação 4.15 e expressos em g de óleo absorvido por 100 g de concentrado proteico (%).

$$CA_{\text{óleo}}(\%) = \frac{\text{Óleo absorvido}}{\text{Peso inicial da amostra}} \times 100$$

Equação 4.15

4.7 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios dos planejamentos foram realizados aleatoriamente e os resultados foram tratados com o programa STATISTICA 11.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). A adequacidade dos modelos foi avaliada através de análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para avaliar as diferenças entre as médias considerando um valor-p menor que 0,05 ($p \leq 0,05$) como estatisticamente significativo. Os ajustes dos dados experimentais para as análises da estrutura proteica, da viscosidade e do comportamento reológico foram tratados com o programa ORIGINPRO 7.0 (*OriginLab Corporation, Ma, USA*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DA BIOMASSA DESENGORDURADA DE *SPIRULINA PLATENSIS*

Para otimização do processo de extração de proteínas e carboidratos da biomassa desengordurada de *Spirulina platensis* aplicou-se uma estratégia sequencial de planejamento experimental, avaliando o efeito de sete variáveis independentes. Primeiramente foi desenvolvido um PFF 2^{7-3} , seguido de dois DCCRs (2^3 e 2^2).

5.1.1 Planejamento Fatorial Fracionário (PFF)

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas e as respostas de proteínas e carboidratos, está apresentada na Tabela 5.1. Os percentuais de extração observados entre as respostas do planejamento foram de 19,31 a 33,97% de proteínas (ensaios 12 e 11) e 5,44 a 10,81% de carboidratos (ensaios 4 e 11). Desta forma o processo de extração representou um percentual de recuperação entre 38,10 a 67,00% e 24,15 a 48,01% de proteínas e carboidratos, respectivamente, considerando o teor de proteínas e carboidratos totais na biomassa desengordurada (50,70 e 22,52% (b.u.)). Ainda, os pontos centrais apresentaram uma pequena variação (erro padrão = $\pm 0,87$ e $\pm 0,35$ para proteínas e carboidratos), indicando uma boa repetibilidade do processo.

Tabela 5.1 – Matriz do PFF 2^{7-3} com valores reais e codificados das variáveis independentes e dependentes para extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis*.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d	x_5^e	x_6^f	x_7^g	y_1^h	y_2^i
1	-1 (100)	-1 (8,0)	-1 (25,0)	-1 (5,0)	-1 (40)	-1 (80)	-1 (10)	20,34 ± 0,46	5,71 ± 0,13
2	+1 (200)	-1 (8,0)	-1 (25,0)	-1 (5,0)	+1 (100)	-1 (80)	+1 (60)	22,76 ± 1,00	8,18 ± 0,14
3	-1 (100)	+1 (10,0)	-1 (25,0)	-1 (5,0)	+1 (100)	+1 (120)	-1 (10)	23,70 ± 1,11	6,12 ± 0,14
4	+1 (200)	+1 (10,0)	-1 (25,0)	-1 (5,0)	-1 (40)	+1 (120)	+1 (60)	22,93 ± 0,83	5,44 ± 0,13
5	-1 (100)	-1 (8,0)	+1 (50,0)	-1 (5,0)	+1 (100)	+1 (120)	+1 (60)	28,68 ± 0,62	9,29 ± 0,40
6	+1 (200)	-1 (8,0)	+1 (50,0)	-1 (5,0)	-1 (40)	+1 (120)	-1 (10)	24,82 ± 0,20	6,44 ± 0,23
7	-1 (100)	+1 (10,0)	+1 (50,0)	-1 (5,0)	-1 (40)	-1 (80)	+1 (60)	28,06 ± 0,62	7,30 ± 0,14
8	+1 (200)	+1 (10,0)	+1 (50,0)	-1 (5,0)	+1 (100)	-1 (80)	-1 (10)	21,05 ± 0,29	9,67 ± 0,02
9	-1 (100)	-1 (8,0)	-1 (25,0)	+1 (30,0)	-1 (40)	+1 (120)	+1 (60)	25,25 ± 0,44	8,69 ± 0,32
10	+1 (200)	-1 (8,0)	-1 (25,0)	+1 (30,0)	+1 (100)	+1 (120)	-1 (10)	20,34 ± 0,68	7,45 ± 0,15
11	-1 (100)	+1 (10,0)	-1 (25,0)	+1 (30,0)	+1 (100)	-1 (80)	+1 (60)	33,97 ± 0,57	10,81 ± 0,04
12	+1 (200)	+1 (10,0)	-1 (25,0)	+1 (30,0)	-1 (40)	-1 (80)	-1 (10)	19,31 ± 0,22	7,10 ± 0,04
13	-1 (100)	-1 (8,0)	+1 (50,0)	+1 (30,0)	+1 (100)	-1 (80)	-1 (10)	22,23 ± 0,97	10,56 ± 0,01
14	+1 (200)	-1 (8,0)	+1 (50,0)	+1 (30,0)	-1 (40)	-1 (80)	+1 (60)	24,00 ± 0,40	8,40 ± 0,01
15	-1 (100)	+1 (10,0)	+1 (50,0)	+1 (30,0)	-1 (40)	+1 (120)	-1 (10)	28,05 ± 0,43	9,41 ± 0,05
16	+1 (200)	+1 (10,0)	+1 (50,0)	+1 (30,0)	+1 (100)	+1 (120)	+1 (60)	21,96 ± 0,82	7,85 ± 0,05
17	0 (150)	0 (9,0)	0 (37,5)	0 (17,5)	0 (70)	0 (100)	0 (35)	29,63 ± 0,49	9,69 ± 0,01
18	0 (150)	0 (9,0)	0 (37,5)	0 (17,5)	0 (70)	0 (100)	0 (35)	28,82 ± 0,54	9,71 ± 0,06
19	0 (150)	0 (9,0)	0 (37,5)	0 (17,5)	0 (70)	0 (100)	0 (35)	27,90 ± 0,12	9,10 ± 0,07

^a Razão Biomassa/água (g.L⁻¹); ^b pH; ^c Temperatura (°C); ^d Tempo de ultrassom (min); ^e Amplitude de frequência (%); ^f Velocidade de agitação (rpm); ^g Tempo de agitação (min); ^h Proteínas Totais (%) (g proteína . 100 g⁻¹ biomassa) ± erro padrão; ⁱ Carboidratos Totais (%) (g carboidratos . 100 g⁻¹ biomassa) ± erro padrão.

Analisando-se os resultados da Tabela 5.1 foi possível calcular os efeitos das sete variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 5.2. Verificou-se que as variáveis razão biomassa/água e tempo de agitação apresentaram efeitos significativos ($p \leq 0,10$) sobre a resposta de proteínas, sendo que para o percentual de carboidratos, as variáveis significativas foram temperatura, tempo de ultrassom e amplitude de frequência.

Tabela 5.2 – Efeito dos fatores estudados no PFF 2^{7-3} sobre os percentuais de proteínas totais (g proteínas . 100 g⁻¹ biomassa) e carboidratos totais (g carboidratos . 100 g⁻¹ biomassa).

Fatores	Proteínas Totais (%) (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa)				Carboidratos Totais (%) (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa)			
	Efeito	Erro Padrão	t (11)	p - valor	Efeito	Erro Padrão	t (11)	p - valor
Média	24,94	0,83	29,90	0,0000*	8,26	0,28	29,46	0,0000*
x₁^a	-4,14	1,82	-2,28	0,0437*	-0,92	0,61	-1,51	0,1603
x₂^b	1,33	1,82	0,73	0,4807	-0,13	0,61	-0,21	0,8387
x₃^c	1,28	1,82	0,70	0,4955	1,18	0,61	1,93	0,0805*
x₄^d	0,35	1,82	0,19	0,8528	1,52	0,61	2,48	0,0305*
x₅^e	0,24	1,82	0,13	0,8971	1,43	0,61	2,34	0,0390*
x₆^f	0,50	1,82	0,28	0,7874	-0,88	0,61	-1,44	0,1774
x₇^g	3,47	1,82	1,91	0,0826*	0,44	0,61	0,72	0,4894

^a Razão Biomassa/água (g.L⁻¹); ^b pH; ^c Temperatura (°C); ^d Tempo de ultrassom (min); ^e Amplitude de frequência (%); ^f Velocidade de agitação (rpm); ^g Tempo de agitação (min); *p ≤ 0,10.

A variável razão biomassa/água foi significativa para a resposta de proteínas, sendo que para ambas respostas, apresentou efeito negativo, indicando que o maior percentual de proteínas e carboidratos extraídos ocorre a menores concentrações de biomassa/água dentro da faixa estudada (100 a 200 g.L⁻¹). Isto pode ser justificado pela dificuldade de interação do solvente com a biomassa, onde conforme o estudo realizado por Silveira et al. (2007), para a extração de ficocianina a partir de *Spirulina platensis*, o máximo de concentração do componente obtido foi em 80 g.L⁻¹ para a razão biomassa/água. Sendo assim, para a realização dos próximos planejamentos visando

maximizar o processo de extração, a faixa de estudo para a razão biomassa/água foi redefinida em 30 a 60 g.L⁻¹.

A variável pH não exerceu efeito significativo em nenhuma das respostas estudadas. Assim, considerando que o efeito para proteínas foi positivo e para carboidratos foi negativo dentro da faixa estudada (8 a 10), e o estudo de Chronakis et al. (2000), o qual relata que a dissolução da biomassa de *Spirulina* em meio alcalino (próximo a 10) facilita a extração de proteínas, sendo que neste meio é onde ocorre a máxima solubilidade das proteínas desta microalga, o pH foi fixado em 9,0.

A temperatura foi significativa para a extração de carboidratos, apresentando um efeito positivo; contudo para a extração de proteínas, não apresentou significância, indicando que qualquer valor dentro do intervalo estudado (25 a 50°C) resultou em uma eficiência de extração similar. Considerando que a fração proteica da biomassa apresenta maior valor agregado, é possível citar o estudo de Ursu et al. (2014) que manteve a temperatura de extração de proteínas da biomassa de *Chlorella vulgaris* em 20°C a fim de limitar os danos durante a extração, e que ao utilizar temperaturas superiores a 50°C pode-se facilitar a desnaturação das proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Portanto, tendo em vista estas considerações e o fator econômico em termos energéticos a faixa desta variável foi fixada em 30°C nos estudos seguintes.

A variável tempo de ultrassom apresentou efeito significativo somente sobre o percentual de carboidratos, sendo este positivo dentro da faixa estudada (5 a 30 min); para a resposta de proteínas o efeito também foi positivo. Este efeito pode ser justificado por estudos que confirmam que com o aumento do tempo de ultrassom é possível atingir maiores percentuais de extração dos componentes desejados (ZHAO et al. 2013). Sendo assim, a faixa de estudo foi redefinida para 10 a 60 min para o desenvolvimento do próximo planejamento.

Já a amplitude de frequência do ultrassom não afetou significativamente a resposta de proteínas, porém, foi significativa para a resposta de carboidratos, possuindo efeito positivo dentro da faixa estudada (40 a 100%) para ambas as respostas. Conforme Filgueiras et al. (2000), o aumento da intensidade da amplitude de

sonificação promove um aumento dos efeitos sonoquímicos. Contudo, como 100% é o limite desta variável, a mesma foi fixada em 100% para as próximas etapas de estudo.

A velocidade de agitação não foi estatisticamente significativa sobre as respostas, de modo que qualquer valor na faixa de 80 a 120 rpm conduziu a resultados semelhantes, tanto para o percentual de proteínas como para carboidratos. Assim, considerando que o elevado cisalhamento mecânico gerado por agitação pode promover desnaturação proteica (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010), optou-se em fixar esta variável em 80 rpm.

A variável tempo de agitação apresentou efeito significativo para a extração de proteínas, sendo positivo para as duas respostas dentro da faixa estudada (10 a 60 min). Conforme o estudo de Harnedy e Fitzgerald (2013) ao avaliarem tempos de agitação entre 30 a 180 min para extração de proteínas de *Palmaria palmata* identificaram que após 60 min de agitação o percentual de extração se tornava constante, sugerindo este tempo como o melhor para extração. Assim, é evidente a necessidade de ampliar a faixa estudada a fim de possibilitar melhores percentuais de extração, portanto a faixa desta variável foi alterada para 20 a 80 min.

5.1.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3

Em função das considerações expostas para o PFF 2^{7-3} , foi elaborado o primeiro DCCR 2^3 (3 pontos centrais, total de 17 ensaios) para a maximização da extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis*, considerando as variáveis: razão biomassa/água, tempo de ultrassom e tempo de agitação.

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para os percentuais de proteínas e carboidratos, está apresentada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Matriz do DCCR 2³ com níveis reais e codificados das variáveis independentes e dependentes para extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis*.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	x ₃ ^c	y ₁ ^d	y ₂ ^e
1	-1 (36)	-1 (20)	-1 (32)	37,53 ± 1,24	10,15 ± 0,21
2	+1 (54)	-1 (20)	-1 (32)	17,32 ± 0,67	5,93 ± 0,03
3	-1 (36)	+1 (50)	-1 (32)	37,69 ± 1,47	11,69 ± 0,17
4	+1 (54)	+1 (50)	-1 (32)	39,78 ± 0,37	9,91 ± 0,15
5	-1 (36)	-1 (20)	+1 (68)	37,20 ± 0,73	6,75 ± 0,13
6	+1 (54)	-1 (20)	+1 (68)	31,43 ± 0,77	5,74 ± 0,13
7	-1 (36)	+1 (50)	+1 (68)	33,36 ± 1,21	5,76 ± 0,28
8	+1 (84)	+1 (50)	+1 (68)	25,75 ± 0,54	8,15 ± 0,07
9	-1,68 (30)	0 (35)	0 (50)	40,19 ± 0,83	9,15 ± 0,35
10	+1,68 (60)	0 (35)	0 (50)	27,73 ± 1,56	7,14 ± 0,17
11	0 (45)	-1,68 (10)	0 (50)	30,45 ± 0,51	8,75 ± 0,25
12	0 (45)	+1,68 (60)	0 (50)	18,58 ± 0,62	3,40 ± 0,07
13	0 (45)	0 (35)	-1,68 (20)	19,42 ± 0,78	6,68 ± 0,17
14	0 (45)	0 (35)	+1,68 (80)	33,71 ± 1,07	3,87 ± 0,14
15	0 (45)	0 (35)	0 (50)	30,15 ± 0,85	5,89 ± 0,07
16	0 (45)	0 (35)	0 (50)	31,58 ± 0,62	5,70 ± 0,16
17	0 (45)	0 (35)	0 (50)	30,80 ± 1,43	5,14 ± 0,14

^a Razão Biomassa/água (g.L⁻¹); ^b Tempo de ultrassom (min); ^c Tempo de agitação (min); ^d Proteínas Totais (%) (g proteína . 100 g⁻¹ biomassa) ± erro padrão; ^e Carboidratos Totais (%) (g carboidratos . 100 g⁻¹ biomassa) ± erro padrão.

Pode-se observar na Tabela 5.3 que os percentuais de extração variaram de 17,32 a 40,19% para proteínas (ensaios 2 e 9) e de 3,40 a 11,69% para carboidratos (ensaios 12 e 3). Sendo que, considerando o teor de proteínas e carboidratos totais na biomassa desengordurada de 50,70 e 22,52% (b.u.), o processo de extração apresentou recuperação de 34,16 a 79,27% e 15,10 a 51,91% de proteínas e carboidratos, respectivamente. Além disso, os pontos centrais apresentaram uma pequena variação (erro padrão = ± 0,71 e ± 0,38 para proteínas e carboidratos, respectivamente), indicando uma boa repetibilidade do processo. Ressalta-se ainda que os resultados de proteínas e carboidratos extraídos, observados no DCCR 2³ foram

superiores aos resultados observados na realização do PFF 2⁷⁻³, ocorrendo um melhor aproveitamento no processo de extração.

Analisando-se os resultados do DCCR foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 5.4. Contudo, o percentual de variação explicado pelo modelo não foi adequado ($R^2 \approx 63\%$ e 66% , para proteínas e carboidratos, respectivamente) e a análise de variância (ANOVA) calculada pelo erro residual não apresentou resultado significativo (Tabela 5.5). Com isso, não foi possível gerar um modelo e, estudaram-se somente os efeitos das variáveis independentes. Neste contexto, foram definidas novas faixas de estudo para o desenvolvimento de um novo DCCR.

Tabela 5.4 – Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para as respostas de proteínas totais (%) (g proteínas . 100 g⁻¹ biomassa) e carboidratos totais (%) (g carboidratos . 100 g⁻¹ biomassa) extraídas da biomassa de *Spirulina platensis*.

Fatores	Proteínas Totais (%) (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa)				Carboidratos Totais (%) (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa)			
	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (7)	p - valor	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (7)	p - valor
Média	30,56	3,76	8,12	0,0001*	5,48	1,16	4,73	0,0021*
x ₁ ^a (L)	-3,84	1,77	-2,17	0,0664*	-0,59	0,54	-1,08	0,3172
x ₁ ^a (Q)	2,07	1,95	1,06	0,3239	1,23	0,60	2,06	0,0785*
x ₂ ^b (L)	-0,50	1,77	-0,28	0,7853	-0,15	0,54	-0,28	0,7903
x ₂ ^b (Q)	-1,28	1,95	-0,66	0,5324	0,50	0,60	0,84	0,4302
x ₃ ^c (L)	1,42	1,77	0,80	0,4474	-1,17	0,54	-2,16	0,0680*
x ₃ ^c (Q)	-0,55	1,95	-0,28	0,7850	0,22	0,60	0,36	0,7286
x ₁ ^a · x ₂ ^b	2,56	2,31	1,11	0,3048	0,73	0,71	1,03	0,3392
x ₁ ^a · x ₃ ^c	0,59	2,31	0,26	0,8050	0,92	0,71	1,30	0,2361
x ₂ ^b · x ₃ ^c	-4,02	2,31	-1,74	0,1256	-0,51	0,71	-0,72	0,4942

^a Razão Biomassa/água (g.L⁻¹); ^b Tempo de ultrassom (min); ^c Tempo de agitação (min); * p ≤ 0,10; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

A variável razão biomassa/água foi significativa para a extração de proteínas, apresentando caráter negativo dentro da faixa estudada (30 a 60 g.L⁻¹), para ambas as respostas, indicando maiores extrações em menores concentrações de biomassa. No

entanto, ao continuar diminuindo esta variável, o rendimento da extração também seria reduzido, tornando o processo inviável, portanto, optou-se em fixar esta variável em 30 g.L⁻¹.

Tabela 5.5 – ANOVA dos modelos quadráticos do DCCR 2³ para o percentual de extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis*.

Fonte de Variação	Proteínas Totais (%) [*] (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa)					Carboidratos Totais (%) ^{**} (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa)				
	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F calculado	p - valor	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F calculado	p - valor
Regressão	515,57	9	57,29	1,34	0,3568	54,69	9	6,08	1,50	0,3021
Resíduos	298,75	7	42,68			28,28	7	4,04		
Total	814,32	16				82,97	16			

*% variação explicada (R²) = 63,31 F_{9;7;0,10} = 2,72

**% variação explicada (R²) = 65,91 F_{9;7;0,10} = 2,72

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

O tempo de ultrassom não apresentou significância para as duas respostas avaliadas, possuindo um efeito negativo dentro do intervalo estudado (10 a 60 min), destacando que tempos inferiores dentro do intervalo avaliado podem extrair maiores percentuais de proteínas e carboidratos. Por outro lado, esta variável havia apresentado efeito positivo no PFF dentro do intervalo estudado (5 a 30 min). Assim, o intervalo desta variável foi modificado para 10 a 40 min para o próximo DCCR.

A variável tempo de agitação foi significativa para o processo de extração de carboidratos, indicando efeito negativo; para extração de proteínas, seu efeito foi positivo dentro da faixa estudada (20 a 80 min). Entretanto, ao considerar que o percentual de proteínas extraídas possui maior valor agregado, foi realizado um estudo avaliando maiores tempos de agitação (100 e 120 min), para que fosse possível visualizar se ao aumentar a grandeza desta variável o percentual de proteínas iria aumentar significativamente; as demais variáveis do processo foram fixadas. Pode-se verificar na Tabela 5.6 que ao aumentar o tempo de agitação, de 100 a 120 min, os percentuais de proteínas e de carboidratos não apresentaram diferenças significativas (p ≤ 0,05). Portanto, o intervalo desta variável foi alterado para 40 a 100 min na sequência do estudo pela aplicação de um novo DCCR.

Tabela 5.6 – Avaliação dos percentuais de proteínas e carboidratos extraídos da biomassa de *Spirulina platensis* ao aumentar somente a variável tempo de agitação.

Ensaio	Proteínas Totais (%)* (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa)	Carboidratos Totais (%)* (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa)
100 min	29,98 ± 1,00	10,38 ± 0,32
120 min	31,38 ± 0,50	9,48 ± 0,50

*Médias ± erro padrão não diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Ensaios submetidos a razão biomassa/água 30 g.L⁻¹, pH 9,0, temperatura de 30°C, tempo de ultrassom de 35 min, amplitude de ultrassom 100% e velocidade de agitação de 80 rpm.

5.1.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2²

A fim de definir as melhores condições para a extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* foi aplicado um DCCR 2² (3 pontos centrais, total de 11 ensaios), cuja matriz de ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas e, as respostas de proteínas e carboidratos, está apresentada na Tabela 5.7. Pode-se verificar que os percentuais de extração variaram de 31,63% a 39,01% para proteínas (ensaios 1 e 2) e de 8,18% a 10,62% para carboidratos (ensaios 6 e 3). O processo de extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* permitiu a recuperação entre 62,39 a 76,93% e 36,31 a 47,17%, respectivamente, considerando o percentual de proteínas e de carboidratos totais de 50,70% e 22,52% (b.u.) na biomassa desengordurada.

Tabela 5.7 – Matriz do DCCR 2² com níveis reais e codificados das variáveis para extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis*.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	y ₁ ^c	y ₂ ^d	y ₁ ^e	Desvio Relativo (%) ^f
1	-1 (14)	-1 (49)	31,63 ± 0,34	8,70 ± 0,42	27,11	14,29
2	+1 (36)	-1 (49)	39,01 ± 0,29	9,85 ± 0,19	40,61	-4,11
3	-1 (14)	+1 (91)	34,25 ± 0,61	10,62 ± 0,32	36,33	-6,07
4	+1 (36)	+1 (91)	32,41 ± 0,89	9,51 ± 0,19	31,39	3,13
5	-1,41 (10)	0 (70)	32,21 ± 0,44	8,77 ± 0,33	30,84	4,25
6	+1,41 (40)	0 (70)	34,36 ± 1,17	8,18 ± 0,05	30,88	-7,34
7	0 (25)	-1,41 (40)	32,40 ± 1,45	8,95 ± 0,16	33,86	-4,51
8	0 (25)	+1,41 (100)	34,75 ± 0,45	8,61 ± 0,19	33,86	2,56
9	0 (25)	0 (70)	33,28 ± 0,74	9,07 ± 0,19	33,86	-1,74
10	0 (25)	0 (70)	34,94 ± 0,78	9,97 ± 0,09	33,86	3,10
11	0 (25)	0 (70)	33,28 ± 0,45	9,17 ± 0,19	33,86	-1,74

^a Tempo de ultrassom (min); ^b Tempo de agitação (min); ^c Proteínas Totais (%) (g proteína . 100 g⁻¹ biomassa) ± erro padrão; ^d Carboidratos Totais (%) (g carboidratos . 100 g⁻¹ biomassa) ± erro padrão.

^e Valores de Proteínas Totais previstas pelo modelo (*Proteínas extraídas* (%) = 33,86 + 2,14 x₁ – 4,61x₁x₂) (g proteína . 100 g⁻¹ biomassa).

^f Desvio Relativo para Proteínas Totais (%) = ((Y - Ŷ)/Y)*100; onde Y= resposta experimental e Ŷ= resposta prevista pelo modelo.

Pode-se verificar na Tabela 5.8 os coeficientes de regressão resultantes do DCCR 2². Confirmando os resultados obtidos no DCCR 2³, a variável tempo de ultrassom não foi significativa para o percentual de carboidratos extraídos de modo que qualquer valor na faixa de 10 a 40 min conduziu a resultados semelhantes de carboidratos extraídos da biomassa de *Spirulina platensis*. Da mesma forma, para o DCCR 2² a variável tempo de agitação também, não apresentou efeito significativo na faixa estudada (40 a 100 min), para a resposta em questão. Além disso, o percentual de variação explicado pelo modelo para o percentual de carboidratos totais extraídos não foi adequado (R² ≈ 34%), e a sua análise de variância (ANOVA) calculada pelo erro residual não apresentou resultado significativo (Tabela 5.9), não sendo possível gerar as superfícies de resposta para esta variável.

Tabela 5.8 – Coeficientes de regressão do DCCR 2² para as respostas de proteínas totais (%) (g proteínas . 100 g⁻¹ biomassa) e carboidratos totais (%) (g carboidratos . 100 g⁻¹ biomassa) extraídas da biomassa de *Spirulina platensis*.

Fatores	Proteínas Totais (%) (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa)				Carboidratos Totais (%) (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa)			
	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p - valor	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p - valor
Média	33,83	0,85	39,73	0,0000*	9,40	0,47	20,04	0,0000*
x₁^a (L)	1,07	0,52	2,05	0,0952*	-0,10	0,29	-0,35	0,7420
x₁^a (Q)	-0,05	0,62	-0,08	0,9400	-0,20	0,34	-0,59	0,5787
x₂^b (L)	-0,08	0,52	-0,16	0,8793	0,14	0,29	0,48	0,6523
x₂^b (Q)	0,10	0,62	0,15	0,8837	-0,05	0,34	-0,14	0,8942
x₁^a · x₂^b	-2,30	0,74	-3,12	0,0261*	-0,57	0,41	-1,39	0,2230

^aTempo de ultrassom (min); ^b Tempo de agitação (min); * p ≤ 0,10; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Por outro lado, considerando os parâmetros significativos ($p \leq 0,10$) para a resposta de percentual de proteínas extraídas da biomassa de *Spirulina platensis* obteve-se a Equação 5.1 que representa o modelo quadrático do teor de proteínas em função das variáveis estudadas. A variável tempo de ultrassom foi mantida no modelo por apresentar proximidade ao nível de significância proposto ($p \leq 0,05$). Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.9. Como o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p=0,005$) sendo 3,5 vezes maior que o F_{tabelado} , e o percentual variação explicado pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 73\%$), pode-se concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 5.1. Além disso, os desvios relativos (Tabela 5.7) foram inferiores a 10% (exceto para o ensaio 1), comprovando o ajuste adequado do modelo aos dados experimentais.

$$\text{Proteínas extraídas (\%)} = 33,86 + 2,14 x_1 - 4,61x_1x_2$$

Equação 5.1

Tabela 5.9 – ANOVA dos modelos quadráticos do DCCR 2² para o percentual de extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis*.

Fonte de Variação	Proteínas Totais (%) [*] (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa)					Carboidratos Totais (%) ^{**} (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa)				
	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F calculado	p - valor	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F calculado	p - valor
Regressão	30,41	2	15,21	11,04	0,0050	1,74	5	0,35	0,53	0,7501
Resíduos	11,02	8	1,38			3,30	5	0,66		
Total	41,43	10				5,04	10			

^{*}% variação explicada (R^2) = 73,40 $F_{2;8;0,10} = 3,11$

^{**}% variação explicada (R^2) = 34,54 $F_{5;5;0,10} = 3,45$

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Pode-se observar através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 5.1) que há diferentes regiões de combinações entre as variáveis do processo que resultaram em percentuais de extração de proteínas semelhantes. Foi possível verificar que combinações de tempos de ultrassom entre 33 a 40 min com tempo de agitação entre 40 a 55 min e, combinações de 10 a 17 min de tempo de sonificação com 90 a 100 min de tempo de agitação promoveram maiores extrações. Entretanto, o tempo total do processo realizado na primeira combinação de variáveis indicada acima é inferior ao tempo da segunda combinação. De acordo com Rodrigues e lemma (2014), a indicação de uma faixa maximizada das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda, o processo na condição otimizada. No entanto, os autores sugerem a realização de ensaios, ao menos em triplicata, nas condições definidas após a análise de superfície de resposta para validação experimental da resposta prevista pelo modelo proposto.

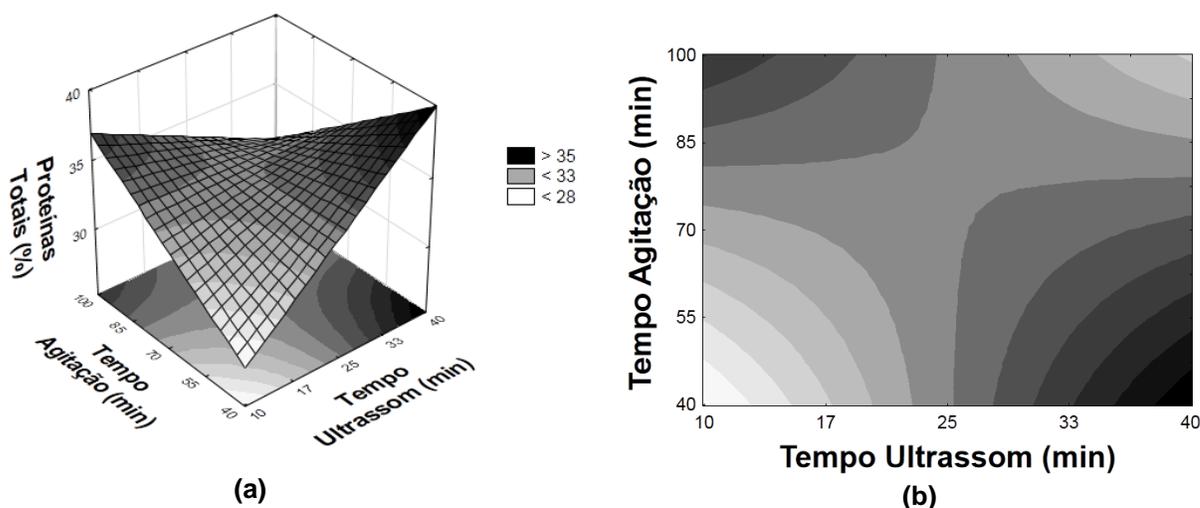


Figura 5.1 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para Proteínas Totais (%) extraídas da biomassa de *Spirulina platensis*.

Em virtude dos resultados encontrados, para validação dos mesmos, foram realizados três ensaios nas seguintes condições: razão biomassa/água em 30 g.L⁻¹; pH 9,0; temperatura em 30°C; tempo de ultrassom de 35 min; amplitude de ultrassom de 100%; velocidade de agitação em 80 rpm; e tempo de agitação de 50 min. A Tabela 5.10 apresenta os resultados de proteínas e carboidratos totais encontrados nos extratos obtidos nas condições definidas, sendo que foi possível verificar que os ensaios de validação não diferiam significativamente ($p \leq 0,05$).

É importante ressaltar que, em comparação aos resultados obtidos no PFF (Tabela 5.1), ao realizar os estudos complementares dos planejamentos completos e com a modificação das faixas de estudo das variáveis, foi possível obter um acréscimo significativo no processo de extração de proteínas da biomassa de *Spirulina platensis*, atingindo uma recuperação final de 75,85%, cerca de 10% maior do que a obtida no PFF. O percentual de extração de carboidratos foi mantido em valores próximos em todos os planejamentos avaliados, alcançando uma recuperação final de 41,54%. De tal modo, os resultados comprovaram que o uso de estratégias sequenciais de planejamento experimental é fundamental para atingir as condições otimizadas das variáveis estudadas.

Neste contexto, também é importante destacar que se optou em priorizar a extração de proteínas da biomassa de *Spirulina platensis* sendo que este é o componente em maior quantidade na biomassa e, também, é a fração que apresenta maior valor agregado. Portanto, frente a efeitos diversos das variáveis a sequência do estudo foi definida a fim de maximizar a extração de proteínas. Caso o objetivo fosse priorizar a extração de carboidratos poderiam ser utilizadas diferentes estratégias.

Tabela 5.10 – Validação do estudo realizado para extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* utilizando uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais.

Ensaio	Proteínas Totais (%)* (g proteínas . 100 g ⁻¹ biomassa)	Carboidratos Totais (%)* (g carboidratos . 100 g ⁻¹ biomassa)
Validação 1	38,42 ± 1,16	9,32 ± 0,44
Validação 2	38,13 ± 1,33	9,48 ± 0,40
Validação 3	38,81 ± 0,73	9,26 ± 0,23

*Médias ± erro padrão não diferentes entre si pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Não foram encontrados dados na literatura a respeito da mesma estratégia de extração utilizada, aplicando ondas ultrassônicas e agitação concomitantes em meio alcalino, para obtenção de proteínas e carboidratos a partir de microalgas. Comparando os resultados com outros estudos os quais, também, objetivaram a extração de proteínas de microalgas, pode-se destacar o estudo de Wang e Zhang (2012) que avaliam diferentes métodos de extração de proteínas da microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Os autores, ao utilizar ondas ultrassônicas no tempo de 180 min, conseguiram atingir 16% de proteínas extraídas e, ao combinar a técnica de extração por ultrassom a outra forma de extração de componentes, o congelamento-descongelamento, aumentaram o teor de proteínas extraídas para 22,9%. Safi et al. (2014) avaliam diferentes tipos de extração de proteínas para cinco microalgas, sendo uma delas a *Spirulina platensis*, e alcançaram uma recuperação de proteínas em relação ao percentual de proteínas da biomassa de 47,1% utilizando sonificação; concluíram que o ultrassom promove a cavitação das células facilitando o rompimento celular, aumentando o percentual de proteínas extraídas. Ambos os estudos citados

indicam resultados inferiores aos encontrados neste trabalho (38,46% de proteínas extraídas, correspondendo a 75,85% de recuperação proteica), indicando que o uso da estratégia de planejamento experimental associado ao tratamento ultrassônico e agitação promoveu maior rompimento celular, aumentando a disponibilidade dos componentes.

A extração de carboidratos, juntamente ao processo de extração de proteínas, se justifica, pois este componente possui um grande potencial como matéria-prima para produção de bioetanol (ZHU et al. 2014), corroborando com o desenvolvimento de biorrefinarias integradas (RIZWAN; LEE; GANI, 2015). Referente a outros estudos que promoveram a extração de carboidratos em microalgas, é possível destacar o estudo de Zhao et al. (2013) que estudaram três diferentes métodos para extração deste componente de *Chlorella* sp., uso de solvente, leite fluidizado e ondas ultrassônicas, sendo que o último apresentou melhor eficiência, abrangendo o máximo de recuperação que foi de 36,94%.

5.2 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO

5.2.1 Rendimentos Global e Proteico

O rendimento global do processo de obtenção do concentrado proteico da biomassa desengordurada de *Spirulina platensis* aplicando tratamento ultrassônico e agitação, concomitantes, em meio alcalino foi de 18,33%, sendo que, deste modo pode-se afirmar que em 100 g da biomassa de *Spirulina platensis* foi possível obter 18,33 g do concentrado proteico, o que corresponde a 13,93 g de proteínas totais. O rendimento proteico para obtenção do concentrado proteico foi de 23,38%, sendo o percentual de proteínas totais do concentrado proteico igual a 75,97%.

O rendimento encontrado foi superior ao obtido por Schwenzfeier, Wierenga e Gruppen (2011) que conseguiram um concentrado proteico a partir da microalga *Tetraselmis* sp. com rendimento de 7,0%; valor calculado a partir de 36,23% de proteínas na biomassa e 64,40% de proteínas no concentrado proteico. Além disso, o estudo de Muñoz et al. (2015) apresentou rendimento proteico inferior ao encontrado; os autores avaliaram a extração de lipídios e proteínas solúveis de *Botryococcus braunii* seguido por uma rota diferenciada, extraíndo-se primeiramente a fração proteica e por fim os lipídios; obtendo 10,2% de rendimento no processo de extração de proteínas, e um produto final com 70% de proteínas solúveis. Gerde et al. (2013), avaliaram as diferenças nos concentrados proteicos obtidos da biomassa de *Nannochloropsis* desengordurada e não desengordurada, encontrando 56,9 e 40,5% de proteínas e, rendimentos proteicos de 16 e 30% respectivamente.

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTEICO

5.3.1 Composição Centesimal

Os resultados da composição centesimal (base seca) da biomassa desengordurada de *Spirulina platensis* e do concentrado proteico obtido a partir desta matéria-prima estão apresentados na Tabela 5.11. A fração proteica obtida neste estudo pode ser considerada um concentrado proteico com base na legislação brasileira para produtos proteicos de origem vegetal, a qual define que a proteína concentrada de soja deve conter no mínimo 68,0% de proteínas em base seca (BRASIL, 2005).

Tabela 5.11 – Composição química da biomassa desengordurada de *Spirulina platensis* e do concentrado proteico obtido (base seca).

	Biomassa Desengordurada*	Concentrado Proteico*
Proteínas (%)	59,50 ± 0,91	75,97 ± 0,57
Lipídeos (%)	0,81 ± 0,03	1,33 ± 0,02
Cinzas (%)	13,25 ± 0,09	3,26 ± 0,02
Carboidratos Totais (%)	26,44	19,44

*Médias ± erro padrão.

Conforme Becker (2007) a composição centesimal da microalga *Spirulina platensis* pode variar entre 46 a 63% de proteínas, 8 a 14% de carboidratos e 4 a 9% de lipídios, sendo o restante composto por minerais, umidade e fibras, quando cultivada em meio repleto de nutriente. Além disso, Tibbetts, Milley e Lall (2014) ao avaliarem a composição química de biomassas de diversas microalgas, entre elas a *Spirulina platensis*, encontraram percentuais de 55,8 de proteínas, 14,2 de lipídios, 22,2 de carboidratos e 7,8 de cinzas. Os resultados indicados na Tabela 5.11 são coerentes com as informações da literatura, diferindo pela fração lipídica, já que a biomassa havia sido desengordurada, e pelo percentual de carboidratos, o qual contempla também o percentual de fibras totais. Ainda é importante destacar que dependendo do meio de cultivo, podem ocorrer variações nos percentuais dos seus principais componentes das microalgas, em destaque no teor de proteínas e carboidratos (COLLA et al., 2007).

Resultados similares aos da composição centesimal do concentrado proteico obtido neste estudo foram encontrados por Chronakis et al. (2000) que obtiveram um concentrado proteico de *Spirulina platensis strain pacifica* com 67,9% de proteínas totais e 0,77% de lipídios. Ademais, Chronakis (2001) e Anusuya Devi e Venkataraman (1984) produziram concentrados proteicos obtidos da mesma microalga com 78,6% e 75,0% de proteínas, respectivamente. Segundo a literatura consultada, ainda existem poucas informações a respeito da composição de concentrados ou isolados proteicos obtidos a partir da biomassa de *Spirulina platensis*.

5.3.2 Análise de Cor

O concentrado proteico obtido a partir das condições maximizadas de extração de proteínas apresentou forma de pó fino com textura aveludada, apresentando coloração verde azulada com medidas instrumentais de $L^* 19,73 \pm 0,34$, $a^* -7,29 \pm 0,26$ e $b^* 3,59 \pm 0,09$ (Figura 5.2). Esta coloração se deve, principalmente, pela presença do pigmento ficocianina (verde/azul), que corresponde ao grupo das ficobiliproteínas, sendo que a fração proteica da *Spirulina platensis* pode conter cerca de 20% deste pigmento (VONSHAK, 1997; REDDY et al, 2003). Este fato justifica a dificuldade e a condição inviável que seria modificar sua coloração, o que implicaria na redução do conteúdo proteico além de outras propriedades benéficas que este pigmento apresenta. A ficocianina é um estimulante do sistema imunológico, principalmente por ser capaz de sequestrar radicais hidroxil, possuindo importante atividade antioxidante (PIÑERO ESTRADA; BERMEJO BESCÓS; VILLAR DEL FRESNO, 2001; SOUZA et al., 2006).



Figura 5.2 – Concentrado proteico obtido a partir da biomassa de *Spirulina platensis*.

5.3.3 Perfil de Aminoácidos

A Tabela 5.12 apresenta o perfil de aminoácidos totais do concentrado proteico de *Spirulina platensis*, comparado com um estudo contemplando o perfil de aminoácidos de albumina sérica bovina (PRATA; SGARBIERI, 2008) e, com o padrão de referência de aminoácidos essenciais em proteínas para faixa etária de 1 a 2 anos (WHO; FAO; UNU, 2007), sendo este o padrão para todos os grupos etários, exceto para bebês (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Além disso, na mesma tabela estão descritos os *escores químicos* que estabelece uma comparação entre o teor de cada aminoácido essencial da proteína avaliada com o padrão de referência (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). O aminoácido que apresentar o menor *escore químico* é considerado como aminoácido limitante e, proteínas que contenham *escores químicos* superiores a 1,0 para todos os aminoácidos essenciais é considerada de alto valor biológico (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012).

Conforme Misurcová et al. (2014) é evidente que as proteínas de microalgas são importantes fontes de aminoácidos. De acordo com os dados apresentados, a histidina aparece como aminoácido limitante do concentrado proteico de *Spirulina platensis*, com *escore químico* de 0,49, seguido pela lisina com 0,50. A histidina, geralmente não é limitante na maioria dos alimentos, sendo que a lisina, treonina, triptofano e outros aminoácidos que contem enxofre são frequentemente encontrados como limitantes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os aminoácidos encontrados em maior concentração no concentrado proteico foram ácidos glutâmico e aspártico e, o maior *escore químico* foi 1,71 para o triptofano. Ao comparar o perfil de aminoácidos encontrado com outros estudos, foi possível verificar semelhanças entre o trabalho desenvolvido por Campanella, Grescentini e Avino (1999) que avaliaram pílulas de *Spirulina platensis*, diferindo principalmente no valor encontrado para arginina. Entretanto, quando comparado ao perfil de aminoácidos de albumina sérica bovina (BSA), o teor de aminoácidos do concentrado proteico de

Spirulina platensis revela valores inferiores, exceto para histidina, isoleucina, triptofano e glicina. Ainda, é importante destacar que, assim como a composição centesimal das microalgas, o perfil de aminoácidos pode variar conforme o meio de cultura ao qual a microalga é submetida (HABIB et al., 2008).

Tabela 5.12 – Perfil de aminoácidos totais do concentrado proteico de *Spirulina platensis*, comparado com valores encontrados para albumina sérica bovina, ao padrão de referência de aminoácidos essenciais e escores químicos.

Aminoácidos	Teor de aminoácidos (mg . g ⁻¹ de proteína)			Escore Químico ^b
	Concentrado Proteico de <i>Spirulina platensis</i>	Albumina Sérica Bovina (PRATA; SGARBIERI, 2008)	Padrão Referência (1-2 anos) ^a	
Essenciais				
Leucina (Leu)	60,55 ± 0,49	117,0	63,0	0,96
Lisina (Lys)	26,25 ± 1,34	124,0	52,0	0,50
Treonina (Thr)	36,40 ± 0,28	58,0	27,0	1,35
Fenilalanina (Phe)	30,40 ± 1,13	67,0	46,0 ^c	1,44 ^c
Tirosina (Tyr)	35,80 ± 2,83	51,0		
Valina (Val)	40,90 ± 0,71	59,0	42,0	0,97
Histidina (His)	8,75 ± 0,49	4,3	18,0	0,49
Isoleucina (Ile)	39,30 ± 0,71	25,0	31,0	1,27
Metionina (Met)	9,20 ± 0,57	10,0	26,0 ^d	0,63 ^d
Cisteína (Cys)	7,30 ± 0,85	51,0		
Triptofano (Trp)	12,65 ± 0,07	8,0	7,4	1,71
Não Essenciais				
Ácido Glutâmico (Glu)	83,05 ± 0,21	177,0		
Arginina (Arg)	51,35 ± 1,20	59,0		
Ácido Aspárico (Asp)	74,95 ± 3,32	116,0		
Glicina (Gly)	37,80 ± 0,71	24,0		
Serina (Ser)	33,55 ± 0,92	50,0		
Prolina (Pro)	24,35 ± 1,34	47,0		
Alanina (Ala)	47,95 ± 0,49	65,0		

^a Valores diários recomendados para ingestão de aminoácidos essenciais para crianças de 1 a 2 anos (WHO; FAO; UNU, 2007); ^b Escore Químico do Concentrado Proteico de *Spirulina platensis*; ^c Phe + Tyr; ^d Met + Cys.

5.3.4 Identificação de Parâmetros Espectrais

As informações referentes às estruturas secundárias das proteínas podem ser obtidas a partir da análise da Amina I (MIYAZAWA; BLOUT, 1961; KRIMM, 1962). Neste contexto, aplicou-se esta análise com o intuito de alcançar maiores informações sobre as proteínas componentes do concentrado proteico de *Spirulina platensis*, sendo possível obter o espectro FTIR ilustrado na Figura 5.3.

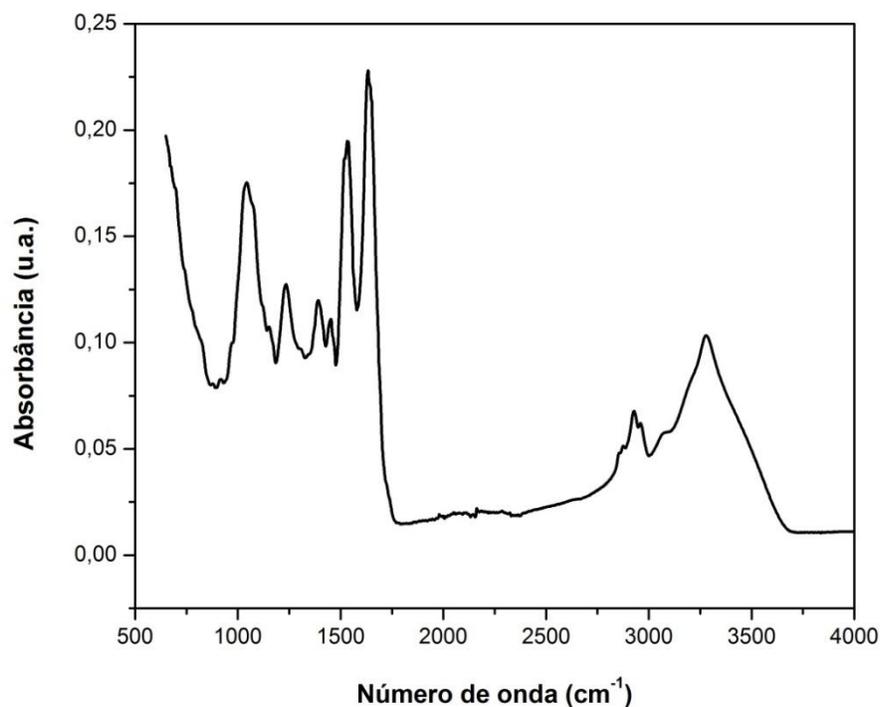


Figura 5.3 – Espectro FTIR do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Bandas características de moléculas proteicas foram observadas na Figura 5.3. Em 1634 cm^{-1} observa-se a banda característica do grupamento amina primária, atribuída devido ao estiramento da ligação C=O da ligação peptídica (HARIS; SEVERCAN, 1999). Esta estrutura presente na molécula proteica permite interação com a água por ligações de hidrogênio, proporcionando um melhor desempenho das

propriedades funcionais tecnológicas, em especial de $CA_{\text{água}}$ e CF_{gel} . Também, foi possível identificar a banda da amina secundária em 1533 cm^{-1} , decorrente, principalmente, do estiramento C – N juntamente com N – H. Por fim, o estiramento vibracional das ligações C – N e as flexões entre N – H, característicos de amida terciária pode ser identificado pela banda 1233 cm^{-1} (HARIS; SEVERCAN, 1999). Além disso, Suganya et al. (2015) também obtiveram um espectro de FTIR de proteínas de *Spirulina platensis*, encontrando resultados semelhantes aos do concentrado proteico de *Spirulina platensis*; os autores observaram que a banda com maior intensidade foi em 1664 cm^{-1} , representada pela amina primária.

Ainda, as bandas 2926 e 2960 cm^{-1} são referentes ao estiramento entre as ligações C – H e a banda 3280 cm^{-1} que ocorre devido a deformação axial de N – H, correspondentes às aminas secundárias (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012). Conforme Xin et al. (2014) a área de absorvância de carboidratos apresenta semelhança com as bandas de absorção das proteínas, podendo destacar que a banda em 1039 cm^{-1} possivelmente esta relacionada à presença de carboidratos totais no concentrado proteico.

Os resultados obtidos por meio das análises de *curve-fitting* revelaram quais as estruturas secundárias, e seus respectivos percentuais, no concentrado proteico de *Spirulina platensis*, conforme apresentado na Figura 5.4 e na Tabela 5.13. Para determinação das bandas pertencentes aos diferentes grupos das estruturas secundárias, levaram-se em consideração os intervalos para proteína do leite β -lactoglobulina (LI; MA; NGADI, 2013).

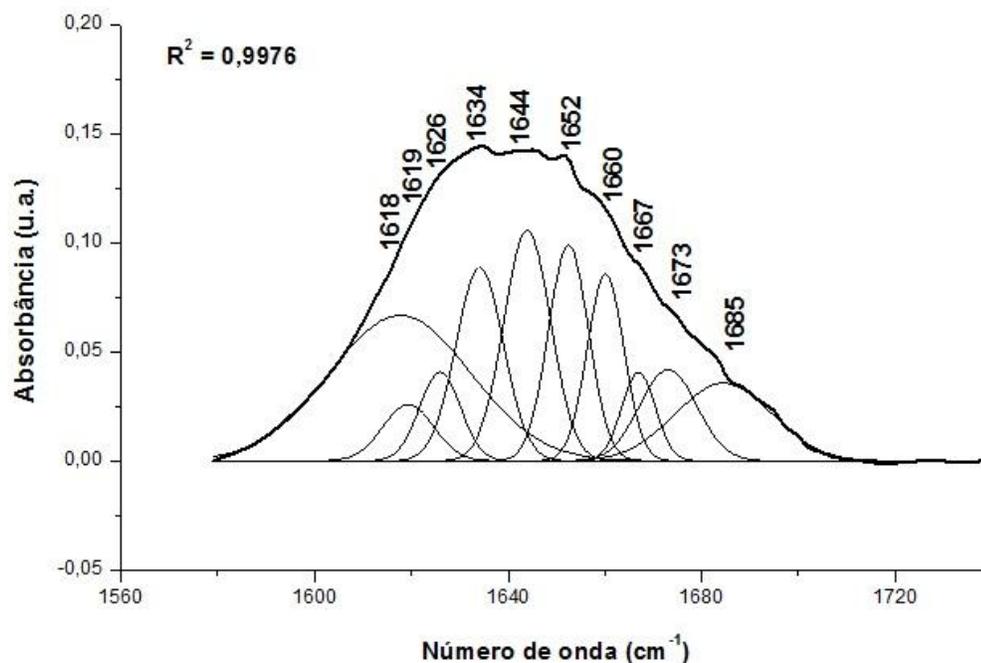


Figura 5.4 – Curve-fitting por meio da segunda derivativa da região amida I (1580-1740 cm^{-1}) do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Tabela 5.13 – Análise das estruturas secundárias presentes no concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Componentes amida I (cm^{-1})	Concentrado <i>Spirulina platensis</i> (%)
β -folha (1642-1610)	46,20
randômicas (1642-1650)	13,85
α -hélice (1660-1650)	19,85
β -volta (1678-1662)	10,50
β -anti (1691-1682)	9,60

As conformações α -hélice e β -folha são as principais estruturas secundárias em proteínas. Neste contexto, de acordo com a Figura 5.4 é possível verificar a presença da β -folha, representada pela principal estrutura secundária presente (46,20%), a qual por ser constituída por aminoácidos hidrofóbicos, que possuem capacidade em promover maior estabilidade da proteína a altas temperaturas. Além disso, observa-se a presença da α -hélice que é constituída por aminoácidos polares e apolares, o que

caracteriza propriedades anfífilas a molécula e que permite influenciar na capacidade emulsificante da proteína (NELSON; COX, 2000).

5.4 FUNCIONALIDADE TECNOLÓGICA DO CONCENTRADO PROTEICO

5.4.1 Solubilidade

A solubilidade é uma característica essencial das proteínas, sendo muitas vezes responsável por afetar as suas demais propriedades funcionais. A solubilidade de uma proteína ocorre devido ao equilíbrio termodinâmico entre interações proteína-proteína e proteína-solvente (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). O comportamento da solubilidade de proteínas solúveis do concentrado proteico de *Spirulina platensis* quando submetido a diferentes pHs está apresentado na Figura 5.5.

A curva plotada apresenta forma de U onde a mínima solubilidade encontrada para as proteínas do concentrado proteico avaliado foi de 3,23% no pH 3,0, que corresponde ao ponto isoelétrico das proteínas de *Spirulina platensis* (CHRONAKIS et al., 2000). A solubilidade mínima desenvolvida próxima ao ponto isoelétrico é referente à falta de repulsão eletrostática que causa a agregação e a precipitação devido às interações hidrofóbicas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Por outro lado, a máxima solubilidade foi de 98,07% no pH 9,0.

Benelhadj et al. (2016) ao estudarem o comportamento da solubilidade de nitrogênio proteico em diferentes pHs de um isolado proteico obtido da microalga *Spirulina platensis*, também, encontraram percentuais mínimo em pH 3,0 (6,20%) e máximo em 10,0 (59,60%). Nirmala, Prakash e Venkararaman (1992) avaliaram a solubilidade proteica da biomassa de *Spirulina platensis* em função do pH e, da mesma forma observaram a solubilidade mínima (9,0%) em pH 3,0 e a máxima (55,0%) em pH

9,0. Acima do pH 10, ocorre redução da ligação da proteína com a água, ou seja, da solubilidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

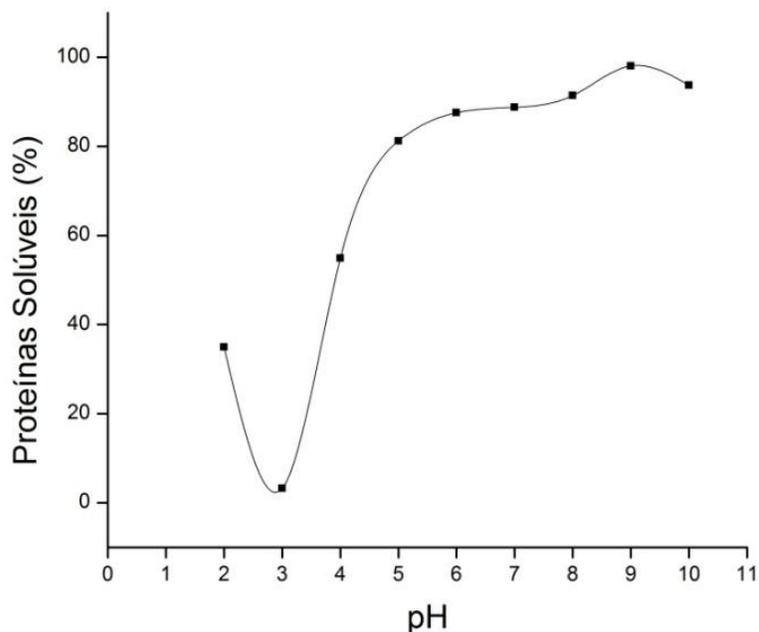


Figura 5.5 – Solubilidade em função do pH do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Além disso, conforme Jambrak et al. (2008) o uso de ondas ultrassônicas em proteínas pode afetar as suas propriedades funcionais. Ao avaliarem a solubilidade de isolado proteico de soro de leite, verificaram que amostras submetidas ao tratamento ultrassônico apresentaram solubilidade máxima de 85% enquanto amostras sem o tratamento apresentaram somente 66,8%.

5.4.2 Capacidade de Absorção de Água ($CA_{\text{água}}$), Capacidade de Formação de Espuma (CF_{espuma}), Estabilidade de Espuma (E_{espuma}), Capacidade de Formação de Emulsão ($CF_{\text{emulsão}}$) e Estabilidade de Emulsão ($E_{\text{emulsão}}$)

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e as respostas de $CA_{\text{água}}$, CF_{espuma} , E_{espuma} , $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$, está apresentada na Tabela 5.14. Os valores encontrados para as propriedades avaliadas entre as respostas do planejamento foram de 435,51 a 1658,39% (ensaios 3 e 7) para $CA_{\text{água}}$, de 101,58 a 226,46% (ensaios 5 e 6) para CF_{espuma} , de 48,47 a 80,38% (ensaios 7 e 6) para E_{espuma} , de 41,67 a 84,00 (ensaios 7 e 2) para $CF_{\text{emulsão}}$ e de 25,92 a 72,96% (ensaios 7 e 4) para $E_{\text{emulsão}}$. Os pontos centrais apresentaram uma pequena variação, indicando uma boa repetibilidade do processo.

Desta forma, conforme os resultados da Tabela 5.14 foi possível calcular os coeficientes de regressão das duas variáveis independentes estudadas sobre as respostas de $CA_{\text{água}}$, CF_{espuma} , E_{espuma} , $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$, os quais estão apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.14 – Matriz do DCCR 2^2 com níveis reais e codificados das variáveis independentes e dependentes para avaliação das propriedades de $CA_{\text{água}}$, CF_{espuma} , E_{espuma} , $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$ do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	y_1^c	y_2^d	y_3^e	y_4^f	y_5^g	Desvio Relativo (%)			
								y^h	y^i	y^j	y^k
1	-1 (3,0)	-1 (0,9)	751,49 ± 33,09	115,92 ± 1,59	58,01 ± 0,86	68,93 ± 2,93	49,53 ± 2,33	-24,16	21,36	6,57	7,59
2	+1 (7,0)	-1 (0,9)	765,75 ± 29,30	113,74 ± 3,39	63,63 ± 0,23	84,00 ± 0,94	55,13 ± 3,43	-21,85	-18,91	0,51	16,97
3	-1 (3,0)	+1 (3,5)	435,51 ± 18,58	216,23 ± 4,60	70,00 ± 1,41	45,51 ± 0,08	68,66 ± 0,13	-10,12	19,69	1,94	7,79
4	+1 (7,0)	+1 (3,5)	656,07 ± 23,53	218,11 ± 9,47	70,75 ± 0,39	58,39 ± 1,36	72,96 ± 1,35	26,90	0,17	-9,88	13,22
5	-1,41 (2,0)	0 (2,2)	448,01 ± 40,95	101,58 ± 2,33	59,17 ± 1,18	53,15 ± 2,66	57,46 ± 1,97	1,20	-21,46	-7,85	-10,82
6	+1,41 (8,0)	0 (2,2)	546,16 ± 4,79	226,46 ± 7,49	80,38 ± 2,03	63,10 ± 0,69	67,44 ± 2,31	18,95	18,07	4,65	5,58
7	0 (5,0)	-1,41 (0,4)	1658,39 ± 15,66	110,73 ± 4,63	48,47 ± 2,16	41,67 ± 2,03	25,92 ± 0,12	22,03	13,04	-6,42	-27,88
8	0 (5,0)	+1,41 (4,0)	677,58 ± 21,68	198,90 ± 2,99	75,75 ± 2,47	80,19 ± 2,30	49,34 ± 0,93	3,55	-6,89	5,03	-17,29
9	0 (5,0)	0 (2,2)	885,14 ± 11,39	132,22 ± 1,67	70,25 ± 0,35	58,40 ± 0,60	59,64 ± 1,26	-9,95	-16,81	0,02	-6,78
10	0 (5,0)	0 (2,2)	871,59 ± 13,13	133,04 ± 6,50	71,81 ± 2,78	58,79 ± 0,35	59,20 ± 2,41	-11,66	-16,09	2,19	-5,56
11	0 (5,0)	0 (2,2)	881,03 ± 16,03	132,00 ± 5,30	70,25 ± 0,35	57,85 ± 1,52	60,15 ± 2,95	-10,46	-17,01	0,02	-5,87

^a pH; ^b Concentrado Proteico (%); ^c $CA_{\text{água}}$ (%); ^d CF_{espuma} (%); ^e E_{espuma} (%); ^f $CF_{\text{emulsão}}$ (%); ^g $E_{\text{emulsão}}$ (%) ± erro padrão.

^h Desvio Relativo para $CA_{\text{água}}$ (%) = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo ($CA_{\text{água}}$ (%) = $973,22 - 266,88x_1^2 - 226,75x_2$);

ⁱ Desvio Relativo para CF_{espuma} (%) = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo (CF_{espuma} (%) = $154,45 + 22,04x_1 + 41,25x_2$);

^j Desvio Relativo para E_{espuma} (%) = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo (E_{espuma} (%) = $70,23 + 4,55x_1 + 7,22x_2 - 4,26x_2^2$);

^k Desvio Relativo para $E_{\text{emulsão}}$ (%) = $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo ($E_{\text{emulsão}}$ (%) = $63,68 + 8,77x_2 - 9,14x_2^2$).

Tabela 5.15 – Coeficientes de regressão do DCCR 2² para avaliação das propriedades de CA_{água}, CF_{espuma}, E_{espuma}, CF_{emulsão} e E_{emulsão} do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Fatores	CA _{água} (%)				CF _{espuma} (%)				E _{espuma} (%)				CF _{emulsão} (%)				E _{emulsão} (%)			
	C.R.	E.P.	t (5)	p - valor	C.R.	E.P.	t (5)	p - valor	C.R.	E.P.	t (5)	p - valor	C.R.	E.P.	t (5)	p - valor	C.R.	E.P.	t (5)	p - valor
Média	879,97	110,11	7,99	0,0005*	132,39	17,88	7,40	0,0007*	70,77	2,83	25,04	0,0000*	58,33	9,69	6,02	0,0018*	59,62	4,25	14,02	0,0000*
x ₁ ^a (L)	46,79	67,53	0,69	0,5193	22,04	10,97	2,01	0,1007*	4,55	1,73	2,62	0,0468*	5,26	5,94	0,89	0,4163	3,00	2,61	1,15	0,3014
x ₁ ^a (Q)	-237,87	80,58	-2,95	0,0318*	17,52	13,09	1,34	0,2382	-0,58	2,07	-0,28	0,7909	1,07	7,09	0,15	0,8857	4,34	3,11	1,39	0,2220
x ₂ ^b (L)	-226,75	67,53	-3,36	0,0202*	41,25	10,97	3,76	0,0131*	7,22	1,73	4,17	0,0088*	0,66	5,94	0,11	0,9156	8,77	2,61	3,36	0,0200*
x ₂ ^b (Q)	99,59	80,58	1,24	0,2714	12,89	13,09	0,99	0,3698	-4,43	2,07	-2,14	0,0849*	2,49	7,09	0,35	0,7401	-8,15	3,11	-2,62	0,0472*
x ₁ ^a · x ₂ ^b	51,57	95,36	0,54	0,6118	1,01	15,49	0,07	0,9503	-1,22	2,45	-0,50	0,6406	-0,55	8,39	-0,07	0,9505	-0,33	3,68	-0,09	0,9329

^a pH; ^b Concentrado Proteico (%);

L: termos lineares;

Q: termos quadráticos;

C.R.: Coeficientes de Regressão;

E.P.: Erro Padrão;

* p ≤ 0,10.

A variável pH apresentou efeito positivo para todas as respostas avaliadas, indicando que em níveis superiores de pH, dentro da faixa estudada (2,0 a 8,0), maiores percentuais das propriedades funcionais foram observados; além disso, este parâmetro foi significativo para CF_{espuma} e E_{espuma} . A hidratação das proteínas está relacionada com a sua solubilidade, sendo que em pH mais próximo do ponto isoelétrico ocorre um aumento das interações proteína-proteína que resulta em baixa interação com a água; por outro lado, acima do seu ponto isoelétrico, em virtude do aumento da carga líquida e das forças repulsivas, as proteínas tendem a absorver mais água (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Resultados similares foram encontrados por Benelhadj et al. (2016), que ao avaliar a $CA_{\text{água}}$ de um isolado proteico de *Spirulina platensis*, em três pHs (3, 7 e 10), observaram maior $CA_{\text{água}}$ em pH 10 (428,8%), além disso, verificaram que o pH também possui influência positiva sobre as propriedades espumantes do isolado proteico, sendo que os resultados mais apreciáveis para estas propriedades foram em pH 10. Da mesma forma, Anasuya Devi e Venkataraman (1984) avaliaram a capacidade espumante da biomassa e do concentrado proteico de *Spirulina platensis* alcançando melhores resultados em pH 10.

Para $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$ é importante destacar que os ensaios que apresentaram melhores resultados foram realizados em pHs distantes do ponto isoelétrico das proteínas. De acordo com Damodaran, Parkin e Fennema (2010) a maioria das proteínas alimentares podem se tornar eficientes emulsificadores quando se distanciam do ponto isoelétrico; neste pH estas proteínas estão pouco solúveis e hidratadas, tornando-as desprovidas de forças repulsivas eletrostáticas, fazendo com que não sejam formadas emulsões adequadas. Anasuya Devi e Venkataraman (1984) defendem que a emulsificação ocorre conforme a solubilidade da proteína, argumentando que a $CF_{\text{emulsão}}$ mínima acontece no ponto isoelétrico, além disso os autores compararam as características emulsificantes da biomassa e do concentrado proteico de *Spirulina platensis* mencionando que o concentrado proteico formou uma emulsão muito melhor que a biomassa. Benelhadj et al. (2016) observaram que níveis de pH inferior ou superior ao ponto isoelétrico proporcionam um aumento da $CF_{\text{emulsão}}$.

Por outro lado a variável concentrado proteico (%) apresentou efeito negativo para $CA_{\text{água}}$, o que sugere que maiores percentuais desta propriedade ocorrem em menores concentrações de amostra, dentro da faixa estudada (0,4 a 4,0%). A absorção de água ocorre conforme a composição da proteína e quantidade de grupos hidrofóbicos disponíveis (LIN; HUMBERT; SOSULSKI, 1974), sendo que possivelmente devido a menor concentração de proteínas disponíveis, a água teve maior facilidade de penetração na molécula proteica.

Para CF_{espuma} , E_{espuma} , $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$, o percentual de concentrado proteico utilizado apresentou efeito positivo, sugerindo que maiores percentuais de concentrado proteico favorecem estas propriedades, dentro da faixa estudada (0,4 a 4%). Conforme Damodaran, Parkin e Fennema (2010), o poder espumante de uma proteína aumenta com a concentração proteica até que um máximo valor seja atingido, além disso, a firmeza e a viscosidade da espuma aumentam, promovendo maior estabilidade da mesma. Entretanto para $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$, uma elevada concentração proteica, possivelmente, promove a competição das proteínas pela adsorção à interface, sendo que a composição da película proteica formada na interface depende da atividade de superfícies relativas dos componentes proteicos da mistura, afetando a formação e a estabilidade da emulsão formada (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Portanto, ao avaliar os resultados apresentados na matriz de ensaios (Tabela 5.14) é possível verificar que os maiores valores de $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$ são desenvolvidos em percentuais intermediários de concentrado proteico, sendo que nas condições máxima e mínima desta variável os resultados foram inferiores.

Neste contexto, é possível destacar os resultados de Benelhadj et al. (2016) que ao utilizar 11,1% de isolado proteico de *Spirulina platensis* para avaliação da sua $CF_{\text{emulsão}}$, conseguiram atingir resultados próximos a 65% em pH entre 8,0 a 10,0, resultado inferior ao encontrado neste trabalho, que foi 84% com 0,9% de concentrado proteico em pH 7,0. Referente aos resultados de $E_{\text{emulsão}}$ pode-se citar o estudo de Cano-Medina et al. (2011) que ao avaliarem esta propriedade para concentrado proteico obtido de semente de gergelim, encontraram melhores resultados (cerca de 50%) em pH inferior a 4,5, enquanto para os resultados apresentados neste trabalho

obteve-se a maior $E_{emulsão}$ (72,96%) em pH 7,0. Além da diferença na forma de condução da análise, a diferença entre os resultados pode estar relacionada com a utilização do tratamento ultrassônico para obtenção do concentrado proteico, pois, conforme Jambrak et al. (2008), este tratamento promove um aumento na $CF_{emulsão}$ por favorecer melhor integração das bolhas de óleo na emulsão.

Desta forma, considerando os parâmetros significativos ($p \leq 0,10$) foi possível determinar modelos matemáticos para as propriedades funcionais de $CA_{água}$, CF_{espuma} , E_{espuma} e $E_{emulsão}$ em função das variáveis avaliadas, representados na Equação 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.16. Como o $F_{calculado}$ foi significativo ($p \leq 0,10$) sendo maior que o $F_{tabelado}$, e os percentuais de variação explicados pelos modelos foram adequados, pode-se concluir que os modelos ajustaram-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir as superfícies de resposta (Figura 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9). Além disso, os desvios relativos (Tabela 5.14) foram baixos nas regiões maximizadas comprovando o ajuste adequado dos modelos aos dados experimentais. Entretanto, para $CF_{emulsão}$ não foi possível obter um modelo matemático, visto que os resultados da ANOVA não foram adequados (elevada falta de ajuste, $F_{calculado} < F_{tabelado}$).

$$CA_{água} = 973,22 - 266,88x_1^2 - 226,75x_2 \quad \text{Equação 5.2}$$

$$CF_{espuma} (\%) = 154,45 + 22,04x_1 + 41,25x_2 \quad \text{Equação 5.3}$$

$$E_{espuma} (\%) = 70,23 + 4,55x_1 + 7,22x_2 - 4,26x_2^2 \quad \text{Equação 5.4}$$

$$E_{emulsão} (\%) = 63,68 + 8,77x_2 - 9,14x_2^2 \quad \text{Equação 5.5}$$

Tabela 5.16 – ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas de CA_{água}, CF_{espuma}, E_{espuma}, CF_{emulsão} e E_{emulsão} (%).

Fonte de Variação	CA _{água} (%)						
	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F calculado	F tabelado	R ² (%)	p - valor
Regressão	846114,83	2	423057,41	12,75	3,11	76,11	0,0033
Resíduos	265531,05	8	33191,38				
Total	1111646	10					
	CF _{espuma} (%)						
Regressão	17444,27	2	8722,13	11,12	3,11	71,68	0,0064
Resíduos	6892,07	8	861,51				
Total	24336,34	10					
	E _{espuma} (%)						
Regressão	692,01	3	230,67	12,66	3,07	84,43	0,0032
Resíduos	127,58	7	18,23				
Total	1111646	10					
	CF _{espuma} (%)						
Regressão	260,89	5	52,18	0,19	3,45	15,64	0,9560
Resíduos	1407,53	5	281,51				
Total	1668,42	10					
	E _{espuma} (%)						
Regressão	1156,30	2	578,15	10,30	3,45	66,71	0,0061
Resíduos	449,20	8	56,15				
Total	1605,50	10					

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

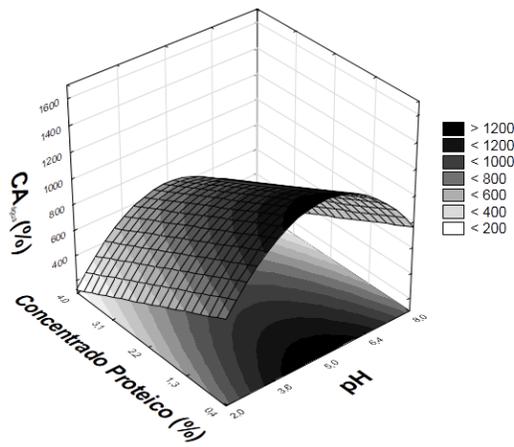
Analisando a superfícies de resposta e as curvas de contorno pode-se observar que as maiores respostas para CA_{água} (Figura 5.6) foram alcançadas no ponto central estudado para o pH (5,0) e em níveis inferiores de concentração de concentrado proteico (0,4%). Para CF_{espuma} (Figura 5.7) maiores respostas foram observadas nos níveis superiores das duas variáveis independentes estudadas, e para E_{espuma} (Figura 5.8) pode-se verificar uma faixa maximizada entre pH de 6,4 a 8,0 e concentração do concentrado proteico de 2,7 a 4,0%. Para E_{emulsão} (Figura 5.9) é possível verificar que as maiores respostas foram observadas nos níveis superiores de concentração de concentrado proteico e a variável pH não apresentou efeito significativo, o que pode ser observado na superfície de resposta.

Torna-se importante destacar que os resultados de CA_{água} para o concentrado proteico de *Spirulina platensis* podem ser comparados à outras proteínas, entre elas à proteína isolada de soja; proteína que têm sido aplicada na indústria de cárneos devido

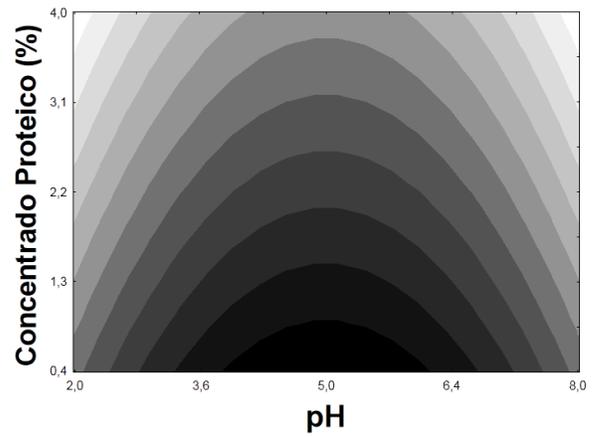
sua $CA_{\text{água}}$, reduzindo a perda de umidade destes produtos. Köhn et al. (2005) avaliaram a $CA_{\text{água}}$ de diversos ingredientes utilizados em indústrias cárneas, sendo que a proteína isolada de soja apresentou 573,90% de absorção de água (pH \approx 7,0 e 15% de isolado proteico). Este resultado foi inferior ao encontrado com concentrado proteico de *Spirulina platensis* (com 0,4% de concentrado proteico observou-se $CA_{\text{água}}$ de 1658,39%).

A albumina é a principal proteína presente na clara do ovo, comumente utilizada na indústria de alimentos para formação de espuma, possibilitando a incorporação de ar nos alimentos, tais como bolos, sobremesas, entre outros (SADAHIRA et al., 2015). Desta forma, é importante relatar que ao verificar a maior CF_{espuma} do concentrado proteico de *Spirulina platensis* (226,46%) é possível encontrar semelhanças com a clara do ovo, que apresenta poder espumante de 240% a partir de 0,5% de amostra em pH 8,0 (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Além disso, Jambrak et al. (2008) relatam que o tratamento ultrassônico pode aperfeiçoar a CF_{espuma} , devido ao efeito da homogeneização proporcionada que favorece a dispersão uniforme das partículas de proteínas e de gordura.

Além disso, a fim de ilustrar as emulsões formadas a partir do concentrado proteico de *Spirulina platensis*, foram realizadas fotos microscópicas onde pode-se verificar as microestruturas das melhores e piores condições de $CF_{\text{emulsão}}$ (ensaios 2 e 7) e $E_{\text{emulsão}}$ (ensaio 4 e 7) (Figura 5.10). Os menores resultados tanto para $CF_{\text{emulsão}}$ como para $E_{\text{emulsão}}$ (Figura 5.10b e 5.10d) apresentaram gotículas com maiores diâmetros que, possivelmente, sofreram coalescência por não possuírem surfactantes suficientes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Por outro lado, os melhores ensaios (Figura 5.10a e 5.10c) apresentaram gotículas com menores diâmetros e mais homogêneas.

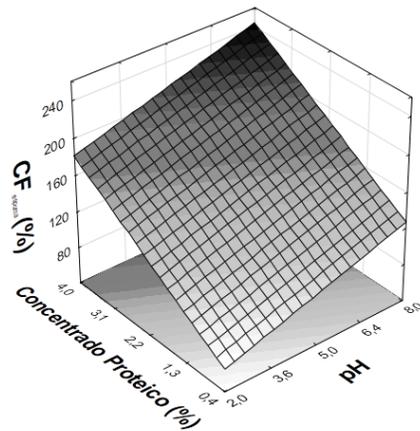


(a)

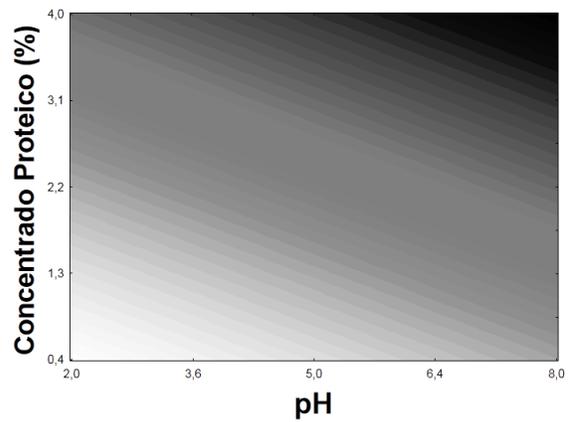


(b)

Figura 5.6 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para $CA_{\text{água}}$ (%) do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.



(a)



(b)

Figura 5.7 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para CF_{espuma} (%) do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

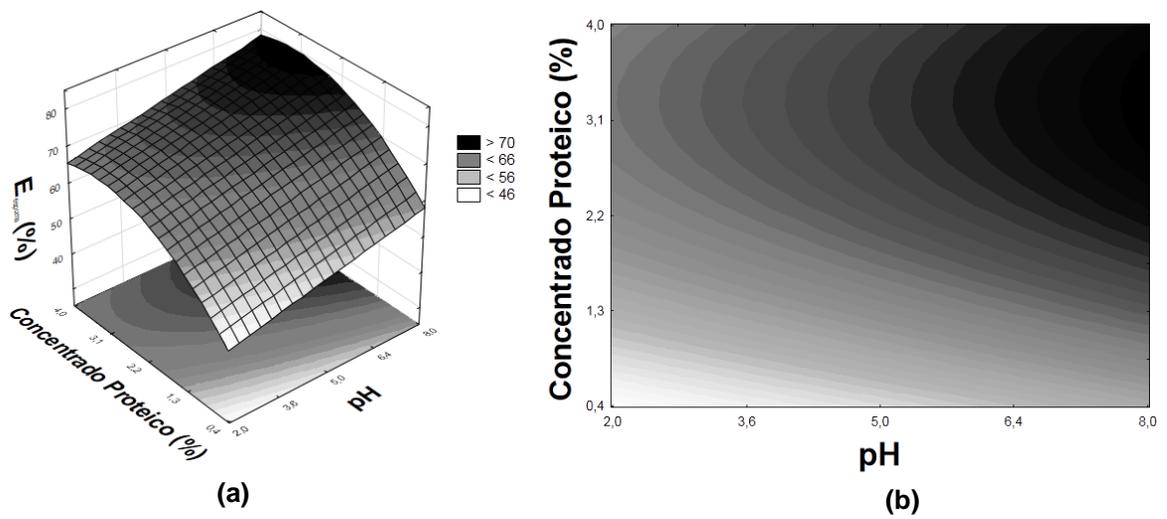


Figura 5.8 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para E_{espuma} (%) do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

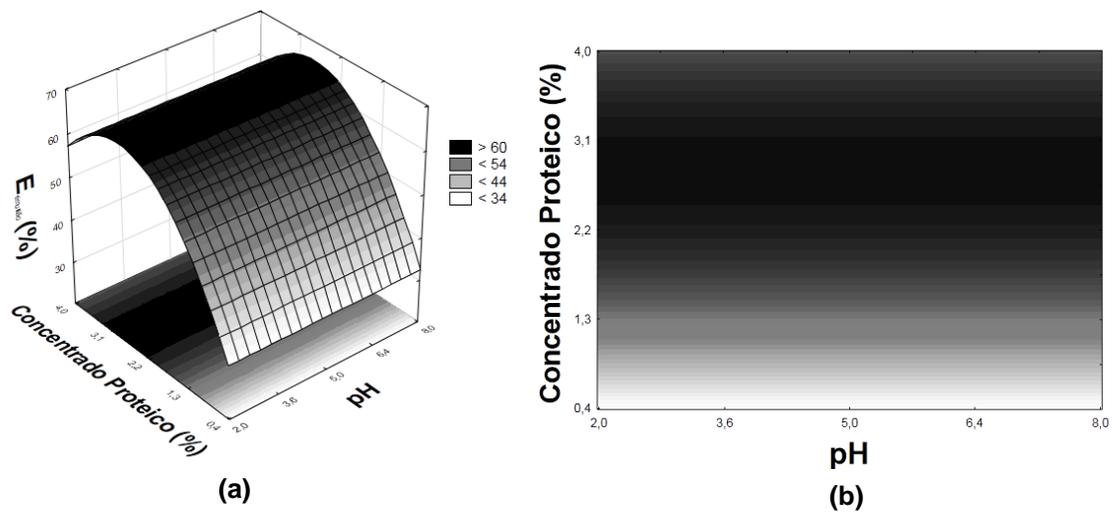


Figura 5.9 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para $E_{\text{emulsão}}$ (%) do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

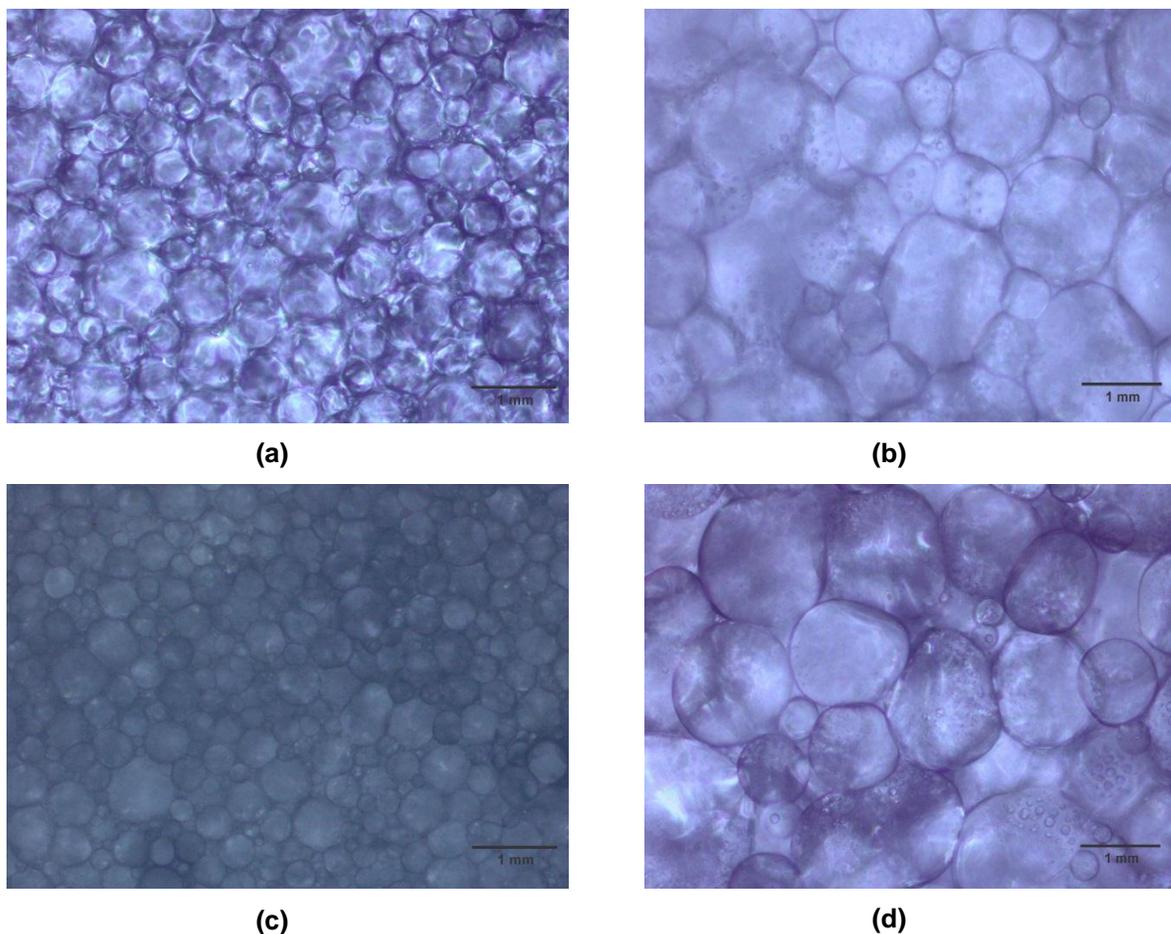


Figura 5.10 – Fotos microscópicas dos ensaios 2 (pH 7,0 e 0,9% de concentrado proteico) (a) e 7 (pH 5,0 e 0,4% de concentrado proteico) (b) da $CF_{emulsão}$ e dos ensaios 4 (pH 7,0 e 3,5% de concentrado proteico) (c) e 7 (pH 5,0 e 0,4% de concentrado proteico) (d) da $E_{emulsão}$ a um aumento de 20x.

5.4.3 Capacidade de Formação de Gel (CF_{gel})

Gelificação é outra importante propriedade funcional das proteínas. Os géis de proteínas são decorrentes da formação de redes interligadas, parcialmente associada, de polipeptídios em qual a água é retida. Além disso, são caracterizados por elevada viscosidade, plasticidade e elasticidade (KINSELLA; MELACHOURIS, 1976). A maior parte dos géis proteicos é elaborada por meio de aquecimento de uma solução concentrada de proteínas onde, primeiramente, a proteína solúvel sofre desnaturação

expondo os grupos funcionais, como pontes de hidrogênio e grupos hidrofóbicos que podem formar ligações não covalentes, originando a rede proteica (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Neste contexto para avaliar a CF_{gel} foi desenvolvido um PFF 2^{4-1} (3 pontos centrais, total de 11 ensaios), sendo que a matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e as respostas de força (g) e deformação (mm), fornecidas pela análise de textura do gel formado, estão apresentadas na Tabela 5.17. Os resultados encontrados de força e deformação entre as respostas do PFF foram de 0,72 a 3,57 g (ensaios 5 e 8) e de 25,45 a 81,18 mm (ensaios 9 e 6). Os pontos centrais apresentaram pequena variação (erro padrão = $\pm 0,03$ e $\pm 0,11$ para força e deformação, respectivamente), indicando adequada repetibilidade da análise.

Tabela 5.17 – Matriz do PFF 2^{4-1} com níveis reais e codificados das variáveis para avaliação da CF_{gel} do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d	y_1^e	y_2^f
1	-1 (4,0)	-1 (70)	-1 (2,0)	-1 (1,0)	1,16 \pm 0,02	56,85 \pm 0,57
2	+1 (12,0)	-1 (70)	-1 (2,0)	+1 (4,0)	1,50 \pm 0,10	65,92 \pm 2,97
3	-1 (4,0)	+1 (90)	-1 (2,0)	+1 (4,0)	1,05 \pm 0,01	57,35 \pm 0,71
4	+1 (12,0)	+1 (90)	-1 (2,0)	-1 (1,0)	3,23 \pm 0,01	62,57 \pm 2,69
5	-1 (4,0)	-1 (70)	+1 (8,0)	+1 (4,0)	0,73 \pm 0,04	57,35 \pm 0,71
6	+1 (12,0)	-1 (70)	+1 (8,0)	-1 (1,0)	2,97 \pm 0,12	81,18 \pm 4,40
7	-1 (4,0)	+1 (90)	+1 (8,0)	-1 (1,0)	0,75 \pm 0,02	55,92 \pm 0,52
8	+1 (12,0)	+1 (90)	+1 (8,0)	+1 (4,0)	3,57 \pm 0,20	71,40 \pm 0,63
9	0 (8,0)	0 (80)	0 (5,0)	0 (2,5)	1,01 \pm 0,04	25,46 \pm 0,58
10	0 (8,0)	0 (80)	0 (5,0)	0 (2,5)	0,95 \pm 0,04	25,67 \pm 0,71
11	0 (8,0)	0 (80)	0 (5,0)	0 (2,5)	1,00 \pm 0,05	25,59 \pm 0,33

^a Concentrado proteico (%); ^b Temperatura (°C); ^c pH; ^d Tempo (h); ^e Força (g) \pm erro padrão; ^f Deformação (mm) \pm erro padrão.

A determinação dos parâmetros força de quebra de gel e deformação possibilita a avaliação do gel, sendo que quanto maiores os resultados, melhores são as características do gel. Analisando-se os resultados da Tabela 5.17 foi possível calcular

os efeitos das quatro variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 5.18. Foi possível verificar que somente a variável percentual de concentrado proteico apresentou efeito significativo ($p \leq 0,10$) sobre a resposta de força de quebra do gel, sendo que para a deformação, nenhum fator foi significativo.

Tabela 5.18 – Efeito dos fatores estudados no PFF 2⁴⁻¹ sobre os resultados de força (g) e deformação (mm) dos géis elaborados com concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Fatores	Força (g)				Deformação (mm)			
	Efeito	Erro Padrão	t (6)	p - valor	Efeito	Erro Padrão	t (11)	p - valor
Média	1,63	0,23	7,21	0,0004*	53,21	7,02	7,58	0,0003*
x₁^a	1,90	0,53	3,58	0,0117*	13,40	16,47	0,81	0,4470
x₂^b	0,56	0,53	1,06	0,3304	-3,52	16,47	-0,21	0,8380
x₃^c	0,27	0,53	0,51	0,6291	5,79	16,47	0,35	0,7374
x₄^d	-0,32	0,53	-0,60	0,5721	-1,12	16,47	-0,07	0,9479

^a Concentrado proteico (%); ^b Temperatura (°C); ^c pH; ^d Tempo (h); * $p \leq 0,10$.

O percentual de concentrado proteico utilizado apresentou efeito significativo somente sobre a resposta de força de cisalhamento, sendo este positivo dentro da faixa estudada (4,0 a 12,0 %); para a resposta de deformação o efeito também foi positivo, sugerindo que maiores percentuais da amostra possibilitaram melhores características do gel formado. Este efeito pode ser justificado devido à necessidade de maiores concentrações de proteínas para o desenvolvimento do gel proteico (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A variável temperatura não exerceu efeito significativo em nenhuma das respostas estudadas, indicando que qualquer valor dentro do intervalo estudado (70 a 90°C) resultou em resultados similares, provavelmente devido a desnaturação irreversível das proteínas. Chronakis (2001), também verificou a gelificação do concentrado proteico de *Spirulina platensis*, determinando que em temperatura de 90°C a adesão agregada diminui, sendo atribuída a estabilidade das forças hidrofóbicas que favorecem o desenvolvimento das redes formadoras do gel de proteína. Desta forma, é possível verificar que em 70°C ocorre o início da formação do gel, iniciado pela

formação da fase pró-gel (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010), sendo que ao aumentar a temperatura para 90°C é possível manter e/ou melhorar as características do gel.

Para ambas as respostas, o pH apresentou efeito positivo, sugerindo que maiores valores de força e deformação foram observados com o aumento do pH dentro da faixa estudada (2,0 a 8,0). Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010) o pH é um dos fatores ambientais que pode afetar a gelificação das proteínas; em proximidades do ponto isoelétrico, as proteínas comumente desenvolvem géis do tipo coágulo, entretanto em extremos de pH, ocorre a formação de géis fracos devido à repulsão eletrostática nesta condição, sendo que a região de pH ótima para o desenvolvimento de géis proteicos ocorre em torno de 7,0 a 8,0.

A variável tempo, também não foi significativa para as respostas avaliadas, contudo apresentou efeito negativo dentro da faixa estudada (1,0 a 4,0 h), sugerindo que em menores tempos foram obtidos géis com melhores condições de força e deformação. Comportamento semelhante foi reportado por Benelhadj et al. (2016) que, para determinarem a menor concentração de isolado proteico de *Spirulina platensis* necessária para formação de gel, aplicaram o tempo de 1,0 h.

Com isso, é possível descrever que o gel do concentrado proteico de *Spirulina platensis* pode ser desenvolvido em uma concentração elevada de proteínas (mínimo 12%) o que irá permitir maior penetração da água entre as moléculas para formação da rede de gel. Na temperatura de 70°C e em 1,0 h de aquecimento ocorreu o início da formação das redes formadoras do gel, sendo que o pH 8,0 pode ter favorecido este mecanismo.

5.4.3.1 Viscosidade do gel

A melhor condição de formação de gel do concentrado proteico de *Spirulina platensis* observada nos ensaios do PFF 2⁴⁻¹ (12% de concentrado proteico em pH 8,0)

foi submetida ao estudo da viscosidade. Primeiramente, foi realizado o estudo do comportamento do gel, o qual, de acordo com a avaliação da Figura 5.11 pode ser considerado um fluido com comportamento não newtoniano do tipo pseudoplástico. São chamados de fluidos pseudoplásticos, substâncias que sofrem redução da viscosidade aparente à medida que o cisalhamento aumenta (ÇENGEL; CIMBALA, 2006).

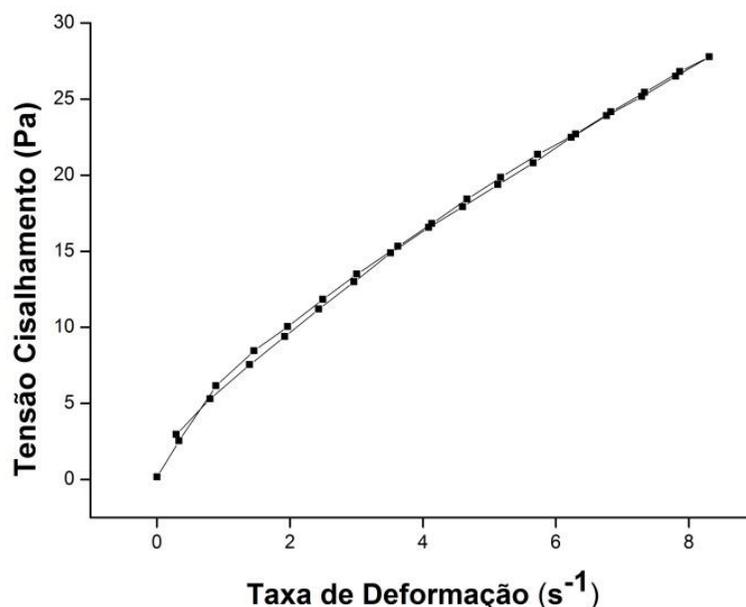


Figura 5.11 – Comportamento reológico do gel do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Entretanto, com o intuito de verificar em qual modelo não-newtoniano os dados experimentais se ajustariam de maneira mais adequada, foram avaliados os coeficientes de determinação (R^2) e os qui-quadrados (χ^2) para os modelos reológicos de Bingham, Casson, Hersch-Bulkley e Lei da Potência (Tabela 5.19). O modelo da Lei da Potência foi o que melhor se ajustou aos dados, possuindo R^2 próximo a 1,0 (um) e o menor χ^2 . A partir deste modelo encontraram-se os índices de consistência do fluido, $K = 6,24 \pm 0,0652 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$, e de comportamento, $n = 0,70 \pm 0,0058$. Conforme Steffe (1996), quando K é maior que zero e n possui um valor entre zero e 1,0 (um), o fluido é considerado pseudoplástico.

Tabela 5.19 – Valores dos coeficientes de determinação (R^2) e qui-quadrado (χ^2) dos modelos de Bingham, Casson, Hersch-Bulkley e Lei da Potência avaliados para o gel do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Modelos	R^2	χ^2
Bingham	0,9829	1,3155
Casson	0,9968	0,2477
Hersch-Bulkley	0,9996	0,0335
Lei da Potência	0,9996	0,0318

A curva de viscosidade do gel proteico de *Spirulina platensis* versus temperatura está apresentada na Figura 5.12. Desta forma, é possível observar que a viscosidade da solução contendo 12% de concentrado proteico de *Spirulina platensis* diminui com o aumento da temperatura, onde de acordo com Chronakis (2001) isto é comum na maioria das proteínas devido ao aumento da energia cinética. Entretanto, a 70°C a viscosidade volta a aumentar, possivelmente pela formação do estado “pró-gel” da mistura decorrente da desnaturação térmica das proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Ainda, Schneider e Gerder (2014) relatam que o aquecimento é responsável por destruir a estrutura celular de microalgas e assim, influenciar na sua viscosidade.

Chronakis (2001) atingiu resultados semelhantes a este estudo, no qual ao avaliar a viscosidade de um concentrado proteico de *Spirulina* dissolvido em solução tampão com pH 7,5 verificou uma redução da viscosidade entre 10 a 50°C e, em seguida, um aumento entre 50 a 70°C. Além disso, Zhang et al. (2013) verificaram o comportamento reológico de suspensões contendo a microalga *Chlorella* e, distinguiram que em baixas concentrações da microalga o comportamento foi newtoniano e ao aumentar a concentração (acima de 0,7% p/v) a suspensão passou a se comportar de forma não-newtoniana.

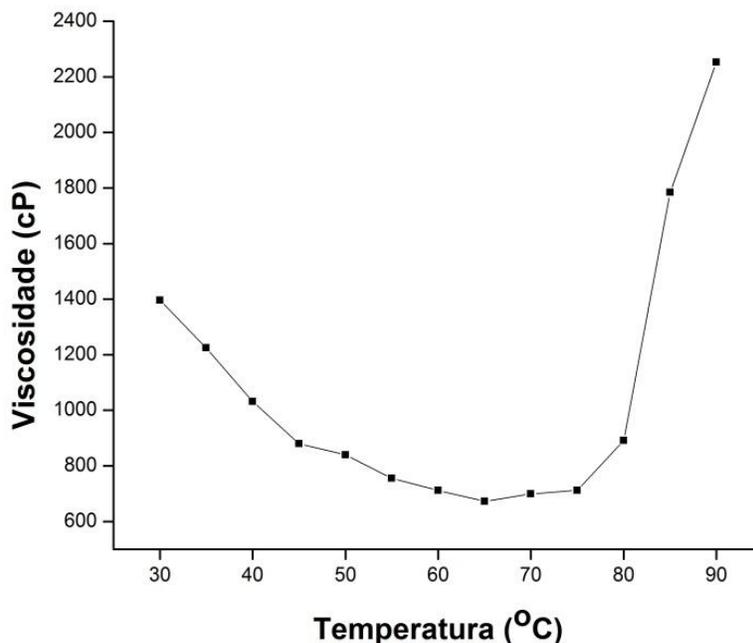


Figura 5.12 – Variação da viscosidade (cP) em função da temperatura (°C) do gel do concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

5.4.4 Capacidade de Absorção de Óleo ($CA_{\text{óleo}}$)

A $CA_{\text{óleo}}$ é de grande importância para o processamento de alimentos, tais como formulações de salsichas, massas de bolo, maioneses e molhos para saladas (CHANDI; SOGI, 2007), principalmente, pelo fato de que quando a proteína se liga a molécula de gordura pode favorecer o desenvolvimento de benefícios sensoriais aos alimentos, como melhor retenção do sabor (KINSELLA, 1979).

A $CA_{\text{óleo}}$ em função do percentual de concentrado proteico de *Spirulina platensis* está apresentada na Figura 5.13. A maior $CA_{\text{óleo}}$ foi de 845,77% que ocorreu no menor percentual (0,4%) de concentrado proteico estudado. Dench, Rivas e Caygill (1981) descrevem que, possivelmente, a absorção de gordura ocorre em função da composição da proteína, dos números de grupos lipofílicos disponíveis. Além disso, Lin,

Humbert e Sosulski (1974) mencionam que as cadeias não polares das proteínas possam ter maior afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura, contribuindo para absorção de mesma. Com isso, é possível justificar o fato de que a maior $CA_{\text{óleo}}$ tenha ocorrido com o menor percentual de concentrado proteico, fazendo com que o óleo penetrasse com maior facilidade nesta condição.

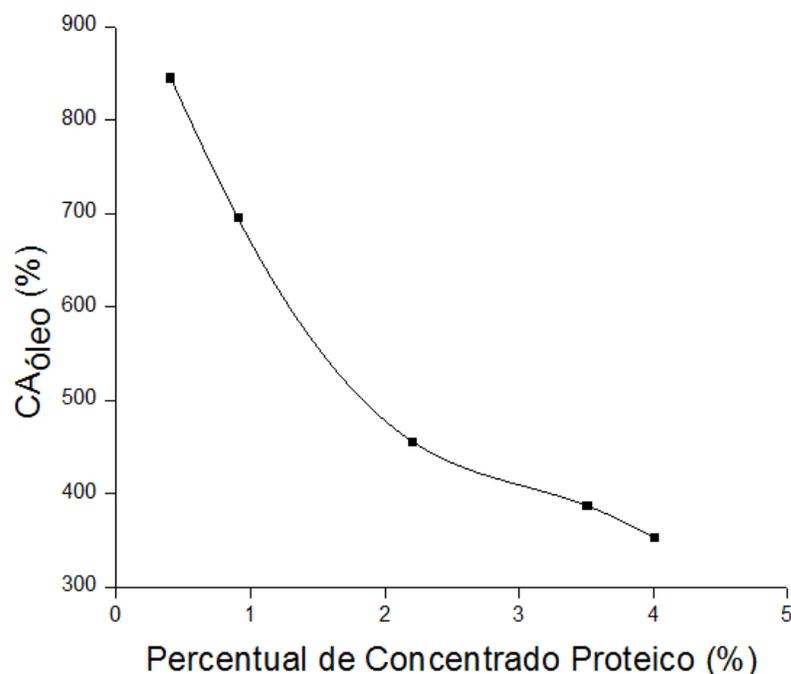


Figura 5.13 – $CA_{\text{óleo}}$ em função da concentração de concentrado proteico de *Spirulina platensis*.

Benelhadj et al. (2016) alcançaram 252,7 g de óleo . 100 g⁻¹ de isolado proteico de *Spirulina platensis* ao utilizar 0,5 g de amostra em 15 mL de óleo de milho o que corresponde a cerca de 3,3% de percentual de isolado proteico utilizado. Anusuya e Venkataraman (1984) verificaram a $CA_{\text{óleo}}$ da biomassa e do concentrado proteico de *Spirulina platensis* a partir da aplicação de 4,0 g de amostra em 24,0 mL de óleo (correspondendo a aproximadamente 16% em percentual de amostra) alcançando resultados de 190 e 280%, respectivamente. Além disso, Nirmala, Prakash e Venkararaman (1992) também avaliaram a $CA_{\text{óleo}}$ da biomassa de *Spirulina platensis*, utilizando cerca de 16% de amostra e, alcançaram 56 g de óleo . 100 g⁻¹ de amostra. Desta forma, é possível notar uma grande variação nos resultados conforme a

literatura, principalmente por avaliarem diferentes percentuais de concentrado proteico; o resultado encontrado neste estudo foi superior aos indicados, utilizando somente 0,4% de concentrado proteico, percentual de estudo que não foi relatado na literatura científica para esta propriedade.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos neste estudo, foi possível realizar as seguintes conclusões:

- A combinação das técnicas de rompimento celular, utilizando ondas ultrassônicas e agitação concomitantes, permitiu a extração conjunta de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* corroborando com o conceito de Biorrefinarias Integradas;
- A estratégia sequencial de planejamentos experimentais possibilitou determinar as melhores condições de extração de proteínas e carboidratos, alcançando cerca de 38% de proteínas extraídas, correspondendo a 75,85% de recuperação de proteínas da biomassa e 9% de carboidratos extraídos, com recuperação de 41,54%;
- Através da precipitação ácida das proteínas extraídas, foi possível obter o concentrado proteico obtido a partir da microalga *Spirulina platensis*, com rendimento global de 18,33%;
- De acordo com as análises de caracterização química do concentrado proteico, foi possível determinar sua composição centesimal, sendo que o percentual de proteínas foi 75,97% (b.s.). Além disso, apresentou coloração verde azulada, com quantidades apreciáveis de aminoácidos, sendo o que o triptofano apresentou o maior escore químico (1,71) e o aminoácido limitante foi a histidina. Conforme a avaliação da estrutura proteica através da análise de FTIR foi possível identificar bandas características em proteínas proporcionando relacionar sua estrutura com algumas propriedades funcionais tecnológicas, tais como $CA_{\text{água}}$, CF_{gel} , $CF_{\text{emulsão}}$ e $E_{\text{emulsão}}$;
- Na avaliação da funcionalidade tecnológica do concentrado proteico foi possível verificar que o pH interferiu de forma positiva nas propriedades funcionais avaliadas, ou seja, nos níveis superiores de pH foi desenvolvido um melhor

desempenho destas propriedades. A influência do pH sobre as propriedades funcionais tecnológicas do concentrado proteico é justificada pelas características de solubilidade desta proteína que apresenta valores mínimos em pH 3,0 e máximos em 9,0. Além disso, a concentração de concentrado proteico também é responsável por alterar estas propriedades, sendo que neste estudo foi possível verificar que esta variável apresentou influência positiva para as análises de funcionalidade tecnológica avaliadas, indicando que quanto maior o nível de adição do concentrado proteico, melhores foram os resultados para estas propriedades, exceto para avaliação da $CA_{\text{água}}$ e $CA_{\text{óleo}}$. Ainda, para CF_{gel} também foi avaliado a interferência da temperatura e do tempo para formação do gel, os quais não apresentaram efeitos significativos.

- Com isso, pode-se ressaltar que o concentrado proteico de *Spirulina platensis* possui adequada qualidade nutricional podendo contribuir como um suplemento alimentar. Ainda, de acordo com a sua funcionalidade tecnológica pode ser uma alternativa adequada para aplicação na indústria alimentícia como componente de emulsões, espumas ou géis. Destaca-se, também, que como a maior objeção do consumo da biomassa completa de *Spirulina platensis* é referente às suas características sensoriais, a utilização somente da sua fração proteica pode favorecer sua aceitação na alimentação humana.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* a partir da biomassa *in natura*, ou seja, não realizar o tratamento prévio referente à extração de lipídios da biomassa;
- A fim de aumentar o percentual de recuperação de carboidratos da biomassa, estudar a utilização de enzimas associada à extração deste componente;
- Avaliar o efeito de sais sobre as propriedades de funcionalidade do concentrado proteico de *Spirulina platensis*;
- Realizar o estudo do potencial antioxidante do concentrado proteico de *Spirulina platensis*;
- Avaliar as características sensoriais do concentrado proteico, comparando-o com a biomassa da microalga *Spirulina platensis*;
- Aplicar o concentrado proteico de *Spirulina platensis* na formulação de alimentos, explorando melhor suas características nutricionais e de funcionalidade tecnológica;
- Realizar o estudo das propriedades funcionais dos carboidratos obtidos da biomassa de *Spirulina platensis*;
- Avaliar o processo de sacarificação enzimática dos carboidratos extraídos com o intuito de estudar a produção de bioetanol.

8 REFERÊNCIAS

AL-HOMAIDAN, A. A.; AL-HOURI, H. J.; AL-HAZZANI, A. A.; ELGAALY, G.; MOUBAYED, N. M. S. Biosorption of copper ions from aqueous solutions by *Spirulina platensis* biomass. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, p. 57-62, 2014.

AHMED, E. M.; SCHMIDT, R. H. Functional properties of peanut and soybean proteins as influenced by processing method. **Peanut Science**, v. 6, p. 1-6, 1979.

ANUSUYA DEVI, M.; VENKATARAMAN, L. V. Functional Properties of Protein Products os Mass Cultivated Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 24-27, 1984.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp.. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 109-117, 2008.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed. Estados Unidos: AOAC International, 1998.

BABADZHANOV, A. S.; ABDUSAMATOVA, N.; YUSUPOVA, F. M.; FAIZULLAEVA, N.; MEZHLYMYAN, L. G.; MALIKOVA, M. K. H. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, p. 276-279, 2004.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, p. 207-210, 2007.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 235-241, 1993.

BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effects of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1056-1063, 2016.

BERMEJO, P.; PIÑERO, E.; VILLAR, A. M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from protean extract of *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 110, p. 436-445, 2008.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 26, p. 9-20, 2008.

BETORET, E.; BETORET, N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 498-508, 2011.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2001.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. v. 70, p. 313-321, 1999.

BRASIL. VII Lista dos novos ingredientes aprovados, 2009 – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm>. Acesso em: 10 fev. 2016.

BRASIL. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3b43f08047457c0188d5dc3fbc4c6735/RDC_268_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 jan. 2016.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, p. 315-331, 1997.

CAMPANELLA, L.; GRESCENTINI, G.; AVINO, P. Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina*. **Analisis**, v. 27, p. 533-540, 1999.

CANO-MEDINA, A.; JIMÉNEZ-ISLAS, H.; DENDOOVEN, L; HERRERA, R. P.; GONZÁLEZ-ALATORRE, G.; ESCAMILLA-SILVA, E. M. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. **Food Research Internacional**, v. 44, p. 684-692, 2011.

CHANDI, G. K.; SOGI, C. D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 592-597, 2007.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; TRIRATANA, P.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 73-78, 2013.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; BUNNAG, B. Lipid and fatty acids extraction from the cyanobacterium *Spirulina*. **Science Asia**, v. 34, p. 299-305, 2008.

CHEL-GUERRERO, L.; PEREZ-FLORES, V.; BENTACUR-ANCONA, D.; DAVILA-ORTIZ, G. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 584-591, 2002.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2011.

CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 603-608, 1996.

CHRONAKIS, I. S. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain Pacifica): Thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 888-898, 2001.

CHRONAKIS, I. S., GALATANU, A. N., NYLANDER, T; LINDMAN, B. The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, p. 181-192, 2000.

COCA, M.; BARROCAL, V. M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented cultura media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2015.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschun**, v. 59, p.55-59, 2004.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBILELI, G. M.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 16, p. 15-18, 2000.

COUSTETS, M.; JOUBERT-DURIGNEUX, V.; HÉRAULT, J.; SCHOEFS, B.; BLANCKAERT, V.; GARNIER, J. P.; TEISSIÉ, J. Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. **Bioelectrochemistry**, v.103, p. 74-81, 2015.

DAMODARAN, S., PARKIN, K. L., FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2010.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation and analytical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 141-158, 2011.

DEMIR, B. S.; TÜKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalys B: Enzymatic**, v. 64, p. 123-128, 2010.

DENCH, J. E.; RIVAS, N. R.; CAYGILL, J. C. Selected functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) flour and two protein isolates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, p. 557-564, 1981.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados.** 2006. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

EL-TANTAWY, W. H. Antioxidant effects of *Spirulina* supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 1-5, 2015.

FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 92, p. 379-385, 2012.

FILGUEIRAS, A. V.; CAPELO, J. L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 53, p. 433-441, 2000.

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.

GERDE, J. A.; WANG, T.; YAO, L.; JUNG, S.; JOHNSON, L. A.; LAMSAL, B. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. **Algae Research**, v.2, p. 145-153, 2013.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60-72, 2009.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torto de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 1-10, 2000.

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. **A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish.** FAO Fisheries and Aquaculture Circular. N° 1034. Roma, FAO. 2008. 33p.

HAGENSON, L. C.; DORAISWAMY, L. K. Comparison of the effects of ultrasound and mechanical agitation on a reacting solid-liquid system. **Chemical Engineering Science**, v. 53, p. 131-148, 1998.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 6, p. 912-916, 1989.

HARNEDY, P. A., FITZGERALD, R. J. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. **LWT - Food Science Technology**, v. 51, p. 375-382, 2013.

HARIS, P. I.; SEVERCAN, F. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, p. 201-221, 1999.

HOSSAIN, M. B.; BRUNTON, N. P.; PATRAS, A.; TIWARI, B.; O'DONNELL, C. P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19, p. 582-590, 2012.

JAMBRAK, A. R.; MASON, T. J.; LELAS, V.; HERCEG, Z.; HERCEG, I. L. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 281-287, 2008.

JUNG, S.; RICKERT, D. A.; DEAK, N. A.; ALDIN, E. D.; RECKNOR, J.; JOHNSON, L. A.; MURPHY, P. A. Comparison of Kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 1169-1173, 2003.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, p. 242-258, 1979.

KINSELLA, J. E.; MELACHOURIS, N. Functional properties of proteins in foods: A survey. **Food Science and Nutrition**, v. 7, p. 219-280, 1976.

KÖHN, C. R., FONTOURA, A. M., KEMPKA, A. P., DEMIATE, I. M., KUBOTA, E. H., PRESTES, R. C. Assessment of different methods for determining the capacity of water absorption of ingredients and additives used in the meat industry. **International Food Research Journal**, v. 22, p. 356-362, 2015.

KRIMM, S. Infrared spectra and chain conformation of proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 4, p. 528-540, 1962.

LEÓN, I. A. A. **Estudo do cultivo de Spirulina platensis por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio**. 2010. 99p. Dissertação (Mestrado Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LI, M.; MA, Y.; NGADI, M. O. Binding of curcumin to β -lactoglobulin and its effect on antioxidant characteristics of curcumin. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1504-1511, 2013.

LIN, M. J. Y.; HUMBERT, E. S.; SOSULSKI, F. W. Certain functional properties of sunflower meal products. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 368-370, 1974.

LUO, J.; FANG, Z.; SMITH, R. L. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 41, p. 56-93, 2014.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 41-47, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAUMOND, J. L. **Krause's Food and the Nutrition Care Process**. 13 ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2012.

MARSH, K. N.; BOXALL, J. A.; LICHTENTHALER, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures – a review. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p. 93-98, 2004.

MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. O.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 52-57, 2009.

MAZOKOPAKIS, E. E.; KAREFILAKIS, C. M.; TSARTSALIS, A. N.; MILKAS, A. N.; GANOTAKIS, E. S. Acute rhabdomyolysis caused by *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). **Phytomedicine**, v. 15, p. 525-527, 2008.

MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, p.1357-1367, 2007.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P. O.; LAGO, M. C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 173-178, 2010.

MISURCOVÁ, L.; BUNKA, F.; AMBROZOVÁ, J. V.; MACHU, L.; SAMEK, D.; KRÁČMAR, S. Amino acid composition of algal products and its contribution to RDI. **Food Chemistry**, v. 151, p. 120-125, 2014.

MIYAZAWA, T.; BLOUT, E. R. The infrared spectra of polypeptides in various conformations: Amide I and II bands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, p.712-719, 1961.

MOHANTY, B.; MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. **Food Chemistry**, v. 28, p. 17-30, 1998.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P. KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1715-1718, 1985.

MUÑOZ, R.; NAVIA, R.; CIUDAD, G.; TESSINI, C.; JEISON, D.; MELLA, R.; RABERT, C.; AZÓCAR, L. Preliminary biorefinery process proposal for protein and biofuels recovery from microalgae. **Fuel**, v. 150, p. 425-433, 2015.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, p. 178-185, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2002.

NIRMALA, C.; PRAKASH, V.; VENKATARAMAN, L. V. Physico-chemical and functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*). **Die Nahrung**, v. 36, p. 569-577, 1992.

NGO, D. H.; VO, T. S.; NGO, D. N.; WIJESEKARA, I.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 378-383, 2012.

OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, V.; ARACAVA, K. K.; RODRIGUES, C. E. C. Effects of the extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol – a response surface approach. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 22-31, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVARES, L. F.; SANZ, M. L. G. **Tecnología de Alimentos**, v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OSBORNE, D. R. **Análisis de nutrientes de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1986.

PHANG, S. M.; MIAH, M. S.; YEOH, B. G.; HASHIM, M. A. *Spirulina* culture in digested sago starch factory waste water. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 395-400, 2000.

PATEL, M. T.; KILARA, A. Studies on whey protein concentrates. 2. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2731-2740, 1990.

PIÑERO ESTRADA, J. E.; BERMEJO BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

PRATA, A. S.; SGARBIERI, V. C. Composition and physicochemical properties of two protein fractions of bovine blood serum. **Food Science and Technology**, v. 4, p. 964-972, 2008.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, p. 89-100, 2012.

RADMANN, E. M.; HENRARD, A. A.; ROSA, A. P. C.; ANDRADE, M. R.; MORAIS, M. G.; ZÍLIO, R. L.; COSTA, J. A. V. Cultivo de microalgas para a biofixação de CO₂ e obtenção de biocombustíveis. In: Congresso Brasileiro de Carvão Mineral, 3., 2011, Gramado. **Anais eletrônicos...** Gramado: Rede Carvão, 2011. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/rede-carvao/Sessoes_C4_C5_C6/C5_ARTIGO_01.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2015.

RAJANBABU, V.; CHEN, J. Y. Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 39-44, 2011.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133-141, 2004.

RASHID, N.; REHMAN, M. S. U.; HAN, J.-I. Recycling and reuse of spent microalgal biomass for sustainable biofuels. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 101-107, 2013.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444-467, 2013.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2-inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Reserch Communications**, v. 304, p. 385-392, 2003.

RIZWAN, M.; LEE, J. H.; GANI, R. Optimal design of microalgae-based biorefinery: Economics, opportunities and challenges. **Applied Energy**, v. 150, p. 69-70, 2015.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6587-6592, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

ROMERO GARCÍA, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M. Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 112, p. 164-70, 2012.

SADAHIRA, M. S.; LOPES, F. C. R.; RODRIGUES, M. I.; YAMADA, A. T.; CUNHA, R. L.; NETTO, F. M. Effect of pH and interaction between egg white protein and hydroxypropylmethylcellulose in bulk aqueous medium on foaming properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 26-34, 2015.

SAFI, C.; CHARTON, M.; PIGNOLET, O.; SILVESTRE, F.; VACA-GARCIA, C.; PONTALIER, P. Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 523-529, 2013.

SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, v. 3, p. 61-65, 2014.

SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content

of the microalgae *Spirulina platensis* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

SARI, Y. W.; BRUINS, M. E.; SANDERS, J. P. M. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 78-83, 2013.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC**, v. 4, p. 48-60, 2012.

SCHNEIDER, N.; GERBER, M.; Correlation between viscosity, temperature and total solid content of algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 293-302, 2014.

SCHWENZFEIER, A.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9121-9127, 2011.

SELLING, G. W.; HOJILLA-EVANGELISTA, M. P.; EVANGELISTA, R. L.; ISBELL, T.; PRICE, N.; DOLL, K. M. Extration of proteins from pennycress seeds and press cake. **Industrial Crops and Products**, v.41, p.113-119, 2013.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades-degradações-modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

SILVEIRA, S. T., BURKERT, J. F. M., COSTA, J. A V., BURKERT, C. A V., KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1629-1634, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217-224, 2005.

SOUZA, M. P.; BJERK, T. R.; GRESSLER, P. D.; SHNEIDER, R. C. S.; CORBELLINI, A.; MORAES, M. S. A. As microalgas como uma alternativa para a produção de biocombustíveis parte 1: Bioetanol. **Tecno-Lógica**, v.16, p.108-116, 2012.

SOUZA, F. T.; MARGARITES, A. C.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistema lipídico óleo de soja e azeite de oliva. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 275-279, 2006.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 1412-1416, 1967.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. Michigan: Freeman Press, 2 ed., 1996.

STOLZ, P.; OBERMAYER, B. Manufacturing microalgae for skin care. **Cosmetics & Toiletries**, v. 120, p. 99,106, 2005.

SU, C. H.; LIU, C. S.; YANG, P. C.; SYU, K. S.; CHIUH, C. C. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. **Separation and Purification Technology**, v. 123, p. 64-68, 2014.

SUREWICZ, W. K.; MANTSCH, H. H.; CHAPMEN, D. Determination of protein secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy: A critical assement. **Biochemistry**, v. 32, p. 389-394, 1993.

TANG, B.; BI, W.; TIAN, M.; ROW, K. H. Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants. **Journal of Chromatography B**, v. 904, p.1-21, 2012.

TIBBETTS, S. M.; MILLEY, J. E.; LALL, S. P. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p.1109-1119, 2014.

UGALDE, U. O.; CASTRILLO, J. I. Single cell proteins from fungi and yeasts. **Applied Mycology and Biotechnology**, v. 2, p. 123-149, 2002.

UMA SUGANYA, K. S.; GOVINDARAJU, K.; GANESH KUMAR, V.; STALIN DHAS, T.; KARTHICK, V.; SINGARAVELU, G.; ELANCHEZHIAN, M. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. **Materials Science and Engineering C**, v. 47, p. 351-356, 2015.

URSU, A. V.; MARCATI, A.; SAYD, T.; SANTE-LHOUTELLIER, V.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresourve Technology**, v. 157, p. 134-139, 2014.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. A. Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, p. 789-807, 2011.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, p. 161-169, 2008.

VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1336-1346, 2013.

VON DER WEID, D.; DILLON, J.C.; FALQUET, J. **Malnutrition: a silent massacre**. Geneve: Antenna Technology, 2000.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology.*** Taylor & Francis: London, 1997.

VONSHAK, A.; TOMASELLI, L. *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology.* In: *The Ecology of Cyanobacteria.* **Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda.** p. 505-522, 2000.

WANG, X.; ZHANG, X. Optimal extraction and hidrolisis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 307-313, 2012.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, p. 170-177, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); UNITED NATIONS UNIVERSITY (UNU). **Protein and amino acid requirements in human nutrition.** Geneva: WHO Press, 1998.

WU, X.; RUAN, R.; DU, Z.; LIU, Y. Current status and prospects of biodiesel production from microalgae. **Energies**, v. 5, p. 2667-2682, 2012.

XIE, Y.; JIN, Y.; ZENG, X.; CHEN, J.; LU, Y.; JING, K. Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycoyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 281-287, 2015.

XIN, H.; ZHANG, Y.; WANG, M.; LI, Z.; WANG, Z.; YU, P. Characterization of protein and carbohydrate mid-IR spectral features in crop residues. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 129, p. 565-571, 2014.

ZHANG, X.; JIAN, Z.; CHEN, L.; CHOU, A.; YAN, H.; ZUO, Y. Y.; ZHANG, X. Influence of cell properties on rheological characterization of microalgae suspensions. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 209-213, 2013.

ZHAO, G.; CHEN, X.; WANG, L.; ZHOU, S.; FENG, H.; CHEN, W. N.; LAU, R. Bioresource ultrasound assisted extration of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 337-344, 2013.

ZHU, L. D.; HILTUNEN, E.; ANTILA, E.; ZHONG, J. J.; YUAN, Z. H.; WANG, Z. M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 1035-1046, 2014.

ÇENGEL; Y. A.; CIMBALA, J. M. **Mecânica dos fluídos: Fundamentos e aplicações**. São Paulo: Gisélia Costa, 2006.