

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LARISSA DE OLIVEIRA BISPO

EFEITO DO pH, NaCl E TRATAMENTO ULTRASSÔNICO NA SOLUBILIDADE
DAS PROTEÍNAS DA MICROALGA *Spirulina platensis*

MEDIANEIRA
2019

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LARISSA DE OLIVEIRA BISPO

EFEITO DO pH, NaCl e TRATAMENTO ULTRASSÔNICO NA SOLUBILIDADE
DA PROTEÍNA DA MICROALGA *Spirulina platensis*

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentada à disciplina Trabalho de
Conclusão de Curso II da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná,
campus Medianeira.

Orientadora: Prof Dr^a Eliane Colla
Co-orientadora: Dr^a Daneysa Lahis
Kalschne

MEDIANEIRA
2019



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Medianeira
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Coordenação Engenharia de Alimentos

Larissa de Oliveira Bispo

**EFEITO DO pH, NaCl E TRATAMENTO ULTRASSÔNICO NA
SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DA MICROALGA *Spirulina platensis***

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado às 13:30 horas do dia 19 de junho de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro(a) de Alimentos, do Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Eliane Colla

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Daneysa Lahis Kalschne

Membro da Banca: Prof^a Dr^a. Cristiane Canan

Membro da Banca: Prof. Dr. Ilton José Baraldi

Aluna: Larissa de Oliveira Bispo

Medianeira, 19 de junho de 2019

“A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso”.

*“Eu me sentirei orgulhoso quando ouvir
você falar com sabedoria”*

(Eclesiastes 7:12)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido paciência, sabedoria, saúde e determinação para realizar este trabalho. Sou grata aos momentos bons e as dificuldades que me fizeram acreditar mais em mim e crescer.

Aos meus pais, Hamilton e Lucimar, e minha irmã Aline, que não mediram esforços para me apoiar durante esta caminhada.

Ao meu companheiro Maxwell, por toda força e companheirismo nos momentos difíceis em que precisei de amparo.

À UTFPR-MD, que permitiu meu desenvolvimento e crescimento intelectual, pessoal e profissional.

As minhas orientadoras profa. Dra. Eliane Colla e Dra. Daneysa Lahis Kalschne que não mediram esforços para a realização do meu trabalho. Foram pacientes, encorajadoras e sem dúvidas uma inspiração para mim. Obrigado por terem acreditado e confiado em minha capacidade. Sinto-me lisonjeada por ter sido orientada por vocês.

Aos demais professores da UTFPR, principalmente aos do departamento acadêmico de alimentos (DAALM), pelos ensinamentos e auxílio durante esses anos.

Aos amigos e colegas de laboratório, que me ajudaram do início ao fim, em especial a Laís, Tatiane, Ana Lúcia e Maria Luiza.

Muito obrigada.

RESUMO

BISPO, O. LARISSA. Efeito do pH, NaCl e tratamento ultrassônico na solubilidade da proteína da microalga *Spirulina platensis*. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus-Medianeira.

A microalga *Spirulina platensis* tem sido objeto de estudo por apresentar elevado percentual proteico, cerca de 50 a 70 % de seu peso, além de conter aminoácidos essenciais, vitaminas, sais minerais, pigmentos, ácidos graxos e outros compostos biologicamente ativos. Neste contexto, atualmente, a elevada concentração de proteínas da biomassa microalgal deve ser valorizada para a complementação da alimentação humana como fonte de proteínas, porém, diferentemente das propriedades nutricionais, as propriedades funcionais das proteínas de *Spirulina platensis* ainda não são bem conhecidas. A solubilidade é uma importante propriedade funcional das proteínas, interferindo diretamente em outras propriedades como a capacidade de emulsificação, formação de espuma e geleificação das proteínas. Assim, objetivou-se investigar os efeitos da aplicação de ondas ultrassônicas, do pH do meio e da concentração de NaCl sobre a solubilidade das proteínas de *Spirulina platensis*, pela aplicação de um planejamento experimental (Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com um total de 11 ensaios) onde as variáveis independentes foram a amplitude de potência (%) em banho de ultrassom, tempo de exposição ao tratamento (min), pH e concentração de NaCl do meio (mol.L^{-1}). A solubilidade foi determinada conforme Glória e Regitano-d'Arce (2000) e Morr et al. (1985), com modificações, o pH foi ajustado em 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10 para analisar as concentrações de proteínas das amostras, que foram determinados de acordo com Lowry et al. (1951). A análise dos efeitos das variáveis permitiu identificar que o pH foi a variável que apresentou maior efeito sobre a solubilidade, observando-se um acréscimo de 36% no pH 3 para 76% no pH 7. Já a concentração salina apresentou efeito significativo negativo ($p \leq 0,05$) na faixa estudada nos pHs 3, 7 e 9. Assim, observou-se que em menores concentrações salinas, a solubilidade proteica é melhorada. Ainda, analisando os efeitos do tratamento ultrassônico na solubilidade, a sonicação apresentou efeito significativo negativo ($p \leq 0,05$) na faixa estudada (40% a 100%) no pH 7. O ensaio realizado em pH 10, concentração de NaCl de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e amplitude do ultrassom de 40% foi a condição que apresentou o maior aumento na solubilidade em pH 7, alcançando 76% de proteínas solúveis.

Palavras-chave: Microalgas; propriedades funcionais; ondas ultrassônicas.

ABSTRACT

BISPO, O. LARISSA. Effect of pH, NaCl and ultrasonic treatment on the solubility of the protein of the microalga *Spirulina platensis*. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus-Medianeira.

The microalga *Spirulina platensis* has been studied because it presents high protein percentage, about 50 to 70% of its weight, besides containing essential amino acids, vitamins, minerals, pigments, fatty acids and other biologically active compounds. In this context, the high protein concentration of the microalgal biomass should now be considered for the complementation of human food as a protein source. However, unlike nutritional properties, the functional properties of *Spirulina platensis* proteins are not yet well known. Solubility is an important functional property of proteins, directly interfering with other properties such as the ability to emulsify, foaming and gelling proteins. The objective of this study was to investigate the effects of ultrasonic waves, the pH of the medium and NaCl concentration on the solubility of *Spirulina platensis* proteins by applying an experimental design (Fractional Factorial Planning 2^{4-1} with a total of 11), where the independent variables were the power amplitude (%) in ultrasonic bath, treatment exposure time (min), pH and NaCl concentration of the medium (mol.L^{-1}). Solubility was determined according to Glória and Regitano-d'Arce (2000) and Morr et al. (1985), with modifications, the pH was adjusted to 2, 3, 4, 6, 7, 9 and 10 to analyze the protein concentrations of the samples, which were determined according to Lowry et al. (1951). The analysis of the effects of the variables allowed to identify that the pH was the variable that showed the greatest effect on the solubility, observing an increase of 36% in pH 3 to 76% in pH 7. The saline concentration showed a significant negative effect ($p \leq 0.05$) in the range studied in pHs 3, 7 and 9. Thus, it was observed that in lower salt concentrations, the protein solubility is improved. Also, analyzing the effects of ultrasonic treatment on solubility, sonication had a significant negative effect ($p \leq 0.05$) in the studied range (40% to 100%) at pH 7. The assay performed at pH 10, NaCl concentration of 0,2 mol.L^{-1} and ultrasound amplitude of 40% was the condition that presented the greatest increase in solubility at pH 7, reaching 76% of soluble proteins

Keywords: Microalgae; functional property; ultrasonic waves.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão microscópica da microalga <i>Spirulina</i>	16
Figura 2 - Fluxograma do processo de condução dos ensaios do planejamento com a biomassa integral de <i>Spirulina platensis</i>	31
Figura 3 - Solubilidade em função do pH da biomassa integral de <i>Spirulina platensis</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de diferentes microalgas (%m/m).....	19
Tabela 2 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no Planejamento Facionário 2^{4-1}	29
Tabela 3 - Composição química da biomassa integral de <i>Spirulina platensis</i> (base seca).....	33
Tabela 4 - Matriz do Planejamento Fatorial Facionário 2^{4-1} com variáveis codificadas e reais e respostas para a solubilidade da proteína em pH 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10.....	35
Tabela 5 - Efeitos dos fatores estudados no Planejamento Fatorial Facionário 2^{4-1} sobre a variável solubilidade da proteína em pH 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10 (mg.mL^{-1}).....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 MICROALGA <i>Spirulina platensis</i>	16
4.1.1 Potencial da <i>Spirulina platensis</i> na alimentação humana	17
4.1.2 Composição química da <i>Spirulina platensis</i>	18
4.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS	20
4.2.1 Solubilidade	21
4.2.2 Influência da solubilidade sobre a funcionalidade tecnológica das proteínas.....	23
4.3 TRATAMENTO ULTRASSÔNICO	25
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 MATÉRIA PRIMA E REAGENTES	28
5.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	28
5.3 PROCESSO DE CONDUÇÃO DOS ENSAIOS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i>	29
5.4 SOLUBILIDADE DA BIOMASSA TRATADA DE <i>Spirulina platensis</i>	31
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA de <i>Spirulina platensis</i>	33
6.2 ANÁLISE DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO	34
6.3 PERFIL DE SOLUBILIDADE	40
7 CONCLUSÕES	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

As microalgas despertam grande interesse, tanto biológico, quanto ecológico e econômico em diversos países, inclusive no Brasil (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). São muitos os possíveis usos dos cultivos de microalgas, sendo que a biomassa produzida se destina às mais diversas aplicações, tais como na alimentação humana e animal na forma de suplementos alimentares e como fonte de matéria prima para a produção de biocombustíveis (KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2013; RODOLFI et al., 2009).

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. Apresentam efeitos benéficos à saúde humana através de atividades imunomoduladores, antioxidantes, anticancerígenas, antivirais e antibacterianas, ação contra diabetes, obesidades e desnutrição (WAN; WU; KUCA, 2016). A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria filamentosa 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 disso, possui alta concentração de vitaminas, ácidos graxos essenciais e minerais (COLLA; BERTOLIN; VIEIRA COSTA, 2004).

Através de seu alto conteúdo proteico, a *Spirulina platensis* torna-se uma fonte de grande interesse no fornecimento de nutrientes nos alimentos. As proteínas presentes na microalga apresentam aminoácidos essenciais, que são de grande importância para o bom funcionamento do corpo humano (CARVAJAL, 2009). No entanto, estes componentes são de difícil acesso e faz-se necessário utilizar metodologias para que se tornem disponíveis e possam ser melhor aproveitados na indústria alimentícia.

A qualidade de um produto alimentício e a aceitabilidade pelo consumidor apresentam uma ligação com as propriedades funcionais que as

proteínas possuem. Estas propriedades funcionais são características físico-químicas das proteínas, que exercem um efeito no comportamento ao longo do processamento até o seu consumo final, provocando um efeito positivo ou negativo nos atributos sensoriais e, conseqüentemente na qualidade do produto final (CARVAJAL, 2009). No entanto, as propriedades funcionais das proteínas de *Spirulina platensis* ainda não são amplamente conhecidas. Até o presente momento, os trabalhos que exploram tais propriedades são escassos.

De todas as propriedades funcionais das proteínas, a solubilidade é a mais complexa, uma vez que a maior parte dos desempenhos funcionais das proteínas apresentam relação com a sua capacidade de se hidratar e solubilizar em água (BENELHADJ et al., 2016). A solubilidade pode ser considerada como a primeira propriedade funcional, pois uma proteína com baixa solubilidade apresenta limitadas propriedades funcionais (WILDING et al., 1984).

A solubilidade das proteínas apresenta influência na qualidade dos alimentos com relação a turbidez e sedimentação, como por exemplo em bebidas proteicas, influencia também nas propriedades, emulsificação e gelificação, tornando-a uma propriedade funcional como requisito de grande importância para diversas aplicações em alimentos. O pH é um parâmetro que afeta diretamente na solubilidade, uma vez que em meios levemente ácidos apresentam uma baixa solubilidade, devido à perda de cargas em torno de seu ponto isoelétrico (GROSSMANN; HINRICHS; WEISS, 2019).

O tratamento ultrassônico é utilizado a muito tempo para estudar as propriedades físicas e funcionais que as proteínas apresentam (PAVLOVSKAYA; POVEY, 1992; OWEN; SIMONS, 1957). O ultrassom pode variar de baixa intensidade a alta intensidade, sendo que o de baixa intensidade vem sendo utilizado principalmente na caracterização das propriedades alimentares, bem como composição, estado físico e estrutura. Já o ultrassom de alta intensidade vem sendo utilizado no processamento de alimentos, no que diz respeito a alteração da viscosidade, desgaseificação de líquidos, geração de emulsão, inativação de microrganismos, ente outros (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho é avaliar o efeito do tratamento ultrassônico sobre a solubilidade das proteínas da microalga *Spirulina platensis*, determinando-se o efeito das variáveis pH e amplitude de potência do ultrassom por meio de um planejamento experimental.

2 JUSTIFICATIVA

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). Espécies de *Spirulina* têm sido utilizadas mundialmente na alimentação humana e animal, assim como na obtenção de aditivos utilizados em formas farmacêuticas e alimentos. Esta microalga é uma fonte rica em proteínas, vitaminas, aminoácidos essenciais, minerais, ácidos graxos poli-insaturados e outros nutrientes, sendo seu principal uso como suplemento alimentar. As propriedades nutricionais de *Spirulina* têm sido relacionadas com possíveis atividades terapêuticas, caracterizando o microrganismo no âmbito dos alimentos funcionais e nutracêuticos (AMBROSI et. al., 2008).

Devido a sua importância nutricional, a *Spirulina* pode ser adicionada a formulações de alimentos e contribuir beneficemente nas características tecnológicas em função de suas propriedades funcionais como solubilidade, propriedades espumantes, emulsificantes e geleificantes. A solubilidade é a medida mais prática de desnaturação e agregação de proteínas e, portanto, um bom índice de funcionalidade proteica, influenciando diretamente em todas as outras propriedades (BENELHADJ et al., 2016).

Algumas proteínas são difíceis de solubilizar por causa da sua natureza hidrofóbica, ou devido à presença de uma ligação dissulfeto entre moléculas de proteínas que induzem a diminuição da solubilidade da proteína. A utilização de sais, como por exemplo o NaCl, podem contribuir no aumento da solubilidade e na capacidade de absorção de água, provendo uma melhoria nas propriedades funcionais, isto pelo fato dos sais promoverem um auxílio na estabilização das proteínas por interações eletrostáticas (VAN HEKKEN e STRANGE, 1993).

O tratamento ultrassônico é uma tecnologia que permite solubilizar compostos em água de forma rápida e com menor gasto energético que vem ganhando espaço na indústria de alimentos, sendo utilizado em diversos

processos como por exemplo em extrações, alterações nas propriedades funcionais e na conservação dos alimentos. A energia ultrassônica em meio fluido leva a formação de pequenas bolhas, provocando agitação e melhorando a homogeneidade do meio. Esse movimento pode enfraquecer as interações proteicas e perturbar as estruturas quaternárias e terciárias da proteína (ZHOU et al, 2016).

Diante ao exposto, a junção de um tratamento ultrassônico com a utilização de sais, associados a parâmetros como amplitude de onda, pH e tempo de exposição, podem provocar melhorias nas propriedades funcionais das proteínas presentes na biomassa de *Spirulina platensis*, aumentando a solubilidade e conseqüentemente melhorando as demais propriedades funcionais, uma vez que a solubilidade é um fator limitante para o bom desempenho das mesmas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH, concentração de NaCl e do tratamento ultrassônico sobre a solubilidade das proteínas da biomassa da microalga *Spirulina platensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

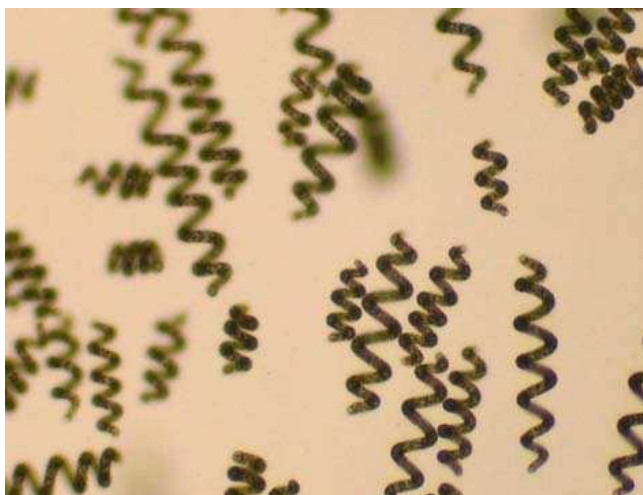
- a) Determinar a composição centesimal da biomassa de *Spirulina platensis* a ser utilizada nos ensaios;
- b) Aplicar um Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} para avaliar a influência das variáveis amplitude de potência (%), tempo de exposição ao tratamento ultrassônico (min), pH do meio e concentração de NaCl do meio (mol.L^{-1}), sobre a resposta de solubilidade das proteínas da microalga *Spirulina platensis*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MICROALGA *Spirulina platensis*

A *Arthrospira* (*Spirulina*) é um gênero de cianobactérias fotossintetizantes, pertencentes à ordem *Oscillatoriales*, da família *Cyanophyceae* (TORTORA et al., 2007). A *Spirulina* é uma alga verde-azulada, que se desenvolve em águas fortemente alcalinas, seu tamanho é microscópico, e possui forma filamentosa cilíndrica. Constituída por células de 2 a 8 μm de comprimento, que formam espiral, conforme apresentada na Figura 1, o que origina seu nome. É um microrganismo unicelular e descendente das primeiras formas fotossintéticas surgidas a aproximadamente 3 bilhões de anos, sem mudanças evolutivas (SHIMAMATSU, 2004). Este gênero *Spirulina* compreende a divisão das cianobactérias filamentosas com elevado teor de proteínas (DA COSTA MONTEIRO; LUCHESE; ABSHER, 2010).

Figura 1 - Visão microscópica da microalga *Spirulina*.



Fonte: KORU (2012).

Os primeiros relatos do uso da *Spirulina spp.* na alimentação datam da pré-história, a partir da informação de que tribos de caçadores que coletavam

massas gelatinosas de algas verde azulada e as consumiam cruas ou cozidas. Para enriquecer suas dietas, também consumiam algas filamentosas coletadas em lagos alcalinos, as quais eram classificadas no gênero *Spirulina* (RICHMOND, 1990). Outros relatos históricos são de povos que viveram nas regiões do Lago Chad na África e os astecas no Lago Texcoco no México que cultivavam *Spirulina platensis* nas águas desses lagos e usavam-na como alimento depois de seca (PIÑERO ESTRADA, 2001; SPOLAORE et al., 2006).

4.1.1 Potencial da *Spirulina platensis* na alimentação humana

A constante busca por alternativas alimentares que possam diminuir o déficit nutricional existente em uma parcela significativa da população, a um custo acessível, envolvem a pesquisa de novos processos e matérias-primas. Por outro lado, existem pesquisas inovadoras envolvendo a biotecnologia, por meio da utilização de microrganismos ou enzimas para a produção de novos produtos, inclusive alimentos (MULITERNO et al., 2005).

Nesse sentido, existe um crescente estudo no uso de microalgas na biotecnologia, uma vez que estas apresentam um metabolismo muito ativo e podem crescer sob condições simples e de baixo custo. O futuro do processo produtivo por meio do uso de microrganismos e de engenharia genética (tecnologia do DNA recombinante, engenharia metabólica, etc.) é praticamente ilimitado. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fontes de uma quantidade ilimitada de produtos como ácidos graxos poliinsaturados, corantes, enzimas, etc. (DERNER, 2006).

Atualmente as microalgas são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas em pó, na forma de tabletes, cápsulas ou extratos. Microalgas também são incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas, etc. Tanto como suplemento nutricional como corante natural (DERNER, 2006; YAMAGUCHI, 1997).

No Brasil, a legislação RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite a comercialização da *Spirulina* desde que o produto final (capsula, pó ou outros produtos no qual o microrganismo tenha sido adicionado) esteja devidamente registrado. Além de atender os requisitos de recomendação diária de consumo do produto que não deve resultar na ingestão de *Spirulina* acima de 1,6 g, que de acordo com Becker (2007), os fatores que limitam a ingestão da biomassa na alimentação humana é devido à presença da parede celular, a qual pode influenciar na digestibilidade e absorção, e ainda o alto conteúdo de ácidos nucleicos, cuja degradação leva à produção de ácido úrico, que pode precipitar e formar cristais de urato de sódio, resultando em extrema sensibilidade das articulações e à presença de sais que poderia resultar em uma sobrecarga renal. Além disso, deve apresentar as especificações do ingrediente, incluindo identificação da espécie da alga e seu local de cultivo, apresentar laudo de análise, utilizando metodologia reconhecida, do teor dos contaminantes inorgânicos em ppm: mercúrio, chumbo, cádmio e arsênio, e também utilizar como referência o Decreto nº. 55871/65, categoria “outros alimentos” para descrever os procedimentos de controle da qualidade do ingrediente e rotulagem (BRASIL, 2010).

Além de suplementação alimentar, um grande interesse na microalga de *Spirulina platensis* está na aplicação como corantes naturais. Quando purificadas, as ficobiliproteínas podem ser aplicadas como corante em alimentos (C-ficocianina) e cosméticos (C-ficocianina e R-ficoeritrina). A C-ficocianina oriunda de *Spirulina* é utilizada como corante natural em goma de mascar, produtos lácteos e geleias (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

4.1.2 Composição química da *Spirulina platensis*

Uma vez que as microalgas constituem um grupo extremamente diverso de organismos, esta diversidade também se reflete na sua composição bioquímica e, logo os fatores biológicos quanto químicos irão influenciar o

crescimento das microalgas, nesse contexto a composição bioquímica pode ser alterada significativamente pelas condições de cultivo das microalgas (SILVA, 2008). Verifica-se pela Tabela 1 a elevada quantidade de proteína de várias espécies de microalgas.

Tabela 1 - Composição química de diferentes microalgas (% m/m).

Microalgas	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-60	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 sp.</i>	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).

A *Spirulina spp.* apresenta elevado conteúdo proteico e é considerada uma das fontes mais ricas de pró-vitamina A (beta-caroteno) e de ferro absorvível, além de apresentar altos níveis de vitaminas e outros minerais, compostos fenólicos, ficocianina, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais (USDA., 2018). O conteúdo proteico da *Spirulina* atinge 50-60% do seu peso seco (BECKER, 2007). Estas proteínas apresentam excelente qualidade com um índice balanceado de aminoácidos essenciais. As proteínas presentes possuem digestibilidade de 70%. Entre os aminoácidos essenciais estão presentes a lisina, leucina, isoleucina, valina, treonina, histidina, fenilalanina, triptofano e metionina. E os não essenciais presentes na *Spirulina* estão: alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutâmico, glicina, histidina, prolina, serina e tirosina (SAFI et al., 2013).

Já os carboidratos presentes no gênero *Spirulina* podem variar de 15 a 20%, sendo a grande maioria representada por polissacarídeos (CHAIKLAHAN et al., 2013).

As vitaminas que podem estar presentes na *Spirulina* são a biotina, o ácido fólico, o inositol, as vitaminas do complexo B, além do ácido pantotênico e vitamina E. Além dos minerais potássio, cálcio, cobre, magnésio, manganês, fósforo, sódio e zinco, os ácidos graxos poli-insaturados presentes são principalmente, os ácidos palmítico, linoleico, oleico e, especialmente, os ácidos essenciais alfa-linolênico e gama-linolênico, correspondendo estes últimos uma parcela de até 30% de todos ácidos graxos presentes, podendo variar suas concentrações de acordo com as condições de cultivo e no que se diz respeito a fonte de nitrogênio (CHU et al., 2010; COLLA; BERTOLIN; VIEIRA COSTA, 2004; SILVA, 2008).

4.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS

As principais fontes de proteínas consumidas pelos seres humanos são provenientes de duas fontes: animais e vegetais, sendo as raízes, cereais e tubérculos as principais fontes vegetais mais encontradas. Nesse contexto, há uma terceira fonte de proteína classificada como não-convencional que engloba proteínas provenientes de microrganismos como bactérias, leveduras e algas (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Em termos de nutrientes as proteínas exercem um importante efeito no fornecimento dos aminoácidos essenciais, onde a sua falta pode provocar alterações bioquímicas, fisiológicas e diminuição acentuada na síntese proteica (TIRAPEGUI, 2002).

Segundo Sgarbieri (1996), as propriedades funcionais têm sido definidas como qualquer propriedade dos alimentos ou de seus componentes, excetuando-se as nutricionais, que influencie a sua aceitação e utilização. Essas propriedades afetam as características nutritivas e sensoriais dos produtos, além de ter um importante papel físico na preparação, processamento ou estocagem dos alimentos. As propriedades dos componentes alimentares estão relacionadas com: capacidade de hidratação, propriedades relacionadas com

tamanho e forma e propriedades de superfície das moléculas (SEIBEL; BELÉIA, 2009).

As propriedades funcionais das proteínas que mais se destacam são a solubilidade, gelificação, propriedades espumantes e emulsificantes, capacidade de absorção de água e de óleo (KINSELLA; MELACHOURIS, 1976; SGARBIERI, 1996). Dentre todas, a solubilidade é a mais complexa, uma vez que a maior parte dos desempenhos funcionais das proteínas apresentam relação com a sua capacidade de se hidratar e solubilizar em água (BENELHADJ et al., 2016).

4.2.1 Solubilidade

A capacidade de uma proteína ser dispersa em uma fase aquosa é uma propriedade funcional essencial. A solubilidade indica quão bem a proteína pode interagir com outros componentes presentes e ainda permanecer em solução, influenciando diretamente a qualidade dos alimentos (por exemplo, bebidas contendo proteína) em termos de turbidez e sedimentação, além disso, é fator primordial para que as proteínas exibam características gelatinizantes, espumantes e emulsificantes e, portanto, uma diminuição na solubilidade proteica afetará negativamente a sua funcionalidade. Assim, o conhecimento detalhado sobre a solubilidade proteica é importante para o sucesso da formulação de novos alimentos com ingredientes inovadores, como os obtidos através de proteínas extraídas de microalgas (NAKAI; LI-CHAN, 1985; VOJDANI, 1996; GROSSMANN et al., 2019).

Em geral, as proteínas exibem uma solubilidade mínima na água próximo ao seu ponto isoelétrico (no caso da *Spirulina platensis* em pH 3,0), onde as interações de atração proteína-proteína são favorecidas devido à falta de forças de repulsão eletrostática (CHRONAKIS et al., 2000; GROSSMANN et al., 2019).

A composição química da microalga, suas características morfológicas e estruturais, também influenciam na eficiência da solubilização proteica, podendo a solubilidade das proteínas aumentar em meio alcalino (ara et al., 2014). Além disso, o NaCl tem sido empregado extensivamente pelas indústrias alimentícias, visando o aumento da absorção de água e da solubilidade proteica, melhorando as propriedades funcionais dos alimentos (VAN HEKKEN e STRANGE, 1993).

A natureza e a concentração de íons exercem efeitos significativos sobre a absorção de água e a solubilidade das proteínas. Em baixas concentrações, sais podem estabilizar proteínas através de interações eletrostáticas não específicas, dependentes apenas da força iônica do meio. Assim, concentrações salinas compreendidas entre 0,5 e 1 mol.L⁻¹ (para os sais neutros), podem elevar a solubilidade da proteína (efeito "*salting in*") devido ao aumento da solvatação. Por outro lado, quando os níveis de sais são maiores, predominam as interações água-sal, em detrimento das interações água-proteína (efeito "*salting out*"). Uma maior interação proteína-proteína ocorre e se torna mais forte que a interação proteína-água, resultando na agregação da molécula proteica seguida de sua precipitação (desidratação por ação salina), contribuindo para uma diminuição da solubilidade proteica. Portanto, em um sistema de três componentes, como proteína-água-sal, o conhecimento das interações preferenciais das proteínas com os componentes do solvente pode dar uma visão na maneira pela qual os aditivos afetam a solubilidade e a estabilidade de proteínas (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1984; CHEFTEL et al., 1989; SILVA et al., 2009).

A diminuição da solubilidade é verificada em virtude do aumento da força iônica da solução, quando consideramos que a hidratação estabiliza os íons em solução. O aumento da concentração de sal atua para reduzir a quantidade de moléculas de água disponíveis e, portanto, a solubilidade proteica é sensível a alterações na força iônica do meio (CHANG, 2008).

Chronakis (2001), observou que a presença de íons divalentes (CaCl₂ 0,02 mol.L⁻¹) aumentou a turbidez e a absorbância da solução de proteína da

Spirulina, provavelmente devido à diminuição da solubilidade da proteína e, portanto, devido a formação de precipitados.

4.2.2 Influência da solubilidade sobre a funcionalidade tecnológica das proteínas

A solubilidade representa uma importante propriedade funcional das proteínas, interferindo diretamente em outras propriedades como a capacidade de emulsificação, formação de espuma e geleificação das proteínas.

Devido à instabilidade das emulsões é necessário a utilização de emulsificantes, de modo a se obter emulsões estáveis. As proteínas são comumente utilizadas pela indústria de alimentos devido as suas propriedades de emulsificação (DICKINSON; STAINSBY, 1988; GUPTA et al., 2016). Possuem tanto afinidade pela fase aquosa como afinidade para a fase oleosa, característica que ocasiona uma redução da tensão superficial entre estas duas fases, formando filmes interfaciais mais ou menos coesos. Assim, a capacidade emulsionante de uma proteína é definida como a quantidade máxima de óleo que pode ser dispersa por unidade de fase aquosa, para uma determinada quantidade de proteína, sob condições experimentais controladas (PHILLIP et al., 1994; LAM; NICKERSON, 2013) e portanto, quanto maior a solubilidade das proteínas na fase dispersa, maior a eficiência da emulsificação (SIKORSKI, 2001).

A espuma é um importante critério de qualidade de muitos produtos alimentares, visto que é responsável por proporcionar uma textura desejável nos alimentos (SIKORSKI, 2001). A capacidade espumante de uma proteína refere-se à expansão de volume da dispersão proteica com a incorporação de ar por batimento, agitação ou aeração, estando a estabilidade e a força da espuma dependentes da flexibilidade e da força mecânica do filme proteico. É uma propriedade funcional de interface que além de depender da solubilidade do

meio, depende da natureza da proteína, do estado de desnaturação da proteína, e da presença de sais e de outros aditivos utilizados no processamento dos alimentos. A propriedade de formar espuma é usualmente representada por dois parâmetros, espumabilidade e estabilidade da espuma. A estabilidade da espuma diz respeito a retenção de volume máximo de espuma formada em função do tempo em repouso, sendo geralmente medida pela liberação de fluido da espuma (SGARBIERI, 1996; CLARKSON et al., 2000; SIKORSKI, 2001).

A gelificação é outra propriedade funcional importante das proteínas. É utilizada para formar géis sólidos viscoelásticos, além de melhorar a absorção da água, o efeito espessante, a fixação de partículas, e estabilizar emulsões e espumas. Estudos mostraram que condições específicas, como a concentração de proteínas, o pH, a força iônica, presença de agentes redutores, desnaturantes e solventes miscíveis com água, têm profunda influência na natureza da gelificação (CHRONAKIS, 2001).

Neste contexto, conclui-se que os atributos sensoriais dos alimentos podem ser afetados pelas proteínas dos alimentos, mais especificamente pelas suas propriedades funcionais, porém, diferentemente das propriedades nutricionais, as propriedades funcionais das proteínas de *Spirulina platensis* ainda não são bem conhecidas. Até o presente momento, poucos são os trabalhos encontrados a respeito destas propriedades, principalmente no que diz a respeito à solubilidade, já que este índice constitui uma propriedade funcional importante, pois, relaciona-se diretamente com outras características funcionais. Ainda, as características de solubilidade servem como índice para a otimização dos efeitos de processos, indicando as vantagens e desvantagens, sendo utilizada como guia para se conhecer a funcionalidade da proteína.

Nirmala, Prakash e Venkararaman (1992), destacam que a solubilidade máxima de proteínas de *Spirulina platensis* ocorre em intervalos de pH entre 8 a 10. Recentemente, Benelhadj et al. (2016) avaliaram o isolado proteico de *Spirulina platensis* e também verificaram uma maior solubilidade em pH 10,0. Já 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,

observaram que a capacidade de formação de espuma também é dependente do pH, sendo que o valor máximo desta propriedade ocorreu em pH 10, resultante do aumento da carga de líquida de proteínas, reduzindo as interações hidrofóbicas permitindo uma maior flexibilidade da proteína.

Já Chronakis (2001) menciona que viscosidades menores foram observadas para o concentrado proteico obtido a partir de *Spirulina platensis* dissolvidas em pH 9 devido ao aumento da solubilidade proteica, e que o isolado de proteína de *Spirulina* possui boas propriedades de gelificação durante o aquecimento a 90°C, subsequente ao resfriamento em temperatura ambiente, o que proporciona o aumento na rede elástica do gel.

Recentemente, Lupatini (2016) observou 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 da biomassa de *Spirulina platensis*. A concentração de concentrado proteico também interferiu no desempenho destas propriedades com melhores resultados em maiores níveis de concentração, exceto para a capacidade de absorção de água e de óleo. Ainda, concluiu 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.

Evidentemente, essas propriedades funcionais são importantes do ponto de vista tecnológico, uma vez que as proteínas da *Spirulina platensis* podem ser utilizadas como ingredientes alimentares, contribuindo para o processamento e características funcionais dos alimentos (LUPATINI et al., 2017).

4.3 TRATAMENTO ULTRASSÔNICO

O tratamento ultrassônico é uma tecnologia chave nos processos das indústrias químicas e de alimentos. É um procedimento considerado “verde” e sustentável, de alta reprodutibilidade, com reduzida utilização de solventes – se comparado a outros processos – o que conseqüentemente elimina o pós-tratamento de águas residuais (CHEMAT et al., 2017).

No processamento de alimentos, o tratamento ultrassônico pode ser de alta frequência e de baixa frequência. O de baixa frequência é utilizado para a caracterização dos alimentos, já o de alta frequência é o mais amplamente utilizado, como por exemplo na modificação de propriedades como solubilidade, emulsão, viscosidade, na ruptura celular, polimerização, inativação de microrganismos, entre outros mais (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). O ultrassom de alta intensidade provoca alterações na estrutura das proteínas, de tal forma que partes hidrofílicas de aminoácidos vão em direção a água, promovendo um aumento da solubilidade das proteínas (MOREL et al., 2000; MOULTON; WANG, 1982).

O processo de ultrassom utiliza conceitos de cavitação e transmissão acústica e podem ser do tipo banho e de sonda. O mecanismo de cavitação é a produção de pequenas bolhas que se expandem e contraem ao longo do processo, tornando-se instáveis explodindo de forma violenta, e com essa explosão ondas de choque são enviadas promovendo o rompimento das células. Já a transmissão acústica é a facilidade de mistura dentro da solução (LEE et al., 2010). O banho de ultrassom funciona através de transdutores localizados no fundo do equipamento, que podem variar de tamanho de forma do equipamento, no qual gera-se ondas ultrassônicas (BRANDALIZE, 2014).

Jambrak et al. (2008) avaliaram o efeito do banho ultrassônico nas propriedades funcionais, solubilidade e espuma de amostra de *whey protein* isolado, concentrado e hidrolisado em duas frequências 40 kHz E 500 kHz durante 15 e 30 minutos, e obtiveram que o maior impacto ocasionado foi com a frequência de 40 kHz durante 15 minutos, no qual aumentou a solubilidade em cerca de 84% para o *whey* isolado, 94% para o *whey* concentrado e 82% para o *whey* hidrolisado.

Os estudos do efeito do banho ultrassônico nas propriedades funcionais, visando o aumento da solubilidade das proteínas da *Spirulina platensis*, são escassos. Logo, explorar estas alternativas com o objetivo de melhoria da solubilidade e outras propriedades funcionais pode promover vantagens à indústria alimentícia, uma vez que aumenta os benefícios da microalga e a sua utilização em produtos alimentares.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATRIA PRIMA E REAGENTES

A biomassa inativa de microalga *Spirulina platensis* foi adquirida em uma loja de produtos naturais localizada na cidade de Medianeira – PR. Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica sendo de procedências comerciais distintas.

5.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A biomassa de *Spirulina platensis* foi submetida às análises de composição centesimal descritas abaixo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

- 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);
- Percentual de umidade (Método 925.45b) de acordo com os procedimentos e normas da AOAC (1998);
- Cinzas (Método 923.03) de acordo com os procedimentos e normas da AOAC (1998);
- Extrato etéreo (Método 920.39) de acordo com os procedimentos e normas da AOAC (1998);
- Teor de carboidratos totais foi obtido por diferença conforme a Equação 2.

$$\%Carb. = 100 - (\%Proteínas + \%Lipídeos + \%Cinzas). \quad (2)$$

5.3 PROCESSO DE CONDUÇÃO DOS ENSAIOS DA BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

Para verificação dos efeitos significativos quanto a solubilidade de proteínas da biomassa de *Spirulina platensis*, foi aplicado um tratamento ultrassônico em equipamento do tipo banho, aliado a uma estratégia sequencial de planejamento experimental. Foi realizado um planejamento fracionário 2^{4-1} (3 pontos centrais, total de 11 ensaios), para avaliação do efeito de 4 variáveis na solubilidade proteica da biomassa de *Spirulina platensis*, a citar: amplitude de potência (%), tempo de exposição ao tratamento (min), pH do meio e concentração de NaCl do meio (mol.L^{-1}). Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fracionário, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no Planejamento Fracionário 2^{4-1} .

Variáveis / Níveis	Amplitude (%)	pH	Tempo de exposição ao tratamento (min)	Concentração de NaCl do meio (mol.L^{-1})
-1	40	2	10	0,2
0	70	6	35	0,6
+1	100	10	60	1,0

Fonte: Autoria própria (2019).

Os ensaios foram conduzidos em béqueres de 600 mL. O procedimento foi iniciado pela suspensão da biomassa em solução de NaCl com concentração de acordo com os níveis propostos no planejamento (Tabela 2), e o ajuste do pH da suspensão com solução de HCl ou NaOH $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, também de acordo com os níveis propostos na matriz do planejamento fracionário (Tabela 2). A razão biomassa/água para a realização dos ensaios foi definida em 30 g.L^{-1} de acordo com Lupatini et al. (2016). Para a variável pH, variou-se desde um meio ácido a

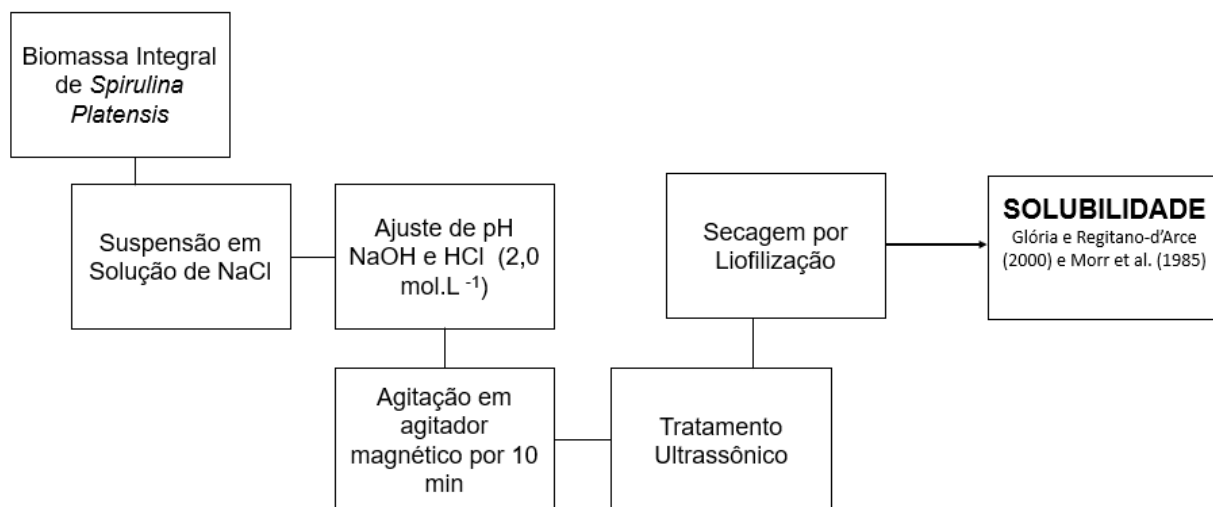
um perto da neutralidade e alcalino, apresentados na Tabela 2, com o objetivo de analisar qual o efeito desta variável no aumento da solubilidade das proteínas. Para a variável amplitude do tratamento ultrassônico, os níveis estudados foram escolhidos de acordo com as faixas de trabalho do equipamento (40% a 100%). Já para a variável tempo de exposição ao tratamento ultrassônico, Marín et al. (2017) descreveram o efeito da cavitação com a sonda ultrassônica rápido e intenso, devido a formação de bolhas que causam elevados picos de temperatura e micro-jatos extremamente rápidos criando alta dispersão de energia mecânica. Assim, foram escolhidos os níveis a serem estudados na faixa de tempo de minutos com base nos trabalhos de Braga et al. (2014) e Chandrapala et al. (2011). A suspensão foi submetida a agitação magnética (Fisatom, 752A, São Paulo, Brasil) por 10 minutos e sequencialmente realizada a exposição ao tratamento ultrassônico em equipamento do tipo banho (Elmasonic, P60H, Alemanha) na frequência de 37 kHz, pelo tempo, e amplitude propostos na Tabela 2. A temperatura do tratamento ultrassônico foi fixada em 30°C.

Após o tratamento ultrassônico, o volume dos ensaios foi congelado a -22°C e submetido 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.

A realização do PFF permitiu selecionar as variáveis estatisticamente significativas do processo de solubilização das proteínas da biomassa de *Spirulina platensis*.

Paralelamente aos ensaios do planejamento foi realizado um tratamento controle (biomassa integral da *Spirulina platensis* dispersa em água destilada na mesma razão biomassa/água dos ensaios, não submetida a ajuste de pH) para fins de comparação. A Figura 3 apresenta o fluxograma do processo de condução dos ensaios do planejamento com a biomassa integral de *Spirulina platensis*.

Figura 2 - Fluxograma do processo de condução dos ensaios do planejamento com a biomassa integral de *Spirulina platensis*.



Fonte: Autoria própria (2019).

5.4 SOLUBILIDADE DA BIOMASSA TRATADA DE *Spirulina platensis*

A solubilidade foi determinada conforme Glória e Regitano-d'Arce (2000) e Morr et al. (1985), com modificações. Foram dispersos 0,2 g da amostra liofilizada 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, 6, 7, 9 e 10, adicionando-se HCl 2,0 mol.L⁻¹ ou NaOH 2,0 mol.L⁻¹. Posteriormente, as amostras foram transferidas para tubos graduados tipo Falcon de 50 mL e centrifugadas 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 e centrifugação. As concentrações de proteínas dos sobrenadantes obtidos durante a centrifugação e da amostra 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 650 nm. Os resultados foram expressos mg mL⁻¹ para os ensaios do planejamento e pelo percentual de proteínas solúveis (PS) contido nas amostras (Equação 1) para a construção dos gráficos de solubilidade.

$$PS (\%) = \frac{\text{Proteína solúvel no sobrenadante (g . 100 g}^{-1})}{\text{Proteína total na biomassa (g . 100 g}^{-1})} \times 100 \quad (1)$$

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de todos os ensaios do planejamento foram analisados 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).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

A composição centesimal (base seca) da biomassa integral de *Spirulina platensis* está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição química da biomassa integral de *Spirulina platensis* (base seca).

Parâmetros	Biomassa Integral*
Proteínas (g 100 g ⁻¹)	59,50 ± 0,76
Lipídeos (g 100 g ⁻¹)	6,68 ± 0,25
Cinzas (g 100 g ⁻¹)	8,70 ± 0,02
Carboidratos Totais (g 100 g ⁻¹) ^a	25,13 ± 0,70

*Médias ± erro padrão;

^aCarboidratos totais obtido por diferença.

Fonte: Autoria própria (2019).

Segundo Becker (2007) a composição centesimal da microalga *Spirulina platensis* pode ter uma variação no teor de proteínas entre 46 a 63 g 100 g⁻¹, para o teor de carboidratos essa variação pode ser de 8 a 14 g 100 g⁻¹, e de 4 a 9 g 100 g⁻¹ no teor de lipídios, sendo o restante composto por minerais, umidade e fibras, quando cultivada em meios repletos de nutriente. Ainda, de acordo com Habib et al. (2008) a biomassa de *Spirulina* em base seca, apresentou 67,70 g 100 g⁻¹ de proteína, 4,16 g 100 g⁻¹ de lipídios e 3,13 g 100 g⁻¹ de cinzas. 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 proteínas de 55,8 g 100 g⁻¹, 14,2 g 100 g⁻¹ de lipídios, 22,2 g 100 g⁻¹ de carboidratos e 7,8 g 100 g⁻¹ de cinzas. Peron (2016), analisou a composição química da biomassa desengordurada de *Spirulina platensis* e encontrou percentuais de 65,76 g 100 g⁻¹ de proteínas, 0,92 g 100 g⁻¹ de lipídios, 9,26 g 100 g⁻¹ de cinzas e 24,06 g 100 g⁻¹ de carboidratos totais.

Torna-se importante ressaltar que dependendo do meio de cultivo, podem ocorrer variações nos percentuais nos principais componentes das microalgas, em destaque no teor de proteínas e carboidratos (COLLA et al., 2007).

6.2 ANÁLISE DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas e a resposta de solubilidade, está apresentada na Tabela 4. De uma maneira geral, o ensaio controle teve solubilidade inferior em todos os pHs avaliados (2, 3, 4, 6, 7, 9, 10) comparando-se com os ensaios do planejamento. Dentre os ensaios, os menores valores da resposta de solubilidade foram no ensaio 3, em pH 2, o qual se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas de *Spirulina platensis*, que varia de 2,8 a 3,5 (CHRONAKIS et al., 2000). Desta forma, observa-se que as maiores solubilidades proteicas foram obtidas na faixa de pH alcalino (9 e 10) (ensaio 2, 4, 6 e 8), variando de 0,84 a 1,09 mg mL⁻¹ para o pH 2, de 0,93 a 1,82 mg.mL⁻¹ para o pH 9, e de 0,92 a 1,87mg mL⁻¹ para o pH 10.

Os pontos centrais apresentaram uma pequena variação, indicando uma boa repetibilidade do processo.

Tabela 4 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com variáveis codificadas e reais e respostas para a solubilidade da proteína em pH 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10.

Ensaio	pH	Concentração salina (mol L ⁻¹)	Amplitude no ultrassom (%)	Tempo no ultrassom (min)	Solubilidade (mg.mL ⁻¹)						
					pH 2	pH 3	pH 4	pH 6	pH 7	pH 9	pH 10
1	-1 (2,0)	-1 (0,2)	-1 (40)	-1 (10)	1,04±0,19	0,99±0,13	0,37±0,02	0,62±0,07	0,74±0,02	0,81±0,01	1,17±0,13
2	1 (10,0)	-1 (0,2)	-1 (40)	1 (60)	1,02±0,05	0,97±0,13	1,43±0,02	1,54±0,04	2,05±0,19	1,82±0,10	1,25±0,14
3	-1 (2,0)	1 (1,0)	-1 (40)	1 (60)	0,09±0,01	0,10±0,00	0,22±0,06	0,30±0,03	0,37±0,07	0,44±0,01	0,93±0,12
4	1 (10,0)	1 (1,0)	-1 (40)	-1 (10)	0,84±0,03	0,48±0,03	0,89±0,06	1,10±0,18	1,13±0,06	1,32±0,07	0,92±0,11
5	-1 (2,0)	-1 (0,2)	1 (100)	1 (60)	0,50±0,07	0,52±0,02	0,44±0,01	0,50±0,06	0,48±0,07	0,64±0,06	0,86±0,13
6	1 (10,0)	-1 (0,2)	1 (100)	-1 (10)	0,91±0,09	1,00±0,12	1,13±0,13	1,47±0,14	1,45±0,20	1,61±0,02	1,87±0,10
7	-1 (2,0)	1 (1,0)	1 (100)	-1 (10)	0,45±0,06	0,07±0,00	0,74±0,03	0,38±0,03	0,04±0,01	0,44±0,05	0,61±0,00
8	1 (10,0)	1 (1,0)	1 (100)	1 (60)	1,09±0,14	0,87±0,08	1,02±0,05	1,53±0,09	1,00±0,07	0,93±0,06	1,05±0,19
9	0 (6,0)	0 (0,6)	0 (70)	0 (35)	0,91±0,07	0,40±0,04	0,89±0,05	1,11±0,06	0,98±0,07	1,47±0,17	1,01±0,03
10	0 (6,0)	0 (0,6)	0 (70)	0 (35)	0,66±0,05	0,66±0,07	0,74±0,02	1,21±0,07	1,02±0,05	1,29±0,01	1,35±0,09
11	0 (6,0)	0 (0,6)	0 (70)	0 (35)	0,92±0,06	0,36±0,02	0,64±0,04	1,08±0,08	0,69±0,02	0,97±0,11	1,05±0,10
C1	-	-	-	-	0,11±0,05	0,40±0,03	0,32±0,01	0,56±0,05	0,36±0,03	1,15±0,18	0,82±0,20

C1: controle biomassa integral; ± erro padrão

Fonte: Autoria própria (2019).

Analisando-se os resultados da Tabela 4, foi possível calcular os efeitos das quatro variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 5. Verificou-se que as variáveis pH, concentração de NaCl e amplitude do ultrassom apresentaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$) sobre a resposta de solubilidade em alguns pHs, sendo que para a variável tempo de exposição ao tratamento ultrassônico, observou-se que não houve interferência significativa na faixa estudada em nenhum dos pHs (2, 3, 4, 6, 7, 9, 10).

Para a resposta de solubilidade proteica em pH 2, 3 e 4, observou-se que o pH do meio demonstrou efeito positivo significativo ($p \leq 0,05$) na faixa estudada. Nos pH 2, 3 e 4 a solubilidade foi mínima, pois este se aproxima do ponto isoelétrico da proteína (DAMODARAN et al, 2010), que varia de 2,8 a 3,5 nas proteínas de *Spirulina platensis* (CHRONAKIS et al., 2000). De forma similar, Chen et al., (2019) ao estudar as propriedades funcionais do isolado proteico da *Spirulina platensis*, observou solubilidade mínima próximo ao ponto isoelétrico. Isso está associado à falta de repulsão eletrostática no ponto isoelétrico, que ocorre devido a densidade de carga negativa e da carga positiva serem equivalentes, logo a carga líquida total é neutra (DAMODARAN et al, 2010; CHEN, et al., 2019). Ainda, as proteínas são menos hidratadas no seu ponto isoelétrico, no qual o aumento das interações proteína-proteína resulta em uma interação mínima com a água (DAMODARAN et al, 2010). Portanto, a utilização do pH no nível superior dentro da faixa estudada (10) promoveu uma modificação no equilíbrio da carga líquida dos grupamentos da proteína, deslocando o equilíbrio e permitindo a maior ocorrência de interações proteína-água, resultando em acréscimo na solubilidade.

Tabela 5 - Efeitos dos fatores estudados no Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹ sobre a variável solubilidade da proteína em pH 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10 (mg.mL⁻¹).

	Fator	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
<i>pH 2,0</i>	Média	0,77	0,08	9,90	0,000*
	pH	0,45	0,18	2,46	0,049*
	Conc. NaCl	-0,25	0,18	-1,38	0,217
	Amplitude US	-0,01	0,18	-0,06	0,956
	Tempo US	-0,13	0,18	-0,74	0,488
<i>pH 3,0</i>	Média	0,58	0,07	8,05	0,000*
	pH	0,41	0,17	2,42	0,052*
	Conc. NaCl	-0,49	0,17	-2,88	0,028*
	Amplitude US	-0,02	0,17	-0,10	0,921
	Tempo US	-0,02	0,17	-0,11	0,916
<i>pH 4,0</i>	Média	0,77	0,07	11,68	0,000*
	pH	0,68	0,16	4,35	0,005*
	Conc. NaCl	-0,12	0,16	-0,79	0,458
	Amplitude US	0,11	0,16	0,68	0,520
	Tempo US	-0,00	0,16	-0,03	0,976
<i>pH 6,0</i>	Média	0,99	0,05	18,72	0,000*
	pH	0,96	0,12	7,79	0,000*
	Conc. NaCl	-0,20	0,12	-1,64	0,151
	Amplitude US	0,08	0,12	0,63	0,550
	Tempo US	0,07	0,12	0,61	0,567
<i>pH 7,0</i>	Média	0,91	0,04	20,63	0,000*
	pH	1,00	0,10	9,70	0,000*
	Conc. NaCl	-0,54	0,10	-5,29	0,002*
	Amplitude US	-0,33	0,10	-3,23	0,018*
	Tempo US	0,14	0,10	1,33	0,232
<i>pH 9,0</i>	Média	1,07	0,07	15,14	0,000*
	pH	0,84	0,17	5,07	0,002*
	Conc. NaCl	-0,44	0,17	-2,66	0,038*
	Amplitude US	-0,19	0,17	-1,14	0,297
	Tempo US	-0,09	0,17	-0,54	0,608
<i>pH 10,0</i>	Média	1,10	0,08	14,14	0,000*
	pH	0,38	0,18	2,08	0,083
	Conc. NaCl	-0,41	0,18	-2,27	0,064
	Amplitude US	0,03	0,18	0,16	0,875
	Tempo US	-0,12	0,18	-0,64	0,548

* $p \leq 0,05$.

Fonte: Autoria própria (2019).

De forma adicional, para a solubilidade em pH 3, a variável concentração de NaCl apresentou efeito significativo negativo ($p \leq 0,05$), assim o acréscimo da concentração salina reduziu as interações proteína-água, portanto, a solubilidade proteica diminuiu com o aumento da força iônica do meio (CHANG, 2008).

Para a solubilidade em pH 7 e 9, o pH teve efeito significativo ($p \leq 0,05$) e a variável concentração de NaCl apresentou efeito significativo negativo ($p \leq 0,05$). Assim ao passar do nível -1 para o +1 da variável pH e do nível +1 para o -1 da variável concentração de NaCl observou-se um aumento na solubilidade das proteínas da *Spirulina platensis* no pH 7 e 9. Assim como observado para a solubilidade nos pHs ácidos, o pH do meio no nível superior (10) promoveu um maior número de interações proteína-água e, ao testar a solubilidade em pH neutro ou alcalino (7, 9 e 10) foram observados os maiores valores de solubilidade da proteína da *Spirulina platensis*. De forma adicional, Damodaran et al. (2010) explicam que os sais em baixas concentrações afetam a estabilidade das proteínas, visto que os íons interagem com proteínas por meio de interações eletrostáticas não específicas. A neutralização eletrostática das cargas proteicas costuma estabilizar a estrutura da proteína. A neutralização completa da carga por íons pode ocorrer em $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de força iônica ou abaixo, independente da natureza do sal. Entretanto, em maiores concentrações, os sais têm efeitos iônicos específicos que influenciam a estabilidade estrutural das proteínas (DAMODARAN et al, 2010).

Adicionalmente, a solubilidade em pH 7 sofreu efeito negativo da variável amplitude do tratamento ultrassônico dentro da faixa estudada ($p \leq 0,05$). O efeito da amplitude do ultrassom foi unicamente observado em pH 7; acredita-se que devido ao equilíbrio de grupos H^+ e OH^- - característico do pH neutro - o efeito do ultrassom tenha se mostrado mais importante na modificação da estrutura tridimensional da proteína, permitindo que mais grupamento dos aminoácidos da proteína interagissem com a água e aumentassem a solubilidade. No presente estudo, um aumento na amplitude do ultrassom reduziu a solubilidade da proteína, logo uma amplitude menor, de 40%, promoveu um

aumento na solubilidade proteica em pH 7. Conforme Cárcel et al., (2012), na cavitação instável ou transiente, as bolhas oscilam entre os estados de compressão/rarefação até ocorrer a sua implosão, gerando um aumento de pressão e temperatura localizada e a produção de microjatos que apresentam energia suficiente para desintegrar células e desnaturar proteínas. A desnaturação proteica promove alterações importantes nas estruturas secundária, terciária e quaternária, sem clivagem das ligações peptídicas da cadeia principal (estrutura primária). A desnaturação, altera o estado inicial definido de uma proteína, transformando em uma estrutura final, e no caso de proteínas alimentares geralmente a desnaturação provoca perda de solubilidade (DAMODARAN et al, 2010), corroborando com os resultados obtidos. Entretanto, assim como observado neste trabalho, Jambrak et al. (2008), empregando ondas ultrassônicas para alterar as propriedades funcionais de *Whey protein*, observaram um acréscimo significativo no percentual de solubilidade (de 66,8% a 85%) utilizando ondas de baixas intensidades.

Para a resposta de solubilidade em pH 10, nenhuma das variáveis estudadas foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Assim como o efeito positivo causado pela variável pH no nível +1 (pH 10) nos testes de solubilidade para os demais valores de pH (2, 3, 4, 6, 7 e 9), verificou-se que em pH 10 a solubilidade foi aumentada, e somente o meio alcalino no qual o teste de solubilidade foi realizado já foi suficiente por promover interações proteína-água mais numerosas, a ponto de aumentar consideravelmente a solubilidade da proteína da *Spirulina platensis*; este comportamento também foi evidenciado na amostra controle. Entretanto, reitera-se que o estudo em pH 10 tem efeitos comparativos com os demais pHs, mas é inviável do ponto de vista da aplicação em alimentos, uma vez que a maioria dos alimentos consumidos pelo homem tem pH próximos a neutralidade ou levemente ácidos (entre 5 e 7) (FRANCO, 2008).

6.3 PERFIL DE SOLUBILIDADE

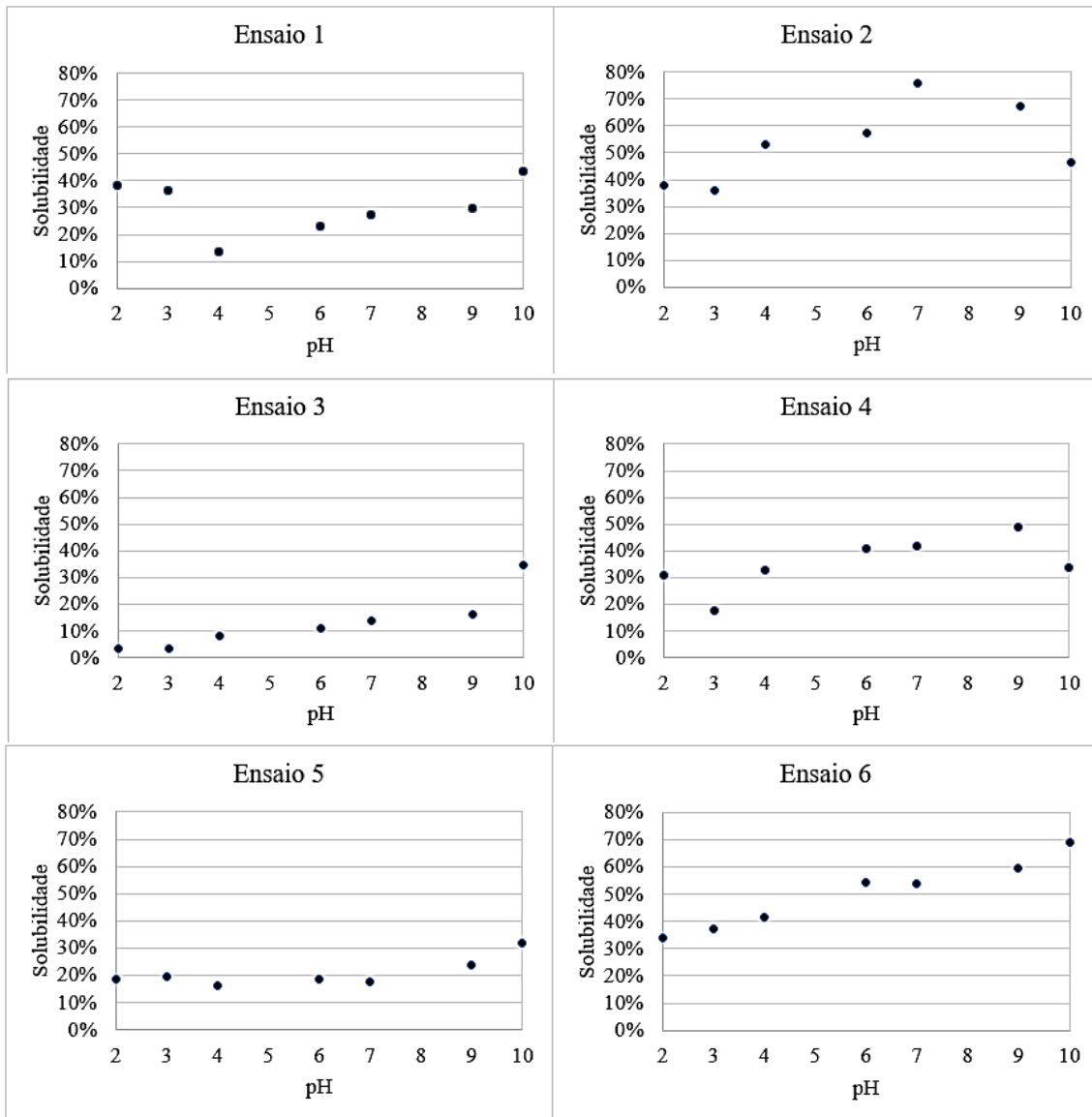
O comportamento da solubilidade das proteínas da biomassa de *Spirulina platensis* integral (Controle 1) e dos ensaios do planejamento, quando avaliados em diferentes pHs, está apresentado na Figura 2.

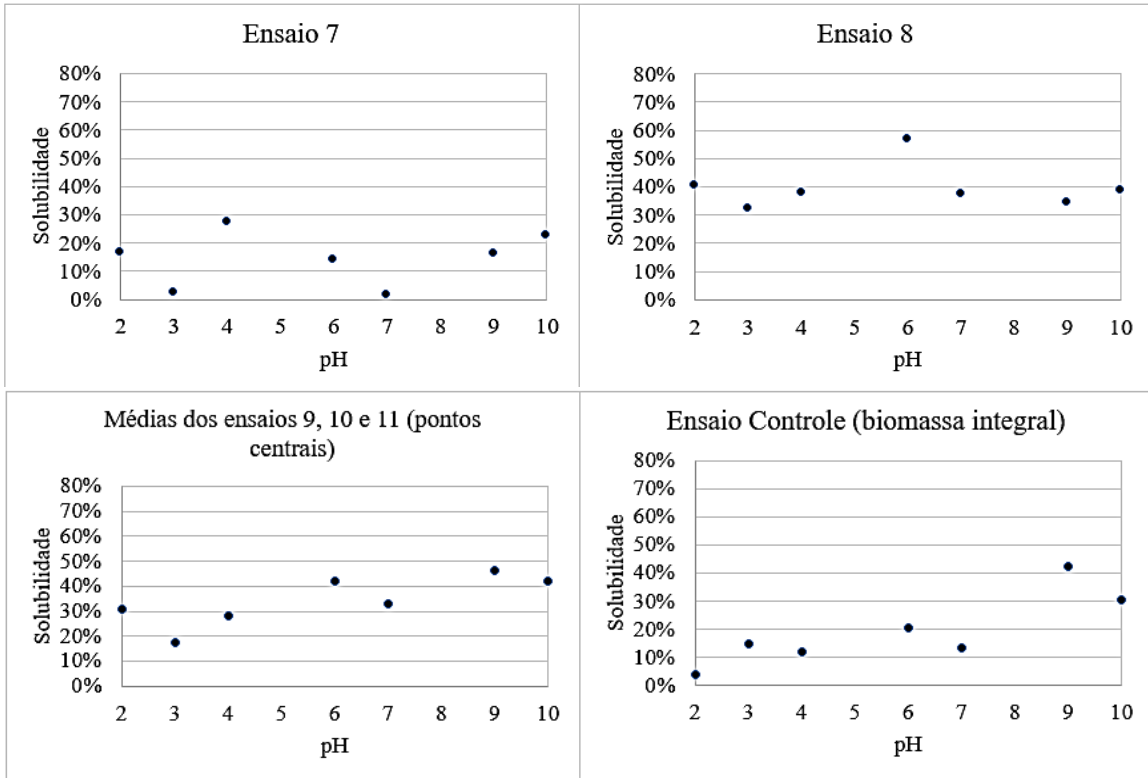
A solubilidade é considerada uma propriedade funcional fundamental na aplicação bem-sucedida de proteínas em alimentos (SCHWENZFEIER et al., 2011). O percentual de solubilidade máxima obtido foi de 76% (Figura 2), observado no ensaio 2 (para solubilidade em pH 7). O aumento da solubilidade em pHs próximo a neutralidade ocorre devido à predominância de cargas negativas que geram forças de repulsão eletrostáticas capazes de promover a dissociação dos complexos e conseqüente solubilização da proteína (SGARBIERI, 1998).

Ainda, observou-se que a mínima solubilidade encontrada nos ensaios 2, 3, 4, 7, 8 e pontos centrais, foi no pH 3, equivalente ao ponto isoelétrico das proteínas da biomassa de *S. platensis*. Lupatini et al. (2016), ao estudar o comportamento da solubilidade de um concentrado proteico de *Spirulina platensis* extraído a partir de tratamento ultrassônico, encontrou mínima solubilidade para as proteínas do concentrado proteico (3,23%) em pH 3,0, e a máxima solubilidade no pH 9 (98,07%). De forma similar, Benelhadj et al. (2016) ao estudarem o comportamento da solubilidade de um isolado proteico obtido da microalga *Spirulina platensis* em diferentes pHs também encontraram percentuais mínimos em pH 3,0 (6,20%) e máximo em pH 10,0 (59,60%).

Observando as curvas de solubilidade da Figura 2, verifica-se que em todos os ensaios em pH 9 e 10, ocorreu um aumento de solubilidade acima do ponto isoelétrico, neste sentido pode ser afirmar que existe um número maior de cargas negativas que garantem a manutenção de pontes de hidrogênio e o estiramento da cadeia polipeptídica, o que possibilita a maior solubilidade da proteína (FARFAN, 1994).

Figura 3 - Solubilidade em função do pH da biomassa integral de *Spirulina platensis*.





Fonte: Autoria própria (2019).

7 CONCLUSÕES

A concentração de proteínas determinada na biomassa de *Spirulina platensis* foi de 59,49%, demonstrando ser a fração predominante dos diferentes nutrientes analisados, logo a microalga pode ser considerada uma fonte alimentar altamente proteica. A solubilidade, por sua vez, é uma propriedade funcional das proteínas que interfere nas demais propriedades funcionais, justificando assim a importância do seu estudo. A *Spirulina platensis*, além do alto teor proteico, tem propriedades funcionais importantes, entretanto a baixa solubilidade da fração proteica limita sua aplicação nos alimentos. No processo de modificação da solubilidade das proteínas da *Spirulina platensis* aplicado neste trabalho, o pH foi a variável com maior efeito significativo na solubilidade em todos os pHs, exceto em pH 10. Baixas concentrações de 0,2 mol.L⁻¹ de NaCl mostraram efeitos significativos no aumento da solubilidade em pH 3, 7 e 9. O tratamento ultrassônico na amplitude de 40% causou efeito significativo na solubilidade das proteínas em pH 7, sugerindo que a utilização de ondas ultrassônicas de baixa potência são mais atrativas na melhoria da solubilidade da proteína estudada. De uma maneira geral, a solubilidade da proteína da *Spirulina platensis* aumentou com o acréscimo da alcalinidade do meio, enquanto que em pHs ácidos na faixa de 2 a 4, próximos ao ponto isoelétrico da proteína, a solubilidade foi reduzida. O ensaio realizado em pH 10, concentração de NaCl de 0,2 mol.L⁻¹ e amplitude do ultrassom de 40% foi o ensaio que apresentou o maior aumento na solubilidade em pH 7, alcançando 76% de proteínas solúveis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMBROSI, M.A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina spp.* **Rev. Ciênc. Básica Apl.**, v. 29, n. 2, p. 109–117, 2008.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. **Biochemistry**, v. 23, n. 25, p. 5912-5923, 1984.

BECKER, E. W. Research review: paper Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 207–210, 2007.

BELAY, A. et al. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, 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.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Química do processamento de alimentos. **3 ed.**, São Paulo: Varela, 143p., 2001.

BRAGA, A.R.C.; FIGUEIRA, F.S.; SILVEIRA, J.T.; GETTENS, J.G.; SILVA, P.B.M.; KALIL, S.J. Cinética de degradação térmica de C-ficocianina purificada. *In*: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20, 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2014, p. 1–6.

BRANDALIZE, M. V. Extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27, de 6 de agosto de – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos**, 2010.

CÂNDIDO, L. M. Obtenção de concentrados e hidrolisados proteicos de Tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. **Tese de Doutorado**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 207 p., 1988.

CARVAJAL, J. C. L. Caracterização e modificações químicas da proteína da

microalga *Spirulina* (*Spirulina maxima*). **Tese de Doutorado**, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, 2009.

CHAIKLAHAN, R. et al. Polysaccharide extraction from *Spirulina sp.* and its antioxidant capacity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 73–78, 2013.

CHANDRAPALA, J.; ZISU, B.; PALMER, M.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 951–957, 2011.

CHANG, R. **Físico-Química para as ciências químicas e biológicas**. 3 ed. São Paulo, McGraw Hill, 618 p, 2008.

CLARKSON, J. R.; CUI, Z. F.; DARTON, R. C. Effect of solution conditions on protein damage in foam. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 2, p.107-114, 2000.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.-L.; LORIENT, D. Proteínas alimentarias. **Zaragoza: Acribia**, p. 179-220; 291-335, 1989.

CHEN, Y., CHEN, J., CHEN, J., CAO, F., CHANG, C., ZHENG, Y., & ZHU, J. Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species. **Food Hydrocolloids** (2019)..

CHEMAT, F. et al. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasound assisted extraction of food and natural products . Mechanisms , techniques , combinations , protocols and applications . A review. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.

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.

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.

CHU, W. L. et al. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 10, p. 53, 2010.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; VIEIRA COSTA, J. A. Fatty Acids Profile of *Spirulina platensis* Grown Under Different Temperatures and Nitrogen

Concentrations. **Z. Naturforsch**, v. 59, p. 55–59, 2004.

CRESPI, H. L.; SMITH, U.; KATZ, J. J. Phycocyanobilin. Structure and exchange studies by nuclear magnetic resonance and its mode of attachment in phycocyanin. A model for phytochrome. **Biochemistry**, v. 7, p. 2232- 2242, 1968.

CÁRCEL, J.A. et al. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v.110, n.2, p.200-207, 2012

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. Química de alimentos de Fennema. **Artmed Editora**, 4^o ed., 2010.

DA COSTA MONTEIRO, M. P.; LUCHESE, R. H.; ABSHER, T. M. Effect of three different types of culture conditions on *Spirulina maxima* growth. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 369–373, 2010.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de Carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados.** p. 158, 2006.

DICKINSON, E.; STAINSBY, G. Advances in food emulsions and foams. Sole distributor in the USA and Canada, **Elsevier Science Publishers**, 1988.

FARFAN, J.A. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia dos alimentos.** Ed. Da UNICAMP, 2. ed., 1994.

FRANCO, B.D.G.M. Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano nos alimentos. *In*: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** Atheneu: São Paulo, 2008, p. 13-26.

GLÓRIA, M. M. da; REGITANO-D'ARCE, M. A.B. Concentrado e isolado proteico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 240-245, 2000.

GROSSMANN, L.; HINRICHS, J.; WEISS, J. Solubility of extracted proteins from *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum*, and *Nannochloropsis oceanica*: Impact of pH-value. **LWT - Food Science and Technology**, 2019.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, v.12, n.11, 2826-2841, 2016.

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

JAMBRAK, A. R. et al. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming

properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 281–287, 2008.

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

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 20, p. 642–656, 2013.

KORU, E. Earth food *Spirulina (Arthrospira)*: production and quality standarts. **Food additive**, p. 75–100, 2012.

LAM, R. S.; NICKERSON, M. T. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, 975-984, 2013.

LEE, J. et al. Bioresource Technology Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S75–S77, 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUPATINI, A. L. Protein and carbohydrates extraction from *Spirulina platensis* biomass and characterization of protein fraction. 2016. 118f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2016.

LUPATINI, A. L. et al. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. **Food Research International**, v. 99, p. 1028–1035, 2017.

MOREL, M. H. et al. Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. **Cereal Chem.**, v. 77, p. 685-691, 2000.

MARÍN, RR Retamal; BABICK, F.; STINTZ, M. Ultrasonic dispersion of nanostructured materials with probe sonication– practical aspects of sample preparation. **Powder technology**, v. 318, p. 451-458, 2017.

MORR, C. V. et al. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

MOULTON, K. J.; WANG, L. C. A pilot-plant study of continuous ultrasonic extraction of soybean protein. **J. Food. Sci.**, v. 47, p. 1127-1129, 1982.

MULITERNO, A. et al. Cultivo mixotrófico da microalga *spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciênc. agrotec. Lavras**, v. 29, n. 6, p. 1132–1138, 2005.

NAKAI, S.; LI-CHAN, E. Structure modification and functionality of whey proteins: quantitative structure-activity relationship approach. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 10, p. 2763-2772, 1985.

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.

OWEN, B. B.; SIMONS, H. L. Standard partial molal compressibilities by ultrasonics. I. Sodium chloride and potassium chloride at 25 degree. **J. Phys. Chem**, v. 61, p. 479-482, 1957.

PAVLOVSKAYA, G.; POVEY, M. J. W. Ultrasonic investigation of aqueous solutions of a globular protein. **Food Hydrocolloids**, v. 6, n. 3, p. 253–262, 1992.

PERON, Bianca C. Residual fractions from *Spirulina platensis* protein extraction as feedstock for bioethanol production. 2018. 67f. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

PHILLIP, L.; WHITEHEAD, D.; KINSELLA, J. Proteins Films. Structure-Function Properties of Food Proteins. **Eds. Academic Press**, p.111-130, 1994.

PIÑERO ESTRADA, J. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 497–500, 2001.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal mass culture. **CRC Press ed.** Boston: 1990.

RODOLFI, L. et al. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100–112, 2009.

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

SCHWENZFEIER, A.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 9121-9127, 2011.

SEIBEL, N. F.; BELÉIA, A. D. P. Características químicas e funcionalidade tecnológica de ingredientes de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]: carboidratos e

proteínas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 113-122, abr./jun. 2009.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113–136, 2008.

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

SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, p. 212-220, 1998.

SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. **Hydrobiologia**, v. 512, p. 39–44, 2004.

SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. 2008. 87f. 2008. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Utfpr, Curitiba.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A.; KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of C-phycoyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n.1, p.5-12, 2009.

SIKORSKI, Z. E. Functional properties of proteins in food systems. **Chemical and functional properties of food proteins**, p. 113-135, 2001.

SOLETTI, D. et al. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, n. 1–4, p. 217–224, 2005.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

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.

TIRAPEGUI, J. Nutrição. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 246-247, 2002.

TORTORA, GERARD J.; FUNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L. Introducción a la Microbiología. **Ed. Médica Panamericana**, 2007.

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*. **Bioresource technology**, 157, 134-139, 2014.

VAN HEKKEN, D.L.; STRANGE, E.D. Functional properties of dephosphorilated bovine whole casein. **J .Dairy Sci.**, v. 76, p. 3384-3391, 1993.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S. Ultrassom na indústria de alimentos: Aplicações no processamento e conservação. **Ponta Grossa (PR): Atena Editora**, 2018.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quimica Nova**, v. 27, n. 1, p. 139–145, 2004.

VOJDANI, F. Solubility. In: G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality*. **London: Blackie Academic & Professional**, p. 11-60, 1996.

WAN, D.; WU, Q.; KUCA, K. Chapter 42 - *Spirulina*. In: **Nutraceuticals**, p. 569–583, 2016.

WILDING, P.; LILLFORD, P. J.; REGENSTEIN, J. M. Functional properties of proteins in foods. **Journal Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 34b, n. 3, p. 182-189, 1984.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 487–502, 1997.