

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

RENATA MINGOTTI

**AUMENTO DO TEOR PROTEICO DA BIOMASSA SECA DA
CIANOBACTÉRIA *Spirulina platensis* POR EXTRAÇÃO DE
CARBOIDRATOS UTILIZANDO SOLVENTE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2019

RENATA MINGOTTI

**AUMENTO DO TEOR PROTEICO DA BIOMASSA SECA DA
CIANOBACTÉRIA *Spirulina platensis* POR EXTRAÇÃO DE
CARBOIDRATOS UTILIZANDO SOLVENTE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química, do Departamento de
Engenharia Química, da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt
Sydney

Co-orientadora: Prof^a. Me. Simone Bowles

PONTA GROSSA

2019



TERMO DE APROVAÇÃO

Aumento do teor proteico da biomassa seca da cianobactéria *Spirulina platensis* por extração de carboidratos utilizando solvente.

por
Renata Mingotti

Monografia apresentada no dia 18 de junho de 2019 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado com restrições.

Prof^a. Dr^a. Alessandra Cristine Novak Sydney
(UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Elisabete Hiromi Hashimoto
(UTFPR)

Prof^a. Me. Simone Bowles
(UTFPR)
Co orientadora

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
(UTFPR)
Orientador

Prof^a. Dra. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

AGRADECIMENTOS

Infinita gratidão a Deus por todas as oportunidades e pela sua presença incondicional na minha vida.

À minha família, em especial meus pais, Nedir e Flávio que em muitos momentos deixaram de realizar seus sonhos para realizar os meus, e a minha irmã Flávia por todo o carinho e apoio nas madrugadas.

Aos demais familiares que sempre me incentivaram nos estudos e compreenderam a minha ausência.

À UTFPR/PG, pela oportunidade de realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney, pela confiança depositada, impecável orientação e sobre tudo por ter me aguentado no seu pé todos os dias. Sua orientação foi o maior privilégio e sempre serei grata.

À co orientadora Prof^a. Me. Simone Bowles por toda a atenção e ensinamento com as etapas envolvidas para a determinação de proteínas totais pelo Método de Kjeldahl.

As Prof^a. Dr^a. Alessandra Cristine Novak Sydney e Prof^a. Dr^a. Elisabete Hiromi Hashimoto, por aceitarem compor a banca examinadora, pelas correções e sugestões pertinentes ao aprimoramento deste trabalho.

Aos demais professores envolvidos na pesquisa pelas dicas e trocas de experiências vivenciadas em laboratório e aquela ajudinha com materiais e reagentes pedidos em cima da hora.

À Luana Santos de Lima, à Sandy Kuki e à Elisabeth Holub pelas ajudas nos laboratórios de pesquisa.

Aos amigos, Caio Correia, Gaiüs Tosso, Maiara Luiza, Alexya Garcia, Mayara Ostwal, Bianca Medeiros, Nicolli Karolini da Rosa e Flávia Woellner pela convivência diária, pelas inúmeras conversas e confidências, além da paciência que tiveram em ouvir meus desabafos e choros durante toda essa jornada e cuidarem de mim de uma forma tão especial.

Ao meu cachorro, Gunter, por ter suportado ficar sozinho diversas vezes e mesmo assim sempre me recebeu com muita alegria quando chegava em casa.

E finalmente, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho.

RESUMO

MINGOTTI, Renata. Aumento do teor proteico da biomassa seca da cianobactéria *Spirulina platensis* por extração de carboidratos utilizando solvente. 2019. 69 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

Spirulina sp. é muito utilizada em suplementos alimentares por possuir um conteúdo nutricional de qualidade, e, também, por apresentar uma enorme disponibilidade de nutrientes, como, por exemplo, um percentual de 50% – 70% de proteínas. O objetivo deste estudo foi aumentar o teor proteico da biomassa seca de *Spirulina platensis*, sendo necessário compreender o efeito da aplicação do solvente na extração de carboidratos da biomassa através de um tratamento químico proposto por uma ferramenta estatística avançada. Aplicou-se o método da pesquisa exploratória, por meio de uma matriz fatorial de *Plackett & Burman*, com o fim de otimizar os parâmetros concentração do solvente (10,55 e 100%) concentração da biomassa (1, 5,5 e 10g/L), temperatura de extração (80, 100 e 120°C) e tempo de extração (5,15 e 25 min). Entre os parâmetros acima citados, foram obtidas respostas significativas e correlacionadas para os fatores de concentração do solvente, a concentração de biomassa e a temperatura. Apresentando as melhores as condições de extração de carboidratos e proteínas através do tratamento químico, tendo como resultados para os experimentos de número 6 e 10, respectivamente: 10g/L biomassa, 10% etanol, 120°C de temperatura e 25 min de tempo de extração e 1g/L biomassa, 10% etanol, 80°C de temperatura e 5 min de tempo de extração.

Palavras-chave: Extração. Proteínas. *Spirulina platensis*. Tratamento químico.

ABSTRACT

MINGOTTI, Renata. Increased protein content of dry biomass of cyanobacterium *Spirulina platensis* by extraction of carbohydrates using solvent. 2019. 69 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

Spirulina is widely used in dietary supplements because it has a high nutritional content and also because it has an enormous availability of nutrients with a percentage of 50% - 70% of proteins. The objective of this study is to increase the protein content of dry *Spirulina platensis* biomass, and it is necessary to understand the effect of solvent application on the extraction of carbohydrates from biomass through a chemical treatment proposed by an advanced statistical tool. The exploratory research method was applied through a Plackett & Burman factorial matrix, in order to optimize the parameters of solvent concentration (in a percentage of 10, 50 and 100%), biomass concentration (in 1, 5,5 and 10g/L), extraction temperature (in 80, 100 and 120°C) and extraction time (in 5, 15 and 25min). Above the parameters, significant and correlated responses were obtained for solvent concentration factors, biomass concentration factors and temperature. With the best conditions of carbohydrate and proteins extraction through the chemical treatment, the results for the experiments of numbers 6 and 10, respectively, are: 10g/L of biomass, 10% of ethanol, 120°C of temperature and 25 minutes of extraction time and 1g/L of biomass, 10% of ethanol, 80°C of temperature and 5 minutes of extraction time.

Keywords: Extraction. Proteins. *Spirulina platensis*. Chemical treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA PARA TRATAMENTO QUÍMICO NA BIOMASSA SECA.....	27
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA COM FOCO NO TRATAMENTO QUÍMICO PROPOSTO	34
FIGURA 3 – SISTEMA DE AQUECIMENTO PARA EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR ETANOL	35
FIGURA 4 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN COM DADOS DOS FATORES SIGNIFICATIVOS	38
FIGURA 5 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN COM DADOS DOS FATORES SIGNIFICATIVOS PARA ELEVAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS.....	40
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA COM FOCO NO NÃO TRATAMENTO QUÍMICO PROPOSTO	43
FIGURA 7 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DE KJELDAHL NA AMOSTRA EM FASE SÓLIDA.....	53
FIGURA 8 – PE CONSIDERANDO O FATOR BIOMASSA (g/10mL) PARA APLICAÇÃO NA ETAPA DE DIGESTÃO NO MÉTODO DE KJELDAHL	54
FIGURA 9 – PREPARO DE AMOSTRA PARA A ETAPA DE DIGESTÃO DE ACORDO COM O PE	55
FIGURA 10 – RESULTADO DA SEGUNDA TENTATIVA DE DIGESTÃO DA AMOSTRA EM FASE SÓLIDA	56
FIGURA 11 – SISTEMA DE AQUECIMENTO PARA DIGESTÃO.....	57
FIGURA 12 – RESULTADO DO REAQUECIMENTO DA AMOSTRA EM FASE SÓLIDA.....	58
FIGURA 13 – PE PARA OTIMIZAÇÃO DOS REAGENTES.....	59
FIGURA 14 – OTIMIZAÇÃO DE REAGENTES BASEADOS NO PE.....	60
FIGURA 15 – PREPARO DE AMOSTRA SEM TRATAMENTO QUÍMICO PARA A ETAPA DE DIGESTÃO.....	62

FIGURA 16 – CÁLCULOS E CONVERSÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS.....	63
FIGURA 17 – AMOSTRAS COM 1,5 g E 2g DE MISTURA CATALÍTICA.....	64
FIGURA 18 – PREPARO DE AMOSTRA UTILIZADA NA ETAPA DE DIGESTÃO DE AMOSTRA NA FASE LÍQUIDA.....	65
FIGURA 19 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DE KJELDAHL NA AMOSTRA EM FASE LÍQUIDA.....	67
FIGURA 20 – PREPARO DE AMOSTRA UTILIZADO NA ETAPA DE DIGESTÃO DE AMOSTRA EM FASE LÍQUIDA.....	68
FIGURA 21 – RESULTADO DA APLICAÇÃO DO MÉTODO DE KJELDAHL NA AMOSTRA EM FASE LÍQUIDA.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE PROTEÍNAS – BSA.....	32
GRÁFICO 2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE GLICOSE.....	33
GRÁFICO 3 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN EM RESPOSTA À CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	39
GRÁFICO 4 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN COM RESPOSTA À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN COM MATRIZ FATORIAL N=15.....	28
TABELA 2 – MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR ETANOL (CUR VALUE)	36
TABELA 3 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN COM RESPOSTA À CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS	37
TABELA 4 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN COM RESPOSTA À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	40
TABELA 5 – MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO MÍNIMA DE PROTEÍNAS (CUR VALUE).....	41
TABELA 6 – CÁLCULOS DOS TEORES DE NITROGÊNIO TOTAL E PROTEÍNA TOTAL	61
TABELA 7 – RANGE DE TEMPERATURA COM CONTROLE DE TEMPO NO AQUECIMENTO.....	66
TABELA 8 – RANGE DE TEMPERATURA COM CONTROLE DE TEMPO NO AQUECIMENTO.....	67
TABELA 9 – RANGE DE TEMPERATURA COM CONTROLE DE TEMPO NO AQUECIMENTO.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
PE	Planejamento Experimental
pH	Potencial Hidrogeniônico
MC	Mistura Catalítica
SCP	Single Cell Protein (Proteínas Unicelulares)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 PROTEÍNAS E SUA IMPORTÂNCIA.....	17
3.2 PROTEÍNA MICROBIANA (<i>SINGLE CELL PROTEIN</i>).....	18
3.2.1 Microalgas.....	19
3.3 SPIRULINA	20
3.3.1 Aplicações de <i>Spirulina platensis</i>	21
3.3.2 Métodos para obtenção do aumento do teor protéico de <i>S.platensis</i>	21
3.4 MÉTODOS PARA TRATAMENTO QUÍMICO NA BIOMASSA SECA.....	23
3.4.1 Planejamento experimental de Plackett & Burman.....	23
3.4.2 Extração de carboidratos solúveis.....	24
3.4.3 Determinação de proteínas totais	25
3.4.4 Determinação de açúcares totais.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 BIOMASSA	26
4.2 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA	26
4.2.1 Planejamento experimental de Plackett & Burman	297
4.2.2 Extração de carboidratos por solvente	298
4.2.3 Determinação de proteínas totais Erro! Indicador não definido.9	
4.2.4 Determinação de açúcares totais.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
5.1 AMOSTRA COM TRATAMENTO QUÍMICO NA BIOMASSA SECA.....	34
5.1.1 Extração de carboidratos por solvente.....	34
5.1.2 Determinação de açúcares totais.....	36
5.1.3 Determinação de proteínas totais	39
5.2 AMOSTRA SEM TRATAMENTO QUÍMICO NA BIOMASSA SECA	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
6.1 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE	53

1 INTRODUÇÃO

Nos processos fisiológicos e bioquímicos existentes nos organismos as proteínas são componentes alimentares necessários, pois atuam como fonte de energia e de aminoácidos essenciais e devem ser introduzidas nos organismos por meio da ingestão de alimentos, podendo ser de origem animal, vegetal e microbiana.

Devido ao custo elevado das fontes proteicas tradicionais (carnes, ovos e leites) e a insuficiência proteica nos hábitos alimentares da população, revela-se a necessidade de fontes alternativas para suprir a falta deste nutriente. Neste contexto, considerando o custo elevado *versus* hábitos alimentares, a biotecnologia traz uma interessante alternativa: a produção de proteínas de origem microbiana.

A falta da inclusão das proteínas nos hábitos alimentares influenciou os avanços tecnológicos na indústria de alimentos e na agricultura, despertando um incentivo ao desenvolvimento de tecnologias não convencionais para a produção de produtos com alto conteúdo proteico, de qualidade nutricional satisfatória a baixo custo e mínima interferência nas características sensoriais dos alimentos (GARCIA, 2003; KAC; VELASQUEZ-MELÉNDEZ, 2003).

As microalgas são uma proposta para essa utilização, devido à sua enorme biodiversidade, e conseqüente variabilidade na composição bioquímica, associada ao emprego de melhoramento genético e a facilidade na implantação das técnicas de cultivo em grande escala (SOLETTO et al., 2005).

De acordo com Colla et al (2007), as microalgas destacam-se principalmente por apresentarem elevado valor proteico (50-70%), carboidratos, vitaminas (especialmente B₁₂), sais minerais, além de pigmentos (carotenoides, ficocianinas e clorofilas), ácidos graxos poli-insaturados (incluindo ômega 3) e outros compostos. A representatividade de cada um destes compostos na composição celular pode variar em função de gênero, espécie e também das condições de cultivo (BROWN et al., 1997).

As condições e a composição dos meios de cultivos das microalgas também podem ser alteradas a fim de modificar características de crescimento celular ou mesmo visando induzir a produção de um componente específico em elevada concentração (DARZINS et al., 2010), como por exemplo proteínas, lipídios e carotenoides.

Entre as microalgas, a que está recebendo maior atenção pelos pesquisadores são as do gênero *Spirulina*. Ela apresenta uma variedade de nutrientes essenciais (não são sintetizados pelo organismo humano), sendo considerada um importante suplemento alimentar (PHANG et al., 2000).

Spirulina platensis se destaca por ser um microrganismo fotossintético, rico em proteínas, adequado para produção em escala industrial (DEMIR e TÜKEL, 2010). Seu cultivo exige uma área 20 vezes menor e utiliza um terço da água quando comparada ao cultivo da soja, sendo 3,5 vezes mais eficiente e não exige o uso de defensivos agrícolas, o que acarreta numa diminuição no custo e na poluição ambiental do processo (GERSHWIN e BELAY, 2007). Além disso, a taxa de fixação de CO₂ das microalgas é muito maior do que das plantas superiores devido à sua maior taxa de crescimento.

Considerando a rica composição da biomassa microalga, a exploração de todas as suas frações permite obter diferentes aplicações em áreas distintas (RASHID; REHMAN e HAN, 2013). Para isso faz-se necessário utilizar uma combinação de várias tecnologias de cultivo, extração e purificação, onde cada uma das frações obtidas é aproveitada, resultando em uma biorrefinaria integrada (RAWAT et al., 2013). Considerando a composição da *S. platensis* (50-70% de proteínas, 8-14% carboidratos, 4-9% lipídeos), por exemplo, verificamos que as principais frações a serem aproveitadas seriam a proteica, carboidratos e a ficocianina (BECKER, 2004).

Considerando as observações na literatura científica de que a evolução das técnicas de cultivo (e compreensão do metabolismo microalgal) permitiu-nos atingir o que parece ser uma limitação fisiológica da *S. platensis* em acumular proteínas (máximo de 70% m/m), entendemos que a única forma de aumentar o teor proteico da biomassa é aplicando tratamentos pós-cultivo. Este trabalho tem como objetivo, portanto, avaliar a possibilidade de aumentar o teor proteico de *S. platensis* por meio do tratamento da biomassa seca com solvente orgânico, visando a remoção da fração de carboidratos intracelulares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do presente trabalho foi concentrar as proteínas da biomassa seca da cianobactéria *Spirulina platensis* por redução de carboidratos com o uso do solvente etanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de proteína na biomassa;
- Determinar as proteínas totais da biomassa seca pré e pós tratamento com solvente;
- Determinar os açúcares totais da biomassa pós tratamento;
- Quantificar o teor de carboidratos e proteínas na fase líquida obtida da extração com solvente;
- Definir a melhor concentração de solvente etanol para a extração de carboidratos resultando em mínima interferência com as proteínas;
- Otimizar as condições de extração dos carboidratos: tempo, temperatura, concentração de solvente, quantidade de biomassa utilizando planejamento estatístico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROTEÍNAS E SUA IMPORTÂNCIA

As proteínas são caracterizadas como macromoléculas orgânicas, formadas a partir de ligações peptídicas entre dois aminoácidos, resultando em uma estrutura com diferentes combinações entre apenas 20 aminoácidos. (COZZOLINO, 2007). São consideradas como um nutriente fundamental para o crescimento, desenvolvimento e a manutenção celular dos organismos vivos, cumprindo funções estruturais, reguladoras, de defesa e também de transporte nos fluidos biológicos (LEHNINGER et al., 1993). Segundo Champe e Harvey (1996), para fornecer os aminoácidos essenciais, isto é, aminoácidos que não são sintetizados pelo próprio organismo a partir de outros compostos orgânicos, é necessário a ingestão de proteínas através da dieta alimentar.

O valor nutricional de uma proteína depende da capacidade desta em fornecer os aminoácidos essenciais, o que acaba refletindo na biodisponibilidade para o organismo. Alguns fatores podem influenciar nessa questão, tais como: conformação estrutural, presença de outros compostos antinutricionais e efeitos das condições de processamento com outros nutrientes (COZZOLINO, 2007).

Dentro deste contexto, é possível observar a importância do consumo de proteínas de alto valor nutricional na alimentação humana. E sua insuficiência na ingestão é prejudicial, pois os indivíduos afetados pela desnutrição possuem um sistema imunológico enfraquecido, acarretando em uma maior propensão para doenças (CHAMPE e HARVEY, 1996). A recomendação é de uma ingestão diária de 37 gramas de proteína de alta qualidade, para um homem adulto moderadamente ativo, de acordo com Organização Mundial da Saúde (FRANCO, 1997).

Por isso existe a necessidade de reavaliar os hábitos alimentares sem criar alterações sobre a diversidade de alimentos que o compõe (GARIB, 2002; NICOLETTI, 2007). Isso se deve ao fato de que as dietas estão se tornando cada vez menos nutritivas e mais calóricas, visto pelo aumento de açúcares e gorduras na composição dos alimentos industrializados (KAC; VELASQUEZ-MELÉNDEZ, 2003).

Em decorrência destas situações, tem-se visto um crescente estímulo na procura por fontes alimentares alternativas e também por novos processos

tecnológicos, com o intuito de reduzir os custos dos produtos e atender as demandas nutricionais (BATISTUTI e FREITAS,1995).

De acordo com Parajó et al (1995), o uso de microrganismos tem despertado grande interesse, pois estes se desenvolvem em diferentes tipos de subprodutos industriais, produzindo quantidades significativas de células, conhecidas como proteínas microbianas. E segundo Villas Bôa e Esposito (2000), essas células são consideradas como um concentrado proteico natural, pois contém todos os aminoácidos essenciais.

3.2 PROTEÍNA MICROBIANA (*SINGLE CELL PROTEIN*)

Segundo Litchfield (1983), o termo *Single Cell Protein* (SCP) reporta-se às células secas de microrganismos, cultivadas em sistemas de larga escala e são utilizadas como fontes de proteína para a dieta alimentar humana e animal. A produção de proteína unicelular tem tido grande importância nos últimos anos, pois o consumo de microrganismos pode ser uma possibilidade frente à desnutrição proteica e energética (KONLANI *et al.*, 1996).

Ainda que esses microrganismos sejam cultivados pelo seu elevado conteúdo proteico, o qual determinará o seu valor comercial, também apresentam lipídeos, vitaminas, minerais, carboidratos, além de nitrogênio não proteico, como os ácidos nucleicos (LITCHFIELD, 1983), sendo esse o principal fator limitante na utilização das células microbianas em dietas alimentares devido a sua elevada concentração, podendo ser reduzido através de métodos químicos ou biológicos (ABOU-ZEID *et al.*, 1995).

Assim, de acordo com Anupama e Ravindra (2000) para melhor explorar o potencial e a utilização da proteína unicelular, apesar de serem muitas e diversificadas as fontes de SCP (algas, fungos e bactérias), o consumo humano deveria ser amplo. A sua aceitação ainda é pequena, por razões de custo do produto final, viabilidade econômica do processo ou até mesmo pelo desconhecimento da população.

3.2.1 *Microalgas*

Segundo Lourenço (2006), as microalgas são eucariontes, caracterizados como unicelulares ou pluricelulares, pertencentes ao reino Protista, já as cianobactérias são procariontes, unicelulares ou pluricelulares, pertencentes ao reino Monera e inseridas na divisão Chloroxybacteria, sendo as únicas bactérias capazes de fixar o dióxido de carbono e produzir oxigênio como produto da realização da fotossíntese.

Na literatura há controvérsias a respeito dessa classificação taxonômica das microalgas e cianobactérias, mas Stanier e Van Neil (1962), propuseram a denominação “cianobactérias” e as incluíram na classificação Prokaryote, sendo esta denominação aceita e publicada pela primeira vez em 1974 (HABIB et al., 2008). Assim, durante o desenvolvimento deste trabalho o termo “microalgas” fará menção a microalgas e cianobactérias, conforme foi citado por Ghosh et al., (2016).

Não se sabe exatamente quantas espécies de microalgas e cianobactérias existem, há uma estimativa que possam existir entre 70.000 e 1.000.000 de espécies, mas só 44.000 espécies aproximadamente já foram descritas (SANCHEZ-SILVA et al., 2013).

Por possuírem muitas vantagens frente a outros microrganismos, pesquisadores têm demonstrado grande interesse em cultivos de microalgas. Dentre essas vantagens destaca-se eficiência fotossintética, taxa de crescimento e produção de biomassas superiores, o que leva ao cultivo em larga escala tornando seu cultivo viável economicamente (MATA et al., 2010).

Essa alta capacidade fotossintética é devida à presença de clorofila e outros pigmentos que em conjunto aos acessórios de proteção e captação da luz proporcionam uma conversão de até 10% da energia solar em biomassa, enquanto que em plantas convencionais esses percentuais ficam em uma faixa de 1% a 5% (PARMAR et al., 2011). Além disso, o cultivo de microalgas não exige solos aráveis, podendo ser cultivadas em águas salinas, salobras e residuais e em condições inóspitas (CHISTI, 2007; MILANO et al., 2016). *Spirulina* sp. do gênero *Arthrospira* é uma das algas cultivadas nessas lagoas, e muito utilizada para suplementos com alto teor de proteínas (NEOFOTIS et al., 2016).

3.3 SPIRULINA

As cianobactérias do gênero *Spirulina* são microscópicas, com estrutura procariótica, multicelular e filamentosa, tendo sua origem há cerca de 3,5 bilhões de anos atrás (GERSHWIN e BELAY, 2007). Sua reprodução é através da divisão transversal binária do tricoma, quando ocorre a formação do hormogônio, que se destaca dando origem a um novo filamento (VONSHAK e TOMASELLI, 2000). Possui coloração verde azulada, atividade fotossintética, sendo composta por tricomas de 5-6 µm de largura e 20 – 200 µm de comprimento em forma de um espiral (HOFF e SNELL, 1999; SHIMAMATSU, 2004).

A célula da *Spirulina* apresenta uma membrana plasmática envolta por muitas camadas da parede celular, possuindo uma fileira de poros ao redor do tricoma, separados por pequenos espaços denominados septos, que são visíveis apenas por microscopia óptica (VONSHAK e TOMASELLI, 2000). Essa parede celular é envolta por uma bainha constituída de polissacarídeos e não apresenta celulose, um dos motivos pelo qual a *Spirulina* é melhor metabolizada pelos organismos. (BABADZHANOV et al., 2004).

Desenvolvem-se naturalmente nas águas salobras e salinas, em ambientes lacustres de regiões tropicais e semitropicais em diversas partes do mundo (CIFERRI e TIBONI, 1985). Segundo Habib et al (2008), sua produção se estendeu mundialmente devido à sua capacidade de se adaptar a condições de altas temperaturas e alta alcalinidade, sendo capazes de apresentar excelente resistência em relação às demais microalgas.

A faixa de temperatura ideal de crescimento é 35-38°C para esta espécie enquanto a faixa mínima de temperatura necessária para manter o crescimento é de 15-20°C (GERSHWIN e BELAY, 2007). Por apresentar uma alta alcalinidade, a faixa necessária de pH para o seu desenvolvimento fica em torno de 8 a 11, o que ocasiona uma baixa susceptibilidade a contaminação por outros microrganismos em seu cultivo (BARROS e SASSI, 2007; VONSHAK, 1997).

Spirulina é muito utilizada em suplementos alimentares por possuir um conteúdo nutricional de qualidade, e também por apresentar uma enorme disponibilidade de nutrientes, sendo que esses podem variar de acordo com o tipo de cultivo empregado (HABIB et al., 2008).

A produção mundial de *Spirulina* vem sendo liderada pela companhia Earthrise Nutraceuticals, com unidade na Califórnia (EUA) e outra em Hainan (China), apresentando uma capacidade de produção de mais de 900 toneladas por ano. Mas há também outras empresas que se destacam, tais como Siam Algae Company em Bangkok (Tailândia) e a Cyanotech Corporation no Havaí. Já no Brasil, ainda não se tem uma produção relevante apesar de ser um país com clima predominante tropical nas regiões do Norte e Nordeste (DARZINS et al., 2010; NICOLETTI, 2007)

3.3.1 Aplicações de *Spirulina platensis*

Na classificação taxonômica, *Spirulina* é um termo comumente usado para descrever principalmente duas espécies de cianobactérias, *Arthrospira maxima* e *A. platensis*, sendo esta a espécie em maior destaque devido a sua situação geográfica (GERSHWIN e BELAY, 2007).

Já em relação às suas propriedades organolépticas, na sua forma seca apresenta odor de peixe e sob forma fresca não apresenta odores nem sabores. Em pequenas quantidades pode potencializar ou não o sabor de qualquer alimento e ainda realçar a coloração de alguns alimentos devido aos pigmentos presentes (BORJA, 2007).

Segundo Henrikson (1994), a comercialização de *Spirulina* como alimento ou complemento alimentício está legalmente autorizado em alguns países da Europa, Japão e costa asiática do Pacífico, por considerar que esta é uma boa fonte de nutrientes. Já no Brasil, é permitido a sua comercialização desde que o produto final esteja devidamente registrado na ANVISA.

3.3.2 Métodos para aumento do teor proteico de *S. platensis*

Segundo Henriques et al (1998), as microalgas reagem a quaisquer variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. Assim, a manipulação das condições e a composição de nutrientes do meio de cultivo, tendem a estimular a biossíntese de compostos, além de influenciar os resultados de crescimento celular

como também os componentes da biomassa e produtos de interesse (DERNER, 2006).

a) Condições de cultivo

O crescimento das microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos, tanto no ambiente natural quanto nos cultivos (DARZINS et al., 2010). Todos esses fatores podem influenciar no seu valor nutricional, incluindo a sua forma e tamanho, estrutura e composição da parede celular e a composição bioquímica (DERNER, 2006).

Existem vários métodos de cultivo para produção de microalgas, que levam a um rápido desenvolvimento de explosões populacionais denominados “blooms” (LOURENÇO, 2006). Para a realização desses métodos, há quatro tecnologias envolvidas nesses cultivos, para os sistemas abertos os *open ponds e raceway* e para os sistemas fechados, os fotobiorreatores e fermentadores (DARZINS et al., 2010)

b) Composição do meio de cultivo

Conforme Brown et al. (1997), para avaliar o desenvolvimento apropriado do cultivo, é essencial avaliar a composição nutricional das microalgas, pois esta pode variar em função de diferentes condições de cultivo e da fase de crescimento da cultura. As quantidades desses componentes nutricionais no meio variam entre as espécies e também dependem de diversas condições ambientais (GUILLARD, 1975).

De forma geral, a composição do meio de cultura é uma simulação do que ocorre no meio natural em que a espécie se encontra, contendo numerosos sais minerais, alguns elementos traço e algumas vitaminas em baixas concentrações (MILANO et al., 2016)

O nitrogênio é o macronutriente básico na formação de proteínas, ácidos nucléicos e pigmentos fotossintetizantes. É incorporado sob forma amoniacal, mas também pode ser assimilado na forma de nitrogênio gasoso ou molecular de nitrato e de nitrito. Se a concentração de proteína for diminuída, esta ocasiona um aumento significativo no percentual de polissacarídeos e a diminuição da clorofila aumenta a

concentração de carotenoides gerando mudança de coloração no cultivo da microalga que tende ao aspecto amarelado (LOURENÇO, 2006).

c) Tratamento químico na biomassa seca

Não foram encontrados na literatura estudos sobre o tratamento químico na biomassa já seca de *S. platensis* com o objetivo de aumentar o teor proteico, pois muitos destes trabalhos focam em estudos sobre melhoramento nas condições e na composição dos meios de cultivo para a obtenção de uma melhor biomassa de *Spirulina*. Por outro lado, são conhecidos diversos métodos para extração da fração proteica, oleosa, carboidratos e pigmentos de microalgas. A maioria destes, porém, visam a quantificação dessas frações e determinação da composição da biomassa, mas não futuras aplicações da biomassa tratada.

O tratamento químico proposto é retirar toda ou a maior parte dos carboidratos já presentes na biomassa, através da extração por um determinado solvente, e em seguida relacionar esses parâmetros para entender quais as melhores combinações: concentração do solvente, concentração da biomassa, temperatura de extração e tempo de extração usando uma ferramenta estatística.

As proteínas são consideradas interferentes nos processos de extração de carboidratos. Porém, nesse caso, ocorre que caso as proteínas não sejam extraídas anteriormente, elas o serão junto com os carboidratos, resultando na superestimação do teor de açúcares da biomassa. Como o objetivo principal deste trabalho é aumentar o teor proteico da biomassa, faz-se necessário compreender o efeito da aplicação do solvente na extração de proteínas e carboidratos da biomassa seca. O objetivo é obter uma biomassa pós-tratamento com maior teor proteico.

Portanto, a proposta é determinar o teor de proteínas totais na biomassa seca de *Spirulina platensis*; determinar os açúcares totais e realizar estudos das melhores condições em que os carboidratos são preferencialmente extraídos, aumentando o teor proteico da biomassa.

3.4 MÉTODOS PARA TRATAMENTO QUÍMICO NA BIOMASSA SECA

3.4.1. Planejamento experimental de Plackett & Burman

O planejamento de experimentos tem como finalidade explorar os dados nas quantidades e condições adequadas no decorrer do experimento, alcançando maior precisão estatística sobre a variável desejada com menor custo e também em um menor período de realização (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2003). Diversas definições são encontradas para planejamento de experimentos e, segundo Spiegel (1982), o termo é definido como “o estudo dos métodos de amostragem e dos problemas correlatos que surgem”. Assim, um experimento é mais do que apenas uma prova ou testes, são experimentos com o propósito de obtenção de informações sobre um determinado sistema, ou a fim de resultados comparativos entre as causas e efeitos causados por vários fatores numa ocorrência (MONTGOMERY, 2001). E é através de uma série de testes, que são feitas modificações nas variáveis, para que possam ser analisados os efeitos resultantes das mudanças realizadas no sistema de estudo. (MONTGOMETY, 2001; SPIEGEL, 1982)

Há uma ampla quantidade de ferramentas que podem ser adotadas para a implementação de um planejamento experimental, o escolhido para este trabalho foi o Planejamento de Plackett & Burman, pois este é conveniente em situações onde se encontra uma enorme quantidade de variáveis a serem estudadas. Além de ser apropriado para situações exploratórias, também pode ser empregado em pesquisas com poucos recursos, pois permite com “n” experimentos investigar “n-1” fatores e utiliza-se de fatores “fantasmas”, que servem para fazer a estimativa do erro experimental (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2003).

3.4.2. Extração de carboidratos solúveis

A solubilidade da proteína pode superestimar o teor de carboidratos solúveis, daí a importância da extração por meio do uso de soluções alcoólicas, as quais podem reduzir essas interferências (WISEMAN; MALLACK e JACOBSON, 1960).

De acordo com Deinun e Maassen (1994), os procedimentos para extração de carboidratos com álcool são secagem da amostra, moagem e extração com etanol 80%. Logo, os açúcares são medidos diretamente no extrato alcoólico e o amido no resíduo insolúvel e tanto os ácidos orgânicos e a fração de polissacarídeos não amido são quantificados por diferença gravimétrica.

3.4.3. Determinação de proteínas totais

O método para determinação de proteínas baseia-se na determinação de nitrogênio, comumente é realizada pelo processo de digestão Kjeldahl. De acordo com Instituto Adolfo Lutz (2005), este método foi desenvolvido em 1883, sofrendo diversas modificações e adaptações até o presente momento, porém sempre se fundamenta em três etapas: digestão, destilação e titulação.

3.4.4. Determinação de açúcares totais

De acordo com Instituto Adolfo Lutz (2005), no grupo de compostos dos carboidratos, têm-se diversos tipos de substâncias, desde os monossacarídeos, representados pela glicose, os dissacarídeos, sendo a sacarose e a lactose, até os polissacarídeos, como amido e celulose. Qualquer que seja a amostra a ser analisada é fundamental caracterizar os carboidratos presentes de uma solução, livres de substâncias que possam interferir no processo escolhido para a sua determinação. Para isso, usam-se soluções de “clarificadores” que precipitam as substâncias interferentes.

O método utilizado no presente trabalho é o Fenol-Sulfúrico, pois dispensa a hidrólise da amostra, uma vez que usa ácido concentrado (DUBOIS et al., 1956).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentações, localizado no bloco D na sala 003, no Laboratório de Química A, localizado no bloco C na sala 112 e o Laboratório de Métodos de Análises Instrumentais, localizado no térreo do bloco H na da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa.

4.1 BIOMASSA

A microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) foi fornecida pela Universidade Federal de Lavras, em Lavras - Minas Gerais, na forma de granulado seco.

4.2 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA

Os passos realizados no presente trabalho foram sumarizados no fluxograma apresentado na Figura 1. Como início do experimento a amostra segue uma divisão, apresentada com um tratamento químico e sem o tratamento químico. A amostra sem tratamento químico consiste em aplicar diretamente o Método de Kjeldahl para determinar as proteínas totais existentes. Já a amostra com tratamento químico, teve como primeira etapa a extração de carboidratos solúveis totais por solvente, a qual foi subdividida em fase líquida e sólida. Na fase líquida, houve um preparo da amostra para posterior leitura no espectrofotômetro com o intuito de determinar os açúcares total pelo Método Fenol Sulfúrico. Na fase sólida, aplicou-se novamente o Método de Kjeldahl.

E por fim, para a obtenção dos dados empregam-se os cálculos específicos das metodologias aplicadas, que serão descritas detalhadamente nos tópicos seguintes.

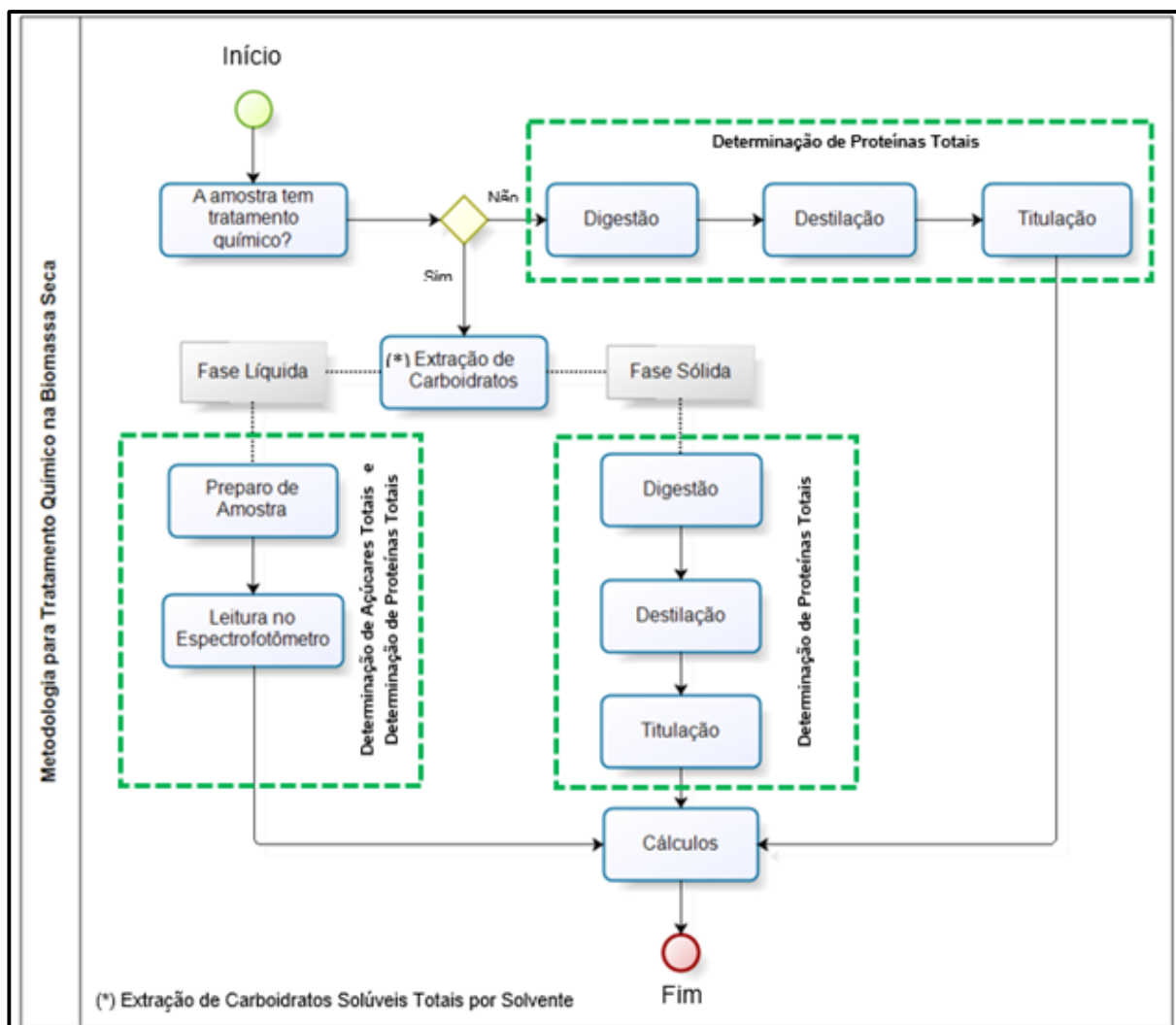


Figura 1: Fluxograma da Metodologia para Tratamento Químico na Biomassa Seca.

Fonte: Autoria própria, 2019.

4.2.1 Planejamento experimental de Plackett & Burman

Foi desenvolvido um planejamento estatístico experimental para otimizar as condições de extração dos carboidratos, como o tempo, a temperatura, a concentração do solvente e a quantidade de biomassa.

Para dispor os fatores investigados ao planejamento experimental e encaminhar a uma aplicação de pesquisa exploratória com baixas aplicações, foi utilizada uma matriz fatorial Plackett & Burman N=15, utilizando 3 valores diferentes para cada fator, baseando-se na temperatura de ebulição do solvente etanol, quantidade mínima de biomassa a ser digerida e tempo máximo para realização da extração, conforme a Tabela 1 representada abaixo.

Tabela 1: Planejamento Experimental Plackett-Burman com matriz fatorial N=15

Experimento	Temperatura (°C)	EtOH (%)	Tempo (min)	Biomassa (g/L)
1	120	100	25	1
2	80	100	25	10
3	120	10	5	1
4	80	100	5	1
5	80	100	25	1
6	120	10	25	10
7	80	10	5	10
8	100	55	15	5,5
9	120	100	5	10
10	80	10	5	1
11	100	55	15	5,5
12	80	10	25	10
13	120	100	5	10
14	120	10	25	1
15	100	55	15	5,5

Fonte: Autoria própria, 2018.

Desse modo, com o desenvolvimento do planejamento experimental Plackett & Burman foi possível criar as combinações de tratamento para investigar de forma eficiente e econômica os efeitos dos fatores especificados sobre a variável de interesse (MONTGOMERY, 2001).

4.2.2 Extração de carboidratos por solvente

Para extração de carboidratos solúveis totais, foi realizada secagem da amostra em uma estufa de 80°C e em seguida a maceração. Nesta amostra macerada foi adicionada uma concentração conhecida de etanol 80% e levada para um sistema de aquecimento por um tempo pré-determinado. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon, sendo desse extrato retirado algumas alíquotas

para quantificação dos teores de carboidratos solúveis totais pelo método Fenol Sulfúrico.

Já os resíduos das extrações alcoólicas foram separados por uma filtração simples com água destilada e sendo posteriormente levado a estufa de 80°C. Após o processo de secagem da amostra, estes foram utilizados para quantificar o teor de proteínas totais.

4.2.3 *Determinação de proteínas totais*

Método de Kjeldahl

a) Materiais

Balança analítica, bloco digestor, destilador de nitrogênio, suporte com garra metálica para titulação, tubos micro e macro de Kjeldahl, erlenmeyer de 250 mL, béquer de 100 mL, bureta de 25 mL, espátula, papel de alumínio, micropipeta monocal, ponteiros para micropipeta de 1 e 5 mL.

b) Reagentes

Ácido sulfúrico concentrado, ácido bórico a 2%, ácido clorídrico diluído 0,02 M, sulfato de potássio anidro, sulfato de cobre anidro, indicador vermelho de metila a 1%, indicador verde de bromocresol a 1%, hidróxido de sódio 11 M e água destilada.

OBS: mistura catalítica de sulfato de potássio e sulfato de cobre anidro na proporção 6:0,3.

c) Procedimento

Etapa da Digestão: Pesou 1 g da amostra em papel alumínio e transferiu para um tubo micro de Kjeldahl. Adicionou 6 g da mistura catalítica e 25 mL de ácido sulfúrico. Em seguida, o tubo foi levado ao aquecimento no bloco digestor até a solução se tornar azul - esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos).

Ao chegar nessa coloração, a solução foi aquecida por mais uma hora e deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente.

Etapa de Destilação: Transferiu-se a amostra da etapa anterior para um tubo macro de Kjeldahl e acoplou imediatamente ao destilador de nitrogênio. Adicionou-se 15 mL de solução de hidróxido de sódio 11M no copo receptor do destilador. Abrindo a torneira cuidadosamente para que a solução de hidróxido de sódio escorresse para o tubo contendo a amostra. Em seguida, lavaram-se as paredes internas do copo receptor com água destilada. Em um erlenmeyer, foram adicionados 5 mL de ácido bórico a 2%, 3 gotas do indicador vermelho de metila e 3 gotas do indicador verde de bromocresol, homogeneizando e conectando na saída do condensador do destilador. E por fim, ligou-se o sistema de aquecimento do destilador e procedeu com a destilação até obter cerca de 50 mL de destilado.

Etapa de Titulação: Completou-se o volume da bureta com a solução de ácido clorídrico diluído 0,02 M e acoplou no suporte com garra metálica. Procedeu-se a titulação do erlenmeyer contendo a amostra até a viragem da cor azul para rósea. O volume gasto foi anotado para realizar os cálculos da porcentagem de proteínas contidas na amostra.

Cálculo do teor de nitrogênio total

$$\%N = \frac{(Va - Vb) \cdot N \cdot 0,1 \frac{mol}{L} \cdot 0,014 mg \cdot 1000 mL \cdot 100\%}{P}$$

Dado que:

Va – Volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL)

Vb – Volume de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (mL)

N – Concentração do ácido clorídrico usado no experimento

0,1 mol/L – Fator de correção do ácido clorídrico

0,014 mg – massa do nitrogênio (mg)

1000 mL – dado para conversão de unidade mL para L

100 % – dado para conversão da resposta em porcentagem

P – Peso da amostra (mg)

Cálculo e conversão do teor de nitrogênio total para o teor de proteína

$$\%Proteína = N.F$$

Dado que:

N – Teor de nitrogênio total na amostra

F– Fator de conversão de nitrogênio em proteína para outros tipos de amostra (6,25)

Método Reagente de Bradford

O princípio do método baseia-se na interação do corante com a proteína, formando um complexo de cor azul. Para calcular a concentração de proteína utilizou-se uma curva de calibração padrão com albumina bovina (BSA) na faixa de concentração de 0 a 1500 µg/mL, sendo necessário a construção dessa curva, assim foram adicionados 37,5 mg de BSA e água destilada para completar 25 mL do balão volumétrico. Retirou-se alíquotas de 0; 0,33; 0,83; 1,66; 2,5; 3,33 e 5 mL dessa solução e completando com água destilada até obter um volume total de 5 mL nos tubos de ensaio, como podemos ver no Gráfico 1 a seguir.

Aplicou-se o método de Reagente de Bradford apenas para a fase líquida, sendo adicionados 0,5 mL do Reagente de Bradford à 5 mL das 15 amostras diluídas (proporção de 2:3) e, em seguida foram efetuadas a leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm.

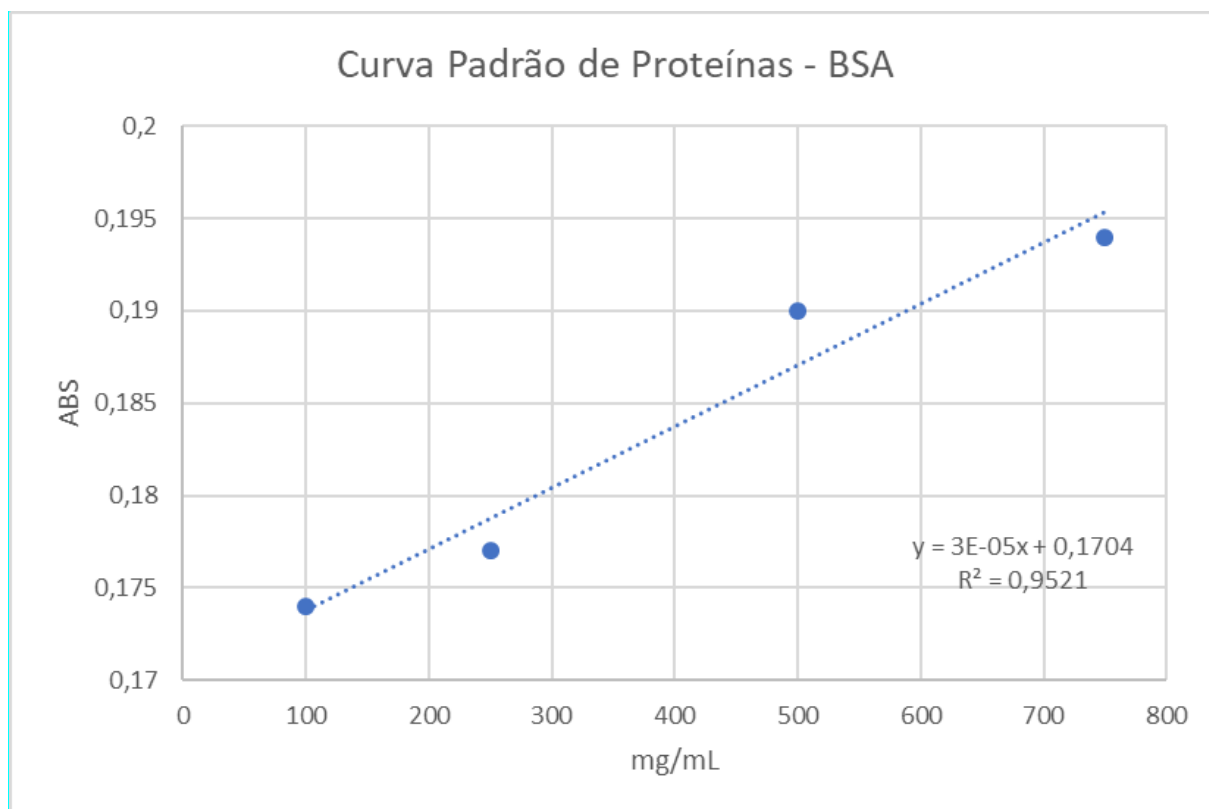


Gráfico 1: Curva de Calibração Padrão de Proteínas – BSA

Fonte: Autoria própria, 2019.

4.2.4 Determinação de açúcares totais

Método Fenol Sulfúrico

a) Materiais

Espectrofotômetro, estante para tubos, tubos Falcon de 15 mL, béquer de 500 mL, balão volumétrico de 10 mL, micropipeta monocal, ponteiros para micropipeta de 1 e 5 mL.

b) Reagentes

Amostra, Fenol 5%, ácido sulfúrico concentrado e água destilada.

d) Procedimento

Retirou-se uma alíquota de 2 mL do sobrenadante ou filtrado (fase líquida obtida da extração) e a esta solução adicionou-se uma mistura composta por 1 mL de fenol 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Como as amostras apresentaram uma coloração escura proveniente da reação do método aplicado, foram realizadas diluições na proporção de 1:9 para que fossem realizadas as leituras no equipamento Espectrofotômetro CINTRA 10 – UV Visible Spectrometer em um comprimento de onda de 490 nm (DUBOIS et al., 1956).

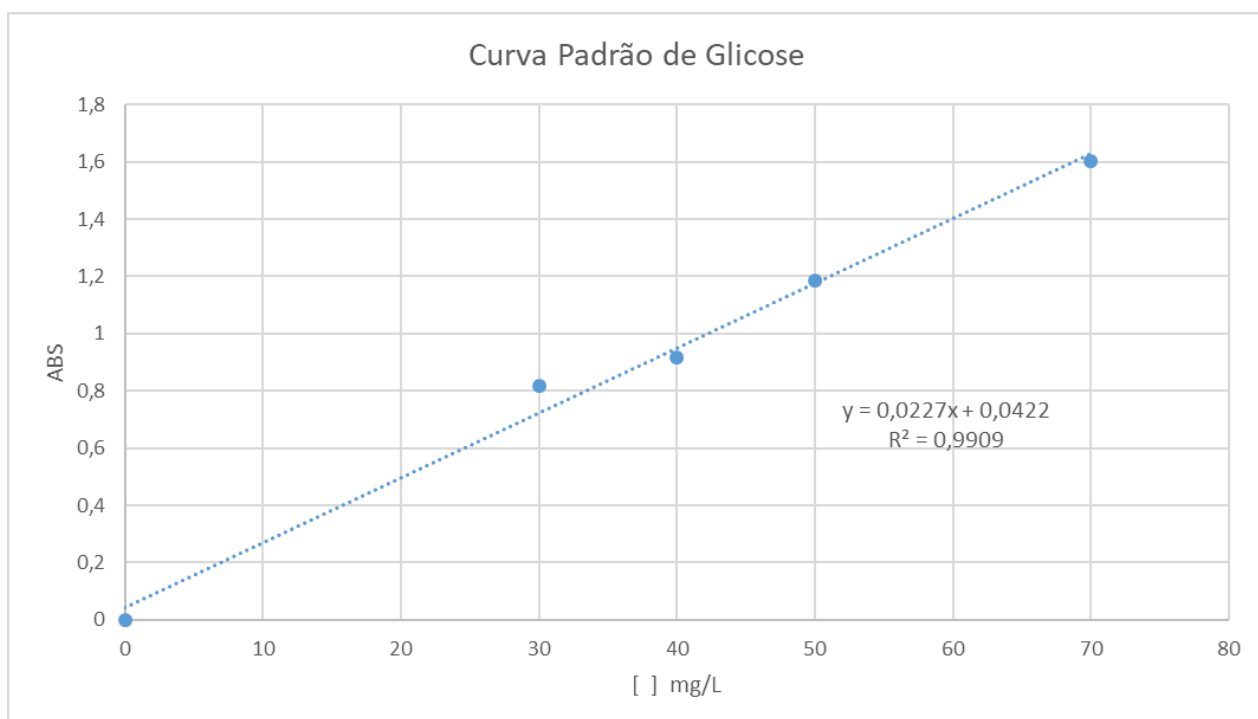


Gráfico 2: Curva de Calibração Padrão de Glicose

Fonte: Autoria própria, 2018.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a discussão dos resultados utilizou-se o mesmo fluxograma caracterizado no item 4.2, mas com uma descrição mais detalhada das linhas de mapeamento da metodologia.

5.1 AMOSTRA COM TRATAMENTO QUÍMICO NA BIOMASSA SECA

5.1.1 Extração de carboidratos por solvente

O tratamento químico na biomassa seca na amostra consiste em uma série de etapas, como demonstrado na Figura 2 do fluxograma abaixo. Tendo como início principal a extração de carboidratos através do uso de solvente.

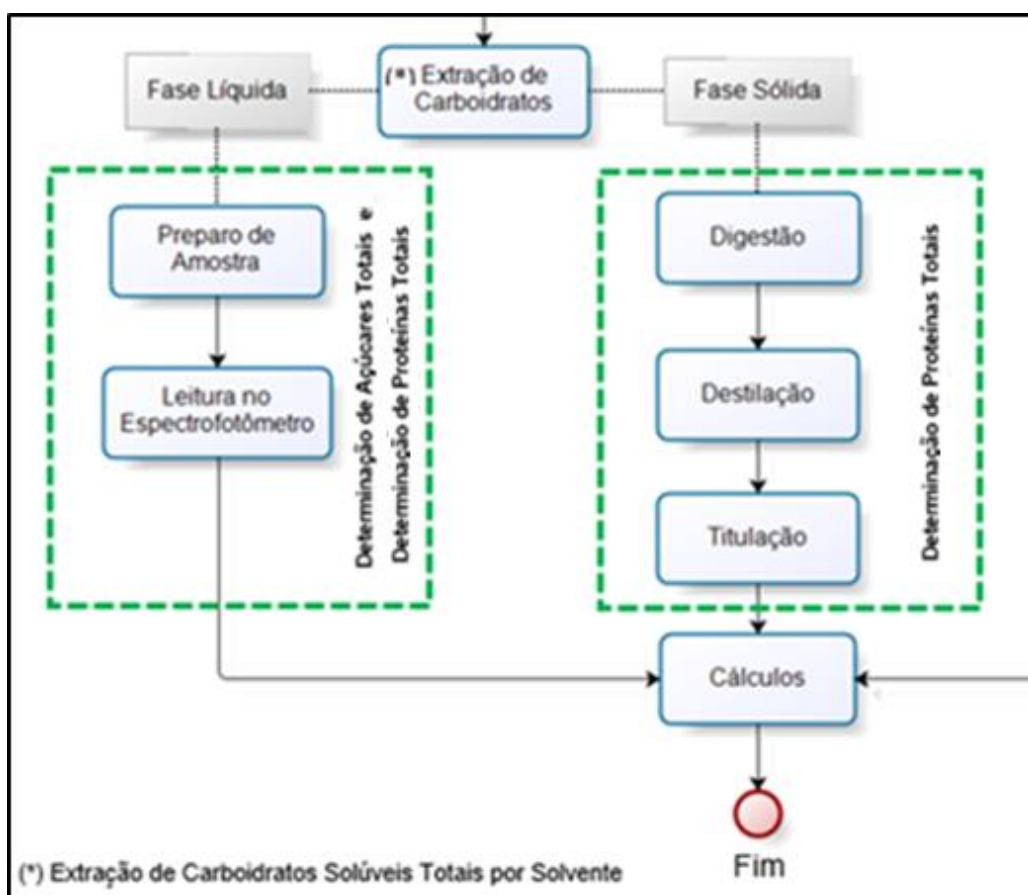


Figura 2: Fluxograma da Metodologia com foco no Tratamento Químico proposto

Fonte: Autoria própria, 2019.

Para realizar a extração em diferentes temperaturas, foram utilizados os seguintes sistemas de aquecimento: estufa de secagem, banho maria e a autoclave, levando em conta o controle do tempo de extração. Na primeira extração, o processo não foi eficiente pois a estufa de secagem e o equipamento de banho maria não chegaram na temperatura desejada e extrapolaram o tempo definido. Buscando maior eficiência do processo e utilizando outro procedimento para aquecimento, usou-se a autoclave para uma temperatura de 120°C e um sistema acoplado de béquer, termômetro e chapa aquecedora para as temperaturas de 80 e 100 °C, como ilustrado na Figura 3 a seguir.

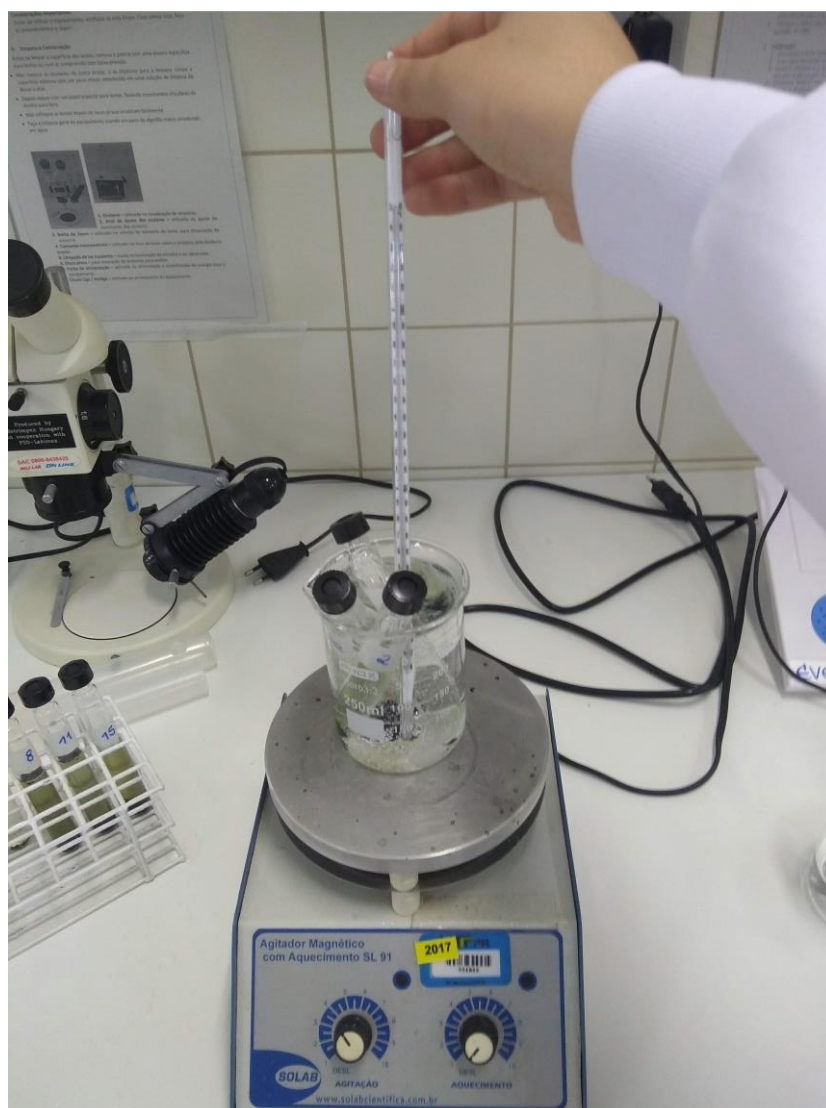


Figura 3: Sistema de aquecimento para extração de carboidratos por etanol.
Fonte: Autoria própria, 2018.

A fim de obter a separação das fases líquida e sólida, aguardou-se o resfriamento das amostras à temperatura ambiente. E, em seguida, efetuou-se uma filtração simples das amostras. O filtrado obtido foi armazenado em tubos Falcon enquanto a torta retida no meio filtrante foi levada à estufa de secagem a 80°C, sendo estes os produtos para as próximas etapas do fluxograma apresentado na Figura 2.

5.1.2 Determinação de açúcares totais

Para determinar os açúcares totais da amostra com tratamento químico, foram feitas as análises na fase líquida, obtida pela filtração da etapa de extração de carboidratos descrita no tópico anterior.

E, através da curva padrão de glicose, apresentada no Gráfico 2, desenvolveu-se os cálculos para a determinação de concentração de açúcares totais por meio da equação da reta obtida da curva padrão, multiplicado pelo fator de diluição.

Os valores de concentração de carboidratos foram lançados no planejamento experimental Plackett & Burman, o qual nos forneceu as respostas dos 15 experimentos, apresentados na Tabela 3. Como também, forneceu o número do experimento que apresentou melhores condições de extração de carboidratos pelo tratamento químico - o experimento de número 6: 10g/L biomassa, 10% etanol, 120°C de temperatura e 25 min de tempo de extração, representado na última linha da Tabela 2 a seguir:

Tabela 2: Melhor condição de extração de carboidratos por etanol (Cur Value)

Term	Biomassa (g/L)	EtOH (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Data Min	1	10	80	5
Data Avg	5,5	55	100	15
Data Max	10	100	120	25
Cur Value	10	10	120	25

Fonte: Programa de Planejamento Experimental Plackett & Burman, 2019.

Tabela 3: Planejamento Experimental Plackett & Burman com resposta à concentração de carboidratos.

Experimento	Temperatura (°C)	EtOH (%)	Tempo (min)	Biomassa (g/L)	Resposta (g/L)
1	120	100	25	1	89,77
2	80	100	25	10	133,39
3	120	10	5	1	99,47
4	80	100	5	1	86,69
5	80	100	25	1	96,82
6	120	10	25	10	656,29
7	80	10	5	10	449,25
8	100	55	15	5,5	343,08
9	120	100	5	10	327,22
10	80	10	5	1	142,2
11	100	55	15	5,5	321,49
12	80	10	25	10	561,14
13	120	100	5	10	194,18
14	120	10	25	1	173,92
15	100	55	15	5,5	331,62

Fonte: Autoria própria, 2019.

Através do programa, foram levantadas as informações sobre quais fatores são significativos baseados em uma equação indicada na Figura 4. Vemos que os fatores mais significativos são b1 e b2, concentração de biomassa e concentração do solvente etanol, ambos indicados por marcador amarelo. Já era esperada que a concentração de biomassa fosse um dos fatores significativos, pois quanto mais biomassa estiver presente em uma amostra mais carboidratos serão extraídos, como evidenciado no experimento 6 representado na Tabela 3.

$Resp_1 = b0 + b1*Biomass(g/L) + b2*EtOH(\%) + b3*Time(min) + b4*Temperature(^{\circ}C)$							
		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	137,10	0,432	167,49	236,09	510,29	0,819	
b1	30,23	0,00110	6,681	15,35	45,12	4,525	1,000
b2	-2,137	0,00950	0,668	-3,626	-0,649	3,199	1,000
b3	3,436	0,280	3,006	-3,263	10,13	1,143	1,000
b4	0,297	0,847	1,503	-3,052	3,647	0,198	1,000

Figura 4: Planejamento Experimental Plackett-Burman com dados dos fatores significativos.

Fonte: Programa de PE Plackett-Burman, 2019.

O interessante desse planejamento foi visualizar o efeito da concentração de etanol, representada pelo Gráfico 3, quanto menor a concentração de etanol utilizada na extração, maior foi a extração de carboidratos resultando em uma menor extração de proteínas. Pois, segundo Instituto Adolfo Lutz (2005), o solvente etanol em altas concentrações não consegue extrair em grandes quantidades esse tipo de carboidrato caracterizado como polissacarídeos, representado pelo amido, celulose e glicogênio, sendo apenas em carboidratos do tipo monossacarídeos. Outra consideração a respeito dessa informação é quanto a solubilidade dos polissacarídeos, pois sabe-se que são divididos em solúveis e insolúveis em água (LEHNINGER, NELSON e COX, 2000), daí, a importância de caracterizar os carboidratos presentes na amostra antes de qualquer análise a ser realizada. Em vista disso, os carboidratos presentes na amostra poderiam ser insolúveis nessas condições de extração e estarem presentes na fase sólida, interferindo no processo escolhido para a sua determinação (DEINUM e MAASSEN, 1994).

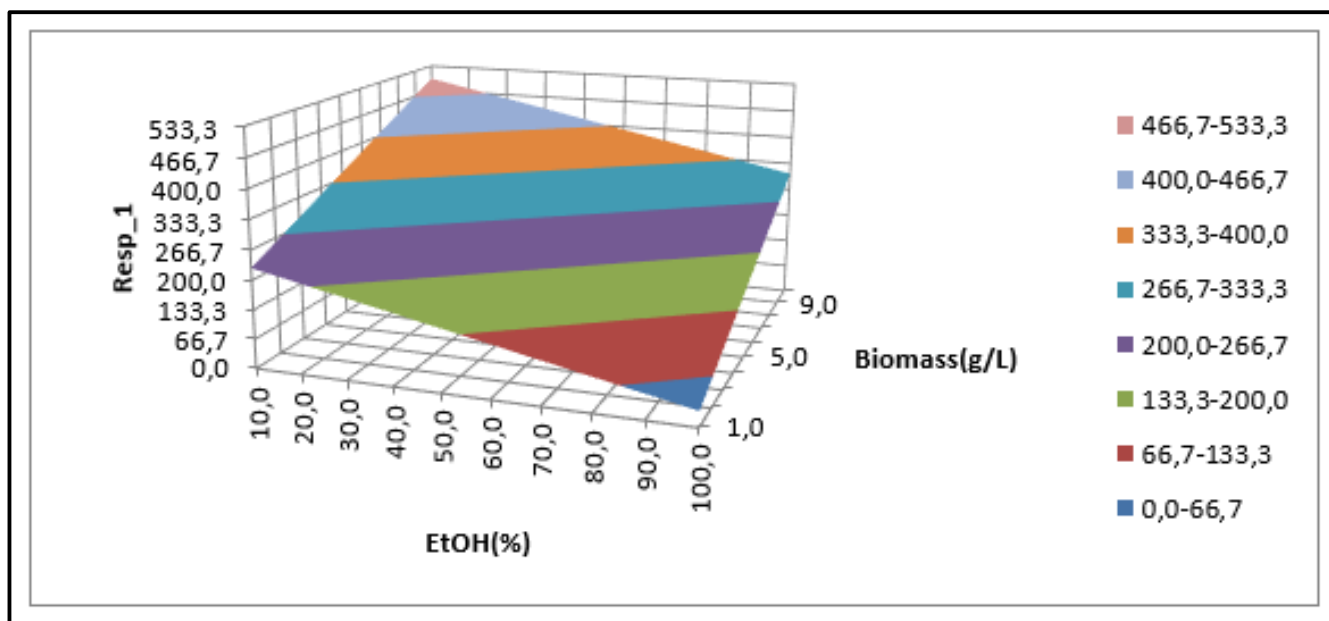


Gráfico 3: Planejamento Experimental Plackett & Burman em resposta à concentração de carboidratos.
Fonte: Programa de Planejamento Experimental Plackett&Burman, 2019.

5.1.3 Determinação de proteínas totais

Para quantificar o teor de proteínas totais na fase sólida e na líquida utilizou-se o método de Kjeldahl, mas devido ao não atendimento descrito na literatura, desenvolveu-se inúmeras modificações na metodologia a fim de adequar para a amostra de estudo, estando detalhado no Apêndice.

Por isso, aplicou-se o método de Reagente de Bradford apenas para a fase líquida. Com os dados obtidos, estes foram lançados no planejamento experimental Plackett & Burman, fornecendo as respostas dos 15 experimentos, apresentados na Tabela 4.

Todas as informações foram geradas pelo programa, o qual forneceu os fatores mais significativos baseados em uma equação indicada na Figura 5. Neste, vemos que os fatores são b1 e b2, concentração de biomassa e temperatura de extração, ambos indicados por marcador amarelo.

Tabela 4: Planejamento Experimental Plackett-Burman com resposta à concentração de proteínas.

Experimento	Temperatura (°C)	EtOH (%)	Tempo (min)	Biomassa (g/L)	Resposta (g/L)
1	120	100	25	1	0,8250
2	80	100	25	10	1,8585
3	120	10	5	1	0,4178
4	80	100	5	1	0,7783
5	80	100	25	1	0,6363
6	120	10	25	10	2,7125
7	80	10	5	10	0,6338
8	100	55	15	5,5	1,2475
9	120	100	5	10	2,3288
10	80	10	5	1	0,4278
11	100	55	15	5,5	1,0623
12	80	10	25	10	0,6173
13	120	100	5	10	2,1900
14	120	10	25	1	0,5405
15	100	55	15	5,5	1,2778

Fonte: Autoria própria, 2019.

<i>Resp_1 = b0 + b1*Biomass(g/L) + b2*Temperature(°C) + b3*EtOH(%) + b4*Time(min)</i>							
		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	-1,591	0,04624	0,700	-3,150	0,03223	2,274	-
b1	0,124	0,00122	0,02790	0,06218	0,187	4,457	1,000
b2	0,01693	0,02246	0,00628	0,00294	0,03092	2,696	1,000
b3	0,00605	0,05532	0,00279	0,000167	0,01227	2,168	1,000
b4	0,00345	0,789	0,01256	-0,02453	0,03142	0,274	1,000

Figura 5: PE Plackett & Burman com dados dos fatores significativos para elevação do teor de proteínas.

Fonte: Programa de PE Plackett & Burman, 2019.

Como já comentado no resultado de planejamento experimental com relação à concentração de carboidratos, era esperada que a concentração de biomassa fosse um dos fatores significativos. O ideal é que na mesma condição do experimento pudesse ser extraído o máximo de carboidratos e mínimo de proteínas da biomassa. Mas como podemos analisar na Tabela 4, o experimento 6 não atendeu o resultado desejado, pois apresentou-se com o maior valor de extração de proteínas em relação aos demais experimentos.

Por isso a divergência quanto ao resultado fornecido pelo programa, dentre os 15 experimentos estudados, o que apresentou a melhor condição para extração mínima de proteínas é o experimento 10, com as seguintes características: 1g/L de biomassa, 10 % de solvente etanol, 80°C de temperatura e 5 minutos de extração, sendo apresentadas na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Melhor condição de extração mínima de proteínas (Cur Value)

Term	Biomassa (g/L)	EtOH (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Data Min	1	10	80	5
Data Avg	5,5	55	100	15
Data Max	10	100	120	25
Cur Value	1	10	80	5

Fonte: Programa de Planejamento Experimental Plackett & Burman, 2019.

Ainda sobre os dados obtidos pelo programa, podemos realizar uma comparação entre os experimentos 3 e 10 da Tabela 4, tendo como única diferença o valor da temperatura de extração, 120 e 80°C, respectivamente. Provavelmente o experimento 10 tenha sido sugerido como melhor opção, mesmo apresentando uma redução de 0,0100 g/L no valor da resposta, este seria justificado pela facilidade em atingir a temperatura de forma mais rápida e eficaz, como podemos observar no Gráfico 4. Outra análise é quanto ao experimento 12, pois apresenta um valor próximo ao ideal para extração de carboidratos e um valor médio para extração mínima de proteínas, mas para isso teria que trabalhar com uma quantidade elevada de biomassa (10g/L) em um maior tempo de extração (25 min), o que não seria viável economicamente.

Logo, podemos observar no Gráfico 4, o efeito da temperatura na extração para a elevação do teor de proteínas presentes na biomassa. Quanto menor a concentração de biomassa utilizada menor será a temperatura de extração resultando em uma elevação no teor de proteínas.

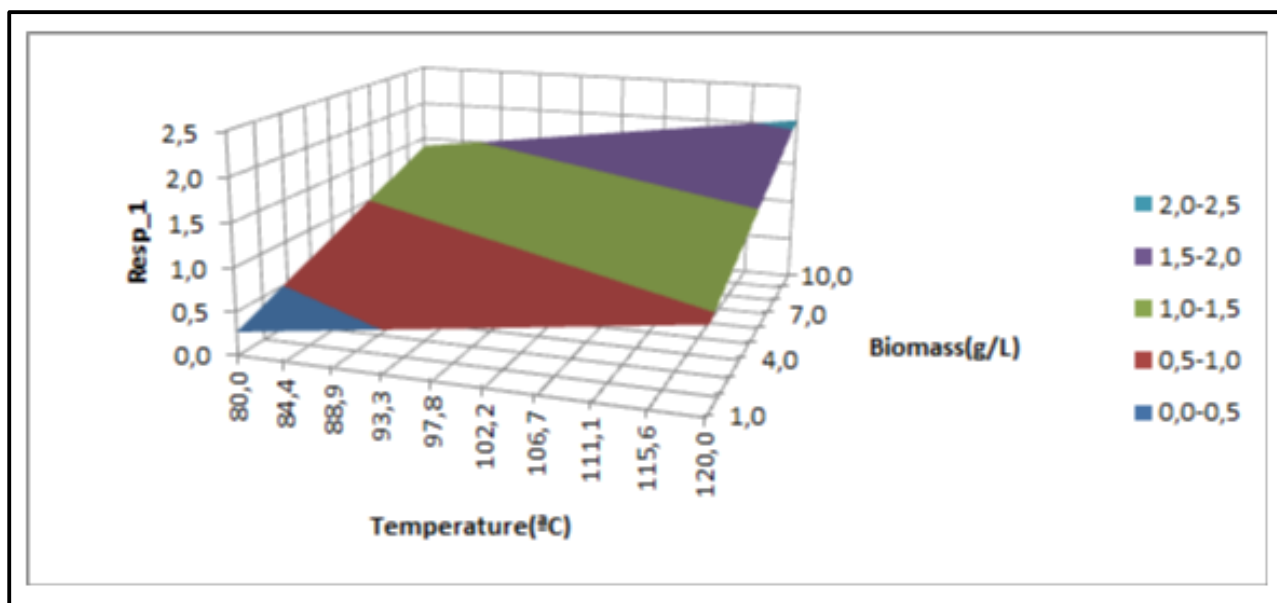


Gráfico 4: Planejamento Experimental Plackett-Burman com resposta à concentração de proteínas.

Fonte: Programa de PE Plackett-Burman, 2019.

5.2 AMOSTRA SEM TRATAMENTO QUÍMICO NA BIOMASSA SECA

O procedimento sem tratamento químico na biomassa seca na amostra consiste em uma única etapa, a determinação de proteínas totais, desenvolvido pelo método de Kjeldahl, como demonstrado na Figura 6 de uma parte do fluxograma apresentado no item 4.2.

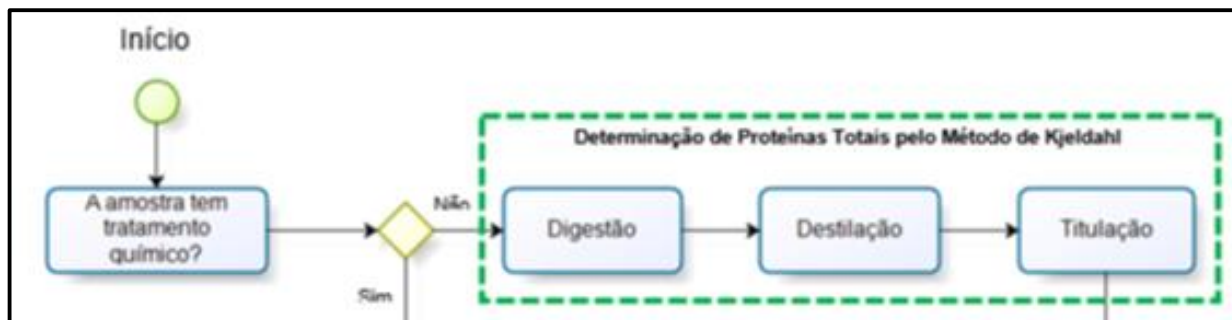


Figura 6: Fluxograma da Metodologia com foco no não Tratamento Químico proposto

Fonte: Autoria própria, 2019.

Como já descrito anteriormente, todo o procedimento que envolveu o método de Kjeldahl está detalhado no Apêndice.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi elevar o teor de proteínas da biomassa seca da cianobactéria *Spirulina platensis* por extração de carboidratos utilizando etanol como solvente através de uma aplicação da ferramenta Planejamento de Experimentos do tipo Plackett & Burman, por meio da análise de variáveis, buscando demonstrar a melhor condição para a extração de carboidratos e conseqüentemente elevar o teor proteico.

Dessa forma, o procedimento adotado e implementado, resultou em fatores significativos para o cumprimento dos objetivos propostos, sendo a concentração de biomassa e a concentração de etanol para a extração de carboidratos, enquanto os fatores de concentração de biomassa e temperatura para a elevação do teor de proteínas. Tendo em comum o mesmo valor da concentração de etanol, demonstrando que a variação na concentração do solvente é significativa para os resultados.

Surgindo duas possibilidades para a extração, uma é aumentar ao máximo a temperatura e extrair altas concentrações de carboidratos com perdas de proteínas ou reduzir a temperatura e extrair pequenas concentrações de carboidratos, mas garantindo o máximo de proteínas presentes na amostra. O que vai definir essa escolha é quanto a finalidade de uso da amostra, neste trabalho a finalidade é para fins alimentícios, justificando a utilização do solvente etanol por este apresentar baixa toxicidade, solúvel em água e proveniente de fontes totalmente renováveis.

E, em meio a essas pesquisas, foram obtidos outros resultados e observações pertinentes ao método mais utilizado para determinação de proteínas em alimentos: o método de Kjeldahl; dessa vez, aplicado ao objeto principal da pesquisa: a cianobactéria *Spirulina platensis*. Oferecendo aos próximos pesquisadores a possibilidade de direcionar as melhorias para os procedimentos que mais agregam valor, evitando desperdícios com fatores não significantes e atendendo uma das premissas básicas de caracterização química: a determinação de proteínas totais para microalgas.

6.1 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para futuros estudos sobre o aumento de teor proteico da biomassa seca da cianobactéria *Spirulina platensis* por extração de carboidratos utilizando solvente obtido a partir das metodologias desenvolvidas neste trabalho podemos incluir:

- Melhorias no processamento de amostra de *Spirulina platensis*.
- Planejamento experimental com mais fatores relacionados, como extração com diferentes solventes e em diversas concentrações.

REFERÊNCIAS

ABOU-ZEID, A.-Z. A.; KHAN, J. A.; ABULNAJA, K. O. On methods for reduction of nucleic acids content in a single-cell protein from gas oil. **Bioresource Technology**, v.52, n.1, p.21-24, 1995.

ANUPAMA; RAVINDRA P. Value-added food: single-cell protein. **Biotechnology Advances**, v.18, n.6, p.459-479, 2000.

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

BARROS, K. K da S.; SASSI, R. Uso de microalgas na alimentação humana e animal: tecnologia de produção e valor nutricional de concentrados algáceos obtidos em cultivo em massa. In: Encontro de Iniciação Científica, 15°, 2007, João Pessoa. Anais eletrônicos... João Pessoa: UFPB, 2007. Disponível em: <http://www.prrpg.ufpb.br/prpg/cgpq/enic/arquivos/anais/EnicXV_2007/livro_enic_2007_vida.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2018

BARROS NETO, BENÍCIO DE; SCARMÍNIO S. IEDA; BRUNS, E ROY. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Unicamp, 2003. 299 p.

BATISTUTI, J. P.; FREITAS, S. D. Propriedade de emulsão da farinha e do concentrado protéico de feijão-guandu (*Cajanus flavus* DC.) cultivar fava-larga. **Alimentos e Nutrição**, v.6, n. 1, p. 55-67, 1995.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, p. 312-351, 2004.

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.

BORJA, F. Spirulina. Jornal Tamanduá. Patos, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.fazendatamandua.com.br/jt-jan07.htm>>. Acesso em: 02 mai. 2018

BRASIL. Resolução RDC no 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos proteicos 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: 15 mai. 2018.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 446p.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potencial of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, n.1, p. 503-526, 1985.

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 Naturforschung**, 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.

COZZOLINO, S. M. F.; Biodisponibilidade de nutrientes - 2.ed. atual, e ampl. Barueri SP: Manole, 2007.

DARZINS, A.; PIENKOS, P.; EDYE, L. Current Status and Potential for Algal Biofuel Production. IEA Bioenergy Task 39, 2010.

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.

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 poli-insaturados**. 2006. 140 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1997. 307p.

GARCIA, R.W.D. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p. 483-492, 2003.

GARIB, C. C. **Alimentação Balanceada**: Uma proposta alternativa para merenda escolar. 2002. 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHARLEY, M. H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum, p. 29-60, 1975.

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.

HENRIKSON, R. Microalga Spirulina superalimento del futuro. 1 ed. Barcelona: Ediciones Urano, p. 222, 1994.

HENRIQUES, N. M.; NAVALHO, J. C.; VARELA, J. C.; CANCELA, M. L. Dunaliella: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de Biotecnologia**, n. 61, p. 12-18, 1998.

HOFF, F. H.; SNELL, T. W. Plankton Culture Manual. 5 ed. Dade City: Florida, Aqua Farms, p. 226, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo, S. P.). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** 4. ed. São Paulo: O Instituto, p. 122-129, 2005.

KONLANI, S.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; TRAORE, A.; DOH, A. Optimization of cell yield of *Candida krusei* SO1 and *Saccharomyces* sp. LK3G cultured in sorghum hydrolysate. **Bioresource Technology**, v.57, n.3, p.275-281, 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M **Princípios de Bioquímica.** 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LITCHFIELD, J. H. Single-Cell Proteins. **Science**, v.219, n.4585, p.740-746, 1983. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.219.4585.740> > Acesso em: 06 mai. 2018.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, p. 606, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MILANO, J.; ONG, H. C.; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; LAM, M. K.; LOH, P.K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180-197, 2016.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3ed. New York: John Wiley & Sons, 2001

NEOFOTIS, P.; HUANG, A.; SURY, K.; CHANG, W.; JOSEPH, F.; GABR, A.; TWARY, S.; QIU, W.; HOLGUIN, O.; POLLE, J. E. W. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal Research**, v.15, p. 164-178, 2016.

NICOLETTI, A. M. Enriquecimento nutricional de macarrão com uso de subprodutos agroindustriais de baixo custo. 2007. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; DOMÍNGUEZ, H.; VÁZQUEZ, M. Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. **Food Chemistry**, v.53, p.157-163, 1995.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v.102, p. 10163-10172, 2011.

PHANG, S.M.; MIAH, M.S.; CHUU, W.L.; HASHIM, M. *Spirulina* culture in digested starch factory waste water. **Journal of Applied Phycology**, v.12, n. 5, p. 395-400, 2000.

SPIEGEL. M. R. **Théorie et Applications de la Statistique**, Éditeur New- York; McGraw-Hill Paris: Ediscience, p. 342 – 358, 1982.

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.

SANCHEZ-SILVA, L.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, D.; GARCIA-MINGUILLAN, A. M.; J. VALVERDE, J. L. Pyrolysis, combustion, and gasification characteristics of *Nannochloropsis gaditana* microalgae, **Bioresource Technology**, v.130, p. 321-331, 2013.

SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. **Hydrobiologia**, v.512, n. 1, p. 39-44, 2004.

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.

STANIER, R.Y.; VAN NIEL, C.B. The concept of a bacterium. **Archiv fur Mikrobiologie**, v.42, p.17-35, 1962.

VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.38-42, 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.

APÊNDICE

Para quantificar o teor de proteínas presentes na amostra sólida advinda da separação de fases da etapa de extração, aplicou-se o método de Kjeldahl constituído de 3 etapas. A primeira etapa deste método é a digestão, e para isso foi necessário preparar a amostra de acordo com a descrição na literatura (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005) e seguir com o procedimento experimental. O resultado obtido não apresentou as características da ocorrência de uma digestão, como ausência de coloração ou pontos pretos na amostra, como podemos observar na sequência da Figura 7. Como não foi atingido a primeira etapa do método, tornou-se inexecutável os próximos procedimentos para a determinação de proteínas totais. Assim, empenhou-se em encontrar uma metodologia que se adequasse a amostra sólida.



Figura 7: Aplicação do Método de Kjeldahl na amostra em fase sólida.

Fonte: Autoria própria, 2018

De acordo com diversas literaturas com metodologia não validada, para conseguir digerir uma amostra contendo altos teores de proteínas existentes, menor deve ser a quantidade de biomassa e mistura catalítica a serem utilizadas no experimento. Havendo divergências quanto a proporção de mistura catalítica e quantidade de ácido sulfúrico concentrado. Assim, a metodologia que pareceu ser a ideal, foi utilizar a mesma quantidade de biomassa da amostra descrita no planejamento experimental no início deste trabalho, aumentando a quantidade de ácido sulfúrico, diminuindo a quantidade e proporção de mistura catalítica.

O planejamento experimental foi desenvolvido de maneira simples considerando apenas o fator biomassa, variando a proporção de mistura catalítica a ser utilizada, como é demonstrada na Figura 8 abaixo.

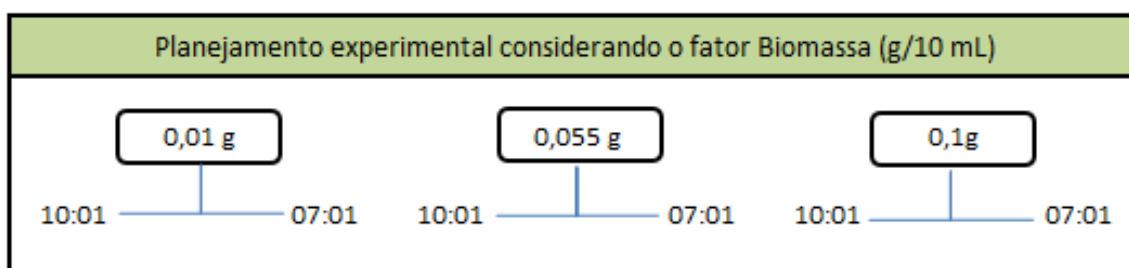


Figura 8: PE considerando o fator Biomassa (g/10mL) para aplicação na etapa de digestão no Método de Kjeldahl.

Fonte: Autoria própria, 2018

Em seguida, realizou-se o preparo das amostras de acordo com o novo planejamento experimental, resultando em 9 experimentos ou tubos como identificados na Figura 9.

Preparo de amostra para Digestão			
Tubo	Biomassa (g/10 mL)	Proporção e quantidade de MC	Ácido Sulfúrico concentrado
1	0,010	7:1 2,004 g	30 mL
2	0,010	10:1 2,004 g	
3	0,055	7:1 2,019 g	
4	0,055	10:1 2,082 g	
5	0,100	7:1 2,024 g	
6	0,100	10:1 2,081 g	

Figura 9: Preparo de amostra para a etapa de digestão de acordo com o PE

Fonte: Autoria própria, 2018.

Deu-se início à etapa de digestão, com o aquecimento no bloco digestor a uma temperatura inicial de 150 °C, com um range de temperatura gradual de 50 em 50 °C a cada 30 min até alcançar a temperatura de 450°C. Possuindo uma atenção redobrada no controle de temperatura, pois esta deve ser aumentada vagorosamente para evitar espirros de amostra para fora do tubo Kjeldahl ou até mesmo a quebra do tubo.

Ao atingir a temperatura de 260 °C, o equipamento permaneceu estável nessa temperatura em um total de 2h e 16 min de digestão. Com esse tempo de digestão, a amostra já deveria ter sido digerida, mas como nem chegou na temperatura final definida pela literatura, deduz-se que houve falha no sistema elétrico do equipamento bloco digestor. O resultado dessa tentativa de digestão está ilustrado na Figura 10, e mesmo não concluindo a procedimento experimental pode-se observar um caminho de qual experimento levaria a digestão completa da amostra, sendo representado pelo experimento 3, o qual apresenta-se com uma coloração preta menos turva se comparada aos demais experimentos.

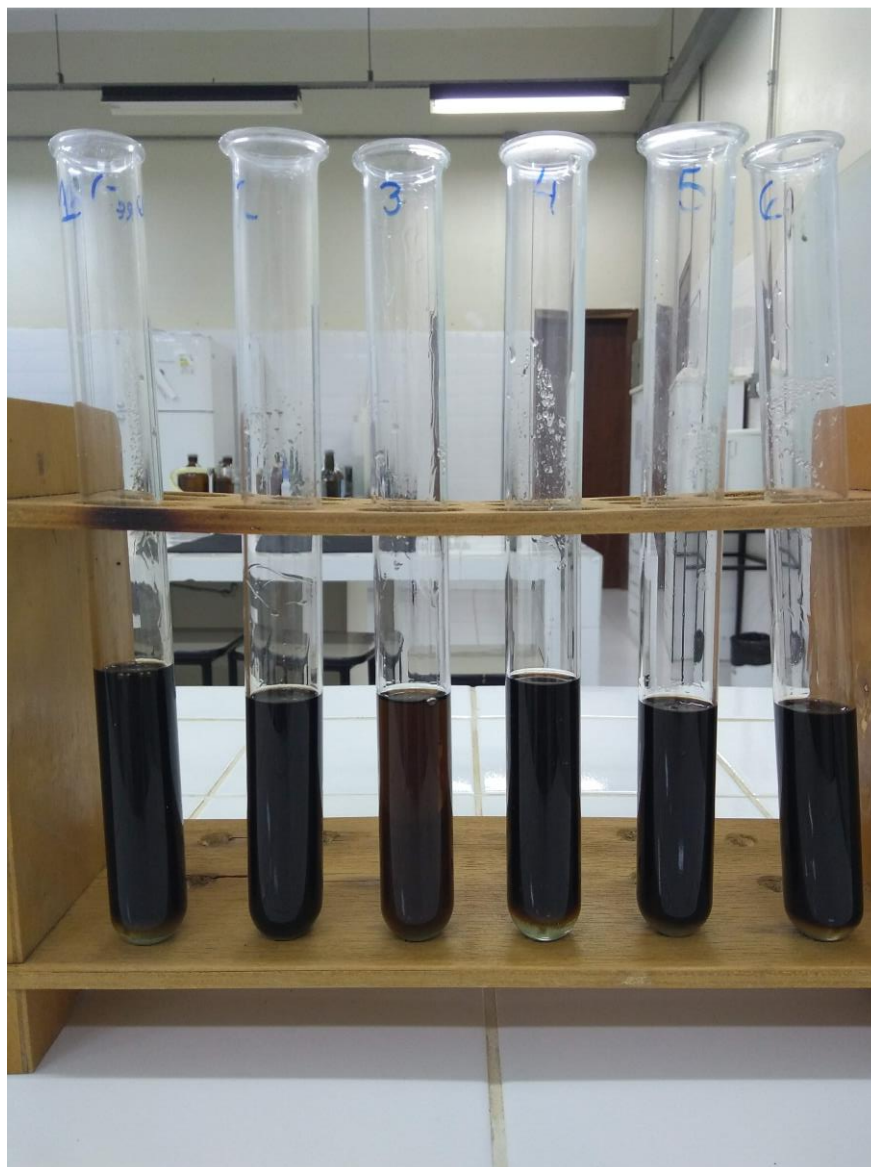


Figura 10: Resultado da segunda tentativa de digestão da amostra em fase sólida.
Fonte: Autoria própria, 2018.

Na busca de um equipamento substituto ao bloco digestor, desenvolveu-se um sistema acoplado do apoio de tubos micro Kjeldahl do próprio bloco digestor sobreposto em cadinhos em uma chapa aquecedora com controle de temperatura, para que não houvesse contato direto com os tubos, como demonstrado na Figura 11. Requitei as amostras e continuei com o procedimento, mas esse sistema de aquecimento não passava de 270°C e novamente não teve a etapa concluída, tendo como possível explicação a perda de calor por transferência por convecção e radiação.

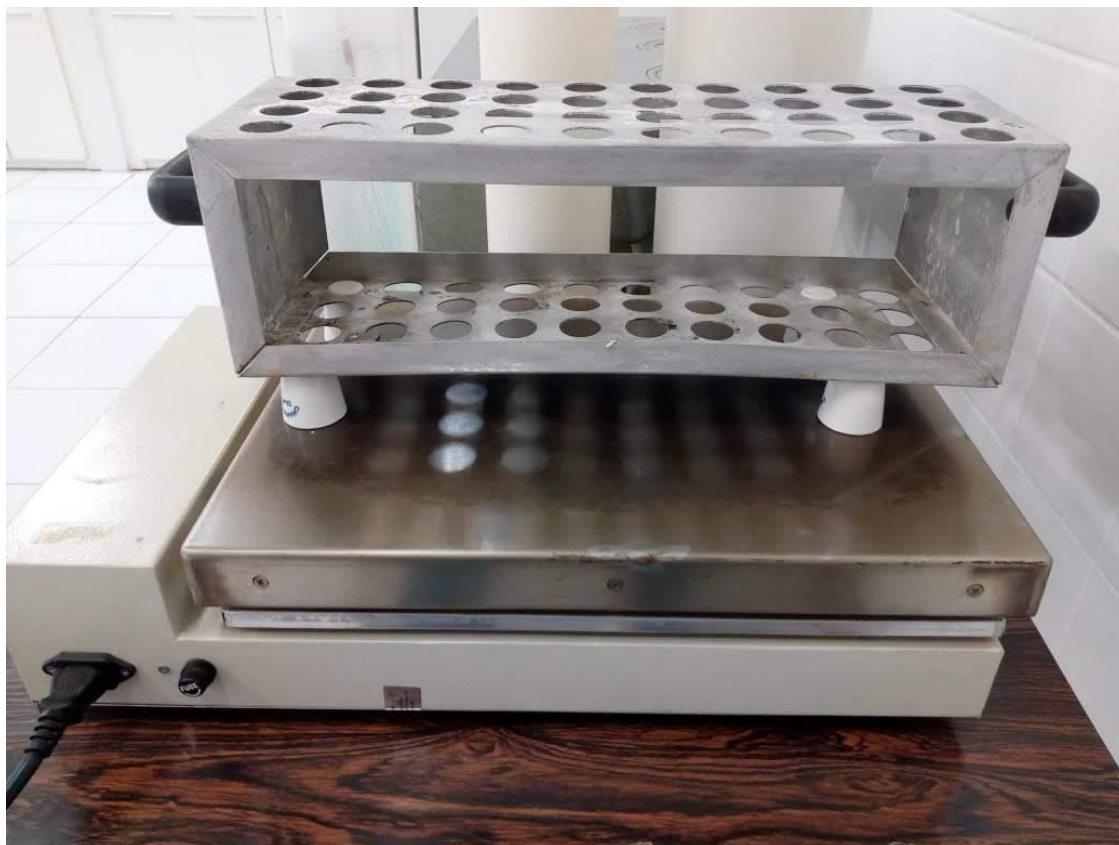


Figura 11: Sistema de aquecimento para digestão.

Fonte: Autoria própria, 2018.

Em meio as tentativas de encontrar um equipamento substituto, soube-se da existência de um bloco digestor em outro laboratório. As amostras foram aquecidas novamente para prosseguir com o procedimento da etapa de digestão por aproximadamente 2 horas e finalmente essa tentativa apresentou bons resultados. Dos 6 experimentos propostos, apenas dois deles apresentaram digestão completa, ou seja, ausência de coloração na amostra, sendo eles o experimento 3 e o experimento 6, como podemos ver na Figura 12. Outra observação importante a ser feita é comparar os resultados dos experimentos 3 e 4 da Figura 10 com os resultados da Figura 12, respectivamente. Pois, o experimento 3 mostrou-se mais avançado para o caminho a ser desenvolvido da metodologia de digestão e por fim ficou quase transparente se comparado ao experimento 4, sendo que este havia presença de excesso de mistura catalítica e não se mostrou tão eficiente de início. Logo, percebe-se a influência da proporção da mistura catalítica, já que ambos apresentaram as mesmas condições de quantidade de biomassa, mistura catalítica e ácido sulfúrico concentrado. Ainda nessa mesma linha de raciocínio, é possível

perceber a mesma influência entre os experimentos 5 e 6. Concluindo que, há uma relação entre a quantidade biomassa e a proporção de mistura catalítica, pois são diretamente proporcionais.



Figura 12: Resultado do reaquecimento da amostra em fase sólida.

Fonte: Autoria própria, 2018.

Encontrado a metodologia adequada para a completa digestão da biomassa seca, realizou-se mais um estudo aplicado em cima desse último resultado afim de otimizar os reagentes utilizados nessa nova metodologia. Assim, aplicou-se o planejamento experimental de Plackett & Burman e seguiu-se com o procedimento experimental já descrito anteriormente, conforme mostrado na Figura 13 a seguir.

Aproveitando a otimização dos dados, teve-se melhor controle da temperatura durante o aquecimento do processo, diminuindo o intervalo de temperatura de 50°C para 25°C para evitar a ocorrência de espirros de amostra e falhas no controlador do equipamento.

Planejamento experimental e preparo de amostra para otimização dos reagentes utilizados na etapa de Digestão			
Tubo	Biomassa (g/10 mL)	Proporção e quantidade de MC	Ácido Sulfúrico concentrado
1	0,010	10:1 2,0160 g	25 mL
2	0,055	10:1 2,0054 g	25 mL
3	0,010	7:1 2,0257 g	15 mL
4	0,010	7:1 2,0020 g	25 mL
5	0,032	8,5:1 2,0038 g	20 mL
6	0,055	7:1 2,0175 g	25 mL
7	0,055	10:1 2,0331 g	15 mL
8	0,055	7:1 1,9815 g	15 mL
9	0,010	10:1 2,0815 g	15 mL
10	0,032	8,5:1 2,0586 g	20 mL

Figura 13: PE para otimização dos reagentes

Fonte: Autoria própria, 2019.

As observações durante o processo de aquecimento foram:

- Com 31 minutos de aquecimento, os experimentos começaram a escurecer, passando de verde clarinho para uma coloração preta com característica turva, devido ao início de digestão.
- Com 1 hora e 29 minutos, houve início de formação de uma névoa branca.
- Com 2 horas e 9 minutos, os experimentos começaram a suar pelas paredes internas dos tubos, pois estava próximo ao ponto de ebulição do ácido sulfúrico.
- Com 2 horas e 11 minutos, os experimentos 7 e 8 apresentaram névoa branca mais espessa.
- Com 2 horas e 27 minutos, os experimentos 3, 8 e 9 apresentaram coloração mais claras se comparada aos demais, tendendo para uma tonalidade em amarelo claro.
- Com 3 horas, os experimentos 3, 8 e 9 apresentaram uma mudança de coloração de amarelo claro para verde claro.

- Os experimentos 2 e 6 continuaram com a coloração escura, não apresentando indícios de uma digestão completa.

O processo de aquecimento foi mantido por 1 hora na temperatura de 336°C ao se observar as primeiras ocorrências de digestão dos experimentos 3 e 9 se tornarem transparente. A Figura 14 ilustra o resultado final da etapa de digestão da otimização dos dados dos reagentes utilizados no experimento. E como já observados, os experimentos 3, 8 e 9 foram os que indicaram melhores resultados aos demais, apresentando uma transparência mais evidente.

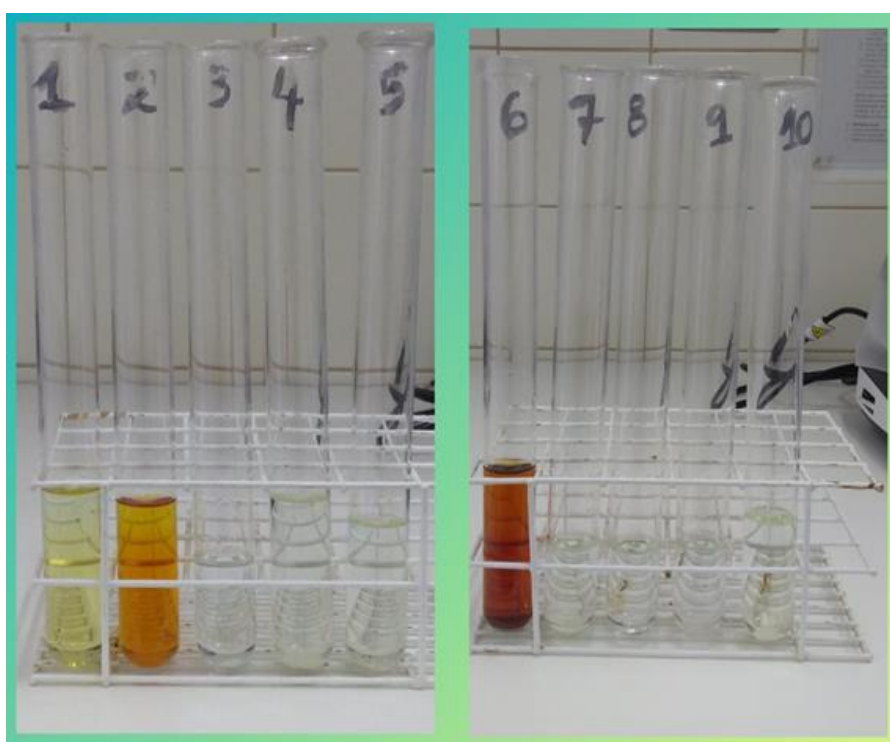


Figura 14: Otimização de reagentes baseados no PE.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Com a metodologia de digestão ajustada e otimizada, conseguiu-se prosseguir com as etapas posteriores. Para isso, foram necessários a preparação das soluções e materiais a serem utilizados no equipamento destilador de nitrogênio e na titulação dos experimentos. Por questões de tempo de operação do destilador de nitrogênio, 40 minutos em média para cada experimento ser destilado, e também na economia de reagentes, foram realizadas essas etapas apenas para os experimentos 3, 8 e 9, por apresentarem os melhores resultados de digestão.

Assim, deu-se início na destilação do experimento 8, com 100 mL de excesso de hidróxido de sódio presente no tubo macro de Kjeldahl, em seguida titulou-se com solução de ácido clorídrico diluído, obtendo 11,5 mL de volume gasto. O mesmo procedimento aconteceu para os experimentos 9, com 100 mL de hidróxido de sódio em excesso, obtendo 2,6 mL de volume gasto. Já o experimento 3, não foi possível obter o volume de ácido clorídrico gasto na titulação, pois na etapa de destilação, houve sucção do destilado na saída do condensador levando a perda total do experimento, este foi misturado com a amostra presente no tubo macro de Kjeldahl.

Com os dois resultados da titulação, desenvolveu-se os cálculos para determinar o teor de proteínas totais presentes nos experimentos 8 e 9, juntamente com o branco. Como descrito passo a passo dos cálculos no tópico 4.2.3, segue os resultados obtidos e apresentados na Tabela 6:

Tabela 6 – Cálculos dos teores de nitrogênio total e proteína total

Experimento	Teor de nitrogênio total (%)	Teor de proteína total (%)
Branco	0,56	3,5
8	0,58	3,6
9	6,72	4,2

Fonte: Autoria própria, 2019.

Devido aos baixos percentuais de proteínas apresentadas, não foram desenvolvidas as etapas de digestão, destilação e titulação dos 15 experimentos das amostras com tratamento químico, pois seria mais conveniente determinar os teores proteínas totais das amostras sem tratamento químico, pois gastaria menos tempo de operação dos equipamentos e quantidade de ácido sulfúrico concentrado já que estava em falta nos laboratórios da universidade. E também, pelo fato de testar diretamente a amostra, obtendo mais resultados para assim comparar erros associados a metodologia ou justificar a falta de caracterização da amostra.

Como já foi retratado todo o passo a passo do procedimento experimental para a determinação de proteínas totais no tópico anterior, a seguir será

apresentado apenas as informações do preparo de amostra para o procedimento sem tratamento químico com base nos melhores resultados obtidos na otimização, sendo eles: 0,010 g de biomassa seca, proporção de 7:1 de mistura catalítica e 15 mL de ácido sulfúrico concentrado, apresentando apenas modificações na quantidade de mistura catalítica.

Preparo de amostra sem tratamento químico para Digestão			
<i>Tubo</i>	<i>Biomassa (g/10 mL)</i>	<i>Proporção e quantidade de MC</i>	<i>Ácido Sulfúrico concentrado</i>
Branco 1	-----	7:1 2,002 g	15 mL
Branco 2	-----	7:1 1,499 g	
1.1	0,012	7:1 1,502 g	
2.1	0,011	7:1 1,504 g	
3.1	0,012	7:1 1,503 g	
1.2	0,011	7:1 2,018 g	
2.2	0,010	7:1 2,009 g	
3.2	0,011	7:1 2,004 g	

Figura 15: Preparo da amostra sem Tratamento Químico para a etapa de digestão

Fonte: Autoria própria, 2019.

Após o aquecimento no bloco digestor com base no range de temperatura, seguiu-se com a destilação seguido da titulação dos experimentos. Os resultados obtidos foram anotados, calculados de acordo com a mesma equação padrão e expostos em uma tabela para melhor visualização, como mostrado na Figura 16.

Cálculo e conversão do teor de proteínas totais			
Experimento	Volume gasto de ácido clorídrico	%Nitrogênio	% Proteínas
Branco 1	0,2 mL	0,560	3,500
Branco 2	0,1 mL	0,280	1,750
1.1	2,5 mL	0,610	3,810
2.1	0,4 mL	0,084	0,525
3.1	0,2 mL	0,025	0,159
1.2	0,3 mL	0,025	0,159
2.2	0,9 mL	0,196	1,225
3.2	3,2 mL	0,764	4,770

Figura 16: Cálculos e conversão do teor de proteínas

Fonte: Autoria própria, 2019.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 16, fica evidente que alguns não apresentaram uma linearidade no percentual de proteínas totais, mostrando que os experimentos 1.1 e 3.2 extrapolaram esses valores. Mas se comparar com os valores obtidos pelas amostras branco, seriam estes a serem considerados, já que na amostra em branco há ausência de biomassa.

Outra consideração a ser analisada é a quantidade de mistura catalítica, pois também apresenta influência nos resultados. Vemos na Figura 17, a diferença na quantidade dessa mistura, apresentando excesso ao fundo do tubo macro de Kjeldahl durante a etapa de destilação. Isso pode ser explicado se voltar na Figura 16, quando se utilizou 2 g de MC resultando em 3,5% de proteínas totais e 1,5 g de MC no experimento 3.2 resultando em 4,77%, se realizar uma diferença no percentual entre o experimento e a amostra, temos 1,27% e 2,06 % de proteínas totais, respectivamente. Ou seja, quanto menor a quantidade de MC utilizada no procedimento, melhor será a reação na etapa de destilação e conseqüentemente melhores resultados em relação a quantificação de proteínas.



Figura 17: Amostras com 1,5 g e 2g de mistura catalítica.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Mesmo apresentando informações relevantes a determinação de proteínas pelo método de Kjeldahl, ainda não foi atingido os percentuais esperados pela literatura.

Em decorrência aos resultados obtidos anteriormente, valeu-se de outras propostas na metodologia para quantificação de proteínas totais presentes na amostra, sendo uma análise em fase líquida obtida da etapa de extração, pois inferiu-se que as proteínas poderiam ter sido extraídas juntamente com os carboidratos.

De acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2005), a metodologia para digestão de amostras na fase líquida pelo método de Kjeldahl é adicionar 2 mL de amostra líquida não diluída em tubo macro de Kjeldahl, juntamente com 6 mL de ácido sulfúrico concentrado e 2 g de mistura catalítica, não citando a proporção dessa mistura. Como já teve um planejamento experimental desenvolvido na etapa de digestão para analisar o efeito da proporção da mistura catalítica sobre a biomassa, aplicou-se a proporção 7:1 tendo como principal fator de escolha o racionamento de reagentes utilizados. Na Figura 18 apresentada logo abaixo, têm-se os dados sobre

o preparo de amostra utilizados na etapa de digestão de amostra na fase líquida proveniente da etapa de extração de carboidratos.

Preparo de amostra utilizada na etapa de digestão de amostra na fase líquida			
<i>Tubo</i>	<i>Amostra na fase líquida</i>	<i>Proporção e quantidade de MC</i>	<i>Ácido Sulfúrico concentrado</i>
Branco	2 mL	7:1 2,003 g	6 mL
1	2 mL	7:1 1,997 g	6 mL
2	2 mL	7:1 2,001 g	6 mL
3	2 mL	7:1 1,998 g	6 mL
4	2 mL	7:1 2,002 g	6 mL
5	2 mL	7:1 2,002 g	6 mL
6	2 mL	7:1 1,997 g	6 mL
7	2 mL	7:1 2,004 g	6 mL
8	2 mL	7:1 2,001 g	6 mL
9	2 mL	7:1 2,002 g	6 mL

Figura 18: Preparo de amostra utilizada na etapa de digestão de amostra na fase líquida.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Foram preparados apenas 10 experimentos, contando com o branco, pois não havia espaço suficiente dentro do bloco digestor para dispor os tubos micro de Kjeldahl, e também por não possuir o mesmo rótulo de ácido sulfúrico concentrado utilizado desde o início deste trabalho.

Após o preparo das amostras, os tubos foram alocados no bloco digestor dando o início a etapa de digestão com o controle de temperatura e o tempo de aquecimento no equipamento, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Range de temperatura com controle de tempo no aquecimento

Temperatura (°C)	Controle de tempo
50	14h25min
100	14h35min
150	14h50min
175	15h05min
200	15h20min
225	15h35min
275	15h50min
300	16h05min
325	16h20min
350	16h35min

Fonte: Aatoria própria, 2019.

Durante o processo de aquecimento, as amostras secaram dentro dos tubos micro de Kjeldahl, como podemos ver na Figura 19. Tendo como principal justificativa a insuficiência na quantidade de ácido sulfúrico presente no experimento. Já que as amostras não chegaram nem no ponto de ebulição do mesmo, sendo finalizado o experimento com 1h14min na temperatura entre 225 e 275°C, como pode ser observado na Tabela 8. De acordo com o que é apresentado em diversas literaturas, o ponto de ebulição do ácido sulfúrico em média é 337°C.

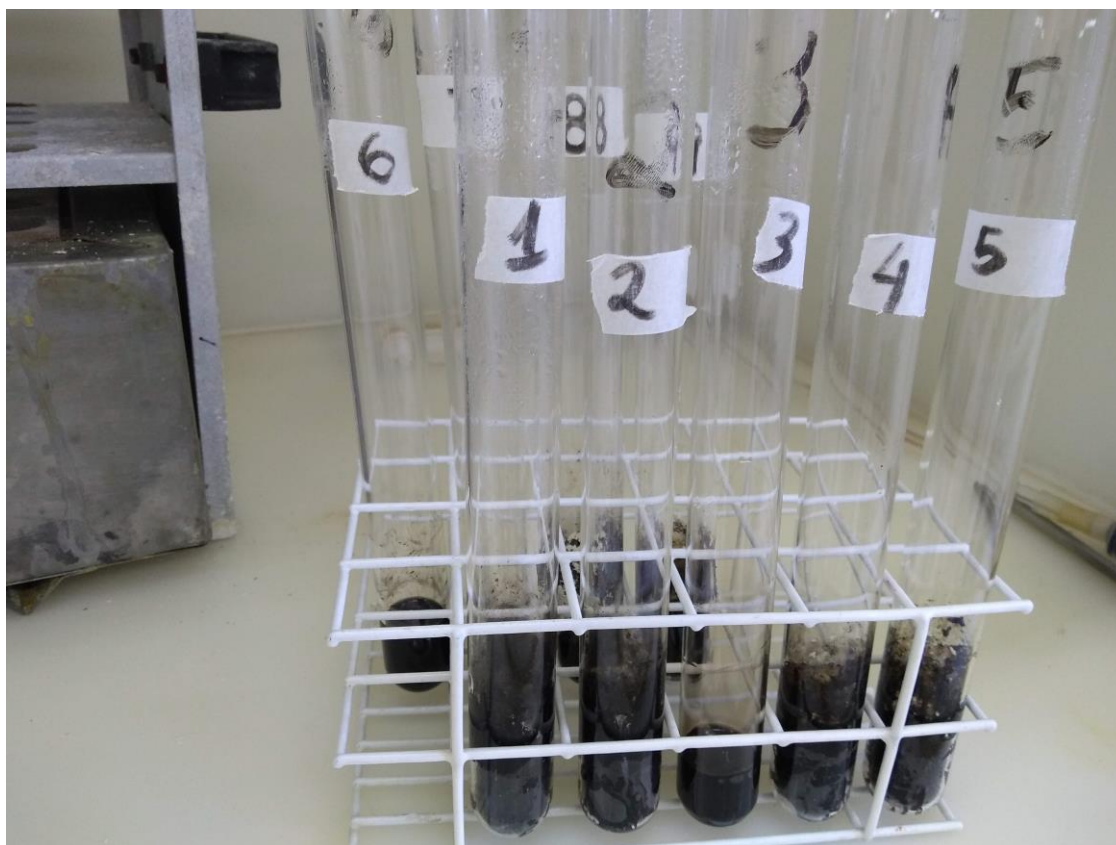


Figura 19: Aplicação do Método de Kjeldahl na amostra em fase líquida.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Tabela 8 - Range de temperatura com controle de tempo no aquecimento

Temperatura (°C)	Controle de tempo
50	14h25min
100	14h35min
150	14h50min
175	15h05min
200	15h20min
225	15h35min
275	15h50min
300	16h05min
325	16h20min
350	16h35min

Fonte: Autoria própria, 2019.

Como a digestão dessas amostras não foram bem-sucedidas, modificou-se a metodologia e aplicou-se novamente para os 10 experimentos. O preparo foi com a mesma quantidade de amostra e a proporção e quantidade de mistura catalítica, apresentando alterações apenas na quantidade de ácido sulfúrico e na adição de água destilada, conforme apresentado na Figura 20.

Preparo de amostra utilizada na etapa de digestão de amostra na fase líquida				
<i>Tubo</i>	<i>Amostra na fase líquida</i>	<i>Proporção e quantidade de MC</i>	<i>Ácido Sulfúrico concentrado</i>	<i>Água destilada</i>
Branco	2 mL	7:1 1,998 g	16 mL	8 mL
1	2 mL	7:1 1,996 g	16 mL	8 mL
2	2 mL	7:1 2,006 g	16 mL	8 mL
3	2 mL	7:1 2,001 g	16 mL	8 mL
4	2 mL	7:1 2,007 g	16 mL	8 mL
5	2 mL	7:1 2,004 g	16 mL	8 mL
6	2 mL	7:1 1,998 g	16 mL	8 mL
7	2 mL	7:1 2,005 g	16 mL	8 mL
8	2 mL	7:1 2,003 g	16 mL	8 mL
9	2 mL	7:1 2,003 g	16 mL	8 mL

Figura 20: Preparo de amostra utilizada na etapa de digestão de amostra na fase líquida.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Após o preparo das amostras, deu-se a mesma sequência descrita anteriormente para o aquecimento no bloco digestor, conforme apresentado na Tabela 9. Os resultados obtidos nessa etapa de digestão mostraram uma evolução na metodologia, visto que as amostras não secaram até a temperatura final proposta como descrito na Tabela 9. Mas não foram totalmente digeridas, pois apresentou diversas colorações, como demonstrado na Figura 21. De acordo com Instituto Adolfo Lutz (2005), sabe-se que a amostra foi digerida totalmente quando esta é caracterizada com uma coloração incolor. Por esse motivo não teve como proceder com as próximas etapas.

Tabela 9 - Range de temperatura com controle de tempo no aquecimento

Temperatura (°C)	Controle de tempo
50	16h20min
100	16h30min
150	16h45min
175	17h00min
200	17h15min
225	17h30min
275	17h45min
300	18h00min
325	18h15min
350	18h30min

Fonte: Autoria própria, 2019.

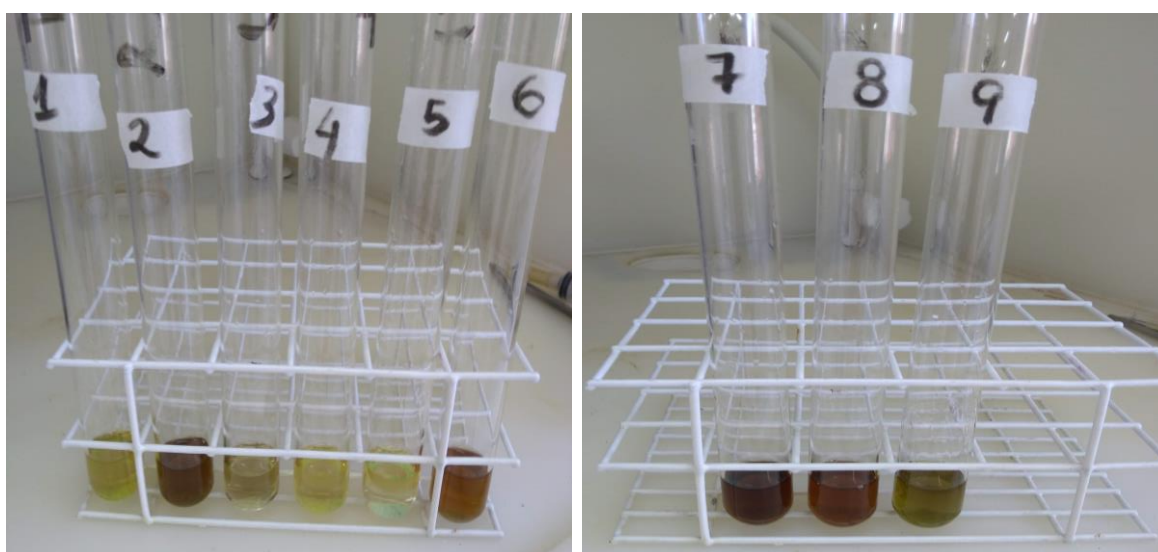


Figura 21: Resultado da aplicação do Método de Kjeldahl na amostra em fase líquida.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Vimos que houveram muitas tentativas para digerir a amostra *Spirulina platensis* pelo método de Kjeldahl, e a melhor metodologia foi aplicada para a amostra sólida. Mas, não atendeu o percentual descrito na literatura, tendo como possível explicação o preparo da amostra para a quantificação das análises.