



***Spirulina platensis* como fonte de ingredientes funcionais e testes de incorporação da sua forma livre e microencapsulada em iogurtes**

Samara Cristina da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito do programa de Dupla Diplomação

Orientadores

Prof. Doutora Maria Filomena F. Barreiro

Prof. Doutora Isabel C.F.R. Ferreira

Prof. Doutora Eliane Colla

Bragança

2018

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me sustentou e me deu forças para a conclusão deste trabalho e por seu infinito amor na realização deste sonho.

A Professora Dra. Filomena Barreiro, Dra. Isabel C.F.R Ferreira e Dra. Eliane Colla pela oportunidade, incansável dedicação, confiança e zelo na orientação deste trabalho. Por meio delas, eu me reporto a toda comunidade do Instituto Politécnico de Bragança (Portugal) e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Brasil) pelo apoio incondicional prestado no âmbito do programa de Dupla Diplomação.

Agradeço a toda equipa BioChemCore, em especial Ângela Fernandes e Lillian Barros, agradeço também a equipa LRSE-LCM em especial Isabel Fernandes, Diana Cuma e Palloma Carvalho por todo auxílio, amizade e pela disposição em esclarecer todas as dúvidas que muito contribuíram para este trabalho.

Aos meus amigos gostaria de externar minha satisfação de poder conviver com eles durante esta minha jornada. Em especial Rafaela Alves e Emanuéli Backes pela prontidão em auxiliar-me nas dificuldades vividas e pela alegria em compartilhar esta amizade. Agradeço também aos meus amigos do Grupo de Oração Universitário Intercambistas por todo carinho prestado durante este tempo de intercâmbio.

Gostaria de deixar registrado o amor incondicional e o reconhecimento à minha família, em especial aos meus pais Juvenal Silva e Valéria Silva, a minha irmã Vivian Silva e ao meu cunhado Everton Silva, que não mediram esforços para que este sonho se tornasse realidade, além da educação, confiança e amor que gravaram em meu coração a inspiração em concluir esta etapa, sou eternamente grata. Ao meu futuro esposo Mateus Pituco que esteve ao meu lado dando-me forças para nunca desistir.

Por fim, a todos os Mestres Professores das duas instituições, que ao longo de toda a jornada académica, trouxeram não somente ensinamentos para a carreira profissional, como também aprendizados e lições para toda a vida.

Gratidão!

Este trabalho foi em parte financiado por:

FCT e FEDER no âmbito do programa PT2020 (CIMO, UID/AGR/00690/2013). Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 (LA LSRE-LCM) financiado pelo FEDER, através do POCI-COMPETE2020 e por fundos nacionais através da FCT. Projeto NORTE-01-0145-FEDER-000006 financiado pelo Norte 2020, através do FEDER e FSE, com o Acordo de Parceria PT2020.



ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
Motivação e Objetivos.....	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	4
1.1.1 Alimentos Funcionais e Nutracêuticos	5
1.2 MICROALGAS.....	5
1.2.1 <i>Spirulina platensis</i> : Morfologia e Histórico	6
1.2.2 Composição Química de <i>S. platensis</i>	8
1.2.3 Propriedades Funcionais de <i>S. platensis</i>	11
1.2.4 Aplicações das Microalgas.....	12
1.2.5 Aplicações das Microalgas em Alimentos.....	13
1.2.6 Principais Problemas da Aplicação de Microalgas em Alimentos ...	16
1.2.7 Principais Soluções para a Aplicação de Microalgas em Alimentos	17
1.3 MICRO/NANOENCAPSULAÇÃO	18
1.3.1 Materiais de Parede.....	20
1.4 TÉCNICAS DE MICRO/NANOENCAPSULAÇÃO.....	21
1.4.1 <i>Spray Drying</i>	22
1.4.2 Reticulação Polimérica (<i>Crosslinking</i>)	24
1.5 TÉCNICAS USADAS PARA MICRO/NANOENCAPSULAÇÃO DE MICROALGAS	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 PADRÕES E REAGENTES	27
2.2 AMOSTRAS DE <i>S. PLATENSIS</i>	27
2.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DESIDRATADA DA MICROALGA <i>S. PLATENSIS</i>	27
2.3.1 Valor Nutricional e Energético	27
2.3.2 Açúcares Livres.....	28
2.3.3 Ácidos Orgânicos.....	29
2.3.4 Ácidos Gordos	29
2.3.5 Tocoferóis	30
2.3.6 Caracterização dos Pigmentos da <i>Spirulina</i>	31
2.3.7 Avaliação das Propriedades Bioativas	32
2.4 ESTUDOS DE MICROENCAPSULAÇÃO	39
2.4.1 Microencapsulação de <i>S. platensis</i> por <i>Spray Drying</i>	39
2.4.2 Caracterização dos Materiais de Base e Microesferas.....	40
2.4.3 Avaliação das Propriedades Bioativas das Microesferas.....	42
2.5 APLICAÇÃO EM MATRIZ ALIMENTAR.....	43
2.5.1 Incorporação em iogurtes.....	43
2.5.2 Avaliação Nutricional e Bioativa dos Iogurtes Incorporados com <i>Spirulina Livre e Microencapsulada ao Longo do Tempo de Armazenamento</i>	44
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DESIDRATADA DE <i>S. PLATENSIS</i> ..	48
3.1.1 Determinação do Valor Nutricional, Açúcares Livres e Ácidos Orgânicos.....	48
3.1.2 Determinação de Ácidos Gordos e Tocoferóis	49
3.1.3 Caracterização dos Pigmentos da Spirulina.....	51
3.2 MICROENCAPSULAÇÃO DE <i>S. PLATENSIS</i> PELA TÉCNICA DE SPRAY DRYING.....	54
3.2.1 Rendimento de Encapsulação (R), Eficiência e Carga	54
3.2.2 Caracterização dos Materiais de Base e das Microesferas.....	55
3.3 ESTUDO COMPARATIVO DAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DA SPIRULINA LIVRE E MICROENCAPSULADA.....	67
3.3.1 Atividade Antioxidante da Spirulina Livre e Microencapsulada.....	67
3.3.2 Atividade Citotóxica em Células Tumorais e Não Tumorais e Atividade Anti-Inflamatória da Spirulina Livre e Microencapsulada.....	69
3.3.3 Atividade Antimicrobiana.....	72
3.4 APLICAÇÃO EM IOGURTE.....	75
3.4.1 Avaliação do Valor Nutricional, Ácidos Gordos e Açúcares Livres ao Longo do Tempo de Armazenamento.....	76
3.4.2 Análise dos Parâmetros Físico-químicos ao Longo do Tempo de Armazenamento	77
3.4.3 Avaliação da Atividade Antioxidante	77
3.4.4 Análise Discriminante Linear	78
3.4.5 Avaliação Microscópica dos Iogurtes ao Longo do Tempo de Armazenamento	85
4. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO.....	87
5. REFERÊNCIAS	90
6. ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto microscópica de <i>S. platensis</i>	7
Figura 2: Estrutura química da ficocianina.....	10
Figura 3: Formas de comercialização de <i>S. platensis</i>	12
Figura 4: Desafios a serem superados para a adição de microalgas em alimentos.	16
Figura 5: Demonstração da localização do material de parede e material de núcleo.	18
Figura 6: Tipos de encapsulados que podem ser obtidos.	19
Figura 7: Materiais de parede de qualidade alimentar normalmente utilizados.	20
Figura 8: Mecanismo do <i>Spray Dryer</i> . (1) Preparação da solução; (2) Alimentação e pulverização; (3) Evaporação da água; (4) Saída do gás de arraste com as partículas; (5) Recolha das partículas; (6) Saída do gás de arraste; (*) Filtro de ar	23
Figura 9: Exemplificação da reação de reticulação química entre a maltodextrina e o ácido cítrico.	25
Figura 10: Descrição detalhada da encapsulação da <i>S. platensis</i> por <i>spray drying</i>	40
Figura 11: Esquema de incorporação da spirulina e microesferas no iogurte.	44
Figura 12: Análise termogravimétrica da spirulina, ácido cítrico e maltodextrina.	56
Figura 13: Análise termogravimétrica das microesferas vazias (MA).	58
Figura 14: Análise termogravimétrica das microesferas spirulina/maltodextrina (SM), spirulina/maltodextrina reticulada com ácido cítrico (SMA) comparados aos materiais de base spirulina (S) e maltodextrina (MD).	59
Figura 15: Espectros de infravermelho obtidos para os materiais de base (S, MD e AC) e microesferas (MA, SM e SMA).	60
Figura 16: Distribuição do tamanho de partícula das microesferas em volume (A) e em número (B).....	63
Figura 17: Iogurtes controlo (IC) e enriquecidos com spirulina livre (IS), encapsulada com maltodextrina (ISM) e encapsulada com maltodextrina reticulada com ácido cítrico (ISMA) no dia da incorporação (dia 0).	75
Figura 18: Efeito conjugado de FI e TA na atividade captadora de radicais DPPH (A) e poder redutor (B).	83
Figura 19: Distribuição tridimensional de marcadores FI de acordo com os coeficientes das funções discriminantes canónicas definidas a partir dos parâmetros avaliados.....	84
Figura 20: Esquema da incorporação das microesferas e o seu comportamento no iogurte.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Categorias dos alimentos funcionais.	4
Tabela 2: Composição química de seis microalgas.	6
Tabela 3: Quantidade de aminoácidos essenciais presentes na <i>S. platensis</i>	9
Tabela 4: Quantidade de aminoácidos não essenciais presentes na <i>S. platensis</i>	9
Tabela 5: Produtos obtidos por meio da microalga e possíveis aplicações.	13
Tabela 6: Produtos adicionados com <i>S. platensis</i> e, respectivas quantidades de microalga utilizada e concentrações que conduziram aos melhores resultados segundo parâmetros sensoriais.	14
Tabela 7: Técnicas de encapsulamento e os respectivos ingredientes encapsulados.	21
Tabela 8: Utilização do método <i>Spray drying</i> na encapsulação de ingredientes e compostos alimentares.	23
Tabela 9: Diferentes técnicas de microencapsulação de microalgas utilizadas na literatura.	25
Tabela 10: Descrição das quantidades e nomenclaturas utilizadas na incorporação dos iogurtes.	44
Tabela 11: Valor nutricional e energético, açúcares livres e ácidos orgânicos de <i>S. platensis</i>	48
Tabela 12: Perfil de ácidos gordos e tocoferóis de <i>S. platensis</i>	50
Tabela 13: Carotenoides e clorofilas de <i>S. platensis</i>	52
Tabela 14: Quantidade de ficocianina extraída de <i>S. platensis</i> com diferentes solventes.	53
Tabela 15: Perfil de degradação térmica dos materiais de base.	57
Tabela 16: Perfil de degradação térmica das microesferas.	58
Tabela 17: Valores de D ₁₀ , D ₅₀ e D ₉₀ para distribuição em volume e número das microesferas.	62
Tabela 18: <i>Span</i> das microesferas obtidos por meio da distribuição em volume.	63
Tabela 19: Microscopia ótica da spirulina e microesferas.	65
Tabela 20: Microscopia eletrônica de varrimento da spirulina e das microesferas.	66
Tabela 21: Resultados obtidos da atividade antioxidante por OxHLIA das diferentes amostras.	68
Tabela 22: Propriedades bioativas da spirulina, maltodextrina e microesferas obtidas.	71
Tabela 23: Atividade antimicrobiana (CMI e CMB, mg/mL) de <i>S. platensis</i> livre (S), maltodextrina (M) e microesferas (SM), (SMA) e (MA).	74
Tabela 24: Composição nutricional (g/100 g massa fresca) e valor energético (kcal/100g massa fresca) para as diferentes formulações de iogurtes (FI) e tempo de armazenamento (TA). Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.	80
Tabela 25: Perfil de ácidos gordos (%) para as diferentes formulações de iogurte (FI) e tempo de armazenamento (TA). Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.	81
Tabela 26: Parâmetros físico-químicos (CIE L^* , a^* , b^* e pH) para as diferentes formulações de iogurtes (FI) e tempo de armazenamento (TA). Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.	82
Tabela 27: Avaliação microscópica do comportamento das microesferas nos iogurtes ao longo do tempo de armazenamento (Ampliação de 100X).	86
Tabela 28: Microscopia eletrônica de varrimento com ampliação 5000x das amostras de microesferas.	107

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetros
AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
AC	Ácido cítrico
AM	Amido modificado
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> – Reflexão Total Atenuada
BHT	2,6-Di- <i>t</i> -butil-4-metilfenol
BV-2	Células micróglias
CF	Concentração de ficocianina (mg/mL)
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
D₁₀	Distribuição em 10% das partículas
D₅₀	Distribuição em 50% das partículas
D₉₀	Distribuição em 90% das partículas
DE	Dextrose equivalente
DHA	Ácido gordo docosa-hexaenóico
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	<i>2,2- difenil-1-picrilhidrazilo</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
DTG	Termogravimetria Derivada
EC₅₀	Concentrações da amostra que fornecem 50% de atividade antioxidante ou concentração que inibe 50% a produção de NO
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i> – Coleção Europeia de Culturas Celulares
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> – Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos
EMM	Médias marginais estimadas
FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FAO	<i>Food and Organization of The United Nations</i> - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F_E	Fluxo de entrada
FI	Formulação de Iogurte
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> – Detetor por Ionização de Chama
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

FUFOSE	<i>European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe - Comissão Europeia sobre Ciência e Alimentos Funcionais</i>
GA	Goma arábica
GC-FID	<i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector – Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama</i>
GE	Gelatina
GI₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe – Reconhecido como seguro</i>
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HDL	<i>High Density Lipoprotein – Lipoproteína de alta densidade</i>
HeLa	Carcinoma cervical
HepG2	Carcinoma hepatocelular
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography – Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
HPLC-RI	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração
IC	Iogurte controle
ILSI	<i>International Life Science Institute – Instituto Internacional de Ciências da Vida</i>
IN	Inulina
INT	Corante cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazóico
IS	Iogurte incorporado com spirulina livre
ISM	Iogurte incorporado com microesferas de spirulina/Maltodextrina
ISMA	Iogurte incorporado com microesferas de spirulina/Maltodextrina reticulada com ácido cítrico
kcal	Quilocaloria
LD	Leite magro
LDA	Análise discriminante linear
LPS	Lipopolissacárido
MA	Maltodextrina reticulada com ácido cítrico
MCF-7	Adenocarcinoma da mama),
MD	Maltodextrina
MEV	Microscopia eletrônica de varrimento
mf	Massa fresca
mg	Miligrama
MHB	Muller Hinton Broth
mL	Mililitro
MLG	Modelo linear geral
mM	Milimol
MO	Microscopia ótica
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
ms	Massa seca
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acids - ácidos gordos monoinsaturados</i>

n.t	Não testada
NCI-H460	Carcinoma de pulmão
NCR	“ <i>Nacional Cash Register</i> ”
nd	Não detetado
ND	Não disponível
NED	Sulfanilamida, hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
NO	Óxido nítrico
OxHLIA	<i>Oxidative hemolysis inhibition assay</i> – Análise da inibição da hemólise oxidativa
P	Produção de eritrócitos
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Pureza da ficocianina
PI	Padrão interno
PLP2	Cultura primária de células de fígado de porco
PS	Permeado de soro de leite
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> - ácidos gordos polinsaturados
R	Rendimento da encapsulação
RAW 246.7	Macrófagos de rato
RE	Rendimento de extração (mg/g)
RSA	Atividade captadora de radicais livres
S	<i>Spirulina platensis</i>
SFA	<i>Saturated fatty acids</i> - ácidos gordos saturados
SM	Microesferas com spirulina/maltodextrina
SMA	Microesferas spirulina/maltodextrina reticulada com ácido cítrico
SRB	Sulforrodamina B
TA	Tempo de Armazenamento
T_E	Temperatura de entrada
TGA	“ <i>Thermogravimetric analysis</i> ” – Análise Termogravimétrica.
Tris	Trisaminometano
T_s	Temperatura de saída
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFLC	<i>Ultra fast liquid chromatograph</i> – Cromatografia líquida ultra rápida
UNU	<i>United Nations University</i> – Universidade das Nações Unidas
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
WPI	Whey protein isolate – Proteína isolada do soro de leite

RESUMO

Os consumidores deixaram de desejar os alimentos somente para satisfazer a fome e começaram a observá-los como um dos agentes principais para alcançar uma vida saudável. Neste âmbito, diversos estudos estão em curso visando a aplicação de novas tecnologias para obtenção de alimentos funcionais e/ou agentes funcionalizantes mais efetivos. A utilização de microalgas, em especial *Spirulina platensis* (spirulina), como agente funcionalizante é uma área de investigação promissora. Esta microalga é certificada pela FDA (*Food and Drug Administration*) como segura para ser adicionada em alimentos, além de ser rica em nutrientes como proteínas e aminoácidos, vitaminas, minerais, ácidos gordos e pigmentos (clorofilas, carotenoides e ficocianina). No entanto, um dos desafios para a sua adição na forma pura (biomassa desidratada) prende-se com a presença de compostos que conferem sabor e odor, manutenção de compostos bioativos e difícil dispersão em matrizes alimentares hidrofílicas. A micro/nanoencapsulação é uma tecnologia que pode contribuir para a resolução deste problema; é utilizada na indústria alimentar com o objetivo de mascarar características de compostos indesejáveis; aumentar a estabilidade de compostos bioativos; aumentar a solubilidade e ainda proteger de degradações que possam ocorrer no contato com o meio externo ou durante o processamento dos alimentos. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu na caracterização de uma amostra comercial de *S. platensis* quanto ao valor nutricional e energético, açúcares livres, ácidos gordos, ácidos orgânicos, tocoferóis, pigmentos e propriedades bioativas e sua posterior microencapsulação pela técnica de *spray-drying*. Realizaram-se dois ensaios de encapsulação: i) spirulina/maltodextrina (SM) e ii) spirulina/maltodextrina reticulada com ácido cítrico (SMA), tendo sido caracterizado quanto ao rendimento (a eficiência de encapsulação e carga foram estimadas), características de degradação térmica (análise termogravimétrica (TGA/DTG)), avaliação química e estrutural (infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)), tamanho de partícula, morfologia e propriedades bioativas (atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e antimicrobiana). Posteriormente, efetuou-se a incorporação destas formulações em iogurtes naturais, tendo-se comparado com a biomassa original quanto à capacidade de dispersão, valor nutricional (proteínas, gorduras, glúcidos e cinzas) e evolução das propriedades bioativas ao longo do tempo de armazenamento (0, 4 e 7 dias). A spirulina apresentou alto teor em proteínas (75,6 g/100g massa seca) e cinzas, além de ácidos gordos essenciais e tocoferóis. Identificaram-se também pigmentos como: β -

caroteno, clorofila *a* e ficocianina. Para a microencapsulação foi possível obter rendimentos superiores a 50% e, comparativamente com a spirulina livre, as microesferas SM e SMA mostraram atenuação de cor, melhor estabilidade térmica, sendo que a atividade anti-inflamatória foi superior para as amostras SM e SMA e a atividade antioxidante similar para as três amostras. Para a atividade antimicrobiana, as microesferas apresentaram melhores resultados na concentração mínima inibitória de algumas bactérias. Relativamente aos iogurtes, observou-se uma melhor homogeneidade quando a spirulina foi adicionada na forma microencapsulada tendo-se verificado uma diminuição do odor proveniente da microalga. Ao longo dos 7 dias de armazenamento, e para as amostras com SM verificou-se a desagregação das microesferas com libertação do composto ativo, enquanto que para as amostras com SMA foi possível verificar a manutenção destas ao fim deste período de tempo, facto suportado pela reação de reticulação. Por meio da análise linear discriminante a melhor formulação foi a que continha SMA já que não altera a composição nutricional e aumenta a atividade antioxidante dos iogurtes. Em síntese, a microencapsulação da biomassa de *Spirulina platensis* é uma alternativa promissora para funcionalizar alimentos, aumentando a bioatividade e permitindo uma melhor dispersão desta em matrizes hidrofílicas.

ABSTRACT

Consumers stopped wanting food only to satisfy hunger and began to consider it as one of the main agents to achieve a healthy life. In this context, several studies are being developed to apply new technologies to obtain functional foods and/or functionalizing agents. The use of microalgae, especially *Spirulina platensis* (spirulina), as a functionalizing agent is a promising area of research. *Spirulina platensis* is certified by the FDA as safe to be added to foods, in addition to be rich in nutrients such as proteins and amino acids, vitamins, minerals, fatty acids and pigments (chlorophylls, carotenoids and phycocyanin). However, one of the challenges for the addition of its pure form (dehydrated biomass) is the perceptible taste and odor, maintenance of its bioactive compounds and difficult dispersion in hydrophilic food matrices. Micro/nanoencapsulation is a technology that can contribute to surpass this problem; it is used in the food industry to mask characteristics of undesirable compounds; increase the stability of bioactive compounds; increase the solubility and protect from the degradation that may occur due to external environment or during food processing. Therefore, the aim of the present work was to characterize a commercial sample of *S. platensis*, namely nutritional and energetic value, free sugars, fatty acids, organic acids, tocopherols, pigments and bioactive properties, and their subsequent microencapsulation by the spray-drying technique. Two encapsulation assays were performed: i) spirulina/maltodextrin (SM) and ii) spirulina/maltodextrin crosslinked with citric acid (SMA). The microspheres were characterized in terms of yield (encapsulation efficiency and load were estimated), characteristics of thermal degradation (thermogravimetric analysis (TGA/DTG)), chemical and structural evaluation (Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)), particle size, morphology and bioactive properties (antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory, and antimicrobial activities). Subsequently, the incorporation of these formulations into natural yoghurts was carried out, by comparing with the original biomass in what respects dispersion capacity, nutritional value (proteins, fats, carbohydrates and ashes) and evolution of bioactive properties throughout the storage time (0, 4 and 7 days). Spirulina showed high protein content (75.6 g/100 g dw) and ash, as well as essential fatty acids and tocopherols. Pigments such as β -carotene, chlorophyll and phycocyanin were also found. For microencapsulation it was possible to obtain yields higher than 50% and, compared to free spirulina, the SM and SMA showed colour attenuation, better thermal stability, higher anti-inflammatory activity, and antioxidant

activity similar for the three samples. For the antimicrobial activity, the microspheres presented better results in the minimal inhibitory concentration (MIC) for some bacteria. Regarding yogurts, a better homogeneity was observed when spirulina was added in the microencapsulated form with a noticed decrease of the microalga odor. During the 7 days of storage, disintegration of the microspheres with release of the active compound was observed for the samples with SM, whereas for the samples with SMA ones preserved microspheres were observed at the end of this period, which can be supported by the effective crosslinking reaction. Through the linear discriminant analysis, the best formulation was the one that contained SMA since there was no change of the nutritional composition, and lead to increased antioxidant activity of the yogurts. In summary, the microencapsulation of *Spirulina platensis* biomass is a promising strategy for food functionalization, increasing bioactivity and allowing better dispersion in hydrophilic matrices.

Motivação e Objetivos

A aplicação de novas tecnologias para a obtenção de alimentos funcionais e/ou agentes funcionalizantes é uma área de investigação muito promissora, já que atualmente os consumidores procuram cada vez mais alimentos que tragam benefícios para a saúde. A utilização de microalgas, em particular *Spirulina platensis* (spirulina) tem ganho destaque dado ser uma matriz rica em proteínas e aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais, ácidos gordos e pigmentos (clorofilas, ficocianina e carotenoides), sendo considerada um potencial ingrediente para agregar valor nutricional aos produtos alimentares.

Diversos estudos têm sido realizados sobre a adição desta microalga em alimentos, como por exemplo em iogurtes, por este ser um alimento aceito e consumido pela maioria dos consumidores. No entanto, um dos maiores problemas da sua utilização em produtos alimentares, na sua forma pura, prende-se com a presença de compostos que conferem sabor e odor, conservação dos compostos bioativos e a sua difícil dispersão em matrizes hidrofílicas.

A micro/nanoencapsulação é uma tecnologia que pode solucionar alguns destes problemas, nomeadamente ocultar/disfarçar compostos indesejáveis, aumentar a estabilidade de compostos bioativos e melhorar a solubilidade.

Desta forma, a utilização desta técnica permite que a spirulina seja adicionada como agente funcionalizante em produtos alimentares, de forma mais eficiente e atrativa para o consumidor, melhorando o valor nutricional e propriedades bioativas. Do ponto de vista tecnológico, permite ainda que sejam disponibilizadas diferentes formas de consumo desta microalga.

Objetivo geral:

O objetivo geral do presente trabalho consistiu na caracterização da biomassa desidratada de *S. platensis* (spirulina) para fins alimentares, obter microesferas pela técnica de *spray drying* e incorporá-las numa matriz hidrofílica (iogurtes), comparando os seus efeitos (nutricionais e bioativos) com a adição na forma livre.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar a biomassa desidratada de *S. platensis* (spirulina) quanto ao valor nutricional e energético, açúcares livres, ácidos orgânicos, ácidos gordos, tocoferóis, pigmentos (clorofilas, carotenoides e ficocianina) e propriedades bioativas (atividade antioxidante, citotóxica em células tumorais e não-tumorais, anti-inflamatória e antimicrobiana);
- Encapsular a biomassa desidratada de spirulina através da técnica de *spray drying* utilizando como material de parede: i) maltodextrina e ii) maltodextrina reticulada com ácido cítrico;
- Caracterizar os encapsulados obtidos, nomeadamente quanto ao rendimento (a eficiência e carga em spirulina foram estimadas), características de degradação térmica (análise termogravimétrica (TGA/DTG)), avaliação química e estrutural (infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)), tamanho de partícula, morfologia (microscopia ótica e microscopia electrónica de varrimento) e propriedades bioativas (atividade antioxidante, citotóxica em células tumorais e não tumorais, anti-inflamatória e antimicrobiana);
- Incorporar a spirulina livre e encapsulada em iogurtes para posterior avaliação do valor nutricional e energético, ácidos gordos, açúcares livres, pH, cor e propriedades bioativas dos produtos funcionalizados, ao longo do tempo de armazenamento (0, 4 e 7 dias). Adicionalmente avaliar a integridade das microesferas incorporadas ao longo do tempo por microscopia ótica.

Estrutura da Dissertação

A presente dissertação está estruturada em seis capítulos:

O capítulo 1 refere-se à revisão bibliográfica abordando definições de interesse para o trabalho desenvolvido e análise da bibliografia relevante para o enquadramento dos temas necessários ao presente estudo.

O capítulo 2 refere-se à descrição das metodologias utilizadas para a caracterização da biomassa desidratada de spirulina, obtenção de microesferas e posterior incorporação das formas livre e encapsulada em iogurtes.

O capítulo 3 centra-se na apresentação e discussão dos resultados obtidos, permitindo estudos comparativos entre as formas livre e encapsulada da spirulina, assim como a sua incorporação em iogurtes e avaliação de parâmetros nutricionais e bioativos ao longo do tempo de armazenamento.

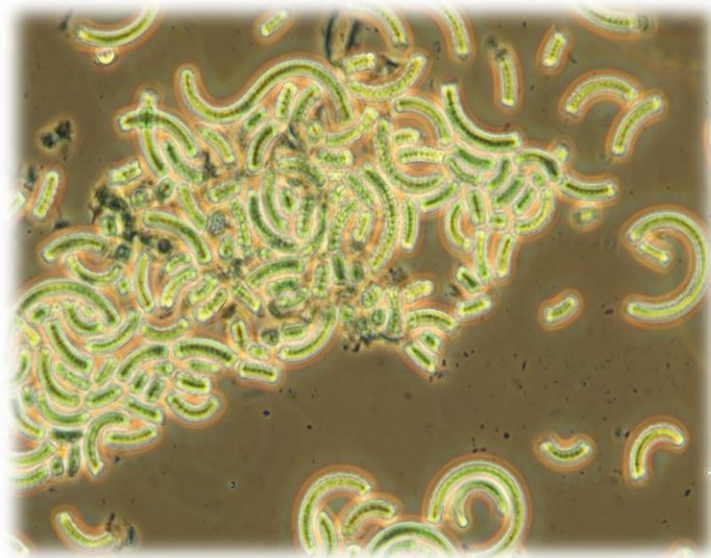
No capítulo 4 são apresentadas as considerações finais do presente trabalho, com o intuito de destacar as principais conclusões obtidas, desafios e trabalhos futuros.

O capítulo 5 reúne as referências bibliográficas utilizadas neste estudo.

O capítulo 6 refere-se aos anexos.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica



1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Diversos cientistas europeus da área da ciência nutricional da Comissão Europeia sobre Ciência e Alimentos Funcionais “*European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe*” (FUFOSE), coordenados pelo *International Life Science Institute* (ILSI Europe) chegaram a um consenso em 1999 sobre o conceito de alimento funcional na Europa. As avaliações para evidenciar os efeitos positivos no organismo provocado por nutrientes, e/ou compostos presentes nos alimentos, foram realizadas até se chegar ao conceito de alimento funcional. Segundo a FUFOSE, um alimento só pode ser considerado funcional, se o mesmo apresentar benefícios para uma ou mais funções do corpo humano, efeito nutricional adequado, melhoria da qualidade de vida (saúde e bem-estar) e/ou diminuição do risco de doença. É necessário ressaltar que estes alimentos devem estar presentes numa alimentação normal (não são pílulas ou cápsulas) e os mesmos devem exibir efeitos nas quantidades em que geralmente são consumidos (Ashwell, 2002).

No Brasil, segundo a Resolução nº18, de 30 de abril de 1999 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, o alimento ou ingrediente que pode alegar propriedades funcionais e/ou de saúde, deve apresentar além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (Brasil, 1999). Desta forma, um alimento funcional pode ser um alimento na sua forma natural, um alimento em que um componente foi adicionado, um alimento onde um componente foi removido, um alimento em que a biodisponibilidade foi modificada, um alimento onde um ou mais componentes foram modificados ou qualquer combinação destes. Essas categorias estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Categorias dos alimentos funcionais.

Categoria	Exemplo
Alimento comum	Cenouras (contendo β -caroteno) Aveia (contendo β -glucano)
Alimentos processados	Cereal de farelo de aveia
Alimentos processados com adição de ingredientes	Sumo de fruta enriquecido com cálcio Margarina enriquecida com fitoesterol
Alimento melhorado para ter mais um componente funcional	Tomates com níveis elevados de licopeno

Fonte: Adaptado de Henry (2010).

1.1.1 Alimentos Funcionais e Nutracêuticos

Um alimento pode ser considerado funcional se trazer benefícios comprovados para uma ou mais funções alvo do corpo humano, sendo estas características obtidas em acréscimo aos efeitos nutricionais que o mesmo apresenta, de modo que a sua relevância seja observada, garantindo bem-estar, saúde e redução do risco de doença (Roberfroid, 2002).

Um alimento nutracêutico concede benefícios relacionados com o tratamento e/ou prevenção da doença, podendo estes ser nutrientes isolados, produtos herbais e suplementos dietéticos na forma de cápsulas. Desta forma, o propósito dos nutracêuticos é diferente dos alimentos funcionais, já que no caso dos nutracêuticos interessa a prevenção e o tratamento de doenças, necessitando de recomendação médica, enquanto que nos alimentos funcionais se observa apenas a redução do risco de doença. Outra diferença, é que os nutracêuticos podem ser considerados como suplementos dietéticos, enquanto que os funcionais devem apresentar-se na condição de um alimento comum (Moraes & Colla, 2006; Kwak & Jukes, 2001).

Os nutracêuticos podem ser definidos e classificados como proteínas, péptidos, aminoácidos, fibras dietéticas, minerais, vitaminas e antioxidantes, enquanto que os funcionais são, por exemplo, as alicinas presentes no alho, flavonoides e carotenoides existentes nas frutas e vegetais, bem como os ácidos gordos polinsaturados encontrados no óleo de peixe e que são consumidos com o alimento (Andlauer & Fürst, 2002; Kruger & Mann, 2003)

1.2 MICROALGAS

As microalgas aquáticas são seres que possuem uma diversidade de características fisiológicas e bioquímicas. São fontes de moléculas bioativas e possuem taxas de crescimento elevadas da sua biomassa, além de fornecerem benefícios técnicos e comerciais relevantes (Chronakis, Galatanu, Nylander, & Lindman, 2000).

Há uma grande diversidade de microalgas, estas com diferentes composições, como se pode visualizar na **Tabela 2** que apresenta uma comparação da composição química de seis microalgas segundo um estudo feito por Matos *et al.* (2016).

Tabela 2: Composição química de seis microalgas.

Microalga	Composição (%)*				
	Matéria seca	Proteína total	Glúcidos	Lípidos totais	Fibras totais
<i>Chlorella vulgaris</i>	93,8 ± 0,3	41,4 ± 0,4	26,7 ± 1,2	12,8 ± 0,1	5,6 ± 0,4
<i>Spirulina platensis</i>	89,9 ± 0,5	42,8 ± 0,1	21,5 ± 0,5	5,5 ± 1,2	8,5 ± 0,5
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	94,7 ± 0,4	41,6 ± 0,3	18,6 ± 0,3	8,1 ± 0,1	14,1 ± 0,3
<i>Nannochloropsis oculata</i>	95,9 ± 0,1	42,1 ± 0,1	16,7 ± 0,6	15,6 ± 1,1	13,0 ± 0,4
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	98,6 ± 0,2	39,0 ± 0,1	15,4 ± 0,5	14,9 ± 0,4	13,2 ± 0,3
<i>Porphyridium cruentum</i>	87,4 ± 0,3	35,4 ± 0,9	12,5 ± 0,6	5,3 ± 0,3	18,3 ± 0,2

*Os dados representam a média (%) e o desvio padrão (±).

Fonte: Matos *et al.* (2016).

Atualmente há algumas microalgas que são produzidas comercialmente, em especial as que pertencem aos géneros: *Chlorella* e *Arthrospira*, sendo, a mais conhecida e utilizada *Arthrospira platensis*, também chamada de *Spirulina platensis*, que contém na sua composição um elevado teor de proteínas e um importante valor nutricional (Beheshtipour, Mortazavian, Haratian, & Khosravi-Darani, 2012).

1.2.1 *Spirulina platensis*: Morfologia e Histórico

Spirulina platensis tem coloração azul-esverdeada, é unicelular (com a formação de tricomas), apresenta forma helicoidal, é filamentosa e não ramificada. Esta microalga (**Figura 1**) é do género *Arthrospira*, ordem *Oscillatoriales*, família *Microcoleaceae* e classe *Cyanophyceae* e ganhou destaque como ingrediente em produtos alimentares saudáveis, bem como na produção de suplementos vitamínicos. Apresenta crescimento sob forte iluminação solar, altas temperaturas, águas salinas (> 30 g/L) e condições alcalinas (pH 8,5-11) (Belay, Ota, Miyakawa, & Shimamatsu, 1993; Habib, Parvin, Huntington, & Hasan, 2008; Guiry & Guiry, 2018; Wan, Wu, & Kuča, 2016).

A reprodução da *S. platensis* dá-se por fissão binária, formando-se tricomas helicoidais que apresentam tamanho variável, podendo obter-se células de tricomas mais largas do que longas, variando de 3 a 12 µm, formando outros filamentos. Estas apresentam plasticidade na sua morfologia, devido a fatores tais como: temperatura, fatores físicos e químicos e mudança genética (Gershwin & Belay, 2008).

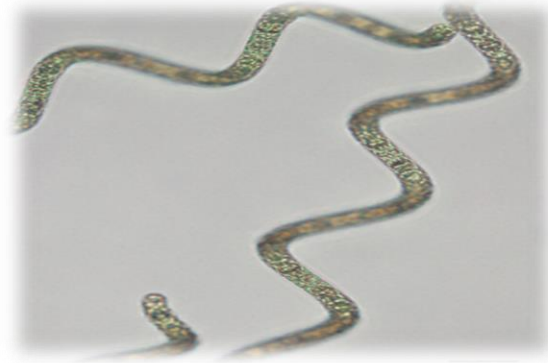


Figura 1: Foto microscópica de *S. platensis*.
Fonte: Small (2011).

O nome *S. platensis* é derivado da sua morfologia, pois a mesma apresenta natureza espiral ou helicoidal nos filamentos (Belay, 2002). Segundo Habib *et al.* (2008) esta microalga é um organismo primitivo tendo surgido há aproximadamente 3,5 bilhões de anos, quando se estabeleceu a capacidade de utilizar o dióxido de carbono dissolvido na água do mar como fonte de crescimento e desenvolvimento. É originária da América Latina e África, no entanto, tem-se propagado para outros locais quentes do mundo. Desta forma, no século XVI, aquando da conquista do México pelos espanhóis, descobriu-se que os Astecas que habitavam o Vale do México colhiam um alimento “diferente” e “novo” do lago, e que o utilizavam na alimentação. Segundo historiadores, os pescadores com as redes finas conseguiam recolher as algas do lago e em seguida faziam um bolo verde-azulado.

A spirulina tem sido utilizada como ingrediente complementar para rações de peixes e aves em países como a China e Japão, já que o interesse inicial se concentrou nesta microalga como fonte de proteína (60-70%) e também de vitaminas, como por exemplo, a vitamina B12 (Habib *et al.*, 2008; Belay *et al.*, 1993).

Em países como o Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) autorizou a comercialização da spirulina como “novo ingrediente” em maio de 2009, devendo seguir algumas recomendações, como por exemplo a menção das especificações dos ingredientes, identificação da espécie de alga e o seu local de cultivo, e para além disso, na rotulagem devem incluir-se as seguintes informações: “Consumir preferencialmente sob orientação médica ou nutricionista”; “Este produto não é indicado para gestantes, lactantes e crianças” e “O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de líquidos”. De realçar ainda que a legislação brasileira, recomenda, como limite máximo de consumo diário por pessoa, 1,6 g spirulina (Brasil, 2009).

Na União Europeia, segundo o Regulamento (UE) N° 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho, um novo alimento ou ingrediente é definido como um alimento ou ingrediente que não contém histórico de consumo na comunidade europeia até 15 de maio de 1997 (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2015). *Spirulina sp.* segundo o catálogo de novos ingredientes disponível no *website* da Comissão Europeia (European Commission, 2018) já era consumida em grau significativo antes de 15 de maio de 1997, sendo, portanto, considerada um alimento ou ingrediente que já está presente no mercado europeu.

1.2.2 Composição Química de *S. platensis*

As microalgas são consideradas ingredientes promissores para adição/enriquecimento de alimentos, pois são uma fonte de compostos biologicamente ativos. De entre esses compostos encontram-se: vitaminas, polissacáridos, proteínas com aminoácidos essenciais, minerais, pigmentos, fibras e ácidos gordos polinsaturados (Matos *et al.*, 2017; Gouveia *et al.*, 2010).

A composição química da spirulina vem sendo estudada desde 1970 e descobriu-se que apresenta concentrações elevadas de proteínas, podendo variar entre 60 a 70% dependendo da espécie e do modo de cultivo (Koru, 2012).

No entanto, ao identificar uma fonte rica de proteína deve ter-se em atenção alguns fatores, nomeadamente se a proteína tem utilidade, não apresenta efeitos colaterais e se é considerada completa por possuir todos os aminoácidos essenciais (não são sintetizados pelo organismo e devem ser consumidos na dieta) (Henrikson, 2010).

A spirulina pode ser considerada uma fonte de proteína completa, pois possui todos os aminoácidos essenciais equivalentes a 47% da massa total da proteína, com exceção da metionina, cisteína e lisina que existem, mas em quantidades inferiores às das proteínas derivadas da carne, leite ou ovos (Habib *et al.*, 2008; Soni, Sudhakar, & Rana, 2017).

A **Tabela 3** apresenta dois estudos que evidenciam a presença de aminoácidos essenciais na microalga *S. platensis*, comparando com a quantidade recomendada pela *World Health Organization* (WHO), *Food and Organization of The United Nations* (FAO) e *United Nations University* (UNU) com um requisito médio de 0,66 g de proteína/kg, por dia para uma pessoa adulta saudável (WHO/FAO/UNU, 2007).

Tabela 3: Quantidade de aminoácidos essenciais presentes na *S. platensis*.

Aminoácidos essenciais	Teor de aminoácidos (mg. g ⁻¹ de proteína)		
	WHO/FAO/UNU (2007) ^a	Safi <i>et al.</i> (2013)	Bashir <i>et al.</i> (2016)
Histidina	15	9,0	11,3
Isoleucina	30	1,2	36,4
Leucina	59	70,2	61,7
Lisina	45	51,0	34
Metionina	16	17,2	17,1
Fenilalanina	-	48,2	33,3
Treonina	23	61,6	33,1
Triptofano	6	12,2	8,5
Valina	39	28,6	42,1

^aRequisito médio de 0,66 g de proteína/kg, por dia (105 mg de azoto/kg, por dia).

Como pode ser observado na **Tabela 3**, a spirulina apresenta todos os aminoácidos essenciais e quando se compara a quantidade de metionina encontrada nos estudos citados acima com o recomendado para uma pessoa adulta saudável pela WHO/FAO/UNU, verifica-se que a spirulina apresenta valores superiores e em alguns casos o dobro do recomendado foi verificado (triptofano).

Adicionalmente, a **Tabela 4** apresenta com base nos mesmos estudos, os teores de aminoácidos não essenciais presentes na *S. platensis*.

Tabela 4: Quantidade de aminoácidos não essenciais presentes na *S. platensis*.

Aminoácidos não essenciais	Teor de aminoácidos (mg. g ⁻¹ de proteína)	
	Safi <i>et al.</i> (2013)	(Bashir <i>et al.</i> , 2016)
Alanina	99,1	50,2
Arginina	76,9	44,7
Ácido aspártico	118,2	63,1
Cisteína	1,8	6,4
Ácido glutâmico	105,0	84,7
Glicina	77,6	34,3
Prolina	19,5	25,3
Serina	68,5	
Tirosina	48,3	30,7
Ornitina	1,6	-

Pode-se encontrar uma enorme variedade de ácidos gordos polinsaturados nas microalgas, sendo que na *S. platensis* estão presentes cerca de 1,5 a 2% do teor de lípidos totais. Esta espécie é rica num ácido gordo essencial e pouco disponível, o ácido γ -linolénico que corresponde a 30 - 35% dos ácidos gordos poliinsaturados totais, além de fornecer também ácidos docosahexaenóico e araquidónico (Wan *et al.*, 2016).

As microalgas no geral apresentam uma gama valiosa de vitaminas: A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, niacina e nicotinato, além do conteúdo mineral incluindo Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn e quantidades vestigiais de outros

minerais. No entanto, a microalga *S. platensis* apresenta na sua composição natural algumas vitaminas como B1, B2, B12, vitamina E e ainda β -caroteno (precursor da vitamina A) sendo que o teor de β -caroteno é relativamente alto, tendo em vista que a spirulina apresenta um conteúdo de β -caroteno 30 vezes maior que o da cenoura, além disso, é rica em vitamina B12 com teores quatro vezes maiores do que o fígado cru. Para além disso, essa microalga é considerada fonte de ferro e ainda apresenta minerais como magnésio, cálcio e fósforo (Gouveia *et al.*, 2010; Soni, Sudhakar, & Rana, 2017)

Uma das características que é observável nas microalgas é a sua coloração, além das clorofilas (pigmento fotossintético primário), existem outros que são formados secundariamente, como as ficobiliproteínas e carotenoides. Por isso, são também consideradas como fontes de corantes alimentares naturais. Os carotenoides presentes nas microalgas são considerados agentes foto protetores, uma vez que agem contra a radiação solar e os efeitos resultantes da mesma, protegendo dessa forma, o aparelho fotossintético.

Além dos pigmentos lipofílicos, as microalgas, em especial *S. platensis* apresentam na sua composição ficobiliproteínas, que são pigmentos fluorescentes e ainda solúveis em água. Na *S. platensis* o recurso natural de ficobiliproteína é encontrado na ficocianina (**Figura 2**) que garante a coloração natural azul brilhante e são muito utilizadas em países como Japão e China em produtos alimentares (doces, geleias, produtos lácteos) e em cosméticos (batons, sombras de olhos) (Gouveia *et al.*, 2010).

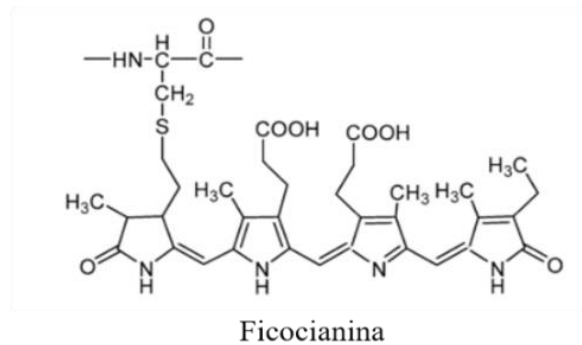


Figura 2: Estrutura química da ficocianina.
Fonte: Adaptado de Zheng *et al.* (2012).

A solubilidade máxima da ficocianina ocorre em torno do pH 7 e diminui com pH ácido; em pH abaixo de 3 este pigmento precipita uma vez que é uma proteína e desnatura-se. Ainda, por ser uma proteína, além do pH, fatores como temperaturas elevadas e concentrações de álcoois podem afetar negativamente o pigmento, sendo importante o

controle destes fatores durante a extração. A ficocianina tem estabilidade à temperatura ambiente ou a frio (Buchweitz, 2016). Alguns estudos demonstraram que cerca de 80% da ficocianina manteve-se estável durante 120 dias a 4 °C (pH 7,0) (Chaiklahan, Chirasuwan, & Bunnag, 2012).

1.2.3 Propriedades Funcionais de *S. platensis*

As microalgas têm ganho potencial de crescimento pois contêm compostos naturais que as tornam capazes de serem utilizadas como ingredientes alimentares funcionais. Atualmente, diversos componentes (óleos, proteínas, glúcidos, vitaminas,) são obtidos a partir do consumo de diversos alimentos, tanto ingredientes de origem vegetal como animal. Nesta perspectiva, as microalgas podem ser adicionadas ao alimento, para garantir um aumento do valor nutricional. Assim, a produção de alimentos com microalgas traz uma nova expectativa para o mercado alimentar, pois fornece características de adição nutricional com compostos bioativos (Matos *et al.*, 2016).

A spirulina apresenta vários efeitos benéficos para a saúde comprovados cientificamente. De entre esses efeitos destaca-se o efeito imunomodulador encontrado numa investigação de Juskiewicz *et al.* (2018) com atletas de remo que consumiram 1500 mg de spirulina durante 6 semanas e esta suplementação protegeu-os da carência imunológica provocada pelo exercício físico intenso. Apresenta ainda efeito antioxidante e anti-inflamatório (Deng & Chow, 2010; Gad *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2016); anticancerígeno e atividade antimicrobiana (Wan *et al.*, 2016).

Estudos recentes, verificaram que o consumo de spirulina pode reduzir os efeitos colaterais de medicamentos utilizados por exemplo, no tratamento do cancro (Afkhami-Ardakani *et al.*, 2018). De acordo com (Khafaga & El-sayed, 2018) nos estudos realizados com ratos, a spirulina apresentou efeito hepatoprotetor comparativamente com o medicamento metotrexato utilizado no tratamento do cancro e doenças autoimunes, no qual o seu uso está limitado devido ao efeito hepatotóxico que pode causar.

Ainda, segundo Hamed *et al.* (2015) a microalga spirulina apresenta efeitos positivos relacionados com o metabolismo do colesterol, fazendo com que aumente os níveis do HDL proporcionando um desempenho saudável do sistema cardiovascular. Estudos realizados em pacientes com dislipidemia e que ingeriram 1 g de spirulina por dia durante 12 semanas, verificaram uma diminuição dos níveis de triglicéridos e colesterol total (Mazokopakis *et al.*, 2014). De acordo com Bishop & Zubeck (2012) esta

espécie apresenta efeitos benéficos para a perda de peso, hipertensão arterial, diabetes e pode contribuir segundo Selmi *et al.* (2011) para a diminuição da anemia e disfunção imunológica em idosos.

Estudos realizados por Pulz & Gross (2004) em que avaliaram os efeitos prebióticos da biomassa de spirulina na sua forma pura e aplicada em alimentos funcionais, apresentaram resultados benéficos quanto às bactérias intestinais, tanto a microalga na sua forma pura ou em alimentos processados. A adição da spirulina ajudou a manter saudáveis as bactérias que auxiliam o equilíbrio da microbiota intestinal.

1.2.4 Aplicações das Microalgas

Segundo León (2010) o consumo da microalga spirulina proporciona benefícios à saúde humana, pois a sua composição química é rica em nutrientes essenciais para o organismo. Ela pode ser comercializada na forma de comprimidos, em pó ou cápsulas (**Figura 3**) e também pode ser ingrediente de destaque em massas e biscoitos, cosméticos e como suplemento proteico e/ou vitamínico para animais e humanos (Henrikson, 2010).

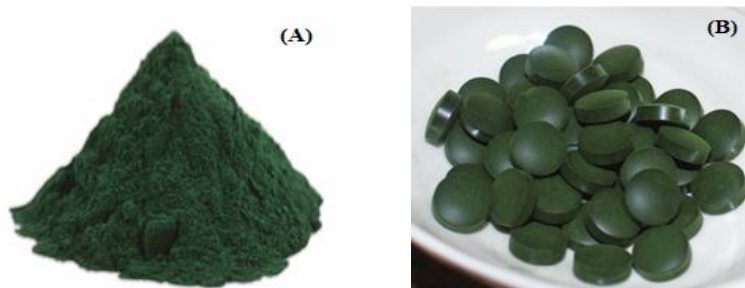


Figura 3: Formas de comercialização de *S. platensis*
(A) spirulina na forma triturada; (B) spirulina na forma de comprimidos.
Fonte: Small (2011).

A **Tabela 5** mostra algumas das aplicações de microalgas (utilização da sua biomassa ou compostos obtidos a partir destas) em produtos alimentares, cosméticos, medicina, assim como na produção de biodiesel.

Tabela 5: Produtos obtidos por meio de microalgas e possíveis aplicações.

Classes de Produtos	Produtos	Aplicações
Biomassa	Biomassa	Alimentos naturais saudáveis Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aquicultura
Corantes e antioxidantes	Xantofilas (astaxantina e cantaxantina) Ficocianina Luteína β-caroteno Vitamina E	Aditivos alimentares Cosméticos
Ácidos gordos	Ácido araquidônico Ácido γ-linolênico Ácido linoleico	Biodiesel Aditivos Alimentares
Enzimas	Luciferase e Luciferina Enzimas de restrição	Alimentos Naturais Investigação Medicina

Fonte: Adaptado de Derner *et al.* (2006).

S. platensis também tem sido estudada quanto aos pigmentos que possui. Dado a cor verde-azulada é uma das principais fontes de clorofila na natureza. Os seus pigmentos despertam o interesse pelas indústrias de cosméticos, farmacêuticas e de alimentos, com a possibilidade de substituir corantes artificiais (León, 2010). As microalgas podem também ser utilizadas no processo de tratamentos de águas residuais ou como adubo orgânico, além de que atualmente tem vindo a ser estudada como possível matéria prima para a produção de biocombustíveis, dado o elevado teor de óleo e ácidos gordos que algumas espécies possuem (Ohse *et al.*, 2009; Rangel-Yagui *et al.*, 2004).

Estas apresentam grandes vantagens em relação a outras culturas convencionais como a soja, girassol, colza, óleo de palma ou cana-de-açúcar, pois apresentam uma taxa de crescimento elevada, não necessitando de grandes áreas para obter produtividades significativas. Em consequência da alta produtividade e rápido crescimento, além da produção de compostos de interesse económico, a investigação envolvendo microalgas tem aumentado significativamente (Chisti, 2007; Ohse *et al.*, 2009; Tan, *et al.*, 2015).

1.2.5 Aplicações das Microalgas em Alimentos

Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos alimentos com adição da biomassa de microalgas, em especial no que respeita à *S. platensis* recebeu o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), garantindo a sua utilização como alimento, sem riscos para a saúde dos consumidores (FDA, 2002). Diversos estudos estão a ser realizados sobre a adição desta microalga em

produtos alimentares: biscoitos (Gouveia *et al.*, 2007), pães (Ak *et al.*, 2016), doces e refrigerantes (Liang *et al.*, 2004), massas (Özyurt *et al.*, 2015), iogurtes (Agustini, Soetrisnanto, & Ma'ruf, 2017). Liang *et al.* (2004) refere a existência de macarrão instantâneo, cerveja e chá verde com adição de microalgas.

A quantidade de microalga a adicionar difere bastante de alimento para alimento. A **Tabela 6** mostra as quantidades utilizadas por diversos autores para o desenvolvimento de produtos alimentares, além das concentrações para as quais foram obtidos os melhores resultados segundo os parâmetros sensoriais avaliados. Verificou-se a existência de uma diversidade de alimentos onde se estudou a adição de spirulina. Entre estes, destacam-se os produtos de panificação e massas, onde as concentrações variam de 0,25% a 15% de microalga adicionada.

Tabela 6: Produtos adicionados com *S. platensis* e, respectivas quantidades de microalga utilizada e concentrações que conduziram aos melhores resultados segundo parâmetros sensoriais.

Produto	Concentração de microalga utilizada (%*)	Concentração que conduziram aos melhores resultados (%*)	Referências
Gelado e Queijo de pasta mole	Gelado: 1 e 1,5 Queijo: 0,6 e 1,2	Gelado: 1 Queijo: 1,2	Agustini <i>et al.</i> (2016)
Pão	1 e 3 10	1 ND	Hafsa <i>et al.</i> (2014) Ak <i>et al.</i> (2016)
Pão sem glúten	1 e 4 2, 3, 4 e 5	ND 3**	Selmo & Salas-Mellado (2014) Figueira <i>et al.</i> (2011)
Cupcake Iraniano	0,5, 1,5 e 2,5	ND	Golmakani <i>et al.</i> (2015)
Massas	5, 10 e 15	10	Özyurt <i>et al.</i> (2015)
Croissants	0,5, 1 e 1,5	1	Massoud <i>et al.</i> (2016)
Extrusados de Milho	2, 4, 6 e 8	8	Tańska <i>et al.</i> (2017)
Iogurte	0,25, 0,5, 0,75 e 1 0,5, 0,75, 1, 2 e 3	0,25 1	Barkallah <i>et al.</i> (2017) Agustini <i>et al.</i> (2017)

ND – Não disponível; *% em m/m; **Os autores sugerem a adição da concentração.

Relativamente ao pão, Ak *et al.* (2016), adicionaram 10% de *S. platensis* e observaram que os teores de cinzas, proteínas e glúcidos foram superiores quando comparados com o controlo (0% de microalga). Adicionalmente, verificou-se um poder inibidor da spirulina nos bolores do pão durante o armazenamento à temperatura

ambiente. De referir que neste estudo os autores concluíram que a adição de *S. platensis* deve ser realizada em concentrações menores para melhor a aceitação por parte dos consumidores.

Os produtos lácteos também estão sendo comumente utilizados para a adição de microalgas. Um dos exemplos consiste no trabalho de Agustini *et al.* (2016) onde se elaboraram formulações de queijo de pasta mole enriquecido com a microalga *S. platensis* entre 1% e 1,5%, tendo-se observado que com a adição da microalga houve uma diminuição do teor de água do queijo, aumento do teor de proteínas e de β -caroteno, comparativamente com as amostras de controlo (queijo sem adição da microalga). Os autores adicionaram também *S. platensis* em gelado (0,6% e 1,2%) tendo obtido resultados que apontam para o aumento do valor nutricional do produto no que respeita às proteínas.

1.2.5.1 Aplicação da Spirulina em Iogurtes

O iogurte segundo a Portaria nº 742/92 publicada no Diário da República de Portugal, é um produto coagulado, obtido por meio da fermentação láctica utilizando exclusivamente dois microrganismos: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre o leite (Ministério da Agricultura e do Comércio e Turismo, 1992). Este produto alimentar é considerado um dos produtos lácteos fermentados mais consumido em todo o mundo, em virtude de ser bastante apreciado e considerado importante na dieta humana. Desta forma, a fortificação de iogurtes com aditivos que melhorem a composição nutricional e funcional do produto, agregarão valor já que o mesmo é bastante consumido. Alguns aditivos sintéticos foram já adicionados pelas indústrias alimentares com o intuito de fortificar, dar cor, aumentar o tempo de vida útil e aromatizar o iogurte (Caleja *et al.*, 2016; Gahruie *et al.*, 2015).

No entanto, alguns estudos comprovam que o consumo excessivo de aditivos sintéticos está relacionado com reações diversas, tais como: dermatológicas, gastrointestinais, respiratórias, entre outras. Neste sentido, procuram-se aditivos vindos de fontes naturais, como por exemplo, antioxidantes que estão presentes em algas, plantas, cogumelos e que são considerados alternativas muito interessantes aos aditivos sintéticos (Caleja *et al.*, 2016; Barkallah *et al.*, 2017).

Como observado na **Tabela 6**, Agustini *et al.* (2017) adicionou diferentes concentrações de *S. platensis* em iogurte, com o objetivo de aumentar as propriedades

nutricionais e funcionais. Estudos como este, mostram o elevado interesse em funcionalizar produtos lácteos, em especial o iogurte e mais ainda, funcionalizar com produtos promissores no sector alimentar, como as microalgas.

1.2.6 Principais Problemas da Aplicação de Microalgas em Alimentos

O enriquecimento de produtos com microalgas é uma estratégia interessante para o desenvolvimento de alimentos inovadores com propriedades funcionais e de alto valor nutricional. No entanto, ainda é necessário ultrapassar alguns desafios tecnológicos, nomeadamente os referidos na **Figura 4** (Chacón-Lee & González-Mariño, 2010).

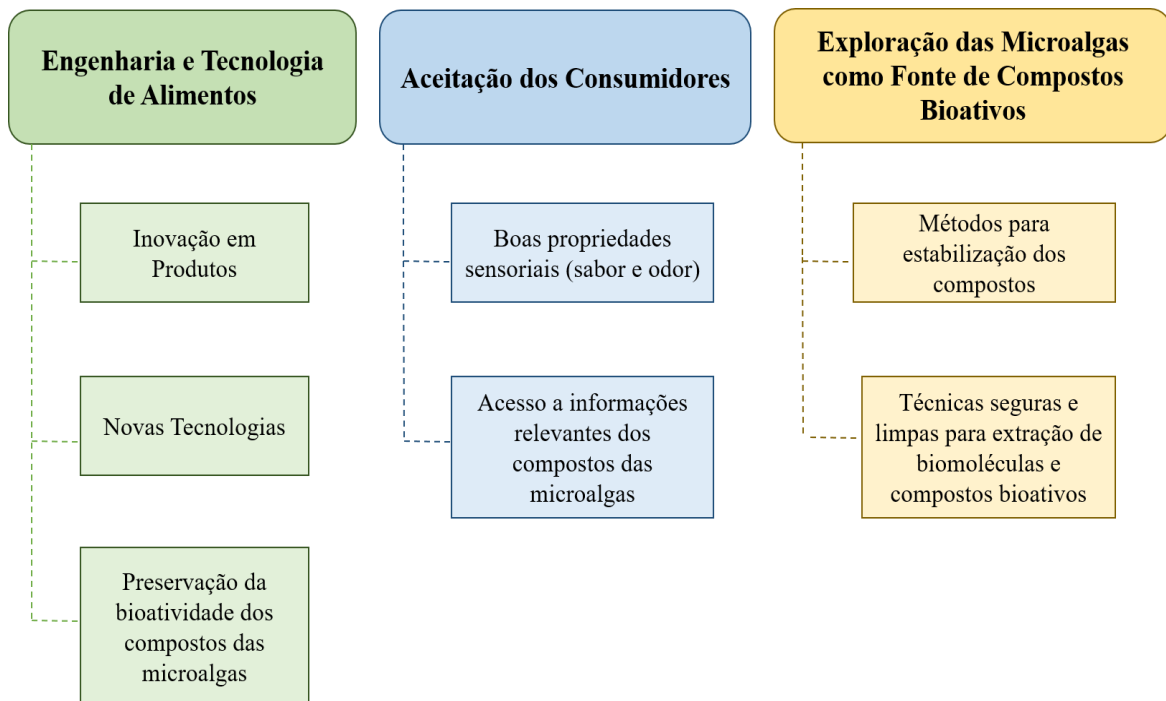


Figura 4: Desafios a serem superados para a adição de microalgas em alimentos.
Fonte: Adaptado de Chacón-Lee & González-Mariño (2010).

Nos estudos visando a adição de microalgas em alimentos, nomeadamente *S. platensis*, relataram-se algumas dificuldades tais como a cor verde escura e o odor característico a peixe desta microalga (Becker, 2007).

Agustini *et al.* (2016) através de análises sensoriais realizadas com gelado e queijo de pasta mole aditivados com spirulina, concluíram que a aceitabilidade dos consumidores diminuiu com o aumento da concentração da microalga, devido ao odor desagradável a peixe e pela intensa coloração verde.

É de destacar ainda que a spirulina quando adicionada aos alimentos na forma livre apresenta pouca homogeneidade, como por exemplo em batidos e *smoothies* (matrizes hidrofílicas), já que apresenta baixa solubilidade em água (FDA, 2002).

1.2.7 Principais Soluções para a Aplicação de Microalgas em Alimentos

No trabalho realizado por Gantar & Svirčev (2008), verificou-se que o futuro da biotecnologia estaria mais centrado na exploração de compostos específicos das microalgas, ao invés do consumo da biomassa. Entretanto, é na biomassa que se concentram os compostos, e assim, seria mais vantajoso o seu consumo, já que não se ingere só um composto específico, mas toda uma gama de compostos com elevadas propriedades funcionais.

Uma solução para os problemas resultantes da aplicação da microalga em produtos alimentares consiste no desenvolvimento de alimentos com “sabor exótico” (adição da microalga e especiarias indianas ou asiáticas), uma vez que na população ocidental o uso de microalgas na culinária tradicional é uma prática corrente em diversas preparações. No entanto, existem soluções mais técnicas que utilizam a biomassa das microalgas encapsulada para encobrir características indesejáveis, tais como o sabor e o odor desagradável (Chacón-Lee & González-Mariño, 2010).

A utilização da encapsulação com esta finalidade foi testada por exemplo no trabalho de Ma *et al.* (2014) em que os autores procuraram encobrir o sabor amargo do hidrolisado das proteína do soro de leite (WPH) através da microencapsulação por *spray drying* e liofilização, obtendo resultados satisfatórios principalmente com a técnica de *spray drying*, reduzindo o sabor amargo sem prejudicar a atividade imunorreguladora do hidrolisado.

A encapsulação garante ainda uma maior conservação das propriedades bioativas das substâncias encapsuladas, como por exemplo no caso das microalgas que apresentam uma infinidade de compostos que podem ser degradados com o tempo de armazenamento, o efeito da temperatura e da luz. Esta técnica permite que o composto fique ativo por mais tempo, já que estará protegido dos fatores ambientais. Outra vantagem da encapsulação é o facto de a redução do tamanho das partículas promover o aumento da solubilidade facilitando a libertação do composto no organismo de forma controlada aumentando assim a absorção eficiente nas células, além de melhorar a homogeneização caso seja adicionada a matrizes alimentares (de Morais *et al.*, 2016).

Outra técnica que também pode ser utilizada para a resolução dos problemas referidos anteriormente consiste na eliminação dos compostos responsáveis pelos odores como referem os autores Bao *et al.* (2018) que avaliaram a fermentação da spirulina com *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus subtilis*, e na qual obtiveram resultados positivos quanto à desodorização da microalga, permitindo assim que seja possível a adição de quantidades superiores em alimentos convencionais.

1.3 MICRO/NANOENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação e nanoencapsulação são tecnologias que permitem aprisionar compostos, podendo estes ser sólidos, líquidos ou gases denominados de materiais de núcleo ou de recheio. Estes incluem exemplos tais como: vitaminas, ingredientes diversos para aplicação em alimentos, pigmentos, enzimas, proteínas, compostos bioativos, etc. Nesta técnica utiliza-se um material de encapsulamento ou revestimento que protegerá o material do núcleo, como evidencia a **Figura 5**, sendo designado de “material de parede”, “encapsulante” ou “revestimento”. Exemplos desses materiais incluem polímeros biodegradáveis que são bastante atrativos para este tipo de aplicações (Desai & Park, 2005; Wen *et al.*, 2014).

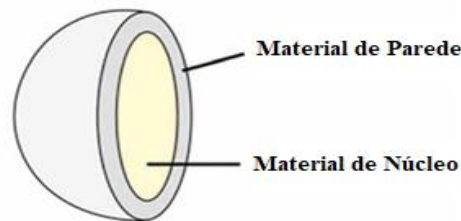


Figura 5: Demonstração da localização do material de parede e material de núcleo.
Fonte: Adaptado de Peanparkde *et al.* (2016).

A técnica de microencapsulação foi estudada pela primeira vez em 1931 pelo químico Barret K. Green que preparou esferas de gelatina através da técnica de coacervação. Em 1953 foi desenvolvido por Barret o papel químico na *Nacional Cash Register* (NCR), sendo este o primeiro produto comercial utilizando microcápsulas. A técnica continuou a ser estudada e melhorada, principalmente na área farmacêutica para fornecer diversas formas de dosagem para utilização em cápsulas, cremes e comprimidos. A indústria farmacêutica foi pioneira no desenvolvimento do conceito de

microencapsulação, com o intuito de aumentar a biodisponibilidade e estabilidade dos princípios ativos terapêuticos (Wen *et al.*, 2014).

Em 2015, 68% do volume de negócio do setor da microencapsulação correspondia à área farmacêutica e 13% ao setor alimentar, porém, desde 2015 tem-se verificado uma busca crescente por esta tecnologia, tanto para a área alimentar quanto para a cosmética e farmacêutica (Dias *et al.*, 2015). Segundo Wen *et al.* (2014) as partículas podem ser produzidas com diferentes tamanhos; se estas apresentarem tamanhos de 3 a 800 μm são denominadas de microcápsulas ou microesferas e o método é chamado de microencapsulação, caso as cápsulas apresentem tamanho entre 10 a 1000 nm são designadas de nanocápsulas ou nanoesferas e a tecnologia nanoencapsulação.

Segundo Azeredo (2005) existem dois tipos principais de morfologia: as partículas tipo “reservatório” (microcápsulas) e as partículas tipo matriz (microesferas). A **Figura 6** apresenta exemplos de diversos tipos de encapsulados.

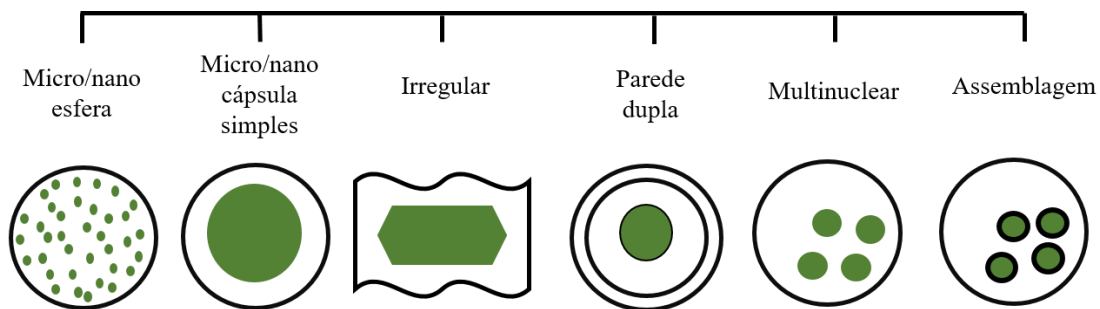


Figura 6: Tipos de encapsulados que podem ser obtidos.
Fonte: Adaptado de Anandharamakrishnan & Ishwarya (2015).

De acordo com Wen *et al.* (2014) na área alimentar, as técnicas de micro/nanoencapsulação são utilizadas para:

- Disfarçar propriedades sensoriais (sabor, cor, odor) indesejáveis que um composto pode gerar;
- Proteger os componentes ativos da interação com fatores envolventes, evitando alterações como: perda de cor, sabor, aroma e valor nutricional;
- Promover uma libertação controlada e direcionada dos compostos ativos;
- Proteger e aumentar a estabilidade de compostos bioativos;

As partículas obtidas podem apresentar diferentes estruturas e morfologias o que depende dos materiais encapsulados, dos encapsulantes e da técnica utilizada (Silva & Meireles, 2014).

1.3.1 Materiais de Parede

A escolha do material de parede deve obedecer a vários parâmetros, visto que é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento do processo de encapsulação. Será este o material que irá proteger o núcleo e permitir a sua libertação no local adequado. Assim, segundo Anandharamakrishnan & Ishwarya (2015) a escolha do material de parede deve levar em consideração os seguintes aspetos:

- Existência de compatibilidade e não reatividade com o material de núcleo;
- Existência de certificação como “reconhecido como seguro” (GRAS) para aplicações em alimentos pela *Food and Drug Administration* (FDA) ou pela *European Food Safety Authority* (EFSA);
- Eficácia e custo;
- Eficiência como barreira protetora;
- Capacidade de encapsulação.

De acordo com os mesmos autores, outras particularidades podem ser observadas: capacidade de formar emulsão, solubilidade, capacidade de formação de filme e estabilidade face a condições adversas, como por exemplo, pH, temperatura, oxigénio, luz e humidade. Na prática não há materiais que se encaixem em todos os requisitos exigidos podendo-se utilizar combinações de materiais com o intuito de obter os melhores resultados (Desai & Park, 2005). A **Figura 7** evidencia alguns materiais de revestimento ou de parede de qualidade alimentar normalmente utilizados.



Figura 7: Materiais de parede de qualidade alimentar normalmente utilizados.
Fonte: Adaptado de Desai & Park (2005).

A maltodextrina (MD) é um polissacárido obtido através da hidrólise parcial do amido, apresenta-se na forma de um pó branco com sabor suave e adocicado. É comumente utilizada como material de parede em encapsulações para uso na indústria alimentar, principalmente quando se utiliza o método de *spray drying*; é de baixo custo, solúvel em água e oferece capacidade de proteção do núcleo, pois forma rapidamente uma capa protetora em torno do conteúdo durante o momento da secagem por pulverização (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015).

1.4 TÉCNICAS DE MICRO/NANOENCAPSULAÇÃO

O método de encapsulação depende de diversos fatores, tais como: propriedades físicas e químicas do núcleo e do material de parede, aplicação do produto final, tamanho de partícula desejado, custos e mecanismos de libertação (Azeredo, 2005).

Segundo Anandharamakrishnan & Ishwarya (2015) os processos de encapsulação subdividem-se em dois grandes grupos: físicos, quando há precipitação do polímero a partir de uma solução onde ocorrem modificações físicas (mudança de pH, temperatura etc.); e os químicos que abrangem reações de polimerização. No entanto, é comum utilizarem-se combinações de diferentes técnicas para garantir uma maior eficácia de encapsulação, como por exemplo, a preparação de emulsões com a secagem por pulverização para a encapsulação de ingredientes alimentares. A **Tabela 7** mostra algumas das técnicas de encapsulação utilizadas e o ingrediente encapsulado para alguns estudos existentes na literatura.

Tabela 7: Técnicas de encapsulamento e os respectivos ingredientes encapsulados.

Processo	Técnica	Ingrediente encapsulado	Referências
	<i>Spray Drying</i>	Extrato hidroalcoólico de cogumelos	Ribeiro <i>et al.</i> (2015)
Físico	<i>Spray Chilling/Cooling/Congeealing</i>	Ácido gálico	Consoli <i>et al.</i> (2016)
	<i>Electrospray</i>	β-caroteno	Gómez-Mascaraque <i>et al.</i> (2017)
	Liofilização	Antocianinas	Yamashita <i>et al.</i> (2017)
	Co-Extrusão	Óleo essencial de alecrim	Dolça <i>et al.</i> (2015)
Químico	Lipossomas	Antocianinas	Zhao <i>et al.</i> (2017)
	Coacervação complexa	Óleo de palma	Rutz <i>et al.</i> (2017)

1.4.1 *Spray Drying*

O método de secagem por pulverização, também conhecido como *spray drying*, é um dos métodos de microencapsulação mais antigos utilizados. O seu uso teve início em 1930 quando as indústrias de sabores procuravam métodos para proteger os componentes voláteis. Desde então tem sido utilizada para a encapsulação de ingredientes alimentares tornando-se a técnica predominante nesta área (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015).

É considerado um método versátil e com capacidade para produção contínua, resultando num processo económico e com escala industrial. Apresenta baixo custo no que se refere ao equipamento e materiais utilizados (comparativamente com outros métodos), o que é considerado favorável para a indústria alimentar (Dias *et al.*, 2015).

Silva *et al.* (2014), além das vantagens já mencionadas, descreve como desvantagem, o facto de conduzir a produtos pouco uniformes quanto ao tamanho de partícula. Outra desvantagem mencionada por Shishir *et al.* (2018) está relacionada com utilização de compostos voláteis ou sensíveis a temperaturas elevadas, uma vez que podem ser degradados no processo de secagem sendo necessário neste caso a otimização do processo de encapsulação.

O processo ocorre de acordo com as etapas descritas abaixo e também esquematizadas, juntamente com os componentes do equipamento, na **Figura 8**.

1. Formação de uma emulsão, solução ou suspensão que contém o material de parede e o material de núcleo;
2. Pulverização em câmara de secagem com ar quente;
3. Evaporação da água ao entrar em contato com o ar quente, resultando na encapsulação do núcleo.
4. O gás de arraste com as partículas sólidas segue para o ciclone separador, e através da força centrífuga, separam-se as partículas do gás;
5. As partículas sólidas são recolhidas;
6. O gás de arraste é descartado;

Os fatores que influenciam a eficiência da microencapsulação por *spray drying* são as propriedades associadas à emulsão/solução/suspensão primária e as condições do processo de secagem, como por exemplo, a temperatura de entrada, o caudal de alimentação e o teor de sólidos utilizados (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015).

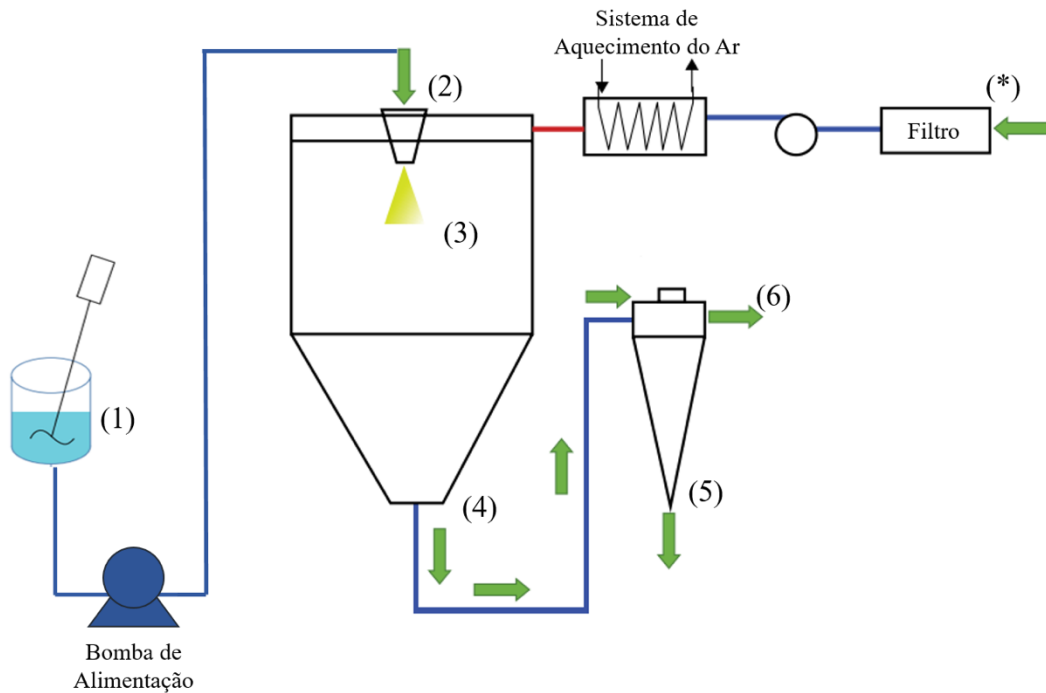


Figura 8: Mecanismo do *Spray Dryer*. (1) Preparação da solução; (2) Alimentação e pulverização; (3) Evaporação da água; (4) Saída do gás de arraste com as partículas; (5) Recolha das partículas; (6) Saída do gás de arraste; (*) Filtro de ar.

Fonte: Adaptado de Anandharamkrishnan & Ishwarya (2015).

A técnica de microencapsulação por *spray drying* tem sido amplamente aplicada na área alimentar. A **Tabela 8** mostra um conjunto de estudos realizados com a tecnologia visando a microencapsulação de ingredientes e compostos alimentares.

Tabela 8: Utilização do método *Spray drying* na encapsulação de ingredientes e compostos alimentares.

Ingrediente Encapsulado	Material de Parede	Condições do Processo	Referências
Óleo de chia	MD e AM	T _E : 170°C T _E : 88°C F _E : 5,5 mL/min	(Noello, Carvalho, Silva, & Hubinger, 2016)
Extrato de antocianina de <i>Berberis vulgaris</i>	MD, MD + GA e MD + GE	T _E : 150°C T _S : 100°C F _E : 800 mL/h	(Akhavan, Mahdi, Assadpoor, & Dehnad, 2016)
Compostos fenólicos extraídos da borra de café	MD e GA	T _E : 135°C T _S : ND F _E : 108 mL/h	(Ballesteros, Ramirez, Orrego, Teixeira, & Mussatto, 2017)
Kefir	LD, PS e MD	T _E : 135°C T _S : 66-69°C F _E : 10 mL/min	(Teijeiro, Pérez, Antoni, & Golowczyc, 2018)
Extrato de beterraba	MD, IN, WPI	T _E : 150°C T _S : 96°C F _E : 0,8 L/h	(Lourenço, Amanda, Teodoro, Henrique, & Félix, 2018)

MD – maltodextrina; AM – amido modificado; GA – goma arábica; GE – gelatina; LD – leite magro; PS - permeado de soro de leite; IN – inulina; WPI – *whey protein isolate* (proteína isolada do soro de leite); T_E – temperatura de entrada; T_S – temperatura de saída; F_E – fluxo de entrada; ND – não detetado.

1.4.2 Reticulação Polimérica (*Crosslinking*)

A maltodextrina (MD), como já referido anteriormente, é utilizada geralmente como material de parede para a encapsulação na área alimentar. Por ser um polissacárido solúvel em água, tem como vantagens promover a compatibilidade de composto hidrofóbicos com meios aquosos. Contudo, pode resultar também numa libertação rápida do composto encapsulado quando adicionado a matrizes hidrofílicas, podendo limitar a sua aplicação.

A técnica de reticulação surge como uma solução para resolver este problema, uma vez que se baseia num processo que conduz à formação de ligações entre as cadeias poliméricas. Esta pode ser conseguida por meio de ligações covalentes (reticulação química) ou não (reticulação física) e é comumente utilizada em biopolímeros (polímeros obtidos de fontes naturais) com a finalidade de melhorar as propriedades mecânicas e de proteção, modelar a solubilidade em água e aumentar a resistência ao calor e luz (Azeredo & Waldron, 2016).

Existem diversos tipos de agentes reticulantes, dependendo do biopolímero e do fim pretendido. O glutaraldeído é o principal agente aplicado na reticulação de polissacáridos e proteínas, no entanto tem apresentado efeitos citotóxicos, o que é desfavorável para a área alimentar, mesmo que forneça boas propriedades mecânicas. Desta forma, e como alternativa mais “verde”, os ácidos carboxílicos como o ácido cítrico têm sido utilizados, já que não apresentam toxicidade (Reddy, Reddy, & Jiang, 2015).

O ácido cítrico (AC) é um ácido orgânico com três grupos carboxílicos e é classificado como aditivo alimentar seguro, ou seja, não apresenta toxicidade e é aceitável do ponto de vista nutricional (Azeredo & Waldron, 2016). Assim, neste contexto vários estudos estão sendo realizados onde a reticulação de polissacáridos é feita com AC (Awadhiya, Kumar, & Verma, 2016; Menzel *et al.*, 2013; González *et al.*, 2016; Francisco *et al.*, 2018). Portanto, quando a MD é utilizada em combinação com o AC, e na gama de temperaturas entre 150-175 °C, os grupos carboxílicos do ácido cítrico ligam-se aos grupos hidroxilos da maltodextrina (**Figura 9**) formando ligações éster que conduzem à formação de uma estrutura em rede que confere melhores propriedades mecânicas ao biopolímero (Reddy *et al.*, 2015; Castro-Cabado, Casado, & San Román, 2016).

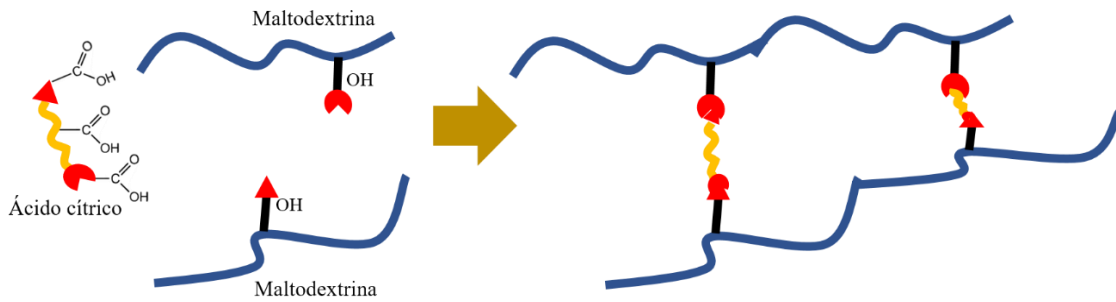


Figura 9: Exemplificação da reação de reticulação química entre a maltodextrina e o ácido cítrico.
Fonte: Adaptado de Reddy *et al.* (2015)

1.5 TÉCNICAS USADAS PARA MICRO/NANOENCAPSULAÇÃO DE MICROALGAS

Atualmente, existem diversos estudos com a aplicação de microalgas em produtos alimentares, no entanto, os estudos com a adição de microalgas na forma microencapsulada são escassos, apesar desta técnica ser uma alternativa para o problema dos sabores e odores desagradáveis ocasionados pela adição de microalgas em alimentos. A **Tabela 9** apresenta alguns estudos publicados utilizando micro e nanoencapsulação de *S. platensis* e *Chlorella vulgaris*, duas microalgas certificadas pela FDA como seguras para a utilização em alimentos.

Tabela 9: Diferentes técnicas de microencapsulação de microalgas utilizadas na literatura.

Microalga micro/nanoencapsulada	Técnica utilizada	Material de parede	Referências
Nanoencapsulação de <i>S. platensis</i>	Lipossomas	Fosfatidilcolina purificada de lecitina de soja	Machado <i>et al.</i> (2015)
Microencapsulação de <i>S. platensis</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	Liofilização	Maltodextrina	Raya <i>et al.</i> (2016)
Microencapsulação do extrato aquoso de <i>S. platensis</i>	<i>Spray Drying</i> e liofilização	Goma arábica e maltodextrina	Migliavacca <i>et al.</i> (2014)

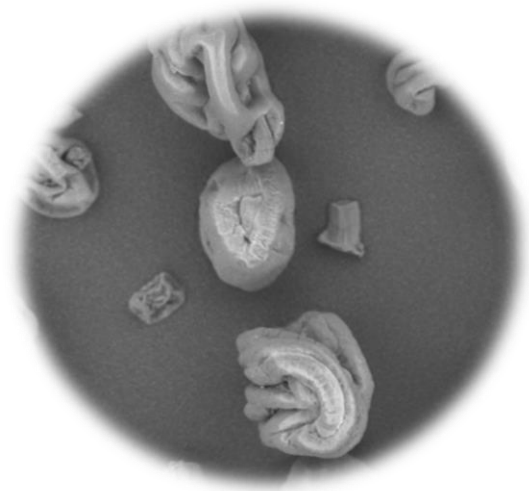
Machado *et al.* (2015) aplicou a técnica de nanoencapsulação (produção de lipossomas) à *S. platensis* tendo utilizado como material de parede a fosfatidilcolina purificada a partir da lecitina de soja e comparando dois processos de preparação diferentes: sonificação e homogeneização. Raya *et al.* (2016) microencapsulou as microalgas *S. platensis* e *Chlorella vulgaris* utilizando o método da liofilização com diferentes concentrações de maltodextrina (10-30%) como material de parede. Teve como principal objetivo encontrar a melhor concentração a utilizar de MD com base na qualidade das microcápsulas formadas, tanto para *S. platensis* como para *C. vulgaris*. No

estudo realizado por Migliavacca *et al.* (2014) o extrato aquoso de *S. platensis* foi encapsulado utilizando as técnicas de *Spray Drying* e liofilização, como material de parede utilizou-se a goma arábica e a maltodextrina, tendo com o objetivo obter microcápsulas estáveis com capacidade de proteção dos compostos bioativos de *S. platensis*.

Em síntese, os estudos sobre a microencapsulação de microalgas e a sua posterior adição em matrizes alimentares tem como principal objetivo reduzir ou eliminar os odores e sabores indesejáveis, aumentar a sua solubilidade em água e garantir a manutenção dos compostos bioativos por tempos mais prolongados. Estes estudos, tornam-se assim promissores colocando em destaque a possibilidade de utilizar a técnica de microencapsulação, nomeadamente a técnica de *spray-drying*, para a resolução dos problemas mencionados neste capítulo.

Capítulo 2

Materiais e Métodos



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PADRÕES E REAGENTES

O acetato de etilo, *n*-hexano e acetonitrilo, todos de grau HPLC, foram adquiridos na Fisher Scientific.

O DMSO, lipopolissacárido (LPS), a dexametasona, a sulforrodamina B (SRB), o azul de tripano, o ácido tricloroacético, o Trisaminometano (Tris) e a elipticina foram adquiridos na Sigma-Aldrich, sendo o meio RPMI-1640 adquirido na HyClone.

O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), a solução salina equilibrada de Hank (HBSS), o soro fetal bovino (FBS), a *L*-glutamina, a tripsina-EDTA e a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente) foram obtidos na Gibco Invitrogen Life Technologies. O kit Griess Reagent System foi adquirido da Promega.

A maltodextrina foi gentilmente cedida pela Cargill e possui um DE (dextrose equivalente) de 18.

A água foi tratada num sistema de purificação Mili-Q (TGI Sistema de água pura). Todos os restantes produtos químicos e solventes eram de grau analítico e foram adquiridos em fornecedores portugueses.

2.2 AMOSTRAS DE *S. platensis*

A amostra comercial (Bio Origens, Portugal) desidratada e pulverizada da microalga *S. platensis* (spirulina) foi adquirida num supermercado em Bragança, Portugal. A amostra foi armazenada sob refrigeração, protegida da luz para posterior análise.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DESIDRATADA DA MICROALGA *S. platensis*

2.3.1 Valor Nutricional e Energético

A composição em macronutrientes (proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas) e valor energético presentes na biomassa desidratada de *S. platensis* foram avaliados segundo

métodos oficiais de análise de alimentos descritos pela AOAC (2016). O teor de proteínas foi estimado pelo método macro-Kjeldahl por conversão do azoto total, utilizando como fator de correção $N \times 6,25$. Os lípidos foram determinados através da extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando um aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração em mufla a $550 \pm 15^\circ\text{C}$. Os hidratos de carbono foram calculados por diferença e a energia total calculada de acordo com as equações [1] e [2], respetivamente.

$$\text{Glúcidos (g/100g massa seca)} = (100 - (\text{g lípidos} + \text{g proteínas} + \text{g cinzas})) \quad [1]$$

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos}) \quad [2]$$

2.3.2 Açúcares Livres

A composição dos açúcares livres foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme a metodologia descrita por Barros *et al.* (2013). As amostras da microalga desidratada e pulverizada (1,5 g) foram enriquecidas com melezitose (1 mL) como padrão interno (PI, 25 mg/mL) e foram extraídas com 40 mL de etanol aquoso 80%, a 80°C , durante 1h 30 min. A suspensão obtida foi centrifugada (10 min, 15000 g) e o sobrenadante foi recolhido e concentrado a pressão reduzida, a 40°C . Foram efetuadas lavagens sucessivas com éter dietílico para remoção de vestígios de gordura. Após nova concentração a 40°C , os resíduos sólidos foram dissolvidos em água até um volume final de 5 mL e filtrados para *vials*. Os açúcares foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), com um sistema de bomba quaternária integrado (Knauer, sistema Smartline 1000), detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna cromatográfica 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 μm, Knauer) operando a 35°C . A fase móvel foi acetoneitrilo: água desionizada, 7:3 (v/v) a um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões. Os resultados foram expressos em g/100 g de massa seca (ms), calculados pela normalização interna da área do pico cromatográfico utilizando o software Software Clarity 2.4 (DataApex).

2.3.3 Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida ultra-rápida com detetor de fotodíodos (UFLC-DAD), segundo o procedimento otimizado e descrito por Barros *et al.* (2013).

As amostras desidratadas (1,5 g) extraíram-se com ácido metafosfórico 4,5 % (25 mL), com agitação durante 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente filtraram-se com papel de filtro (filtros Whatman nº 4). De seguida foram filtradas com filtros de nylon de 0,2 µm (Millipore) para *vials* para posterior injeção. A análise realizou-se num cromatógrafo Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation) acoplado a um detetor de fotodíodos usando como comprimento de onda preferencial 215 nm. A separação foi realizada numa coluna SphereClone (Phenomenex, Torrance, CA, USA) C18 de fase reversa (4,6 × 250 mm, 5 µm) operando a 35 °C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 3,6 mM a um caudal de 0,8 mL/min. Os ácidos orgânicos quantificaram-se em função das áreas dos picos mediante retas de calibração de padrões comerciais. Os resultados foram expressos em mg/100 g de massa seca (ms).

2.3.4 Ácidos Gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID) segundo a metodologia descrita anteriormente por Barros *et al.* (2013), e após o processo de trans-esterificação descrito seguidamente. Após extração em Soxhlet, os ácidos gordos foram metilados num meio metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante 12 h, num banho a 50 °C e agitação de 160 rpm. De seguida, foi adicionada água desionizada para promover a separação de fases e os esteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foram recuperados com éter etílico após agitação no *vortex*. O sobrenadante foi desidratado com sulfato de sódio anidro e filtrado através de filtros de nylon 0,2 µm para posterior análise. O perfil de ácidos gordos foi obtido num sistema de cromatografia gasosa (GC) modelo DANI 1000, equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID, 260°C) e uma coluna Zebron-Kame (30 m × 0,25 mm × 0,20 µm df). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 100 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 10 °C/min até 140 °C, 3 °C/min até 190 °C, 30 °C/min até 260 °C que foi mantida por 2 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de

1,1 mL/min (0,61 bar), medido a 100 °C. A injeção *split* (1:50) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software Clarity 4.0.1.7 (DataApex) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.3.5 Tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fluorescência seguindo o procedimento previamente otimizado e descrito por Barros *et al.* (2010).

Antes do processo de extração, adicionou-se à amostra (~500 mg) uma solução butil-hidroxitolueno em hexano (BHT, antioxidante, 10 mg/mL; 100 µL) e uma solução de tocol em hexano (PI, 50 µg/mL; 400 µL). As amostras foram homogeneizadas com metanol (4 mL) no *vortex* (1 min). Posteriormente, adicionou-se hexano (4 mL) e homogeneizou-se novamente no *vortex* durante 1 min. Em seguida, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 mL), homogeneizou-se (1 min) e centrifugou-se (5 min, 4000 g). O sobrenadante foi, cuidadosamente, transferido para um *vial*. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano. Os extratos combinados foram desidratados com sulfato de sódio anidro, levados à secura sob corrente de azoto, re-dissolvidos em 2 mL de hexano, filtrados através de um filtro de nylon de 0,2 µm, transferidos para um *vial* de injeção ambar e analisados no HPLC. Para a análise dos tocoferóis utilizou-se o equipamento descrito para a análise dos açúcares (Secção 2.3.2), mas utilizando um detetor de fluorescência (Jasco FP-2020, Easton, MD, USA), programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o software Clarity 2,4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna de fase normal Poliamida II (250 4,6 nm) YMC Waters operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada consistiu numa mistura de hexano e acetato de etilo (7:3, v/v) a um caudal de 1 mL/min. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em µg/100 g de massa seca (ms).

2.3.6 Caracterização dos Pigmentos da Spirulina

2.3.6.1 Extração e quantificação dos carotenoides e clorofilas

A biomassa desidratada e pulverizada de *S. platensis* (500 mg) foi vigorosamente agitada com 10 mL de uma solução acetona:hexano (4:6, v/v) durante 1 minuto e filtrada (filtro Whatman nº 4). Mediu-se a absorvância do filtrado a 453, 505, 645 e 663 nm (Petropoulos *et al.*, 2018). As quantidades de β -caroteno, licopeno, clorofila *a* e clorofila *b* foram determinados segundo as equações [3], [4], [5] e [6], respectivamente.

$$\beta\text{-caroteno (mg/100 mL)} = (0,216 \times A_{663}) - (1,220 \times A_{645}) - (0,304 \times A_{505}) + (0,452 \times A_{453}) \quad [3]$$

$$\text{Licopeno (mg/100 mL)} = - (0,0458 \times A_{663}) + (0,204 \times A_{645}) - (0,304 \times A_{505}) + (0,452 \times A_{453}) \quad [4]$$

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/100 mL)} = (0,999 \times A_{663}) - (0,0989 \times A_{645}) \quad [5]$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg/100 mL)} = - (0,328 \times A_{663}) + (1,77 \times A_{645}) \quad [6]$$

Onde A_{453} , A_{505} , A_{645} e A_{663} são as absorvâncias aos respectivos comprimentos de onda. A análise foi realizada em triplicado. Os resultados foram expressos em mg/100 g massa seca (ms).

2.3.6.2 Extração e quantificação da ficocianina

Para a extração e quantificação da ficocianina foram utilizados diferentes solventes, utilizando o método de congelação/descongelação para a ruptura das células de acordo com Saran *et al.* (2016) com algumas modificações. A *S. platensis* desidratada e pulverizada (1,5 g) foi colocada em 20 mL de diferentes solventes (água destilada, tampão acetato 0,1M (pH 6,0), tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) e uma mistura etanol:água 3:7 v/v). As soluções foram submetidas a três ciclos de congelação/descongelação, sendo que cada ciclo de congelação (-20 °C) teve a duração de uma hora e a de descongelação (temperatura ambiente) os seguintes tempos: 15 minutos para o primeiro ciclo, 30 minutos para o segundo ciclo e 45 minutos para o terceiro ciclo. Após o último ciclo de descongelação, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 6000 rpm durante

15 minutos. De seguida, mediram-se as absorvâncias a 615 nm, 652 nm e 280 nm. A concentração de ficocianina (CF) foi determinada de acordo com a equação [7] recomendada por Bennett & Bogorad, (1973). Os resultados foram expressos em mg/mL.

$$CF = \frac{(Abs_{615} - 0,474 Abs_{652})}{5,43} \quad [7]$$

Onde, CF é a concentração de ficocianina em mg/mL, Abs_{615} é a absorvância do sobrenadante a 615 nm e Abs_{652} é a absorvância do sobrenadante a 652 nm.

O rendimento da extração (RE) foi determinado segundo a equação [8].

$$RE = \frac{CF \times V}{MS} \quad [8]$$

Onde, RE é o rendimento da extração em mg/g de spirulina, CF é a concentração de ficocianina (mg/mL), V é o volume utilizado de cada solvente (mL) e MS é a massa de *S. platensis* utilizada na extração (g). Os resultados foram expressos em g/100g de massa seca (ms).

A pureza da ficocianina (PE) foi determinada espectrofotometricamente como a razão dentre a absorvância obtida a 615 nm e a obtida a 280 nm (Abalde, 1998) (Equação [9]). Esta fórmula, permite calcular a pureza do extrato de acordo com outras formas de proteínas; a 615 nm determina-se a ficocianina enquanto que a 280 nm determinam-se outros tipos de proteínas que estão na solução (Pan-utai, Kahapana, & Iamtham, 2018).

$$PE = \frac{Abs_{615}}{Abs_{280}} \quad [9]$$

2.3.7 Avaliação das Propriedades Bioativas

2.3.7.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da spirulina foi determinada *in vitro* conforme a metodologia descrita por Sarmiento *et al.* (2015). Resumidamente, a biomassa desidratada e pulverizada de *S. platensis* foi dissolvida em água para a preparação da solução-mãe

(50 mg/mL), que foi posteriormente diluída em diferentes concentrações (25 mg/mL a 0,39 mg/mL) para os diferentes métodos de atividade antioxidante.

As concentrações da amostra que fornecem 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância (EC_{50}) foram calculadas a partir dos gráficos das percentagens da atividade antioxidante (ensaios de DPPH e β -caroteno/linoleato) ou da absorvância a 690 nm (ensaio do poder redutor) em função da concentração da amostra. O padrão utilizado foi o Trolox.

a) Atividade Captadora de Radicais DPPH (*2,2-difenil-1-picrilhidrazilo*)

Esta metodologia foi realizada recorrendo ao leitor de microplacas ELX800 (Biotek, Instruments Inc) utilizando-se microplacas de 96 poços. A mistura de reação em cada um dos poços consistiu em: soluções da amostra com diferentes concentrações (30 μ L), compreendidas entre 50 mg/mL a 0,78 mg/mL, e solução metanólica contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L, 270 μ L). A mistura foi mantida em repouso e ao abrigo da luz durante 60 min, para a estabilização dos valores de absorvância, sendo avaliada posteriormente a redução do radical DPPH pela medição da absorvância a 515 nm.

A atividade captadora de radicais livres (RSA) foi calculada como percentagem de descoloração de DPPH usando a equação [10].

$$\%RSA = \frac{A_{DPPH} - A_S}{A_{DPPH}} \times 100 \quad [10]$$

Nesta equação, A_S corresponde à absorvância da solução que contém a amostra e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH.

b) Poder Redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o leitor de microplacas mencionado anteriormente e foi avaliada a capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . As soluções da amostra com diferentes concentrações (0,5 mL), 25 mg/mL a 0,78 mg/mL, foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L; pH 6,6; 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% w/v; 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e, de seguida, adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v; 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada em microplacas

de 48 poços, assim como água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% w/v; 0,16 mL). Posteriormente, a absorvância foi lida a 690 nm.

c) Inibição da descoloração do β -caroteno

Foi preparada uma solução por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL) e transferiram-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo, juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsificante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) e agitou-se vigorosamente.

Uma alíquota (4,8 mL) desta emulsão foi transferida para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações das amostras (0,2 mL). Os tubos foram agitados e incubados a 50 °C em banho-maria. Imediatamente após a adição da emulsão a cada tubo mediu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero (absorvância inicial) (A_{T0}). Posteriormente, os tubos foram mantidos a 50 °C durante 2h e foi medida novamente a absorvância, sendo esta designada de absorvância após 2h de ensaio (A_{T120}). A inibição da descoloração do β -caroteno/linoleato foi calculada utilizando a equação [11].

$$\% \text{ Inibição do } \beta\text{-caroteno} = \frac{A_{T120}}{A_{T0}} \times 100 \quad [11]$$

d) Ensaio da inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

Para a realização deste ensaio celular, foi efetuada uma colheita de sangue de ovelha. A amostra de sangue foi centrifugada (Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific; 2900 rpm, 5 min, 10 °C) e o sobrenadante descartado de modo a recuperar apenas os eritrócitos. Estes foram submetidos a uma primeira lavagem com NaCl (150 mM) seguida de três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS; pH 7,4), com centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem (Evans *et al.*, 2013). Seguidamente preparou-se uma solução de eritrócitos a 2,8% (v/v) em PBS. Posteriormente, 200 μ L da solução de eritrócitos foram adicionados a 400 μ L de PBS (controlo), da amostra antioxidante dissolvido em PBS (20 a 0,625 mg/mL) e a água (para promover hemólise completa) utilizando microplacas de 48 poços. Após pré-incubação das microplacas a 37 °C durante 10 min com agitação, adicionaram-se 200 μ L de dicloro-hidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH; 160 mM) e mediu-se a densidade ótica a 690 nm. As

microplacas foram depois incubadas nas mesmas condições durante cerca de 400 min, com medições a cada 10 min (Takebayashi, Iwahashi, Ishimi, & Tai, 2012). A percentagem da população de eritrócitos (PE) que permaneceu intacta foi calculada utilizando a equação [12].

$$PE (\%) = \frac{S_t - CH_0}{S_0 - CH_0} \times 100 \quad [12]$$

Onde S_t e S_0 correspondem à densidade ótica da amostra a um instante de tempo t e 0 min, respetivamente, e CH_0 é a densidade ótica correspondente à hemólise completa aos 0 min. Os resultados foram expressos como o tempo de atraso da hemólise (Δt), que foi calculado utilizando a equação [13].

$$\Delta t (\text{min}) = Ht_{50} (\text{amostra}) - Ht_{50} (\text{controlo}) \quad [13]$$

Onde Ht_{50} é o tempo correspondente a 50% de hemólise (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise para cada concentração de amostra antioxidante. Posteriormente, foram estabelecidas correlações lineares entre os valores de Δt e as diferentes concentrações de amostra (Takebayashi *et al.*, 2012). A partir das mesmas, foi calculada a concentração capaz de retardar a hemólise em 60 min ($EC_{50} (60 \text{ min})$, mg/mL) e 120 min ($EC_{50} (120 \text{ min})$, mg/mL).

2.3.7.2 Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais humanas

Para a avaliação da atividade citotóxica em linhas celulares tumorais humanas, a biomassa desidratada de *S. platensis* (8 mg) foi dissolvida em água destilada de forma a obter uma concentração 8 mg/mL e submetida a diluições sucessivas, obtendo concentrações compreendidas entre 400 $\mu\text{g/mL}$ a 3,125 $\mu\text{g/mL}$. Foram utilizadas as seguintes linhas celulares humanas: MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) obtidas no DSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ECACC (European Collection of Cell Cultures). As células foram mantidas rotineiramente como culturas de células aderentes

em meio RPMI-1640 contendo 10% de FBS inativado pelo calor, suplementado com glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), numa incubadora a 37 °C com ar humidificado e 5% de CO₂.

Para avaliar a citotoxicidade, foi realizado o ensaio da Sulforodamina B (SRB) de acordo com o procedimento descrito por Abreu *et al.* (2011). Para isso, as suspensões celulares foram colocadas em microplacas de 96 poços (190 µL/poço) com as diluições (10 µL) a uma densidade adequada ($1,0 \times 10^4$ células/poço) e incubadas durante 48h. Após o período de incubação, as células aderentes foram fixadas pela adição de ácido tricloroacético 10% previamente refrigerado (100 µL) e incubadas por 60 minutos a 4 °C. Decorrido esse período, as microplacas foram lavadas com água desionizada e secas. Em seguida, foi adicionado SRB (0,1% em ácido acético a 1%, 100 µL) nos poços da microplaca e incubou-se durante 30 minutos. Posteriormente, foi removida a SRB não aderida pela lavagem com solução de ácido acético a 1% e novamente a placa foi seca. A SRB aderida foi solubilizada com Tris 10 mM (200 µL) e a absorvância foi medida com o comprimento de onda de 540 nm, no leitor de microplacas (ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Curvas de dose-resposta que relacionam a concentração do amostra utilizada com a percentagem de inibição do crescimento celular foram obtidas e expressas em valores de GI₅₀ (concentração da amostra que inibe 50% do crescimento celular). A Elipticina foi utilizada como padrão.

2.3.7.3 Atividade citotóxica em células não tumorais

Para a análise da atividade citotóxica em células não tumorais, utilizaram-se as mesmas concentrações descritas na secção 2.3.7.2. Foi preparada uma cultura de células a partir do fígado de porco obtido num matadouro local, designada PLP2 (*porcine liver primary culture*; cultura primária de células de fígado de porco). O tecido de fígado foi lavado com solução salina equilibrada de Hank (HBSS) (solução contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e divididos em explantes de 1mm³. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25 cm² em DMEM suplementado com 10% de FBS, 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e incubados a 37 °C em atmosfera humidificada contendo 5 % de CO₂. O meio foi renovado a cada dois dias e o crescimento celular foi controlado com um microscópio com contraste de fase. As células foram subcultivadas e plaqueadas em

microplaca de 96 poços a uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço. As células foram tratadas durante 48 horas com as diferentes diluições da amostra em análise seguindo o ensaio SRB anteriormente descrito (Secção 2.3.7.2), segundo Abreu *et al.* (2011). Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50 % do crescimento celular na cultura primária PLP2). A Elipticina foi utilizada como padrão.

2.3.7.4 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi determinada segundo metodologia descrita por Corrêa *et al.* (2015). A linha celular de macrófagos de rato RAW 246.7, foi mantida em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, 1% de L-glutamina, 1 % de aminoácidos não-essenciais e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) a 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera humidificada. Para o ensaio foram preparadas suspensões celulares com uma densidade de 5×10^5 células/mL. A viabilidade celular foi calculada pelo teste da exclusão de Azul de tripano, onde se verificou ser inferior a 5%. Em seguida as células foram transferidas em microplacas de 96 poços com 150000 células/poço, e foram incubadas durante 24 h a 37 °C com 5% de CO₂.

Após incubação, os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações da biomassa desidratada de *S. platensis* dissolvida em água (400 a 1,56 µg/mL) durante 1 hora. De seguida procedeu-se à estimulação celular pela adição de lipopolisacárideos (LPS; 1 µg/mL) aos poços, durante 24 horas. Foram realizados controlos na ausência de LPS para observar se estes induziam alterações a níveis basais de óxido nítrico (NO). As amostras e o LPS foram preparados em DMEM suplementado e a dexametasona foi utilizada como controlo positivo.

A presença de óxido nítrico foi determinada através da utilização do Kit de Reagentes Griess (Promega), que contém sulfanilamida, hidrócloro de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e soluções nitradas. Para isso, 100 µL do sobrenadante da cultura celular foram transferidos para outra placa e misturados com sulfanilamida e soluções NED e mantidos em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. O óxido nítrico produzido foi determinado através da absorvância a 540 nm (leitor de microplacas Biotek ELX800) e comparado com a curva de calibração padrão ($y = 0,007x + 0,1328$, $R^2 = 0,9982$). O valor de EC₅₀ foi calculado a partir do gráfico que descreve a percentagem de inibição da produção de NO *versus* a concentração da amostra.

2.3.7.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada por meio de isolados clínicos de pacientes internados na Unidade de Saúde Local de Bragança e Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto-Douro de Vila Real. Foram utilizadas as seguintes bactérias:

- Bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (isolado de urina); *Listeria monocytogenes* (isolada de líquido cefalorraquidiano); *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina - MSSA (isolados de exsudado de ferida) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina - MRSA (isolado de expectoração).
- Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (isoladas de urina), *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* (isolado de exsudado de ferida) e *Pseudomonas aeruginosa* (isolados de expectoração).

A identificação dos microrganismos e os testes de suscetibilidade foram realizados utilizando painéis MicroScan (MicroScan®; Siemens Medical Solutions Diagnostic) pelo método de microdiluição em placa (Alves, Ferreira, Martins, & Pintado, 2012). Os critérios de interpretação foram baseados em Breakpoints Interpretativos, conforme indicado no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e no *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2013). Para determinar a atividade antimicrobiana de *S. platensis*, foi utilizado o método de microdiluição em microplaca por ensaio colorimétrico utilizando o corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazóico (INT) segundo Kuete *et al.* (2011) com algumas modificações. Foi preparada uma solução padrão a partir da biomassa desidratada de *S. platensis* dissolvendo 100 mg em 750 µL de meio de cultura Muller Hinton Broth (MHB) ou Tryptic Soy Broth (TSB) de acordo com o tipo de bactéria e 250 µL de DMSO. Preparou-se a partir desta solução padrão uma concentração inicial de 20 mg/mL da amostra. Adicionou-se 40 µL desta solução e 150 µL de meio de cultura TSB ou MHB no primeiro poço de uma microplaca de 96 poços. Os restantes poços foram preenchidos com 90 µL de meio de cultura TSB ou MHB. Posteriormente foram feitas diluições sucessivas compreendidas entre 20 a 1,25 mg/mL.

Após a preparação prévia do inóculo bacteriano com turvação correspondente a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foram adicionados a todos os poços 10 µL de inóculo. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas numa estufa. Os ensaios foram realizados em duplicado. Como controlo negativo foram utilizados dois antibióticos de acordo com a estirpe em estudo, para bactérias gram-negativas usou-se a

Ampicilina e o Imipinem e para as bactérias gram-positivas foram usadas a Vancomicina e Ampicilina. O controlo positivo foi realizado usando bactéria e meio de cultura TSB ou MHB de acordo com a estirpe. E também foi realizado um controlo negativo somente com a amostra.

Decorridas as 24 horas foi aplicado 40 μL cloreto de *p*-iodonitrotetrazólico (INT) (0,2 mg/mL) em todos os poços com posterior incubação por 30 minutos a 37°C. Os organismos viáveis provocaram uma alteração na cor de amarelo para cor-de-rosa. A CMI foi definida como sendo a menor concentração da amostra para inibir o crescimento bacteriano. Após a determinação das CMIs, retirou-se 50 μL dos poços que apresentaram inibição das bactérias até a máxima concentração testada (20 mg/mL) para uma placa de petri com meio de cultura (MHB/TSB), as placas foram incubadas por 24 horas a fim de identificar a concentração mínima bactericida (CMB).

Os resultados foram expressos em concentração mínima inibitória (CMI) definida como a concentração mínima de amostra necessária para promover a inibição do crescimento bacteriano, e concentração mínima bactericida (CMB) correspondente a concentração mínima de amostra necessária para obter a ação bactericida.

2.4 ESTUDOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

2.4.1 Microencapsulação de *S. platensis* por *Spray Drying*

A microencapsulação foi realizada pela técnica de *spray drying* utilizando a maltodextrina não modificada e maltodextrina reticulada com ácido cítrico como materiais encapsulantes. O procedimento realizado e as condições utilizadas foram adaptadas do trabalho de Francisco *et al.* (2018), com algumas modificações. Prepararam-se duas soluções: (i) uma solução designada SM com uma razão spirulina/maltodextrina de 1:1 (m/m) que resultou numa fração de sólidos de 31,5% e (ii) uma solução designada por SMA com a mesma razão spirulina/maltodextrina (1:1, m/m) com ácido cítrico (10%, base maltodextrina) que resultou numa solução com uma fração de sólidos de 33,0%.

As condições de operação foram as seguintes: temperatura de entrada a 170°C, temperatura de saída a 95°C, aspirador a 90% e bomba a 20% (6 mL/min). Para preparar a solução (SM), *S. platensis* (15,75 g) foi dissolvida em água destilada (150 mL) e em seguida adicionou-se maltodextrina (15,75 g). Para a solução (SMA), *S. platensis* (15,75g) juntamente com a maltodextrina (15,75 g) foi dissolvida em água destilada (150

mL) e posteriormente adicionou-se ácido cítrico (1,58 g) sob agitação até completa dissolução. Este procedimento foi realizado imediatamente antes da atomização da solução. O equipamento utilizado foi um Mini *Spray Dryer* B-290 Buch em operação normal utilizando ar. O bocal utilizado tem um diâmetro de 0,7 mm e o volume atomizado foi de 150 mL. Foram também produzidas microesferas contendo apenas maltodextrina e ácido cítrico com o objetivo de serem utilizadas como controlo. As correspondentes esferas vazias, sem incluir spirulina, foram designadas de MA. As microesferas produzidas com as soluções SM e SMA mantiveram esta designação. A **Figura 10** apresenta detalhadamente o esquema de encapsulação da spirulina descrito acima colocando em evidência as formulações, condições de atomização utilizadas e microencapsulados obtidos.

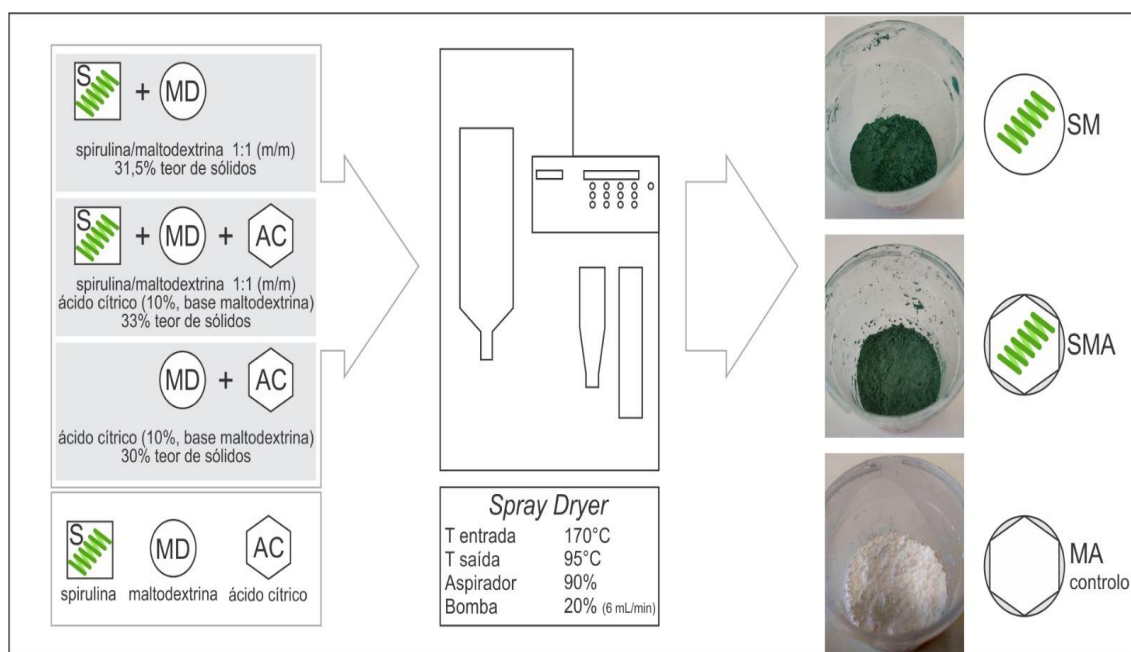


Figura 10: Descrição detalhada da encapsulação de *S. platensis* por *spray drying*.

2.4.2 Caracterização dos Materiais de Base e Microesferas

Os materiais de base foram caracterizados quanto as características de degradação térmica (análise termogravimétrica (TGA/DTG)), avaliação química e estrutural (infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)), morfologia (no caso da spirulina) e propriedades bioativas. As microesferas foram caracterizadas conforme os métodos descritos acima e ainda quanto ao rendimento, eficiência e carga em spirulina e tamanho de partícula. Seguidamente descreve-se cada um dos procedimentos utilizados.

2.4.2.1 Rendimento de encapsulação (R), eficiência e carga

O rendimento de encapsulação (R) foi determinado gravimetricamente como a razão entre a massa de microesferas recolhida no final do processo e a massa dos materiais atomizados, conforme a equação [14]:

$$R = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad [14]$$

Onde M_i é a soma das massas dos materiais utilizados na encapsulação e M_f o valor da massa obtida de microesferas após atomização (base seca). Este parâmetro fornece uma estimativa das perdas de material durante o processo de encapsulação.

O conceito de carga (*load*) é utilizado para expressar o teor de spirulina nas microesferas produzidas, sendo um parâmetro de grande importância para o cálculo da quantidade de microesferas a incorporar numa dada matriz alimentar. A carga considera o valor da spirulina efetivamente encapsulada relativo à massa de microesferas obtidas. No presente trabalho, e dado a complexidade da matriz estudada (mistura de diferentes compostos, nomeadamente proteínas, lípidos, glúcidos, vitaminas etc.), as características do processo de encapsulação (a solução a atomizar está em condições de homogeneidade mantida por agitação constante) e da própria spirulina no que respeita à resistência térmica (compatível com a temperatura de atomização utilizada) assumiu-se uma eficiência de encapsulação próxima de 100% e uma carga equivalente ao valor teórico.

2.4.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA/DTG)

A análise termogravimétrica foi realizada num equipamento NETZSCH modelo TG 209 F3 Tarsus nas condições descritas pelos autores Francisco *et al.* (2018). De forma sucinta, os materiais de base descritos, *S. platensis* e as microesferas obtidas na secção 2.4.1 foram colocadas num cadinho de alumina (6-8 mg) e sujeitas a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, sob fluxo de azoto, na gama de 30 a 600°C. Os termogramas foram obtidos e tratados com o *software* Netzsch Proteus – Thermal Analysis, versão 5.2.1.

2.4.2.3 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os materiais de base descritos, a spirulina e as microesferas obtidas na secção 2.4.1 foram analisadas por FTIR utilizando o equipamento MB300 (ABB) em modo de ATR (Refletância Total Atenuada) com um acessório equipado com um cristal de diamante (para o ácido cítrico). Para as outras amostras (spirulina, maltodextrina, SM, SMA e MA) a análise foi realizada em modo de transmitância pela técnica das pastilhas KBr a 1% (m/m). As análises foram realizadas com os seguintes parâmetros: resolução de 16 cm^{-1} , 32 scans e na gama espectral de $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$. Os espetros foram obtidos e tratados com o *software* Horizon MB versão 3.4.

2.4.2.4 Tamanho de partícula

Para caracterização do tamanho da partícula as microesferas obtidas na secção 2.4.1 foram analisadas num equipamento Malvern Mastersizer 3000 equipado com uma unidade de dispersão Hydro MV, utilizando etanol como solvente (solvente incompatível com as microesferas de forma a evitar a sua dissolução). Os dados foram obtidos e tratados com o *software* Mastersizer versão 3.10.

2.4.2.5 Análise morfológica

Os aspetos morfológicos da spirulina e das microesferas obtidas na secção 2.4.1 foram analisadas por microscopia ótica (MO) e microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Para a microscopia ótica utilizou-se um microscópio Ni-U Nikon equipado com uma câmara digital e *software* para tratamento de dados Nis Elements Deconvolution. A microscopia eletrónica de varrimento foi obtida num microscópio Phenom Pro da Phenom World existente no LSRE-LCM na Universidade do Porto.

2.4.3 Avaliação das Propriedades Bioativas das Microesferas

As microesferas obtidas foram diluídas em água e preparadas em diferentes diluições, com o intuito de analisar todas as bioatividades descritas acima na secção 2.3.7.

A atividade antioxidante foi determinada utilizando a metodologia descrita na secção 2.3.7.1, em que as amostras de microesferas foram dissolvidas em água a fim de obter uma concentração de 50mg/mL a 0,39 mg/mL.

Para a análise da atividade citotóxica em linhas celulares tumorais e não tumorais, as amostras de microesferas foram dissolvidas em água a fim de obter uma concentração de 8 mg/mL e submetidas a diluições sucessivas, obtendo concentrações na faixa de 400 µg/mL a 3,125 µg/mL que foram analisadas conforme descrito nas secções 2.3.7.2 e 2.3.7.3.

Para a análise anti-inflamatória as microesferas também foram dissolvidas em água, obtendo-se concentrações de trabalho entre 400 µg/mL a 1,56 µg/mL, e analisadas segundo o método descrito na secção 2.3.7.4.

Para a análise antimicrobiana as microesferas foram dissolvidas no meio de cultura Muller Hinton Broth (MHB) ou Tryptic Soy Broth (TSB) de acordo com o tipo de bactéria e DMSO (20 a 1,25 mg/mL) e analisados segundo o método anteriormente descrito (Secção 2.3.7.5).

2.5 APLICAÇÃO EM MATRIZ ALIMENTAR

2.5.1 Incorporação em iogurtes

O iogurte natural (agricultura biológica) foi adquirido num supermercado local da cidade de Bragança, Portugal. A composição de 100 g é: 3,8 g de lípidos, dos quais 2,4 g saturados, 4,7g de glúcidos dos quais 4,7 g são açúcares, 5 g de proteínas, 0,15 g de sal e 316 kJ/75 kcal de valor energético.

A quantidade de spirulina adicionada ao iogurte foi determinada de acordo com as recomendações da *Food and Drug Administration* (FDA, 2002) que indica a faixa de 0,5-3 g de spirulina por porção para a adição em alimentos. Assim, determinou-se a adição de 1,5 g da microalga no iogurte. A **Figura 11** indica o processo de adição das microesferas e da spirulina ao iogurte.

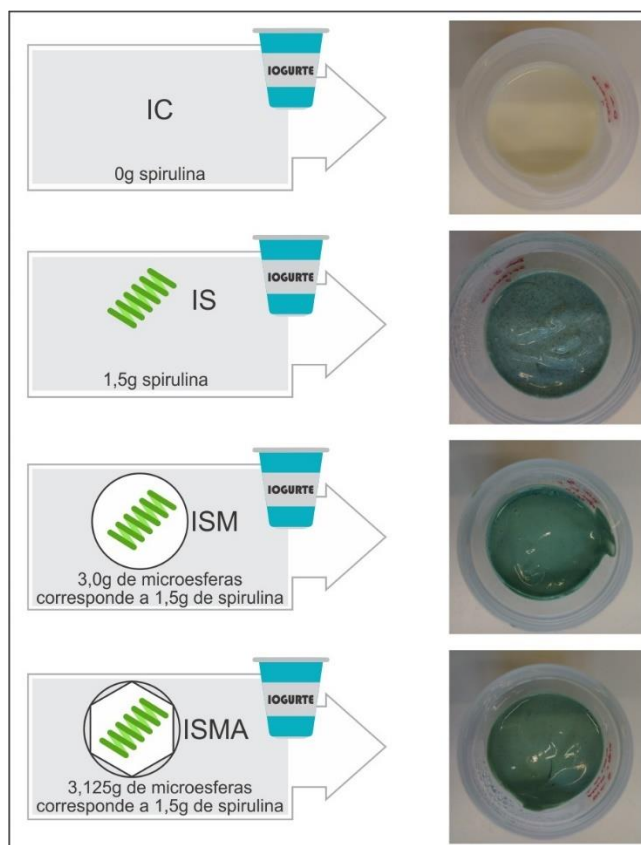


Figura 11: Esquema de incorporação da spirulina e microesferas no iogurte.

Os ensaios de incorporação da spirulina livre e microencapsulada com maltodextrina e maltodextrina reticulada com ácido cítrico e o controlo estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10: Descrição das quantidades e nomenclaturas utilizadas na incorporação dos iogurtes.

Ensaio	S, SM ou SMA (g)	Iogurte (g)	Total (g)
IC – Iogurte controlo	-	150	150
IS – Iogurte com (S)	1,5	150	151,5
ISM - Iogurte com (SM)	3,0*	150	153
ISMA – Iogurte com (SMA)	3,125*	150	153,125

*Massa das microesferas que corresponde a 1,5 g de spirulina.

2.5.2 Avaliação Nutricional e Bioativa dos Iogurtes Incorporados com Spirulina Livre e Microencapsulada ao Longo do Tempo de Armazenamento

Os iogurtes foram submetidos a avaliação nutricional e das propriedades bioativas ao longo do tempo de armazenamento a 0, 4 e 7 dias. Para isso, nos dias determinados as amostras de iogurtes foram congeladas e posteriormente liofilizadas.

2.5.2.1 Valor nutricional, açúcares livres e ácidos gordos dos iogurtes incorporados com spirulina livre e microencapsulada

A composição em macronutrientes (proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas), humidade e valor energético dos iogurtes foram determinados segundo o protocolo descrito na secção 2.3.1 utilizando no cálculo do teor de proteínas um fator de correção $N \times 6,38$ e para o cálculo dos glúcidos a equação [15]. Os resultados foram expressos em g/100 g de massa fresca (mf) e o valor energético expresso em kcal/100 g de massa fresca (mf).

$$\text{Glúcidos (g/100 g massa fresca)} = (100 - (\text{Humidade} + \text{g lípidos} + \text{g proteínas} + \text{g cinzas})) \quad [15]$$

Os açúcares livres e ácidos gordos foram determinados segundo os métodos descritos nas secções, 2.3.2 e 2.3.4, respetivamente. Os açúcares livres foram expressos em g/100 g de mf enquanto que os ácidos gordos foram expressos em percentagem relativa.

2.5.2.2 Determinação da cor e pH dos iogurtes incorporados com spirulina livre e microencapsulada

A fim de validar as alterações de cor nas amostras de iogurtes, foi utilizado um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc.), para medição dos parâmetros L^* , a^* e b^* (CIELAB), em que: L^* indica a luminosidade; a^* varia de valores negativos (verde) a valores positivos (vermelho) e b^* varia de azul (valores negativos) a amarelo (valores positivos) e foram registados por meio de um software de dados “Spectra Magic Nx” (versão CM-S100W 2.03.0006).

O pH das amostras de iogurte foi medido utilizando um medidor de pH HI 99161 (Hanna Instruments). As respetivas análises foram realizadas em triplicada.

2.5.2.3 Propriedades bioativas dos iogurtes incorporados com spirulina livre e microencapsulada

As amostras de iogurte foram avaliadas quanto à atividade citotóxica em células não tumorais e atividade antioxidante. Para a atividade citotóxica em células não tumorais utilizou-se diferentes concentrações das amostras de iogurte que foram dissolvidas em água a fim de obter concentrações na faixa 400 µg/mL a 3,125 µg/mL. Para a avaliação da atividade antioxidante (DPPH e Poder Redutor), as amostras de iogurte liofilizadas foram dissolvidas em água e foram preparadas diluições na faixa de 100 mg/mL a 1,5625 mg/mL para o DPPH e 50 mg/mL a 1,5625 mg/mL para o poder redutor. Os métodos foram realizados segundo os protocolos descritos nas secções 2.3.7.1 e 2.3.7.3, respetivamente.

2.5.2.4 Avaliação microscópica dos iogurtes incorporados com spirulina livre e microencapsulada ao longo do armazenamento

As amostras de iogurtes foram analisadas ao longo do tempo de armazenamento (0, 4 e 7 dias) em microscópio ótico, como descrito na Secção 2.4.2.5.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes estatísticos foram realizados com um nível de significância de 5% utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22.0. (IBM Corp.). Em cada tabela, os dados foram expressados como média±desvio padrão, mantendo os números significativos permitidos pela magnitude do desvio padrão correspondente.

Inicialmente foi feita uma análise de variância *one way* (ANOVA) para comparar as diferenças nos resultados obtidos pelo método de atividade antioxidante OxHLIA. A análise da distribuição normal dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados pelo teste de Shapiro-Wilk e teste de Lavene, respetivamente. As variáveis foram comparadas utilizando teste de Tukey quando foi verificado homocedasticidade ou o teste Tamhane T2 quando se verificou heterocedasticidade.

Foi feita uma análise de variância (ANOVA) com soma de quadrados do tipo III, segundo o procedimento de modelo linear geral (GLM) para comparar as diferenças nos

parâmetros analisados. As variáveis dependentes foram analisadas usando ANOVA a 2 fatores, considerando a “formulações de iogurte” (FI) e o “tempo de armazenamento” (TA) como fatores de análise. Quando uma interação estatisticamente significativa foi encontrada entre os dois fatores, o efeito foi avaliado através da representação gráfica das médias marginais estimadas para todos os níveis de cada fator. Pelo contrário, os casos sem interação significativa foram avaliados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, após a verificação da homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene.

Foi também feita uma análise discriminante linear (LDA) para compreender melhor o efeito global das formulações de iogurte (FI). As variáveis foram selecionadas passo-a-passo (*stepwise*), considerando o teste de λ de Wilks com as probabilidades usuais de F (3,84 para entrar e 2,71 para remover). Este procedimento é baseado na seleção sequencial de variáveis, com verificação simultânea da significância de todas as variáveis previamente selecionadas antes de incluir uma nova (Zielinski *et al.*, 2014). O objetivo principal foi estimar a relação entre as variáveis dependentes categóricas simples (formulações de iogurte) com as variáveis independentes quantitativas (resultados obtidos nas análises laboratoriais). Os resultados da LDA permitiram identificar as variáveis independentes que mais contribuíram para as diferenças nos perfis paramétricos das diferentes formulações de iogurte (FI). Para avaliar o desempenho e adequação do modelo discriminante, foi aplicado um procedimento de validação cruzada interna.

Capítulo 3
**Resultados e
Discussão**



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DESIDRATADA DE *S. platensis*

3.1.1 Determinação do Valor Nutricional, Açúcares Livres e Ácidos Orgânicos

A caracterização da biomassa desidratada de *S. platensis*, nomeadamente o valor nutricional e energético, açúcares livres e ácidos orgânicos são apresentados na **Tabela 11**. Esta microalga já é conhecida pelo seu elevado teor em proteínas que pode ser verificado através dos resultados obtidos neste trabalho. O teor de proteínas obtido foi de 75,6 g/100 g de ms, o que é considerado um valor elevado face ao que já era esperado de acordo com a literatura.

É importante referir que a spirulina apresenta um elevado teor de cinzas (6,19 g/100 g ms), visto que é rica em minerais. De acordo com os estudos efetuados por Agustini *et al.* (2015) em que se comparou a composição dos macronutrientes de *S. platensis* na forma seca e fresca, obteve-se o valor de 72,85% para as proteínas (amostra seca), valor semelhante ao encontrado neste estudo. No entanto, os autores encontraram um teor em cinzas de 11,56% e 2,86% em lípidos, que diferem dos resultados obtidos com esta amostra (**Tabela 11**). Sharoba (2014) obteve um valor de 62,84% para as proteínas, valor inferior ao encontrado neste estudo e 7,47% de cinzas. Esta diferença na composição da microalga pode ser justificada pelas condições de cultivo que influenciam a quantidade dos constituintes, como por exemplo proteínas e glúcidos.

Tabela 11: Valor nutricional e energético, açúcares livres e ácidos orgânicos de *S. platensis*.

Valor Nutricional (g/100 g ms)	<i>S. platensis</i>
Cinzas	6,19±0,06
Glúcidos	17,5±0,3
Lípidos	0,65±0,04
Proteínas	75,6±0,3
Energia (kcal/100 g ms)	378,5±0,03
Açúcares Livres (g/100 g ms)	nd
Ácidos Orgânicos (mg/100 g ms)	
Oxálico	v
Quínico	792±19
Total	792±19

Os resultados estão expressos em média±desvio padrão. nd = não detetado. v = vestígios.

Não foram encontrados açúcares livres na spirulina, no entanto foi encontrado o ácido quínico (792 mg/100 g massa seca) que em estudos recentes têm sido destacado dado o seu efeito anti-inflamatório e antioxidante (Jang *et al.*, 2017).

3.1.2 Determinação de Ácidos Gordos e Tocoferóis

A fração lipídica desta microalga também foi analisada, com o intuito de identificar e quantificar os principais ácidos gordos apresentados. Foram identificados 22 ácidos gordos, sendo os ácidos gordos polinsaturados (PUFAS) os maioritários (47,8%) (**Tabela 12**), apresentando também uma elevada quantidade de um ácido gordo essencial e que dificilmente se encontra nos alimentos: o γ -linolénico (27,6%). De acordo com Choopani *et al.* (2016) este ácido gordo é facilmente absorvido pelas células humanas e auxilia no mecanismo de defesa do corpo, além de apresentar efeito anti-inflamatório.

A spirulina analisada, apresentou também ácido linoleico (17,9%) e o ácido gordo saturado maioritário foi o ácido palmítico (33,3%). Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Mühling, Belay, & Whitton (2005) que avaliaram a variação dos principais ácidos gordos em diferentes variedades de *Spirulina sp.*, sendo que para *S. platensis* que foi obtida no lago Natron em Chad a quantidade de γ -linolénico foi de 12,9%, de ácido palmítico 46,1% e de ácido linoleico 31,5%, diferenciando-se das quantidades encontradas neste trabalho. Nos estudos realizados por Sharoba (2014) a percentagem de ácido γ -linolénico na spirulina foi 24,49%, ácido palmítico 40,65% e ácido linoleico 17,95%, estando na mesma ordem de valores encontrados neste trabalho (**Tabela 12**). As diferenças encontradas podem-se justificar pelo facto de essas quantidades poderem variar dependendo das condições ambientais, como por exemplo temperatura e incidência da luz – que podem alterar a quantidade de ácidos gordos (Handayania, Ariyantib, & Hadiyanto, 2012; Mühling *et al.*, 2005).

Tabela 12: Perfil de ácidos gordos e tocoferóis de *S. platensis*.

Ácidos Gordos (%)	<i>S. platensis</i>
C6:0	0,08±0,01
C8:0	0,14±0,01
C10:0	0,21±0,01
C12:0	1,76±0,07
C14:0	1,00±0,05
C15:0	1,01±0,02
C16:0	33,3±0,5
C16:1	3,24±0,03
C17:0	1,07±0,07
C18:0	5,77±0,08
C18:1n9	3,3±0,2
C18:2n6	17,9±0,1
C18:3n6	27,6±0,3
C18:3n3	0,36±0,01
C20:0	0,26±0,02
C20:1	0,11±0,01
C20:2	0,11±0,01
C20:3n6	0,84±0,06
C20:4n6	0,48±0,04
C22:0	0,93±0,01
C22:6n3	0,55±0,04
C24:0	0,09±0,01
Total SFA	45,6±0,5
Total MUFA	6,6±0,1
Total PUFA	47,8±0,4
Tocoferóis (µg/100 g ms)	
α-tocoferol	388±8
β-tocoferol	32±1
δ-tocoferol	139±5
Total	559±14

Os resultados estão expressos em média±desvio padrão. SFA *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA *polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). Ácidos caprótico (C6:0); caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9), linoleico (C18:2n6), γ-linolénico (C18:3n6), α-linolénico (C18:3n3), araquídico (C20:0), *cis*-11-eicosenoico (C20:1), *cis*-11,14-eicosenoico (C20:2), di-homo-γ-linolénico (C20:3n6), araquidônico (C20:4n6), beénico (C22:0), docosa-hexanóico (C22:6n3) e lignocérico (C24:0).

É de salientar ainda que a spirulina estudada apresenta 0,55% do ácido gordo docosa-hexanóico (DHA), conhecido por ter ação antioxidante, poder auxiliar no desenvolvimento fetal, ser benéfico para a saúde do cérebro e apresentar substâncias anti-inflamatórias (Andrade, 2018). Matos *et al.* (2016) também identificaram a presença do DHA na microalga *S. platensis* que analisaram, nomeadamente cerca de 62 mg/100 g, resultado superior ao obtido neste estudo.

Existem quatro tipos de tocoferóis disponíveis na natureza (α-, β-, γ- e δ-tocoferol), diferenciando-se apenas pelo número e posição dos grupos metilo do anel

cromanol (Azzi, 2018). A spirulina apresentou três isoformas de tocoferóis (α -, β -, δ -tocoferóis), sendo o α -tocoferol (388 $\mu\text{g}/100\text{ g ms}$) e o δ -tocoferol (139 $\mu\text{g}/100\text{ g ms}$) os maioritários (**Tabela 12**). Entretanto Gómez-Coronado *et al.* (2004) identificaram numa amostra de spirulina comercial adquirida em Espanha, o vitâmero α -tocoferol correspondendo a 1300 $\mu\text{g}/100\text{ g de ms}$, valor muito superior ao encontrado neste trabalho. Ainda Santiago-morales, Trujillo-valle, & Márquez-rocha (2018) quantificaram no extrato lipofílico da *Spirulina maxima* 2,5 mg/g biomassa do α -tocoferol e 1,4 mg/g biomassa do γ -tocoferol. Estas diferenças podem ser justificadas pelos diferentes métodos de extração, bem como pelo facto de que os tocoferóis são facilmente oxidáveis pela ação da luz, calor, pH alcalino ou radicais livres (Gómez-Coronado *et al.*, 2004). Entretanto ainda assim a spirulina apresenta um elevado teor de tocoferóis (vitamina E) e é comparável ao trigo germinado, considerado uma fonte natural rica desta vitamina (Soni, Sudhakar, & Rana, 2017).

A vitamina E é importante uma vez que previne o processo oxidativo dos lípidos da membrana e previne doenças coronárias, sendo que a deficiência desta vitamina é evitada através da suplementação com α -tocoferol (Andrade, 2018; Azzi, 2018).

3.1.3 Caracterização dos Pigmentos da Spirulina

3.1.3.1 Extração e quantificação dos carotenoides, clorofilas e ficocianina

Os carotenoides são compostos lipofílicos e que frequentemente apresentam coloração vermelha, laranja ou amarela. São divididos em dois grupos (carotenos e xantofilas), sendo que os mais interessantes são: β -caroteno, astaxantina, luteína, licopeno e cantaxantina (Gong & Bassi, 2016). Destes, dois foram encontrados na spirulina analisada (**Tabela 13**), o licopeno (1,2 mg/100 g ms) e o β -caroteno (7,8 mg/100 g ms). Este carotenoide, maioritariamente de coloração amarelo/laranja, é utilizado como corante no sector alimentar ou como suplemento (é precursor da vitamina A), apresentando grandes benefícios para a saúde humana, uma vez que previne a acumulação de toxinas no fígado e doenças oculares como cataratas ou cegueira noturna (Gong & Bassi, 2016; Alessandro & Antoniosi, 2016). No estudo realizado por Paliwal *et al.* (2015) os valores obtidos para o licopeno (0,17 mg/g biomassa) e β -caroteno (0,23 mg/g biomassa) no extrato metanólico de *Spirulina sp.* foram superiores aos encontrados neste estudo, o que pode ser justificado pelo facto de terem utilizado um extrato metanólico da

spirulina e o método de detecção ter sido efetuado por HPLC-DAD (detetor de díodos), enquanto que neste trabalho realizou-se a extração com uma mistura acetona:hexano e utilizou-se a espectrometria como método de detecção.

Tabela 13: Carotenoides e clorofilas de *S. platensis*.

Carotenoides (mg/100 g ms)	<i>S. platensis</i>
β-caroteno	7,8±0,03
Licopeno	1,2±0,1
Clorofilas (mg/100 g ms)	
Clorofila <i>a</i>	20±2
Clorofila <i>b</i>	1,1±0,2

Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.

As clorofilas são compostos lipofílicos e apresentam coloração verde, estão presentes em frutas e vegetais como pigmento fotossintético primário. A clorofila *a* é o principal composto fotoquimicamente ativo e é encontrada nos organismos fotossintéticos, enquanto que a clorofila *b*, também presente em algas, é considerada pigmento acessório (substâncias que auxiliam no processo de fotossíntese) (Roca, Chen, & Pérez-Gálvez, 2016; Wayne *et al.*, 2017). Assim, a amostra comercial de *S. platensis* analisada apresentou maior quantidade de clorofila *a* (20 mg/100 g massa seca), comparativamente com a clorofila *b* (1,1 mg/100 g massa seca) (**Tabela 13**). No entanto, noutros estudos a quantidade de clorofila *a* encontrada foi superior, por exemplo, no estudo realizado por Paliwal *et al.* (2015) encontraram-se 480 mg/100 g massa seca de clorofila *a* no extrato metanólico de *Spirulina sp.* Hynstova *et al.* (2018) quantificou 273 mg/100 g de clorofila *a* numa amostra comercial de spirulina, enquanto que numa amostra comercial de spirulina na forma de comprimido a clorofila *a* foi superior (428 mg/100 g) (todas as amostras continham exclusivamente *S. platensis*).

De acordo com Danesi, Rangel-Yagui, Carvalho, & Sato (2004) a intensidade da luz é um dos fatores que podem influenciar na biossíntese da clorofila. Caso essa intensidade luminosa seja limitada, o nível de pigmentação pode ser mais elevado, sendo isso confirmado no estudo em que se avaliou a diminuição da intensidade luminosa no 9º e 13º dia de cultivo de *S. platensis* em lago aberto e se obteve como resultado um aumento de 29% da produção total de clorofila, quando comparado com as amostras que receberam luminosidade fixa. De acordo com esta observação, conclui-se que os resultados obtidos neste trabalho diferem dos encontrados na literatura, pelo facto de que a biomassa

desidratada de *S. platensis* foi adquirida num supermercado local, não sabendo pormenores de como foi cultivada.

A ficocianina é um pigmento fotossintético acessório da clorofila e pertencente à família das ficobiliproteínas. É solúvel em água podendo ser facilmente extraído da microalga *S. platensis* (Chaiklahan *et al.*, 2012). Diferentes solventes foram utilizados com o intuito de encontrar a maior concentração de ficocianina extraída através do método de congelação/descongelação. Este método de extração é comumente utilizado em vários estudos na literatura (Abalde, 1998; Soni *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2014), sendo utilizado com o objetivo de que na congelação e descongelação os cristais de gelo formados levem à rutura da célula e posterior libertação do pigmento para o meio de extração.

Como pode ser observado na **Tabela 14**, o solvente que apresentou maior capacidade de extração da ficocianina foi a água conduzindo a um valor de 1,44 mg/mL, existindo diferenças significativas quando comparado com o tampão acetato 0,1M (pH=6,0) e tampão fosfato 0,1M (pH=7,0) e com o etanol. Não houve diferenças significativas entre a utilização dos tampões (acetato e fosfato).

Tabela 14: Quantidade de ficocianina extraída de *S. platensis* com diferentes solventes.

Solventes	Concentração (mg/mL)	Rendimento (g/100 g ms)	Pureza
Água	1,44±0,01 a	1,82±0,01 a	0,330±0,002 b
Tampão acetato de sódio 0,1M pH 6,0	1,37±0,01 b	1,75±0,01 c	0,328±0,001 b
Tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0	1,37±0,01 b	1,77±0,01 b	0,353±0,002 a
Etanol	0,86±0,01 c	1,111±0,001 d	0,26±0,01 c

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão.

Relativamente ao rendimento (g/100 g de ms de spirulina) houve diferenças significativas entre todos os solventes, sendo que o melhor rendimento obtido para a água (1,82 g/100 g), seguido do tampão fosfato (1,77 g/100 g). Quanto à pureza, não foi a água que conduziu ao melhor valor para este parâmetro, tendo sido o tampão fosfato o solvente que extraiu a ficocianina mais pura (0,353) e em seguida a água (0,330), existindo diferenças significativas entre todos os solventes analisados.

Assim, a água foi considerada o melhor solvente para extrair a ficocianina tendo conduzido à concentração e rendimento superiores, porém, pode ser suscetível de ocorrerem contaminações resultando numa pureza inferior. De acordo com Buchweitz (2016), se a pureza for superior a 0,7 o pigmento é considerado de grau alimentar, se for

igual a 3,9 é de grau reativo e se for acima de 4,0 é de grau analítico. A ficocianina obtida neste trabalho teve uma pureza abaixo do estipulado para o grau alimentar, no entanto, é de salientar que este composto pode ainda ser purificado por diversos métodos já utilizados, como a precipitação de sulfato de amónio, adsorção de carvão, cromatografia e também ultrafiltração (Patel *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2014).

No estudo realizado por Paliwal *et al.* (2015) obtiveram-se resultados inferiores de rendimento para a ficocianina extraída de *Spirulina sp.* (1,16 g/100 g ms), quando comparados com os encontrados no presente trabalho utilizando o método de congelação/descongelação (5-6 ciclos). No entanto, no trabalho de Pablo *et al.* (2017) obtiveram-se valores superiores aos encontrados para a concentração de ficocianina extraída de *S. platensis* (biomassa congelada) utilizando o tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e o tampão acetato de sódio (pH 5,0), variando de 1,776-2,032 mg/mL e 7,001-3,720 mg/mL, respetivamente. Desta forma, os valores de ficocianina inferiores aos descritos na literatura podem ser justificados pelo facto da biomassa da microalga estar na forma desidratada, já que segundo Ilter *et al.* (2018) a biomassa após passar pelo processo de secagem e ser submetida à temperatura pode perder quantidades significativas de ficocianina.

3.2 MICROENCAPSULAÇÃO DE *S. platensis* PELA TÉCNICA DE *SPRAY DRYING*

3.2.1 Rendimento de Encapsulação (R), Eficiência e Carga

O rendimento (R) relaciona a massa obtida no final do processo de encapsulação com a massa inicial dos materiais atomizados, quantificando a perda global de massa durante a encapsulação. Para as microesferas constituídas por spirulina e maltodextrina (SM) o rendimento obtido foi de 66% enquanto que para as microesferas constituídas por spirulina e maltodextrina sujeita à reticulação com ácido cítrico (SMA) o rendimento foi de 75%, um pouco superior ao anterior. A técnica *Spray Drying* já é conhecida pela sua elevada capacidade de produzir materiais com alto rendimento a nível industrial. Contudo, estes rendimentos podem ser mais modestos quando se atomizam volumes baixos, o que é o caso dos ensaios laboratoriais realizados no presente trabalho (escala de 150 mL). Tal foi também verificado nos estudos realizados por Ribeiro *et al.* (2015) que chegaram ainda a rendimentos inferiores (cerca de 50%) nos seus estudos sobre a

microencapsulação de extratos hidroalcoólicos de cogumelos utilizando a maltodextrina como material de parede.

A carga em spirulina é um parâmetro que fornece o conteúdo de spirulina numa dada massa de microesferas, sendo um parâmetro importante para efetuar a incorporação dos ingredientes desenvolvidos em matrizes alimentares. Tendo em consideração a estabilidade térmica dos materiais de base (ver secção seguinte), assumiu-se uma eficiência de encapsulação de 100% pelo que para SM a carga foi de 0,50 g spirulina/g de microesferas e para SMA 0,48 g de spirulina/g de microesferas.

3.2.2 Caracterização dos Materiais de Base e das Microesferas

3.2.2.1 Análise termogravimétrica (TGA/DTG)

Os materiais de base (spirulina, maltodextrina e ácido cítrico) foram submetidos a análise termogravimétrica (TGA – *Thermogravimetric Analysis*). Este método avalia a perda de massa quando um material é sujeito ao aquecimento (degradação térmica). A análise pode ser realizada em atmosfera inerte (caso deste trabalho que utilizou atmosfera de azoto) ou em atmosfera oxidativa na presença de ar. A curva termogravimétrica diferencial (DTG) pode ser obtida por meio da derivada da curva de TGA, auxiliando a determinar, por exemplo, a temperatura máxima de degradação e as temperaturas de início e fim das principais degradações. Apresenta como vantagens o facto de ser uma técnica de fácil operação e que necessita de pouca quantidade de amostra (tipicamente não excede as 10 mg) (Bach & Chen, 2017).

A **Figura 12** apresenta a análise termogravimétrica dos materiais de base: spirulina, maltodextrina e ácido cítrico e a **Tabela 15** mostra um resumo da percentagem de água, temperatura máxima de degradação e resíduo final obtido para os vários materiais. O perfil de degradação da spirulina apresenta uma degradação inicial centrada a 100°C (5,49%) correspondente à água presente no material. A spirulina degrada no intervalo compreendido entre 163 °C e 464 °C, sendo a temperatura máxima de degradação 304 °C. O resíduo final obtido a 600 °C foi de 27,65%.

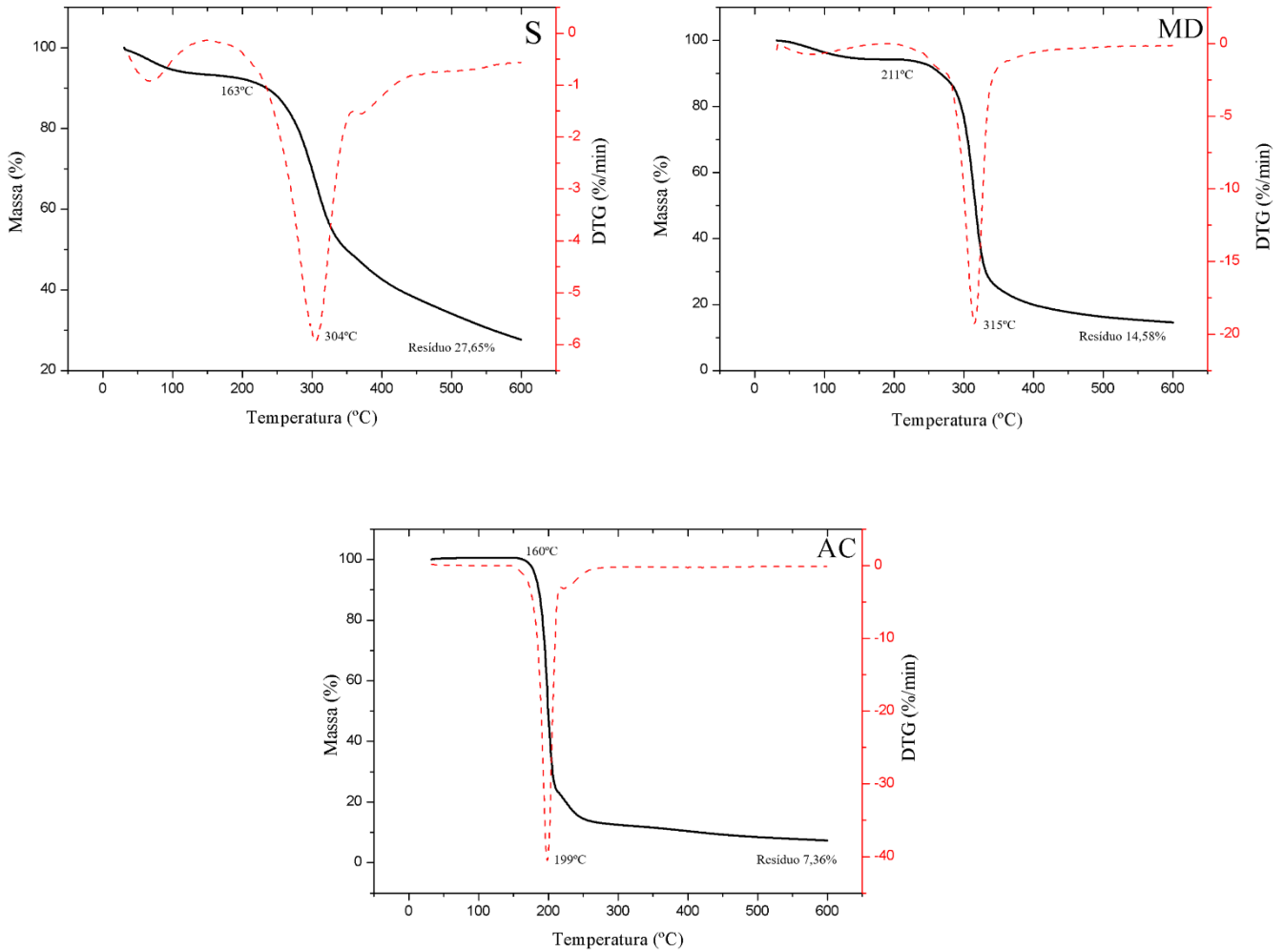


Figura 12: Análise termogravimétrica da spirulina, ácido cítrico e maltodextrina.

Observou-se que a microalga sofreu vários estágios de degradação devido à sua mistura complexa de biomoléculas. A primeira etapa (163-358 °C) é caracterizada pela degradação de glúcidos e proteínas (Bach & Chen, 2017; Batista *et al.*, 2013). A segunda zona de degradação (358-464 °C) está relacionada com a perda de lípidos, tal como descrito nos estudos realizados por (Li, Srivatsa, Batchelor, & Bhattacharya, 2017) para a microalga *Tetraselmis suecica*. Adicionalmente, foi possível observar no caso da spirulina, uma terceira zona de degradação (acima dos 463 °C) relacionada com a degradação de outros compostos mais resistentes termicamente.

O ácido cítrico inicia sua degradação a 160 °C e apresenta uma temperatura máxima de degradação a 199 °C. Não apresenta a degradação típica correspondente à água. O resíduo final foi de 7,36%. No caso da maltodextrina verificou-se uma perda de

água que ocorre numa zona mais extensa, o que de acordo com alguns autores é uma característica dos polímeros hidrofílicos onde esta degradação se sub-divide em “água livre” (até 100 °C) e água ligada (100-180/200 °C) (5,84%). A degradação da maltodextrina apresenta uma zona inicial (211-277 °C; 6,25%) possivelmente associada a moléculas de baixa massa molecular. A degradação principal ocorre na faixa de 277-408 °C sendo a temperatura máxima de degradação 315 °C. O resíduo final foi de 14,58%.

Tabela 15: Perfil de degradação térmica dos materiais de base.

Amostra	Massa (mg)	Água (% m/m)	Temperatura Máxima de Degradação (°C)	Resíduo Final a 600°C (% m/m)
S	8,6	6,86	304	27,65
MD	8,6	5,84	315	14,58
AC	8,4	-	199	7,36

Em síntese, conclui-se que os materiais de base são resistentes à temperatura de atomização (170 °C), não existindo problemas relacionados a degradação destes face às condições de atomização utilizadas no processo de *spray drying*. No caso da spirulina e ácido cítrico onde as degradações se iniciam antes de 170 °C o valor da degradação que ocorre até esta temperatura não ultrapassa 1%, tal como verificado pela análise dos termogramas obtidos, validando a estimativa feita para a eficiência de encapsulação (próxima de 100%).

A **Figura 13** mostra o perfil de degradação térmica referente às microesferas vazias obtidas a partir de maltodextrina e ácido cítrico (MA). Verifica-se que a degradação do material se inicia a 229 °C apresentando uma temperatura máxima de degradação de 292°C, valor inferior ao da maltodextrina pura (315°C). No entanto, verificou-se que o resíduo final obtido para a amostra MA foi superior (21,04%) ao da maltodextrina pura (14,58%). Tal indica que a resistência térmica do material aumentou, facto que pode ser justificado pela ocorrência efetiva de reticulação com o ácido cítrico. Adicionalmente, verificou-se também que na faixa de temperaturas compreendida entre 100-200°C houve perda de massa, estado esta relacionada com a libertação da água existente no material, incluindo água formada na reação de esterificação (Castro-Cabado, Casado, & San Román, 2016a).

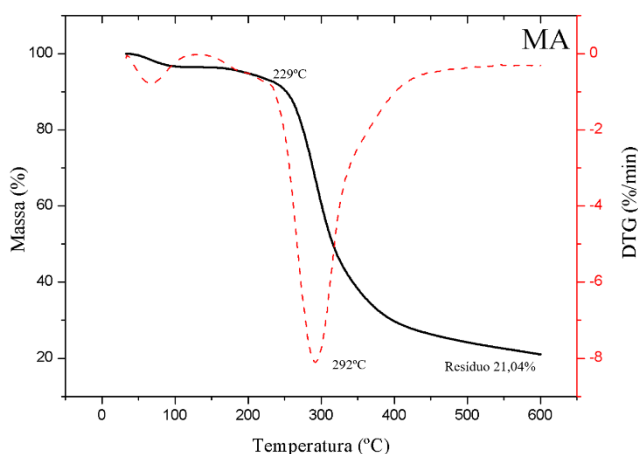


Figura 13: Análise termogravimétrica das microesferas vazias (MA).

A análise termogravimétrica das microesferas obtidas: SM (spirulina/maltodextrina), SMA (spirulina/maltodextrina reticulada com ácido cítrico), juntamente com os materiais de base spirulina e maltodextrina estão representados na **Figura 14** com o intuito de mostrar as diferenças entre as duas amostras, nomeadamente colocar em evidência o efeito da reticulação. A **Tabela 16** mostra um resumo dos dados mais relevantes extraídos a partir da análise do perfil de degradação.

Para a amostra SM, observou-se uma primeira perda de massa na gama 100-144 °C associada à perda de água. Após esta degradação ocorrem dois estágios de degradação do material. O primeiro ocorre na faixa de 144-242°C (13,80%) e o segundo na faixa de 242-304 °C (22,00%). De realçar que relativamente aos materiais de base, o perfil de degradação correspondente às microesferas SM é mais lento iniciando-se a temperaturas inferiores. Tal comportamento pode estar relacionado com as características do material (mistura de maltodextrina com spirulina). O resíduo final obtido foi de 25,10%, superior ao da amostra MA (21,04%), refletindo a contribuição da spirulina pura que também apresenta um resíduo final elevado.

Tabela 16: Perfil de degradação térmica das microesferas.

Amostra	Massa (mg)	Água (% m/m)	Temperatura Máxima de Degradação (°C)	Resíduo Final a 600°C (% m/m)
SM	6,53	6,07	304	25,10
SMA	6,58	4,76	306	25,49
MA	6,52	3,76	292	21,04

Para as microesferas SMA que utilizam maltodextrina reticulada com ácido cítrico, observa-se uma perda de massa também na faixa de 100-145°C que tal como

descrito está associada à liberação da água. A temperatura máxima de degradação ocorre para 306°C e o resíduo final a 600 °C foi de 25,49%. Nota-se pela comparação dos perfis (**Figura 14 (A)**) que as microesferas SM e SMA apresentam características semelhantes no que se refere à faixa de degradação (temperatura inicial e temperatura final) tendo-se obtido um resíduo final idêntico (25,10 e 25,49%, respectivamente para as amostras SM e SMA). Pela análise da **Figura 14 (B)** é possível observar que a amostra SM apresenta duas faixas de degradação mais definidas comparativamente com a amostra SMA onde a primeira faixa de degradação não é tão pronunciada. Tal pode ser justificado pela ocorrência da reação de reticulação que promoveu uma melhor homogeneidade do material e um efeito de proteção superior.

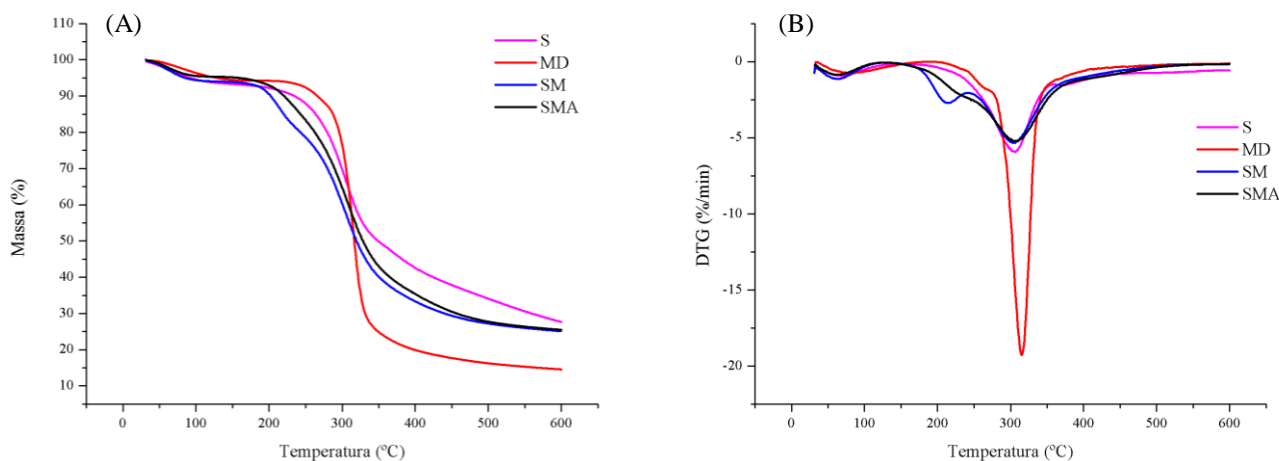


Figura 14: Análise termogravimétrica das microesferas spirulina/maltodextrina (SM), spirulina/maltodextrina reticulada com ácido cítrico (SMA) comparados aos materiais de base spirulina (S) e maltodextrina (MD).

De uma forma geral, o perfil de degradação da amostra SMA está deslocado para temperaturas superiores o que é compatível com o aumento da resistência térmica do material decorrente de uma reação de reticulação efetiva. Os resíduos das microesferas SM e SMA são semelhantes, mas superiores aos da maltodextrina e inferiores ao da spirulina.

3.2.2.2 Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica baseada na absorção da luz na região do infravermelho a qual fornece informações sobre a estrutura molecular do composto analisado (grupos funcionais). A utilização desta técnica no contexto do presente trabalho permitiu identificar a presença dos materiais de

base nas microesferas assim como verificar a ocorrência da reação de reticulação. A **Figura 15** apresenta os espectros dos materiais de base (spirulina (S), maltodextrina (MD) e ácido cítrico (AC)) e das microesferas (MA, SM e SMA).

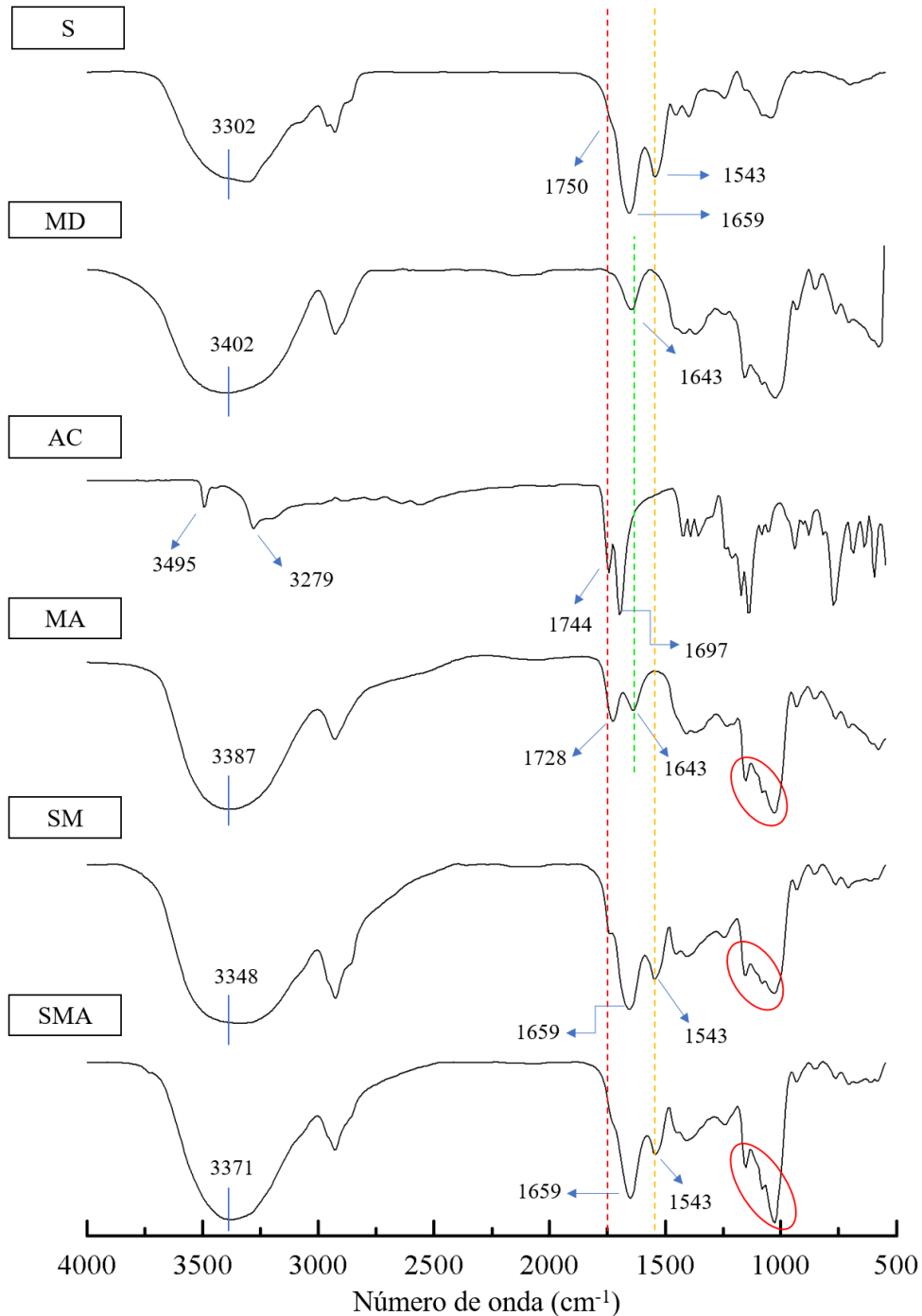


Figura 15: Espectros de infravermelho obtidos para os materiais de base (S, MD e AC) e microesferas (MA, SM e SMA).

Pela análise dos espectros dos materiais de base (spirulina, maltodextrina e ácido cítrico) verifica-se que:

- O espectro da spirulina tem como características principais a existência de uma banda larga centrada a 3302 cm^{-1} associada à contribuição dos grupos OH e NH, a contribuição dos grupos C-H na região $3000\text{-}2750\text{ cm}^{-1}$, dos grupos C=O assinalados a 1750 cm^{-1} (ésteres) e 1659 cm^{-1} (amidas). Adicionalmente apresenta a banda assinalada a 1543 cm^{-1} atribuída às vibrações por deformação dos grupos N-H. A região compreendida entre $1500\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$ corresponde à sobreposição de várias bandas, nomeadamente deformações dos grupos C-H (múltiplas bandas) e estiramento do grupo C-O (duas ou mais bandas).
- O espectro da maltodextrina tem como características gerais a banda larga centrada a 3402 cm^{-1} atribuída aos grupos OH, a contribuição dos grupos C-H na região $3000\text{-}2750\text{ cm}^{-1}$, e as bandas diversas na região $1500\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$ (p. ex. deformação C-H e estiramento do grupo C-O), tal como descrito anteriormente. A banda assinalada a 1643 cm^{-1} corresponde à água ligada (e.g. ligações de hidrogénio) à maltodextrina (característica comum aos polissacarídeos).
- O espectro do ácido cítrico mostra, como principais características, na zona dos grupos OH a existência de OH livres (3495 cm^{-1}) e OH associados por ligações de hidrogénio (zona centrada a 3279 cm^{-1}). Adicionalmente apresenta dois picos associados ao grupo carbonilo ($1744\text{ e }1697\text{ cm}^{-1}$). O desaparecimento destas duas bandas está relacionada com a ocorrência de esterificação (Castro-Cabado et al., 2016a).

Pela análise dos espectros das microesferas produzidas (MA, SM e SMA) verifica-se que:

- Estes apresentam a contribuição das matérias-primas originais, nomeadamente da spirulina e maltodextrina (materiais existentes em concentração elevada). Um exemplo é a vibração 1659 cm^{-1} atribuída grupos carbonilo das amidas e também a vibração 1543 cm^{-1} que é atribuída a vibrações do grupo N-H na spirulina e que apresenta sua contribuição nas microesferas SM e SMA.
- Adicionalmente, é possível verificar a ocorrência de esterificação pelo desaparecimento das duas bandas características do ácido cítrico ($1744\text{ e }1697\text{ cm}^{-1}$) e surgimento de uma outra numa frequência intermédia (1728 cm^{-1}). Este ponto é particularmente visível no espectro da amostra MA onde esta vibração se distingue facilmente. De notar que a vibração próxima (1643 cm^{-1}) está, tal como no caso da maltodextrina, associada à água ligada.

- No caso da amostra SMA, a identificação da banda a 1728 cm^{-1} torna-se mais complicada dado a sobreposição com vibrações existentes no espectro da spirulina (ver “ombro” a 1750 cm^{-1}). Este aspeto é também visível no espectro da amostra SM (amostra sem adição de ácido cítrico). Não obstante, da observação da região associada ao estiramento do grupo C-O do éster (tal descrito nas características individuais do espectro e assinalado com círculo vermelho na **Figura 15**), verifica-se que esta contribuição se intensifica na amostra SMA, relativamente à SM. Este aspeto também é visível na amostra MA.

3.2.2.3 Tamanho de partícula

A caracterização do tamanho de partícula das microesferas obtidas (SM, SMA e MA) foi realizada por meio da técnica de difração a laser, no qual um raio laser passa através das microesferas e os fótons são difratados. Esta luz difratada é detectada numa faixa de ângulos que estão relacionados com o tamanho das partículas (Singh, 2016). A **Tabela 17** apresenta a distribuição do tamanho de partícula em volume e em número, os resultados foram expressos em D_{10} , D_{50} e D_{90} o que corresponde ao tamanho máximo da partícula para 10%, 50% e 90%. É possível observar que as microesferas apresentam distribuição de tamanhos em volume que variam entre 3,11 a 21,7 μm , com tamanho médio 10,78 μm para a amostra SM, 11,14 μm para a amostra SMA e 7,94 μm para a amostra MA. Em número apresentam tamanhos que variam entre 1,09 a 6,25 μm e tamanho médio de 2,90 μm (SM), 2,89 μm (SMA) e 2,19 μm (MA).

Tabela 17: Valores de D_{10} , D_{50} e D_{90} para distribuição em volume e número das microesferas.

		D_{10} (μm)	D_{50} (μm)	D_{90} (μm)
Distribuição em Volume	SM	4,68±0,02	10,8±0,02	19,5±0,02
	SMA	4,84±0,03	11,2±0,02	21,7±0,2
	MA	3,11±0,01	7,56±0,02	15,2±0,09
Distribuição em Número	SM	1,33±0,01	2,10±0,01	6,24±0,03
	SMA	1,30±0,01	2,05±0,01	6,25±0,05
	MA	1,09±0,01	1,69±0,01	4,39±0,01

Os resultados foram expressos em média±desvio padrão.

Pela observação da **Figura 16** é possível verificar que as distribuições em volume para as microesferas contendo spirulina (SM e SMA) apresentam comportamento semelhante, enquanto que a amostra MA (microesferas formadas por spirulina) apresenta

um desvio para tamanhos inferiores. Para a distribuição em número existe uma maior concordância entre as distribuições de tamanho obtidas para as três amostras.

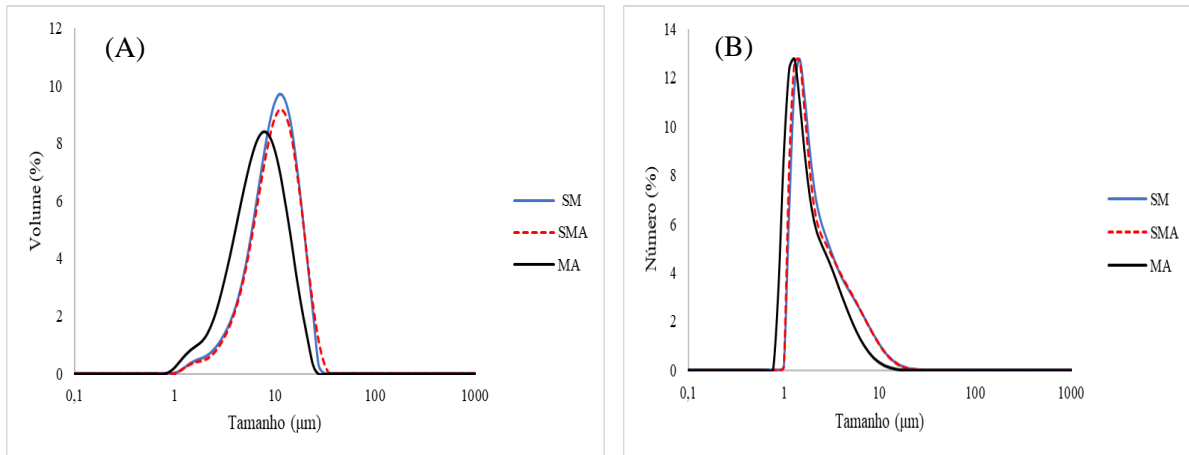


Figura 16: Distribuição do tamanho de partícula das microesferas em volume (A) e em número (B).

Adicionalmente, para a avaliação da heterogeneidade dos tamanhos de partícula, calculou-se o *Span* (Equação [15]). Este parâmetro baseia-se nos valores de D_{10} , D_{50} e D_{90} da distribuição em volume. Quanto maior que 1 conclui-se que há heterogeneidade na distribuição do tamanho de partícula.

$$Span = \frac{D_{90}-D_{10}}{D_{50}} \quad [15]$$

Os resultados obtidos para o cálculo do *Span* (cálculo recomendado pelo equipamento) podem ser observados na **Tabela 18** concluindo-se que as microesferas apresentam heterogeneidade na distribuição do tamanho de partícula, pois seus valores de *Span* estão acima de 1.

Tabela 18: *Span* das microesferas obtidos por meio da distribuição em volume.

Amostra	<i>Span</i>
SM	1,37
SMA	1,51
MA	1,60

3.2.2.4 Análise morfológica

A morfologia das microesferas é um parâmetro importante e comumente avaliado no que diz respeito a micro/nanoencapsulação. Tal pode ser realizado por um método de microscopia. No presente trabalho a spirulina e as microesferas obtidas (SM, SMA e MA) foram submetidos à análise por microscopia ótica (MO) e microscopia eletrônica de varrimento (MEV).

a) Microscopia Ótica

A **Tabela 19** apresenta as imagens obtidas por microscopia ótica. Verifica-se que a spirulina apresenta uma estrutura em forma de espiral o que é característico desta microalga, facto que está na origem do nome “spirulina”. Por esta estar na sua forma desidratada observam-se microscopicamente os seus fragmentos, provavelmente resultantes da secagem. As microesferas, de um modo geral, não apresentam uniformidade nas suas estruturas, no entanto observou-se que as amostras que continham maltodextrina reticulada com ácido cítrico (SMA) apresentaram maior uniformidade quando comparadas com a amostra SM. Notou-se ainda que as microesferas MA possuem uma estrutura esférica enquanto que as microesferas contendo spirulina apresentam, muitas vezes, uma estrutura espiral significando isto que em alguns casos os fragmentos de spirulina foram recobertos pela maltodextrina.

b) Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)

A microscopia eletrónica de varrimento permite uma visualização mais detalhada das estruturas nano/micrométricas e baseia-se na utilização de feixe de eletrões que atravessam a amostra. Esta interação origina sinais que são coletados e traduzidos como pixels para formar a imagem da superfície da amostra tridimensionalmente (Carter & Shieh, 2015). Assim, esta análise vem enriquecer o presente trabalho complementando a análise feita por microscopia ótica.

Pela observação da **Tabela 20**, nota-se que as estruturas de *S. platensis* (S) na sua forma original se apresentam aglomeradas. Com relação às microesferas formadas, SM e SMA, observou-se que o material de parede (maltodextrina ou maltodextrina reticulada com ácido cítrico) envolve as estruturas da microalga ou aglomerados desta.

Adicionalmente, verifica-se que no caso da amostra SMA as microesferas são mais uniformes, comparativamente às da amostra SM. A amostra MA apresentou estruturas mais esféricas relativamente às microesferas contendo spirulina. Conclui-se desta forma que a morfologia da microalga influencia a encapsulação, nomeadamente a morfologia das microesferas obtidas. De facto, a spirulina apresenta forma em espiral sendo que o material de parede se adequa à sua estrutura e/ou aglomerados desta. Estas observações que já estavam patentes na análise por microscopia ótica puderam ser comprovadas de forma mais clara por esta análise por microscopia eletrónica. As ampliações de 5000x podem ser consultadas no Anexo A.

Tabela 19: Microscopia ótica da spirulina e microesferas.

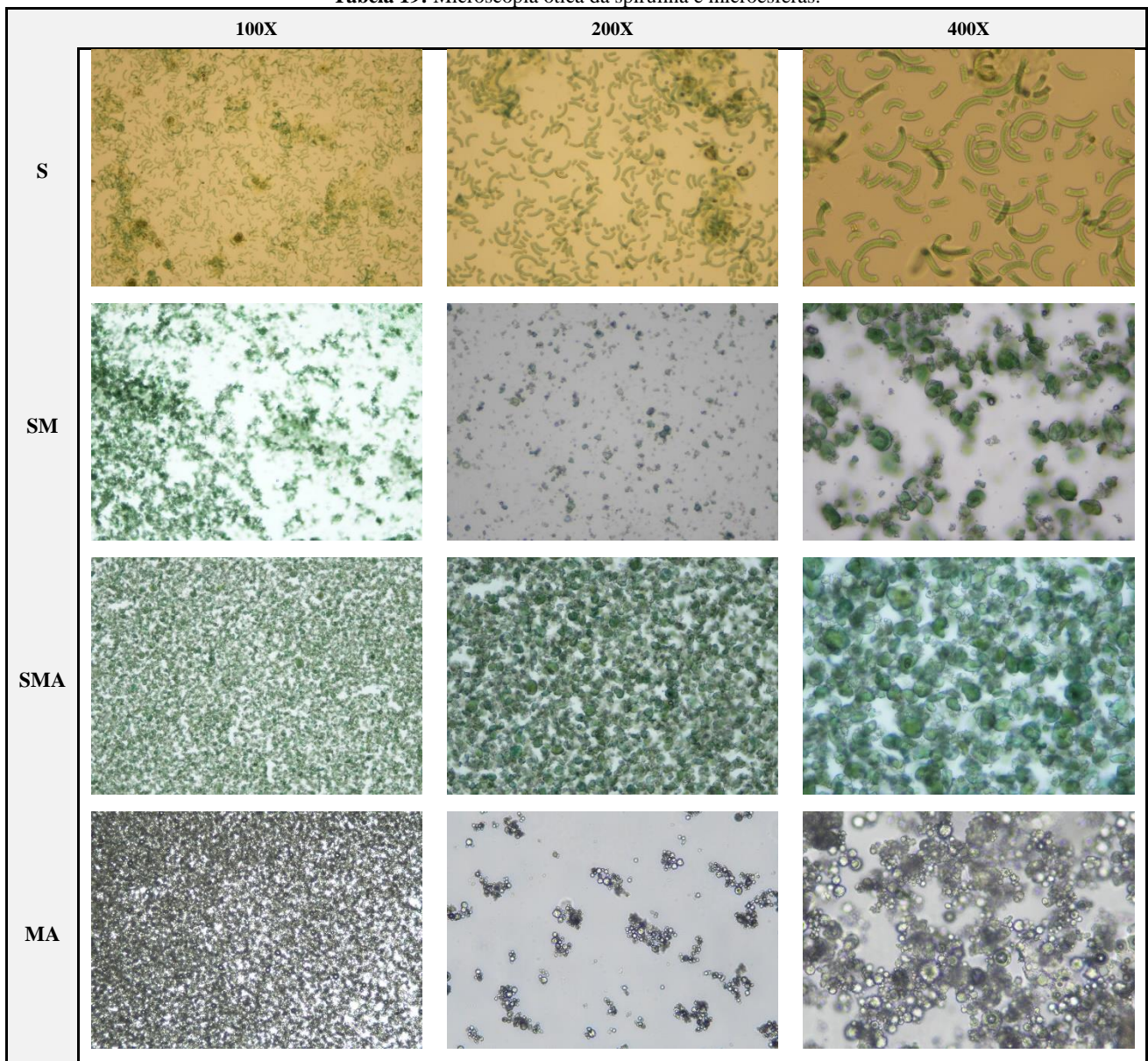
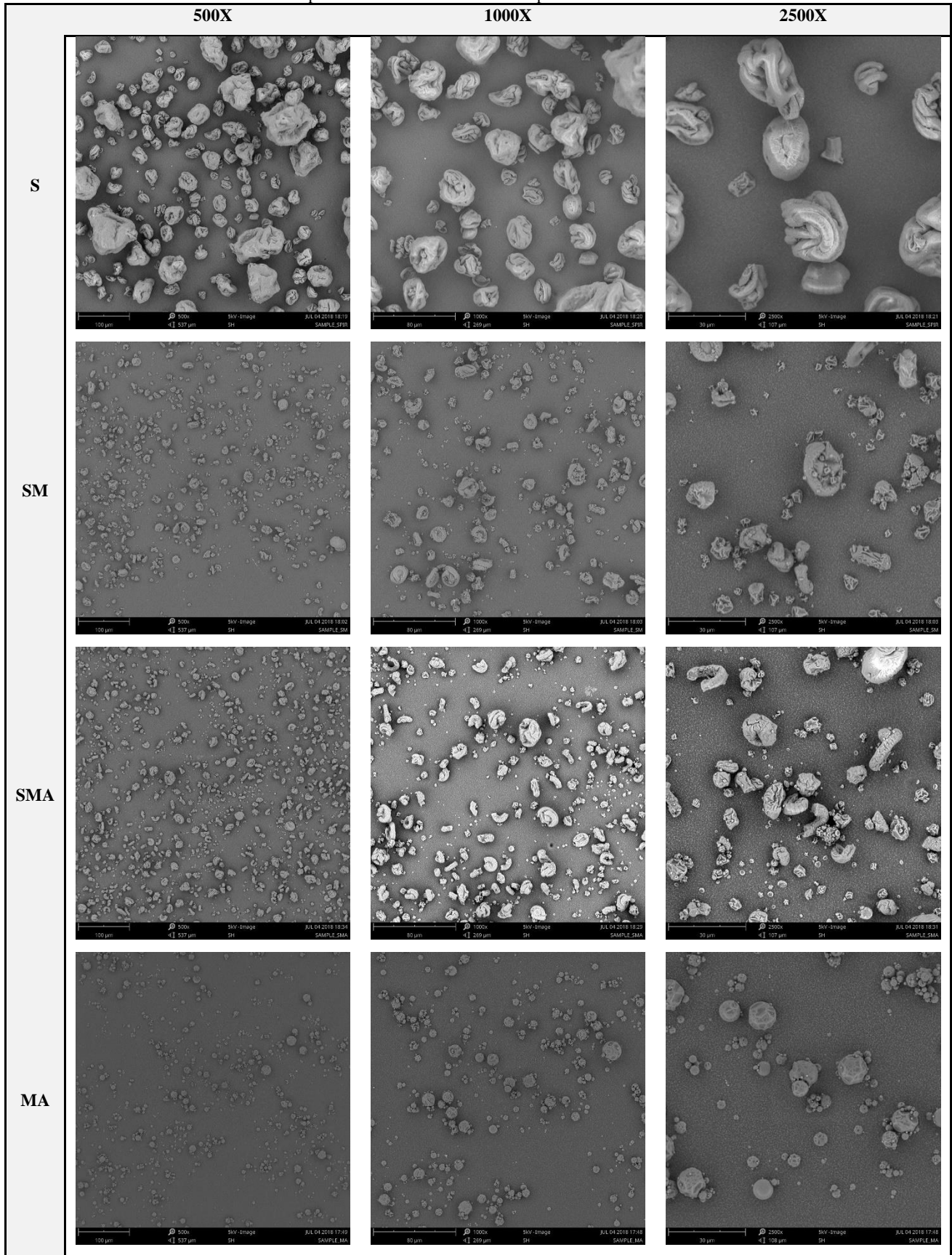


Tabela 20: Microscopia eletrônica de varrimento da spirulina e das microesferas.



3.3 ESTUDO COMPARATIVO DAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DA SPIRULINA LIVRE E MICROENCAPSULADA

As microesferas obtidas (SM) spirulina/maltodextrina, (SMA) spirulina/maltodextrina reticulada com ácido cítrico e o branco (MA) maltodextrina reticulada com ácido cítrico, além dos materiais de base (S) biomassa de *S. platensis* desidratada e (M) maltodextrina foram submetidos a avaliação das propriedades bioativas: atividade antioxidante, citotoxicidade em células tumorais e não tumorais, atividade anti-inflamatória e atividade antimicrobiana, com o intuito de realizar um estudo comparativo.

3.3.1 Atividade Antioxidante da Spirulina Livre e Microencapsulada

O stresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos e da sua eliminação pelos sistemas antioxidantes, estando associado a diversas doenças como: Alzheimer e Parkinson, cancro, diabetes, doenças inflamatórias e envelhecimento (Ďuračková, 2014). Assim, os antioxidantes são compostos que em baixas concentrações inibem ou previnem esta oxidação, podendo utilizar mecanismos como: inibição da peroxidação lipídica e eliminação dos radicais livres, dependendo do agente oxidante (Carocho, Morales, & Ferreira, 2018). Diversos métodos *in vitro* são efetuados com o objetivo de identificar a atividade antioxidante de compostos/extratos, nomeadamente métodos rápidos como a atividade captadora de radicais DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e poder redutor. No entanto, os métodos que utilizam células como o OxHLIA (inibição da hemólise oxidativa) estão a ser comumente realizados em combinação com os métodos químicos mencionados acima.

O método OxHLIA baseia-se na utilização de eritrócitos ovinos em que se adiciona dicloridrato de 2-2'-azobis (2-amidinopropano) (APPH), radicais peroxilas que podem atacar a membrana dos eritrócitos, provocando a hemólise. Esta hemólise pode ser inibida pela ação de antioxidantes, tal como observado no trabalho de Takebayashi *et al.* (2012). Desta forma, avaliou-se por meio da inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA) o potencial antioxidante das amostras livres e microencapsuladas de spirulina e maltodextrina. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 21**, onde se expressa a concentração necessária para a proteção de 50% da população de eritrócitos (EC_{50}) da

ação hemolítica causada pelo agente oxidante durante 60 e 120 minutos. Assim, quanto menor for o EC₅₀, maior o poder antioxidante da amostra.

Na **Tabela 21** é possível observar que todas as amostras apresentaram diferenças significativas entre elas para os valores de EC₅₀ para os tempos de 60 e 120 minutos. A spirulina foi a amostra que apresentou maior atividade antioxidante, com um E₅₀ de 0,26 e 0,57 mg/mL em 60 e 120 minutos, respetivamente. Seguidamente, a amostra que apresentou maior poder antioxidante foi a SM (50% spirulina) e depois a SMA (48% spirulina). No entanto, comparativamente com o controlo positivo (Trolox) (0,022 e 0,044 mg/mL a 60 e 120 minutos) as amostras apresentaram baixa capacidade anti-hemolítica.

Tabela 21: Resultados obtidos da atividade antioxidante por OxHLIA das diferentes amostras.

	EC ₅₀ (mg/mL)		
	Δt = 60 min	Δt = 120 min	
S	0.26±0.01 e	0.57±0.01 e	
SM (50% spirulina)	0.49±0.01 d	1.10±0.04 d	
SMA (48% spirulina)	0.78±0.01 c	1.74±0.04 c	
MA	1.72±0.02 b	3.24±0.04 b	
MD	9.20±0.08 a	23.4±0.4 a	
Trolox	0.022±0.001f	0.044±0.001f	
Valor de p (n = 54)	Homocedasticidade¹	0.009	0.018
	One-way ANOVA²	<0.001	<0.001

Os valores são expressos em média±desvio padrão. S: spirulina; SM: spirulina/maltodextrina; SMA: spirulina/maltodextrina reticulada com ácido cítrico; M: maltodextrina; MA: maltodextrina reticulada com ácido cítrico. EC₅₀: Concentração da amostra que corresponde a proteção de 50% da população dos eritrócitos. ¹p>0.05, homocedasticidade entre as amostras; p<0.05, heterocedasticidade entre as amostras. ²p<0.05 indica que o valor médio de pelo menos uma amostra difere das demais (neste caso, testes de comparação múltipla foram realizados).

Como já referido anteriormente, além das técnicas celulares para a análise da atividade antioxidante, também se podem realizar testes químicos para avaliar esta atividade. O ensaio da atividade captadora de radicais DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, baseia-se na descoloração do radical estável (DPPH) de cor violeta pela redução ocasionada por compostos antioxidantes (dadores de um átomo de hidrogénio) à hidrazina, composto de coloração amarela (Hamid, Abdullah, & Al-haiqi, 2016). Os antioxidantes também são conhecidos como redutores e o poder redutor é considerado um indicador do potencial antioxidante e é medido através da reação redox com vários iões metálicos, como por exemplo, o ferro (Shahidi & Zhong, 2015).

A spirulina livre apresentou maior atividade antioxidante comparativamente com as microesferas (SM e SMA), quando avaliadas pelos ensaios de DPPH e poder redutor, existindo diferenças significativas entre as mesmas (**Tabela 22**). Nas amostras M e MA não se verificou atividade antioxidante na máxima concentração testada (50 mg/mL). O poder antioxidante da spirulina pode ser devido à presença de vários compostos bioativos como por exemplo: α -tocoferol, β -caroteno e ficocianina, compostos identificados neste trabalho.

É de realçar também que os autores Paliwal *et al.* (2015) verificaram atividade antioxidante de acordo com o ensaio de DPPH para os extratos aquosos e metanólicos de *Spirulina sp.*, evidenciando uma atividade superior para o extrato aquoso onde existe uma maior concentração do pigmento ficocianina. No extrato metanólico os pigmentos maioritários foram o β -caroteno e clorofila *a*. Agregán *et al.* (2018) descreveram atividade antioxidante para o extrato alcoólico de *S. platensis*, utilizando os ensaios de DPPH e poder redutor.

O método de β -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade de inibição dos radicais livres durante a peroxidação do ácido linoleico, avaliando se a amostra é capaz de proteger o substrato lipídico da oxidação, ou seja, se impede a descoloração do β -caroteno. De acordo com os resultados obtidos (**Tabela 22**) neste caso a amostra que obteve maior atividade antioxidante pelo método de β -caroteno/ácido linoleico foi a SMA com 0,7 mg/mL (amostra com 48% de spirulina), no entanto, é de realçar que o controlo (MA) também apresentou atividade antioxidante (0,57 mg/mL), podendo este resultado ser justificado pela presença do ácido cítrico.

É importante realçar ainda que caso as microesferas tivessem concentrações maiores de spirulina (equivalentes à spirulina livre avaliada), valores semelhantes ou até superiores aos da microalga livre poderiam ser obtidos para a atividade antioxidante.

3.3.2 Atividade Citotóxica em Células Tumorais e Não Tumorais e Atividade Anti-Inflamatória da Spirulina Livre e Microencapsulada

A avaliação da citotoxicidade em linhas celulares não tumorais foi realizada com a finalidade de verificar se as amostras apresentavam efeito inibidor perante as culturas celulares, no entanto estas não apresentaram efeito citotóxico nas concentrações e células testadas. Em contrapartida, noutro estudo realizado por Czerwonka *et al.*, (2018), o extrato aquoso de *S. platensis* apresentou efeito citotóxico na linha celular tumoral

adenocarcinoma pulmonar (A549) com um GI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular) de 2,42 mg/mL após 24 horas de incubação. Adicionalmente, a spirulina livre, as microesferas e a maltodextrina não apresentaram efeitos citotóxicos em células não tumorais (fígado de porco, PLP2) (**Tabela 22**). Estes resultados indicam que as amostras obtidas não são tóxicas e podem ser adicionadas em matrizes alimentares. É de realçar também, que mesmo com a reação de reticulação da maltodextrina com ácido cítrico nas amostras SMA e MA não houve formação de compostos tóxicos.

A inflamação é uma resposta biológica do corpo humano frente à tentativa de eliminar patógenos e toxinas. Os macrófagos são linhas celulares que desempenham funções importantes na estimulação do sistema imunológico e excretam mediadores inflamatórios, tais como o NO (óxido nítrico). Estes mediadores aumentam a produção quando são expostos a imunoestimulantes como lipopolissacáridos (LPS) e proteínas virais. O NO por exemplo, é um radical livre e tem capacidade de se ligar a outros compostos promovendo a oxidação da célula e levando ao desenvolvimento de doenças (Taofiq *et al.*, 2016).

As amostras de spirulina na forma livre e encapsulada foram submetidas à análise da atividade anti-inflamatória, utilizando macrófagos de ratos (RAW 246.7) e LPS como estimulante, a fim de identificar a concentração que inibiu 50% da produção de NO. Como se pode verificar na **Tabela 22** as amostras S, SM, SMA e MA apresentaram atividade anti-inflamatória, enquanto que a amostra M não apresentou atividade anti-inflamatória nas concentrações testadas. Adicionalmente observou-se que houve um aumento da atividade nas amostras encapsuladas SM e SMA, existindo diferenças significativas entre elas. No caso da atividade anti-inflamatória, mesmo com concentrações de 50% e 48% de spirulina as microesferas mostraram maior potencial anti-inflamatório que a própria microalga, ou seja, caso as microesferas apresentassem concentrações superiores de spirulina ou fosse utilizado maior quantidade de microesferas na análise, a atividade anti-inflamatória poderia ter sido ainda maior.

De referir que a amostra controlo MA apresentou efeito anti-inflamatório considerável ($EC_{50} = 351 \mu\text{g/mL}$). Quando se encapsula a spirulina utilizando MA como material de parede, este efeito aumenta (EC_{50} : $258 \mu\text{g/mL}$), o que é considerado positivo do ponto de vista da microencapsulação, pois com o uso desta tecnologia verifica-se uma maior disponibilidade e estabilidade dos compostos bioativos presentes na microalga, podendo ser utilizados em matrizes alimentares com a finalidade de atribuir características anti-inflamatórias..

Tabela 22: Propriedades bioativas da spirulina, maltodextrina e microesferas obtidas.

	S	SM (50% spirulina)	SMA (48% spirulina)	M	MA
Atividade Antioxidante (EC₅₀ mg/mL)					
Atividade captadora de radicais DPPH	0,93±0,03 c	2,7±0,1 a	2,1±0,1 b	>50	>50
Poder Redutor	2,23±0,04 c	4,91±0,15 b	7,68±0,04 a	>50	>50
Inibição da descoloração do β-caroteno	3,3±0,1 a	5,2±0,5 b	0,7±0,1 c	>50	0,57±0,09 d
Citotoxicidade (GI₅₀, µg/mL)					
MCF-7 (adenocarcinoma da mama)	>400	>400	>400	>400	>400
NCI-H460 (carcinoma de pulmão)	>400	>400	>400	>400	>400
HeLa (carcinoma cervical)	>400	>400	>400	>400	>400
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	>400	>400	>400	>400	>400
Hepatotoxicidade (GI₅₀, µg/mL)					
PLP2 (células não tumorais de fígado de porco)	>400	>400	>400	>400	>400
Atividade Anti-inflamatória (EC₅₀, µg/mL)					
Inibição de NO	273±5 b	295±6 c	258±9 d	>400	351±3 a

Os valores são expressos em média±desvio padrão. S: spirulina; SM: spirulina/Maltodextrina; SMA: spirulina/Maltodextrina reticulada com ácido cítrico; M: maltodextrina; MA: maltodextrina reticulada com ácido cítrico. EC₅₀: Concentração da amostra correspondendo a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 da absorvância no ensaio do poder redutor. Trolox (control positivo) Valores EC₅₀: 41 µg/mL (poder redutor), 42 µg/mL (atividade captadora de radicais DPPH) e 18 µg/mL (inibição da descoloração do β-caroteno). Os valores da citotoxicidade são expressos em GI₅₀: concentração que inibiu 50% do crescimento celular. Valores GI₅₀ de Elipticina (controlo positivo): 1,21 µg/mL (MCF-7), 1,03 µg/mL (NCI-H460), 0,91 µg/mL (HeLa), 1,10 µg/mL (HepG2) e 2,29 µg/mL (PLP2). Atividade anti-inflamatória está expressa em valores de EC₅₀ correspondentes a 50% da inibição da produção de NO (Oxido nítrico) em comparação com o controlo negativo (100% de produção de NO). Dexametasona (controlo positivo) Valores de EC₅₀: 16 µg/mL. Em cada linha letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05).

Estudos realizados por Chen *et al.* (2012) apontaram também efeitos anti-inflamatórios no extrato aquoso da *S. platensis* e no pigmento ficocianina em células micróglias (BV-2) estimuladas com LPS. Noutro estudo realizado por Al-qahtani & Binobead (2018) analisou-se o efeito anti-inflamatório *in vivo*, utilizando indução de hepatotoxicidade em ratos e inclusão na dieta de *S. platensis* em diferentes concentrações durante uma semana. Observou-se que com a ingestão da microalga houve redução das citocinas pró-inflamatórias confirmando o seu efeito anti-inflamatório.

3.3.3 Atividade Antimicrobiana

Diversos estudos foram realizados nos últimos anos com o intuito de encontrar e explorar agentes antimicrobianos para combater a resistência microbiana. Desta forma, a spirulina livre e microencapsulada e a maltodextrina foram submetidos à análise da atividade antimicrobiana em bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* suscetível a meticilina e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), com a finalidade de encontrar a concentração mínima inibitória (CMI) e também a concentração mínima bactericida (CMB).

Nas bactérias Gram-negativas verificou-se que as amostras S, SM e SMA apresentaram resultados semelhantes de CMI, no entanto a amostra MA também apresentou bons resultados de CMI para as bactérias testadas (**Tabela 23**), o que pode ser justificado pela presença do ácido cítrico que é considerado um agente antimicrobiano.

Kaushik & Chauhan (2008) descreveram que o extrato metanólico de *S. platensis* apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo. El-sheekh *et al.* (2014) descreve a extração das substâncias antimicrobianas de *S. platensis* e a sua ação efetiva contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e ainda contra o fungo *Aspergillus niger*. Sendo de realçar que há estudos que indicam o potencial antifúngico de *Spirulina sp.*, como por exemplo o referido por Marangoni *et al.* (2017) onde esta microalga apresentou CMIs para diferentes espécies de *Candida*.

Todas as amostras apresentaram CMIs para a bactéria *K. pneumoniae* semelhantes ao controlo Ampicilina. Para *P. aeruginosa*, as amostras SM (50% spirulina), SMA (48% spirulina) e MA apresentaram melhores resultados comparativamente com à S e ao

controle Ampicilina. Relativamente às bactérias Gram-positivas, as amostras que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram as S e SMA (48% spirulina), sendo que estas apresentaram CMI's semelhantes. Comparativamente com os controles, as amostras apresentaram menor atividade antimicrobiana e nenhuma das amostras apresentou concentrações mínimas bactericidas (CMB).

As atividades antimicrobianas das microalgas podem estar relacionadas com a produção de péptidos, alcaloides e lipopolissacáridos. No entanto, para *S. platensis* esta atividade pode ser justificada pela presença de ácidos gordos como o γ -linolénico (El-sheekh *et al.*, 2014).

Portanto, a encapsulação da microalga *S. platensis* aumentou a atividade antimicrobiana para a bactéria *P. aeruginosa*, enquanto que para as outras bactérias testadas as concentrações mínimas inibitórias permaneceram semelhantes. É importante realçar ainda que as microesferas apresentam concentrações de spirulina inferiores (SM – 50% e SMA – 48%) que S (considerando 100% spirulina) de forma a concluir que, mesmo com 50% ou 48% de spirulina, as microsferas apresentaram melhores resultados comparativamente à spirulina na sua forma livre. Desta forma, a estratégia de microencapsulação de *S. platensis* e utilização do sistema de reticulação (maltodextrina/ácido cítrico) apresenta vantagens em relação à bioatividade (anti-inflamatória e antimicrobiana), se comparada com a spirulina livre.

Tabela 23: Atividade antimicrobiana (CMI e CMB, mg/mL) de *S. platensis* livre (S), maltodextrina (M) e microesferas (SM), (SMA) e (MA).

	S		SM (50% spirulina)		SMA (48% spirulina)		M		MA		Ampicillia (20 mg/mL)		Imipenem (1 mg/mL)		Vancomicina (1 mg/mL)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Bactéria gram-negativa																
<i>Escherichia coli</i>	10	>20	10	>20	20	>20	>20	>20	20	>20	<0.15	<0.15	<0.0078	<0.0078	n.t.	n.t.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	>20	10	>20	10	>20	10	>20	10	>20	10	20	<0.0078	<0.0078	n.t.	n.t.
<i>Morganella morganii</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	20	>20	20	>20	<0.0078	<0.0078	n.t.	n.t.
<i>Proteus mirabilis</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	<0.15	<0.15	<0.0078	<0.0078	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	20	>20	20	>20	>20	>20	20	>20	>20	>20	0.5	1	n.t.	n.t.
Bactéria gram-positiva																
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	>20	10	>20	10	>20	20	>20	10	>20	<0.15	<0.15	n.t.	n.t.	<0.0078	<0.0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	>20	10	>20	10	>20	20	>20	10	>20	<0.15	<0.15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
MSSA	5	>20	10	>20	5	>20	20	>20	10	>20	<0.15	<0.15	n.t.	n.t.	<0.0078	<0.0078
MRSA	10	>20	10	>20	10	>20	20	>20	10	>20	<0.15	<0.15	n.t.	n.t.	0.25	0.5

MSSA –*Staphylococcus aureus* suscetível a meticilina; MRSA –*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; CMI – Concentração mínima inibitória; CMB – Concentração mínima bactericida; n.t – não testada.

3.4 APLICAÇÃO EM IOGURTE

Seguindo a tendência atual de incorporação de compostos bioativos naturais em alimentos (Carocho, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014), foram preparados diferentes grupos de iogurtes funcionalizados com spirulina na sua forma livre, encapsulada em maltodextrina ou maltodextrina reticulada com ácido cítrico. Para fins de comparação, foram também analisados iogurtes sem adição de spirulina ou qualquer outro agente funcionalizante. Os ensaios laboratoriais foram realizados em três momentos distintos: dia da compra (quando as incorporações foram feitas) e após 4 e 7 dias sob armazenamento em refrigeração.

Os seguintes códigos foram considerados: iogurte controlo (IC), iogurte com spirulina livre (IS), iogurte com spirulina encapsulada em maltodextrina (ISM) e iogurte com spirulina encapsulada em maltodextrina reticulada com ácido cítrico (ISMA), tal como indicado na **Figura 17**. Os números 0, 4 e 7 indicam o dia da compra, 4 e 7 dias de armazenamento.

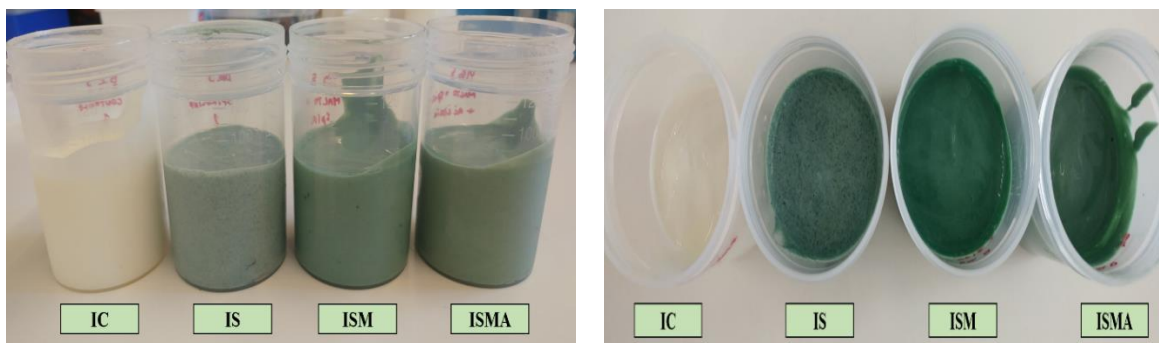


Figura 17: Iogurtes controlo (IC) e enriquecidos com spirulina livre (IS), encapsulada com maltodextrina (ISM) e encapsulada com maltodextrina reticulada com ácido cítrico (ISMA) no dia da incorporação (dia 0).

Uma vez que o efeito de cada fator (FI ou TA) pode ser afetado pelo outro (ou seja, diferentes efeitos do tempo de armazenamento (TA) de acordo com cada tipo de formulação de iogurte (FI), ou vice-versa), a interação (FI×TA) foi avaliada. Em todos os casos em que foi encontrada uma interação significativa ($p < 0,050$), a classificação estatística resultante dos testes de comparação múltipla não pode ser indicada. Nestes casos, as conclusões gerais foram (quando possível) obtidas a partir das correspondentes representações gráficas das médias marginais estimadas (EMM).

3.4.1 Avaliação do Valor Nutricional, Ácidos Gordos e Açúcares Livres ao Longo do Tempo de Armazenamento

A partir da análise dos resultados dos parâmetros nutricionais (**Tabela 24**), pode-se verificar que a interação entre FI e TA (FI×TA) não foi significativa em nenhum caso, indicando que as mudanças ocorridas ao longo do tempo não dependeram de FI e vice-versa. No que diz respeito aos efeitos de cada fator individual, pode-se concluir que o FI causou mudanças significativas em todos os parâmetros, exceto na lactose, enquanto o TA não teve efeito significativo ($p < 0,050$) em nenhum parâmetro. Os iogurtes controle apresentaram teores de água superiores (84,6 g/100g mf), o que pode estar relacionado com o facto de que a spirulina e os encapsulados terem sido adicionados na forma de pó seco. Em consonância com a observação anterior, os iogurtes funcionalizados apresentaram maior teor de gordura (3,2 a 3,3 g/100 g mf), proteína (6,2 a 6,3 g/100g mf) e cinzas (0,88 a 0,89 (84,6 g/100g mf), bem como maior valor energético (77 a 80 kcal/100g mf), o que deverá estar relacionado com o facto de a spirulina apresentar elevada quantidade de proteínas, diversidade de ácidos gordos e minerais. Os resultados para a galactose, por outro lado, são um pouco surpreendentes, uma vez que não seria expectável ter uma concentração superior nos iogurtes funcionalizados. É mais provável, no entanto, que a diferença seja resultado de qualquer erro circunstancial de quantificação do que consequência de uma diferença efetiva entre as amostras. Apesar das diferenças destacadas, os resultados evidenciaram a manutenção do perfil nutricional que tipifica os iogurtes naturais (identificados como IC).

Os perfis de ácidos gordos, devido à sua eficácia como indicadores de um bom processo de conservação (Barreira, Pereira, Oliveira, & Ferreira, 2010; Pereira *et al.*, 2016), também foram caracterizados. Os ácidos gordos apresentados na **Tabela 25** foram quantificados em percentagens relativas acima de 1%, mas também foram detectados outros ácidos gordos em percentagens menores: C13:0, C15:1, C17:0, C20:0 e C20:1 (porém, todos os ácidos gordos foram incluídos na análise discriminante linear discutida adiante).

Ao contrário dos parâmetros nutricionais, os ácidos gordos apresentaram diferentes variações ao longo do tempo para cada FI, ou seja, a interação entre os fatores foi significativa em todos os casos. Assim, a classificação estatística resultante dos testes de comparações múltiplas não pôde ser indicada. Várias diferenças aparentes podem ser

identificadas na **Tabela 25**. No entanto, essas diferenças foram inequívocas (ou seja, o efeito do TA ser independente da FI, ou uma determinada FI ter a mesma tendência para todos os TA) apenas no caso de C12:0 (menor no ISMA), C14:0 (menor no ISM) e PUFA (menor após 7 dias), conforme validado pelas EMM (dados não exibidos). No entanto, os perfis globais podem ser considerados semelhantes entre todas as formulações preparadas e tempos de ensaio.

3.4.2 Análise dos Parâmetros Físico-químicos ao Longo do Tempo de Armazenamento

O maior efeito da FI também foi observado entre os parâmetros de cor e pH. De facto, o TA não causou alterações significativas em qualquer dos casos (**Tabela 26**). No que se refere à FI, o IC apresentou valores luminosidade (L^*) superiores, o que pode ser justificado pela ausência de qualquer ingrediente em pó adicionado e sua cor mais branca. Essas mesmas amostras apresentaram maior amarelecimento (b^*), enquanto que, como esperado, os iogurtes adicionados com spirulina em pó (diretamente adicionada ou encapsulada) apresentaram um esverdeamento levemente maior (por esta microalga ser rica em clorofilas), como indicado pelos menores valores de tonalidade vermelha (a^*). Além do efeito na cor, foi possível observar que os iogurtes preparados com spirulina encapsulada apresentaram uma aparência mais homogênea, enquanto os adicionados com spirulina livre apresentaram uma espécie de efeito pontilhado (**Figura 17**).

3.4.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das diferentes formulações de iogurte também foi estudada, especificamente através da realização da atividade captadora de radicais livres DPPH e poder redutor. Como pode ser confirmado na **Figura 18**, a evolução dos valores de EC_{50} ao longo do tempo não é a mesma para todas as formulações, o que está de acordo com a interação significativa entre os fatores (FI×TA) encontrada em ambos os ensaios de atividade antioxidante. Em relação ao efeito individual de cada fator, foram observadas diferenças significativas, entre diferentes FI e TA. O captador de DPPH mais ativo foi o ISMA ($EC_{50} = 9$ mg/mL), seguido pelo IS e ISM ($EC_{50} = 13$ mg/mL e 15 mg/mL, respetivamente) e IC ($EC_{50} = 89$ mg/mL). Na verdade, o aumento obtido na atividade

captadora de radicais DPPH, foi melhor que o observado em iogurtes funcionalizados com funcho ou camomila (Caleja *et al.*, 2016).

As diferenças no poder redutor não foram igualmente notórias (IC: $EC_{50} = 29$ mg/mL, IS: $EC_{50} = 17$ mg/mL, ISM: $EC_{50} = 22$ mg/mL, ISMA: $EC_{50} = 20$ mg/mL), apesar da maior atividade obtida em iogurtes funcionalizados. Em termos de TA, nenhum efeito significativo foi observado na atividade captadora de radicais DPPH, enquanto o poder redutor apresentou uma leve diminuição nas amostras armazenadas (4 e 7 dias).

3.4.4 Análise Discriminante Linear

Depois de identificar as diferenças individuais anteriores, pretendia-se agora verificar as alterações gerais (avaliando todos os parâmetros simultaneamente) que estavam mais correlacionadas com cada FI preparada. Nesse sentido, uma análise discriminante linear (LDA) foi realizada para avaliar as correlações entre FI (variáveis dependentes categóricas) e os resultados obtidos (variáveis independentes quantitativas). As variáveis independentes significativas foram selecionadas de acordo com o teste de λ Wilks. Apenas as variáveis com desempenho de classificação estatisticamente significante ($p < 0,050$) foram mantidas pelo modelo estatístico.

As três funções discriminantes definidas incluíram 100% (primeira função: 80,9%; segunda função: 15,7%; terceira função: 3,4%) da variância observada (**Figura 19**). Entre as 35 variáveis analisadas, o modelo discriminante selecionou umidade, L^* , b^* , a^* , lactose, C14:1, C15:0, C15:1, C17:0, C18:3n3, C20:0, C20:1, SFA, atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor, como aquelas que possuem capacidade discriminante significativa.

A função 1 demonstrou maior correlação com L^* , sendo o seu efeito principal a separação dos marcadores correspondentes a IC (valores de L^* mais elevados) no lado positivo do eixo. A função 2, por seu lado, correlacionou-se mais com b^* , discriminando amostras contendo spirulina livre (IS) daquelas adicionadas com as formas encapsuladas (ISM e ISMA), devido aos seus menores valores de amarelecimento (b^*). Como pode ser observado pela distribuição tridimensional de marcadores correspondentes a diferentes FI, as formulações mais similares foram ISM e ISMA, que só puderam ser separadas com a contribuição da função 3. As variáveis mais correlacionadas com esta função foram a atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor, ambos apresentando valores mais

baixos de EC₅₀ no caso de ISMA. No LDA realizado, o desempenho da classificação foi 100% exato, tanto para os casos agrupados originais, como para os agrupados por validação cruzada.

Em geral, o ISMA acabou por resultar ser a melhor solução, uma vez que a incorporação de spirulina encapsulada em maltodextrina reticulada com ácido cítrico no iogurte manteve os perfis nutricionais e de ácidos gordos, resultou numa cor atraente e, acima de tudo, melhorou a atividade antioxidante em grande medida. Num estudo realizado por Francisco *et al.* (2018), a incorporação de extrato de *Agaricus bisporus* encapsulado em maltodextrina reticulada com ácido cítrico em iogurtes, aumentou a atividade antioxidante (ao longo de 7 dias). Este efeito pode ser em parte justificado pela reação do ácido cítrico com a maltodextrina, ocasionando a efetiva reticulação, ou pela possível reação do ácido cítrico com a spirulina, produzindo compostos que aumentaram a atividade antioxidante.

Tabela 24: Composição nutricional (g/100 g massa fresca) e valor energético (kcal/100g massa fresca) para as diferentes formulações de iogurtes (FI) e tempo de armazenamento (TA). Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.

		Humidade	Gordura	Proteína	Cinzas	Glúcidos	Galactose	Lactose	Valor Energético
FI	IC	84.6±0.3 a	3.0±0.1 c	5.4±0.2 b	0.83±0.02 b	6.1±0.4 b	1.2±0.1 c	3.3±0.2	73±2 d
	IS	84.0±0.2 b	3.3±0.1 a	6.2±0.2 a	0.89±0.02 a	5.5±0.2 c	1.4±0.1 ab	3.3±0.2	77±1 c
	ISM	83.4±0.2 c	3.2±0.1 b	6.3±0.2 a	0.89±0.02 a	6.2±0.3 b	1.4±0.1 a	3.2±0.1	79±1 b
	ISMA	83.1±0.3 d	3.2±0.1 b	6.3±0.2 a	0.88±0.02 a	6.5±0.3 a	1.3±0.1 bc	3.3±0.2	80±1 a
ANOVA	Valor de p (n = 27) ²	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.086	<0.001
TA	0 dias	84±1	3.2±0.1	6.1±0.4	0.87±0.03	6.1±0.5	1.4±0.1	3.3±0.2	77±3
	4 dias	84±1	3.2±0.2	6.0±0.4	0.87±0.03	6.1±0.5	1.3±0.1	3.2±0.2	77±3
	7 dias	84±1	3.2±0.1	6.1±0.4	0.87±0.04	6.0±0.5	1.3±0.1	3.3±0.2	77±3
ANOVA	Valor de p (n = 36) ³	0.967	0.702	0.906	0.935	0.752	0.153	0.121	0.969
FI×TA	Valor de p (n = 108) ⁴	0.740	0.110	0.635	0.249	0.665	0.072	0.897	0.688

¹Os resultados são apresentados como a média de cada IF (agregando os resultados de 0, 4 e 7 dias) ou como a média dos TA, combinando todas as FI. ²Dado que o valor de p foi <0.050 em todos os casos, o parâmetro correspondente apresentou uma diferença significativa para pelo menos uma FI. ³Dado que o valor de p foi >0.050 em todos os casos, o parâmetro correspondente não apresentou qualquer diferença significativa. ⁴Nesta tabela, a interação entre fatores não foi significativa em nenhum caso, permitindo a classificação das comparações múltiplas.

Tabela 25: Perfil de ácidos gordos (%) para as diferentes formulações de iogurte (FI) e tempo de armazenamento (TA). Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.

		C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1n9	C18:2n6	C18:3n3	SFA	MUFA	PUFA
FI	IC	3.1±0.2	1.9±0.1	3.6±0.1	4.2±0.1	13.8±0.3	1.4±0.1	1.5±0.1	38±1	1.8±0.1	12.0±0.4	12.4±0.3	2.8±0.1	2.1±0.1	79±1	16.0±0.2	4.9±0.2
	IS	3.3±0.5	2.1±0.3	4.0±0.4	4.3±0.1	13.5±0.3	1.3±0.1	1.5±0.1	37±1	1.7±0.1	12.2±0.2	12.2±0.2	2.8±0.1	2.1±0.1	79±1	15.6±0.2	4.9±0.1
	ISM	3.9±0.3	2.3±0.2	4.0±0.3	4.1±0.2	13.1±0.4	1.3±0.1	1.4±0.1	37±1	1.7±0.1	12.2±0.4	12.3±0.3	2.8±0.1	2.1±0.1	79±1	15.7±0.2	4.9±0.1
	ISMA	3.0±0.5	1.8±0.3	3.3±0.4	3.9±0.2	13.8±0.4	1.3±0.1	1.5±0.1	39±1	1.8±0.1	11.8±0.2	12.5±0.5	2.8±0.2	2.0±0.1	79±1	16.0±0.5	4.8±0.1
ANOVA	Valor de <i>p</i> (n = 27) ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.056	0.254	0.001	0.150	<0.001	0.004
TA	0 dias	3.4±0.5	2.1±0.3	3.7±0.4	4.1±0.2	13.4±0.5	1.3±0.1	1.5±0.1	37±1	1.7±0.1	12.3±0.4	12.4±0.3	2.8±0.1	2.1±0.1	79±1	15.8±0.3	4.9±0.2
	4 dias	3.1±0.5	1.9±0.4	3.6±0.5	4.1±0.2	13.6±0.4	1.3±0.1	1.5±0.1	38±1	1.7±0.1	12.1±0.3	12.4±0.5	2.9±0.1	2.1±0.1	79±1	15.9±0.5	4.9±0.1
	7 dias	3.6±0.4	2.1±0.2	3.9±0.2	4.2±0.1	13.7±0.2	1.3±0.1	1.5±0.1	37±1	1.7±0.1	11.8±0.1	12.2±0.1	2.7±0.1	2.0±0.1	79±1	15.7±0.1	4.8±0.1
ANOVA	Valor de <i>p</i> (n = 36) ³	0.001	0.019	0.020	0.013	0.117	0.521	0.785	0.152	0.156	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	0.101	0.111	<0.001
FI×TA	Valor de <i>p</i> (n = 108) ⁴	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

¹Os resultados são apresentados como a média de cada IF (agregando os resultados de 0, 4 e 7 dias) ou como a média dos TA, combinando todas as FI. ²Se o valor de *p* for <0.050, o parâmetro correspondente apresentou uma diferença significativa para pelo menos uma FI. ³ Se o valor de *p* for <0.050, o parâmetro correspondente apresentou uma diferença significativa para pelo menos um dos períodos. ⁴Nesta tabela, a interação entre fatores foi significativa em todos os casos, não permitindo a classificação das comparações múltiplas.

Tabela 26: Parâmetros físico-químicos (CIE L^* , a^* , b^* e pH) para as diferentes formulações de iogurtes (FI) e tempo de armazenamento (TA). Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.

		L^*	a^*	b^*	pH
FI	IC	92±1 a	-4±1	10.7±0.2	4.1±0.1 b
	IS	60±1 b	-10±1	2.2±0.4	4.3±0.1 a
	ISM	56±1 c	-13±2	4.9±0.2	4.3±0.1 a
	ISMA	58±1 d	-12±1	6.4±0.5	4.0±0.1 b
ANOVA	Valor de p ($n = 27$) ²	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
TA	0 dias	67±15	-11±4	6±3	4.2±0.1
	4 dias	67±15	-10±3	6±3	4.2±0.1
	7 dias	66±15	-9±3	6±3	4.2±0.1
ANOVA	Valor de p ($n = 36$) ³	0.967	0.702	0.906	0.935
FI×TA	Valor de p ($n = 108$) ⁴	0.389	<0.001	<0.001	0.654

¹Os resultados são apresentados como a média de cada FI (agregando os resultados de 0, 4 e 7 dias) ou como a média dos TA, combinando todas as FI. ²Como o valor de p foi <0.050 em todos os casos, todos os parâmetros apresentaram diferenças significativas para pelo menos uma FI. ³ Como o valor de p foi >0.050 em todos os casos, nenhum dos parâmetros apresentou diferenças significativas. ⁴Um valor de p <0,050, indica uma interação entre fatores significativa, não permitindo a classificação das comparações múltiplas no parâmetro correspondente.

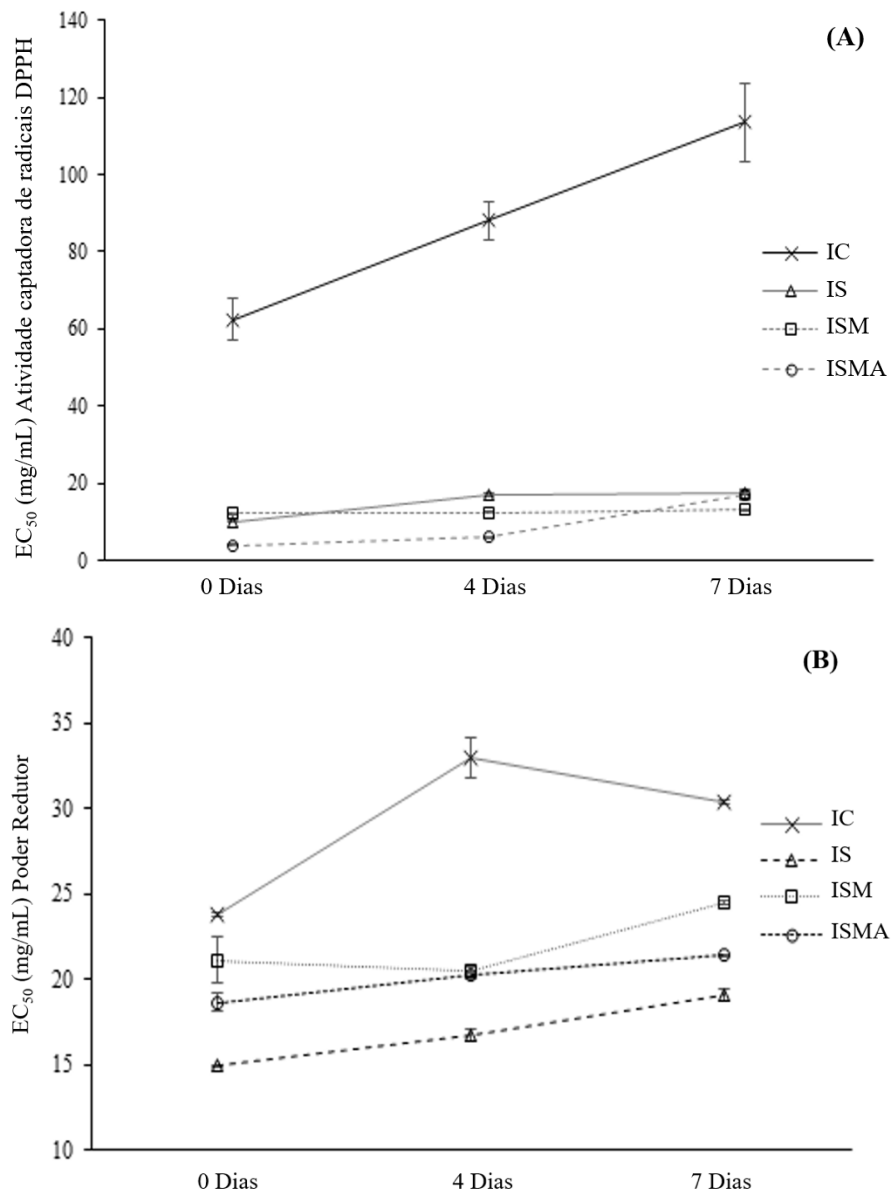


Figura 18: Efeito conjugado de FI e TA na atividade captadora de radicais DPPH (A) e poder redutor (B).

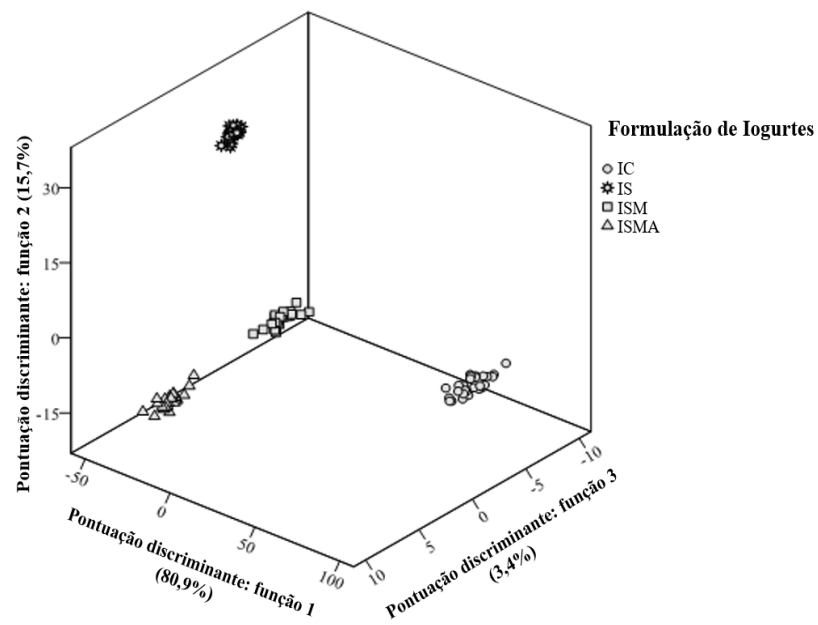


Figura 19: Distribuição tridimensional de marcadores FI de acordo com os coeficientes das funções discriminantes canônicas definidas a partir dos parâmetros avaliados.

3.4.5 Avaliação Microscópica dos Iogurtes ao Longo do Tempo de Armazenamento

Os iogurtes foram avaliados por microscopia ótica (MO) ao longo do tempo de armazenamento (0, 4 e 7 dias) com a finalidade de observar o comportamento das microesferas quando incorporadas na matriz hidrofílica (Tabela 27). Observou-se, como já citado anteriormente, o efeito pontilhado que a spirulina livre ocasiona quando adicionada ao iogurte, comprovando a difícil dispersão na matriz.

Este efeito está representado de forma esquemática na **Figura 20** e pode ser observado na **Tabela 27** que reúne imagens microscópicas ao longo dos 7 dias de armazenamento. Verifica-se que a spirulina livre se aglomera e não permite a total dispersão; para a amostra SM, ao ser adicionada e durante o tempo de armazenamento, as microesferas desagregam-se, contudo a spirulina que estava encapsulada permanece totalmente dispersa no iogurte (aspecto homogêneo). Com a adição da amostra SMA observa-se uma melhor dispersão, sendo ainda possível observar microesferas intactas ao fim de 7 dias de armazenamento, o que pode ser justificado pela reação de reticulação que confere maior resistência às microesferas, portanto, melhores características de proteção sem comprometer a compatibilidade com o meio hidrofílico.

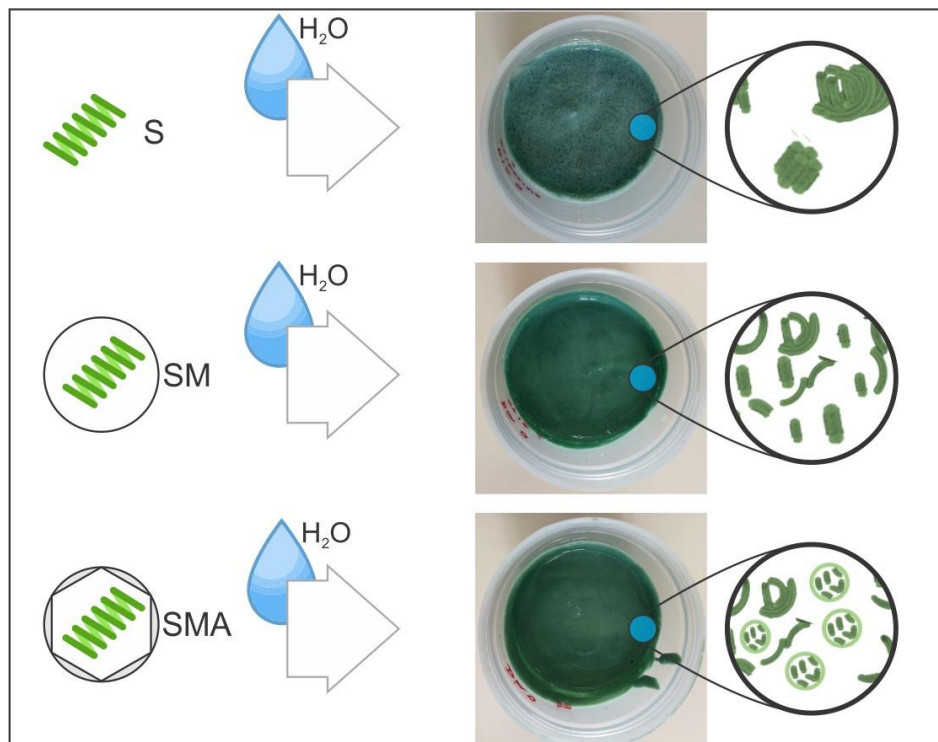
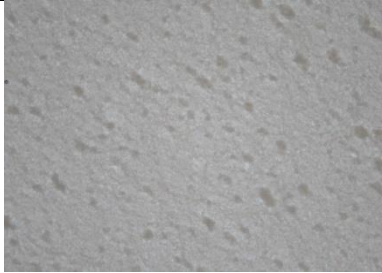
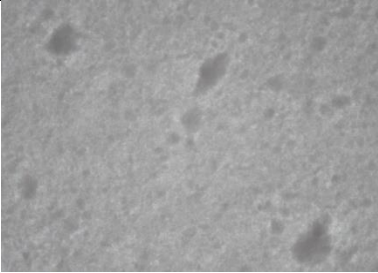
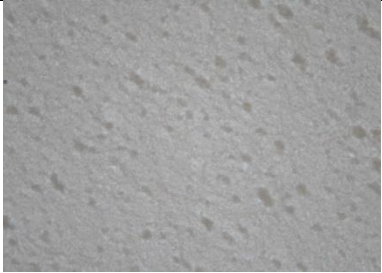
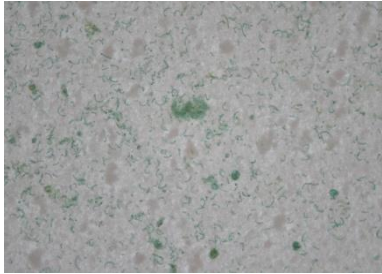
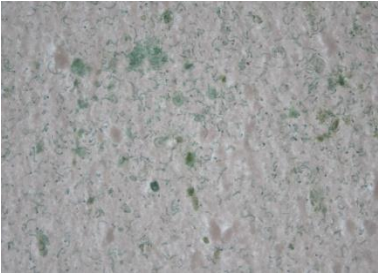
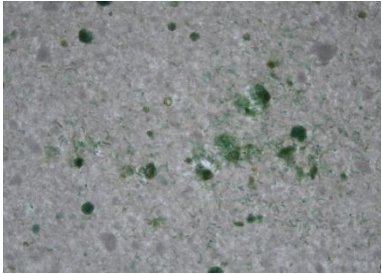
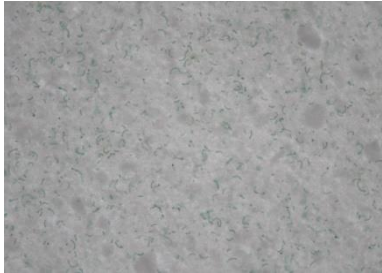


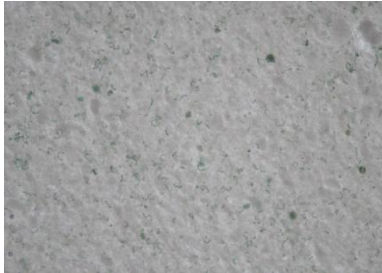
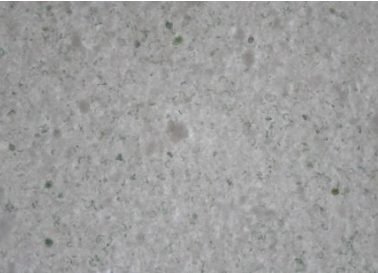
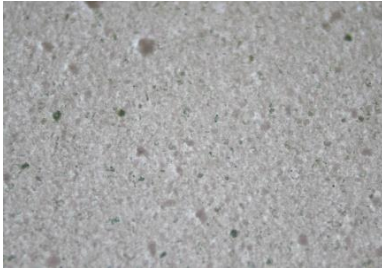


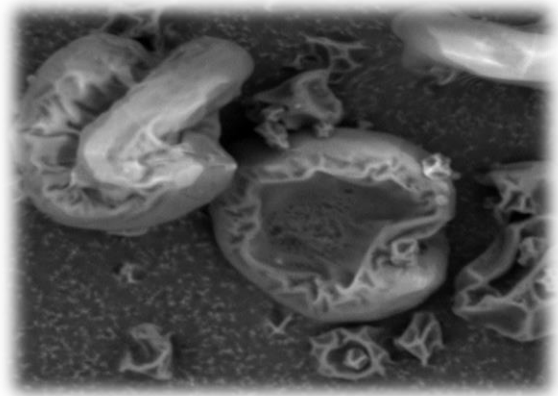
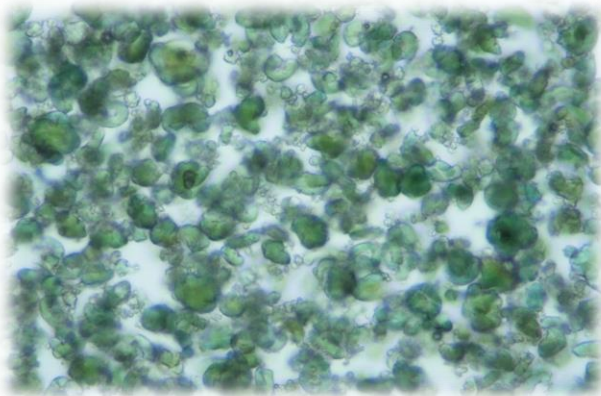
Figura 20: Esquema da incorporação das microesferas e o seu comportamento no iogurte.

Tabela 27: Avaliação microscópica do comportamento das microesferas nos iogurtes ao longo do tempo de armazenamento (Ampliação de 100X).

	Dia 0	Dia 4	Dia 7
IC			
IS			
ISM			
ISMA			

Capítulo 4

Conclusão e Trabalho Futuro



4. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO

O presente trabalho teve como objetivo a utilização da técnica de microencapsulação por *spray drying* aplicada a uma microalga, nomeadamente *Spirulina platensis*, visando solucionar problemas identificados na sua incorporação em alimentos, tais como sabor e odor indesejável, manutenção dos compostos bioativos e aumento da sua compatibilidade com matrizes hidrofílicas. A adição desta microalga, na forma livre e microencapsulada, foi feita tendo por base uma matriz alimentar hidrofílica selecionada pela sua importância e aceitabilidade na dieta alimentar (iogurtes). Os efeitos (nutricionais e bioativos) destas aditivações ao longo do tempo de armazenamento do produto (0, 4 e 7 dias) foi avaliada para verificar as vantagens e desvantagens da utilização da forma microencapsulada, relativamente à forma livre, na funcionalização de alimentos.

De forma a avaliar o potencial como fonte de ingredientes funcionais, na fase inicial do trabalho, realizou-se a caracterização da amostra comercial da microalga *S. platensis* com o intuito de obter informações detalhadas sobre a sua composição. Assim, no que respeita ao valor nutricional, concluiu-se que a microalga estudada apresentou alto teor em proteínas (75,6g/100 g ms) e cinzas (6,19g/100 g ms), além de ser uma matriz rica em ácidos gordos polinsaturados. Apresentou ainda na sua composição pigmentos como β -caroteno, clorofila *a* e ficocianina. Em relação às suas propriedades bioativas a microalga *S. platensis* mostrou ter atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

O processo de microencapsulação por *spray drying* resultou em rendimentos superiores a 50% (66% e 75% para as microesferas SM e SMA, respetivamente). Estes valores são bastante promissores considerando a escala laboratorial utilizada (150 mL de solução atomizada). Adicionalmente, as microesferas produzidas apresentaram boa estabilidade térmica, de uma forma geral superior ou comparável à dos materiais de base. No que respeita à reticulação da maltodextrina com ácido cítrico, verificou-se também a ocorrência do aumento da resistência térmica (comparativamente às microesferas produzidas somente com maltodextrina). Por meio da análise de FTIR, foi possível concluir que os materiais de base estavam presentes nas microesferas, e comprovar a ocorrência da reação de reticulação da maltodextrina na presença do ácido cítrico.

As microesferas apresentaram atividade anti-inflamatória superior à spirulina na sua forma livre e atividade antioxidante semelhante. Em relação à atividade

antimicrobiana, para algumas bactérias, as microesferas apresentaram maior efeito antimicrobiano comparativamente com a spirulina livre. As microesferas não apresentaram uniformidade no que respeita à sua morfologia nem formato esférico, tendo-se verificado que em alguns casos o material de parede (maltodextrina) se adequava à morfologia da microalga (espiral) ou à morfologia dos seus aglomerados. Quanto ao tamanho médio da partícula em volume, observaram-se tamanhos de 10,78 μm para a amostra SM, 11,14 μm para a amostra SMA, isto é, o tamanho não difere muito entre as amostras SM e SMA. A mesma tendência foi verificada para o tamanho médio em número.

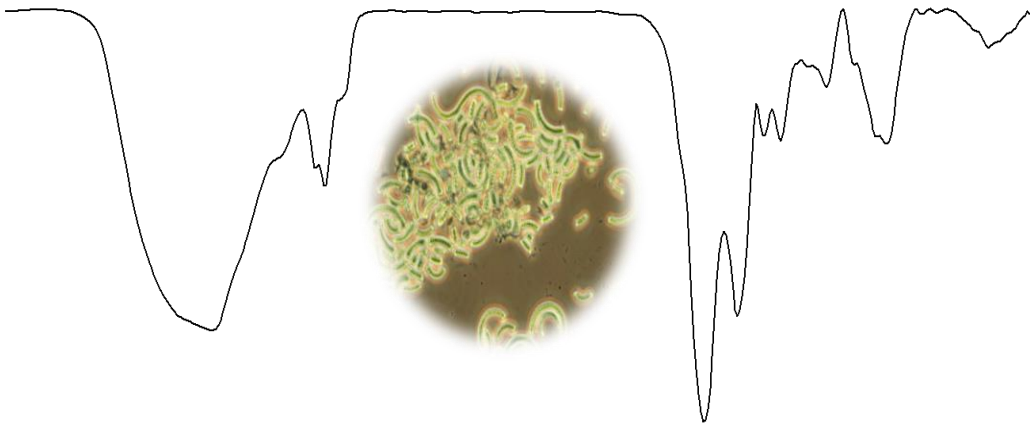
Em relação ao processo de incorporação da spirulina livre e encapsulada nos iogurtes concluiu-se que a adição da spirulina na forma microencapsulada permitiu uma melhor homogeneidade do produto final; quando se adicionou a spirulina livre notou-se um efeito de “pontilhado” representando uma má dispersão da microalga no iogurte (matriz hidrofílica). Por intermédio da análise discriminante, foi possível concluir que entre as formulações de iogurte produzidas, a SMA (spirulina/maltodextrina reticulada com ácido cítrico) é a mais recomendada para funcionalizar os iogurtes, pois manteve os perfis nutricionais, garantindo uma cor mais atraente e melhorando a atividade antioxidante. Adicionalmente, é importante salientar que ao longo do tempo de armazenamento (7 dias) parte das microesferas SMA apresentavam-se intactas, enquanto que as microesferas SM (spirulina/maltodextrina) se tinham desagregado na sua maioria (observação em microscópio ótico).

Em síntese, a utilização da técnica de *spray drying* para a microencapsulação de microalgas pode ser considerada uma alternativa útil para facilitar a funcionalização de alimentos, solucionando problemas como a sua difícil dispersão em meios hidrofílicos e garantindo a manutenção dos compostos bioativos. Esta técnica apresenta um grande potencial dado que já é utilizada na indústria alimentar e a sua utilização permite uma produção a grande escala. Além dos diversos novos produtos alimentares que podem ser desenvolvidos utilizando os microencapsulados de spirulina, as próprias microesferas podem ser comercializadas, diretamente ao consumidor, como um produto funcional para que este o utilize da forma mais adequada, representando um produto alternativo à comercialização da spirulina com as vantagens anteriormente descritas. De realçar que este produto contém, adicionalmente, maltodextrina que também é comercializada como suplemento alimentar.

O presente estudo, consistiu um estudo inicial no campo da microencapsulação da spirulina podendo ainda ser explorado a diversos níveis em trabalhos futuros. Alguns exemplos incluem:

- Estudar a obtenção de compostos, ou classes de compostos, com funcionalidade reconhecida mediante estudos de otimização da extração dessas moléculas alvo. Um exemplo poderá ser a extração da ficocianina, composto reconhecido pela sua bioatividade e poder corante. Neste tópico, poderá ainda inovar-se recorrendo a técnicas de extração mais sustentáveis e amigas do ambiente (por exemplo, técnicas baseadas em ultrassons e microndas);
- Dar continuidade aos estudos de microencapsulação, nomeadamente estudando outras técnicas de microencapsulação e testando outros materiais encapsulantes e reticulantes. Dando seguimento ao ponto anterior, proceder à encapsulação de diferentes bioativos extraídos da biomassa de spirulina;
- Estudar a aplicação das microesferas desenvolvidas noutras matrizes alimentares hidrofílicas. Na sequência do ponto anterior, e tendo por base a utilização de materiais de parede com características lipofílicas (por exemplo ceras), testar a sua introdução em matrizes de base lipofílica.
- Tendo em consideração a aceitação destes novos produtos por parte do consumidor proceder à realização de testes de análise sensorial.

Capítulo 5
Referências



5. REFERÊNCIAS

- Abalde, J. (1998). Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp . 109201. *Plant Science*, 136, 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00113-7)
- Abreu, R. M. V, Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., ... Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2- carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 5800–5806. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.029>
- Afkhami-Ardakani, M; Hasanzadeh, S; Shahrooz, R; Delirezh, N; Malekinejad, H. (2018). Antioxidant effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Veterinary Research Forum*, 9(1), 35–41.
- Agregán, R., Munekata, P., Franco, D., Medicines, J. C., Barba, F. ., & Lorenzo, J. . (2018). Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro-(*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and Micro-Algae (*Chlorella vulgaris* and. *Mdpi.Com*. <https://doi.org/10.3390/medicines5020033>
- Agustini, T. W., Ma'ruf, W. F., Widayat, Suzery, M., Hadiyanto, & Benjakul, S. (2016). Application of *spirulina platensis* on ice cream and soft cheese with respect to their nutritional and sensory perspectives. *Jurnal Teknologi*, 78(4–2), 245–251. <https://doi.org/10.11113/jt.v78.8216>
- Agustini, T. W., Soetrinanto, D., & Ma'ruf, W. F. (2017). Study on chemical, physical, microbiological and sensory of yoghurt enriched by *Spirulina platensis*. *International Food Research Journal*, 24(1), 367–371.
- Agustini, T. W., Suzery, M., Sutrisnanto, D., Ma'ruf, W. F., & Hadiyanto. (2015). Comparative Study of Bioactive Substances Extracted from Fresh and Dried *Spirulina* sp. *Procedia Environmental Sciences*, 23(Ictcred 2014), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.01.042>
- Ak, B., Avşaroğlu, E., Işık, O., Özyurt, G., Kafkas, E., & Uslu, L. (2016). Nutritional and Physicochemical Characteristics of Bread Enriched with Microalgae *Spirulina platensis*. *International Journal of Engineering Research and Application*, 6(12),

- 30–38.
- Akhavan, S., Mahdi, S., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin , gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>
- Al-qahtani, W. H., & Binobead, M. A. (2018). Anti-inflammatory , antioxidant and antihepatotoxic effects of Spirulina platensis against D -galactosamine induced hepatotoxicity in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.01.003>
- Alessandro, E. B. D., & Antoniosi, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Martins, A., & Pintado, M. (2012). Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *Journal Applied Microbiology*, 113, 466–475. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05347.x>
- Anandharamakrishnan, C., & Ishwarya, P. I. (2015). *Spray Drying Technique for Food Ingredient Encapsulation*. India.
- Andlauer, W., & Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35(2–3), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00179-X)
- Andrade, L. M. (2018). Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Processing & Technology*, 6(2). <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2018.06.00144>
- AOAC. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. USA: AOAC INTERNATIONAL.: (D. G. W. L. Jr; Ed.) (20th ed.).
- Ashwell, M. (2002). *Concepts of functional foods*. IISI Europe Concise Monograph Series. Retrieved from <http://fst.sagepub.com/content/3/4/306.2.full.pdf>
- Awadhiya, A., Kumar, D., & Verma, V. (2016). Crosslinking of agarose bioplastic using citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 151, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.040>
- Azeredo, H. M. C., & Waldron, K. W. (2016). Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - A review. *Trends in Food Science and*

- Technology*, 52, 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.008>
- Azeredo, H. M. C. de. (2005). Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentação E Nutrição, Araraquara*, 16(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.04.001>
- Azzi, A. (2018). Many tocopherols , one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.004>
- Bach, Q., & Chen, W. (2017). Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgae via thermogravimetric analysis (TGA): A state-of-the-art review. *Bioresource Technology*, 246, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.087>
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>
- Bao, J., Zhang, X., Zheng, J., Ren, D., & Lu, J. (2018). Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization. *Food Chemistry*, 264(April), 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.027>
- Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrich, B., Mechichi, T., ... Abdelkafi, S. (2017). Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.071>
- Barreira, J. C. M., Pereira, J. A., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Sugars profiles of different chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and almond (*Prunus dulcis*) cultivars by HPLC-RI. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(1), 38–43. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0147-7>
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247–254.
- Barros, L., Pereira, E., Calhela, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>

- Bashir, S., Sharif, M. K., Butt, M. S., & Shadid, M. (2016). Functional properties and amino acid profile of spirulina platensis protein isolates. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 59(1), 12–19.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.004>
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Haratian, P., & Khosravi-Darani, K. (2012). Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *European Food Research and Technology*, 235(4), 719–728. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1798-4>
- Belay, A. (2002). The Potential Application of Spirulina (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health A Peer-Reviewed Journal on Nutraceuticals and Nutrition The Potential Application of Spirulina (*Arthrospira*) as a Nutritional and. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5(2).
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., & Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *Journal of Applied Phycology*, 5(2), 235–241. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00004024>
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58, 419–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
- Bishop, W. M., & Zubeck, H. M. (2012). Nutrition & Food Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *Nutrition & Food*, 2(5), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>
- Brasil. Resolução nº18, de 30 de abril de 1999 - Diário Oficial da União (1999).
- Brasil. VII Lista dos Novos Ingredientes Aprovados - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2009). Brasil. Retrieved from http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm
- Buchweitz, M. (2016). Natural Solutions for Blue Colors in Food. In R. Carle & R. M. Schweiggert (Eds.), *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages Industrial Applications for Improving*. Elsevier.

- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Carocho, M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food Chemistry*, *210*, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.114>
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(4), 377–399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, *71*, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374849-2.00004-5>
- Castro-Cabado, M., Casado, A. L., & San Román, J. (2016a). Bio-based thermosets: Effect of the structure of polycarboxylic acids on the thermal crosslinking of maltodextrins. *European Polymer Journal*, *78*, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.03.007>
- Castro-Cabado, M., Casado, A. L., & San Román, J. (2016b). Effect of CaO in the thermal crosslinking of maltodextrin and citric acid: A cooperative action of condensation and ionic interactions. *Journal of Applied Polymer Science*, *133*(46), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.44203>
- Chacón-Lee, T. L., & González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “Healthy” Foods- Possibilities and Challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(6), 655–675. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00132.x>
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, *47*(4), 659–664. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.010>
- Chen, J., Liu, K. S., Yang, T., Hwang, J., Chan, Y., & Lee, I. (2012). Spirulina and C-phycocyanin reduce cytotoxicity and inflammation-related genes expression of microglial cells, *15*(6).
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, *26*(3), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>

- Choopani, A., Poorsoltan, M., Fazilati, M., Latifi, A. M., & Salavati, H. (2016). Spirulina: A source of gamma-linoleic acid and its applications. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 3(4), 483–488.
- Chronakis, I. S., Galatanu, A. N., Nylander, T., & Lindman, B. (2000). 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*, 173(1–3), 181–192. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00548-3)
- CLSI. (2008). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute (Vol. 32).
- Consoli, L., Grimaldi, R., Sartori, T., Menegalli, F. C., & Hubinger, M. D. (2016). Gallic acid microparticles produced by spray chilling technique: Production and characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.052>
- Corrêa, R. C. G., de Souza, A. H. P., Calhelha, R. C., Barros, L., Glamoclija, J., Sokovic, M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. *Food Funct.*, 6(7), 2155–2164.
- Czerwonka, A., Ka, K., Adrianna, S., Lemieszek, M. K., Bartnik, M., Wojtanowski, K. K., ... Rzeski, W. (2018). Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line, 106(June), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.116>
- Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. O., Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 329–335. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00127-2)
- de Moraes, M. G., Moraes, D., Greque, E., Silva Vaz, B. da, Gonçalves, C. F., Lisboa, C., & Vieira Costa, J. A. (2016). Nanoencapsulation of the Bioactive Compounds of *Spirulina* with a Microalgal Biopolymer Coating. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), 81–91. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10899>
- Deng, R., & Chow, T.-J. (2010). Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*, 28(4), 1–23. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x.Hypolipidemic>

- Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M. de, & Fett, R. (2006). Microalgas , produtos e aplicações Microalgae , products and applications. *Ciência Rural*, 36, 1959–1967. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050>
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients*. *Drying Technology* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>
- Dias, M. I., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2015). Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food Function*, 6(4), 1035–1052. <https://doi.org/10.1039/C4FO01175A>
- Dolçà, C., Ferrándiz, M., Capablanca, L., Franco, E., Mira, E., López, F., & García, D. (2015). Microencapsulation of Rosemary Essential Oil by Co-Extrusion/Gelling Using Alginate as a Wall Material. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 5(3), 121–130. <https://doi.org/10.4236/jeas.2015.53010>
- Ďuračková, Z. (2014). *Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts*. (I. Laher, Ed.). Vancouver, Canada: Springer Berlin Heidelberg.
- El-sheekh, M. M., Daboor, S. M., Swelim, M. A., & Mohamed, S. (2014). Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(2), 112–119.
- European Commission. (2018). Novel Foods Catalogue. Retrieved January 9, 2018, from http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/nfnetweb/mod_search/index.cfm
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2013). Stockholm, Sweden.
- Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., ... Duvall, C. L. (2013). Red Blood Cell Hemolysis Assay for the Evaluation of pH-responsive Endosomolytic Agents for Cytosolic Delivery of Biomacromolecular Drugs. *Journal of Visualized Experiments*, (73), 7–11. <https://doi.org/10.3791/50166>
- FDA. (2002). GRAS notification “Spirulina” microalgae.
- Figueira, F. D. S., Crizel, T. de M., Silva, C. R., & Salas-Mellado, M. de las M. (2011). Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14(4), 308–316. <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140400037>
- Francisco, C. R. L., Heleno, S. A., Fernandes, I. P. M., Barreira, J. C. M., Calhelha, R.

- C., Barros, L., ... Barreiro, M. F. (2018). Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid. *Food Chemistry*, 245(September 2017), 845–853. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.098>
- Gad, A. S., Ph, D., Khadrawy, Y. A., Ph, D., D, A. A. E. P., Mohamed, S. R., ... D, M. A. A. P. (2011). Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. *Nutrition*, 27(5), 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.04.002>
- Gahruie, H. H., Eskandari, M. H., Mesbahi, G., & Hanifpour, M. A. (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. *Food Science and Human Wellness*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.03.002>
- Gantar, M., & Svirčev, Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: Food for thought. *Journal of Phycology*, 44(2), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00469.x>
- Gershwin, M. E., & Belay, A. (2008). *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Boca Raton: CRC Press.
- Golmakani, M., Moayyedi, M., Raissjalali, A., Pesaran, Y., & Aghajani, A. (2015). Investigation of Physicochemical, Nutritional, Textural, and Sensory Properties of Iranian Yazdi Cupcake Enriched with *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). *International Conference on Latest Trends in Food, Biological & Ecological Sciences*, 12, 30–34.
- Gómez-Coronado, D. J. ., Ibañez, E., Rupérez, F. J., & Barbas, C. (2004). Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin, 1054, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.072>
- Gómez-Mascaraque, L. G., Perez-Masiá, R., González-Barrio, R., Periago, M. J., & López-Rubio, A. (2017). Potential of microencapsulation through emulsion-electrospraying to improve the bioaccessibility of β -carotene. *Food Hydrocolloids*, 73, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.019>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- González, P., Medina, C., Famá, L., & Goyanes, S. (2016). Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch – glycerol with citric acid as crosslinking

- agent. *Carbohydrate Polymers*, 138, 66–74.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.041>
- Gouveia, L., Batista, A. P., Miranda, A., Empis, J., & Raymundo, A. (2007). Chlorella vulgaris biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(3), 433–436.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.026>
- Gouveia, L., Marques, A. E., Sousa, J. M., Moura, P., & Bandarra, N. M. (2010). Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(2), 21–37.
<https://doi.org/10.1616/1476-2137.15884>
- Guiry, M. ., & Guiry, G. . (2018). Algaebase. Retrieved February 18, 2018, from <http://www.algaebase.org>
- Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C., & Hasan, M. R. (2008). *A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture Circular.
- Hafsa, Y. A., Amel, D., Samia, S., Sidahmed, S., & Ali, B. (2014). Evaluation of Nutritional and Sensory Properties of bread enriched with Spirulina. *Annals. Food Science and Technology*, 15(2).
- Hamed, I., Özogul, F., Yesim, Ö., & Regenstein, J. M. (2015). Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits : A Review Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits : A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 0, 1–20. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12136>
- Hamid, K., Abdullah, A., & Al-haiqi, A. (2016). Determination of DPPH free radical scavenging activity : Application of artificial neural networks. *Food Chemistry*, 194, 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.038>
- Handayania, N. A., Ariyantib, D., & Hadiyanto. (2012). Potential Production of Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae, 1(2), 2–5.
<https://doi.org/10.4172/scientificrep>
- Henrikson, R. (2010). *Spirulina World Food. Aquaculture* (Vol. 29).
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00966.x>
- Henry, C. J. (2010). Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(7), 657–659. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.101>
- Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D., & Adam, V. (2018).

- Separation , identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.018>
- İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70(August 2017), 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>
- Islam Shishir, M. R., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>
- Jang, S. A., Park, D. W., Kwon, J. E., Song, H. S., Park, B., Jeon, H., ... Kang, S. C. (2017). Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96(October), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.021>
- Juszkiewicz, A., Basta, P., Petriczko, E., Machaliński, B., Trzeciak, J., Łuczowska, K., & Skarpańska-Stejnborn, A. (2018). An attempt to induce an immunomodulatory effect in rowers with spirulina extract. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0213-3>
- Kaushik, P., & Chauhan, A. (2008). In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 348–352. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0043-0>
- Keven Silva, E., & Angela A. Meireles, M. (2014). Encapsulation of Food Compounds Using Supercritical Technologies: Applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent. *Food and Public Health*, 4(5), 247–258. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20140405.06>
- Khafaga, A. F., & El-sayed, Y. S. (2018). Spirulina ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant , immune stimulation , and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. *Life Sciences*, 196(December 2017), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.010>
- Koru, E. (2012). Earth Food Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Standarts. *Food Additive*. <https://doi.org/10.5772/31848>

- Kruger, C. L., & Mann, S. W. (2003). Safety evaluation of functional ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 793–805. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00018-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00018-8)
- Kuete, V., Ango, P. Y., Fotso, G. W., Kapche, G. D. W. F., Dzoyem, J. P., Wouking, A. G., ... Abegaz, B. M. (2011). Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 25, 11–42.
- Kumar, D., Dhar, D. W., Pabbi, S., Kumar, N., & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(2), 184–188. <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7>
- Kwak, N. S., & Jukes, D. J. (2001). Functional foods. Part 1: The development of a regulatory concept. *Food Control*, 12(2), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00028-1)
- León, I. A. Á. (2010). *Estudo do cultivo de Spirulina platensis por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica*. Universidade de São Paulo.
- Li, F., Srivatsa, S. C., Batchelor, W., & Bhattacharya, S. (2017). A study on growth and pyrolysis characteristics of microalgae using Thermogravimetric Analysis-Infrared Spectroscopy and synchrotron Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Bioresource Technology*, 229, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.005>
- Liang, S., Liu, X., Chen, F., & Chen, Z. (2004). Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiologia*, (March 2017), 45–48. <https://doi.org/10.1023/B>
- Lourenço, E., Amanda, R., Teodoro, R., Henrique, P., & Félix, C. (2018). Stability of spray-dried beetroot extract using oligosaccharides and whey proteins. *Food Chemistry*, 249(October 2017), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.076>
- Ma, J. J., Mao, X. Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S. W., & Li, Y. H. (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.019>
- Machado, A. R., Assis, L. M., Costa, J. A. V., Badiale-Furlong, E., Motta, A. S., Micheletto, Y. M. S., & Souza-Soares, L. A. (2015). Application of sonication and

- mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. *International Food Research Journal*, 22(1), 96–101.
- Marangoni, A., Foschi, C., Micucci, M., Nahui Palomino, R. A., Toschi, T. G., Vitali, B., ... Budriesi, R. (2017). In vitro activity of *Spirulina platensis* water extract against different *Candida* species isolated from vulvo-vaginal candidiasis cases. *PLoS ONE*, 12(11), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188567>
- Massoud, R., Khosravi-Darani, K., Nakhsaz, F., & Varga, L. (2016). Evaluation of physicochemical, microbiological and sensory properties of croissants fortified with *arthrospira platensis* (*Spirulina*). *Czech Journal of Food Sciences*, 34(4), 350–355. <https://doi.org/10.17221/289/2015-CJFS>
- Matos, Â. P., Feller, R., Moecke, E. H. S., Oliveira, J. V., Junior, A. F., Derner, R. B., & Sant'anna, E. S. (2016). Chemical Characterization of Six Microalgae with Potential Utility for Food Application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(7), 963–972. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2849-y>
- Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & Afonso, C. (2017). Function Microalgae as healthy ingredients for functional food : a review. *Food & Function*, 8, 2672–2685. <https://doi.org/10.1039/c7fo00409e>
- Mazokopakis, E. E., Papadomanolaki, M. G., Fousteris, A. A., Kotsiris, D. A., Lampadakis, I. M., & Ganotakis, E. S. (2014). The hepatoprotective and hypolipidemic effects of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) supplementation in a Cretan population with non-alcoholic fatty liver disease: A prospective pilot study. *Annals of Gastroenterology*, 27(4), 387–394. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6261>
- Menzel, C., Olsson, E., Plivelic, T. S., Andersson, R., Johansson, C., Kuktaite, R., ... Koch, K. (2013). Molecular structure of citric acid cross-linked starch films. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.044>
- Migliavacca, M., Decosta, D. T., Cardoso, L. G., Oro, T., Bertolin, T. E., Costa, J. A. V., & Bertolin, T. E. (2014). Microencapsulação do extrato aquoso de *Spirulina platensis*. Passo Fundo - Rio Grande do Sul: XXIV Mostra de Iniciação Científica.
- Ministério da Agricultura e do Comércio e Turismo. Portaria nº 742/92 (1992). Diário da República de Portugal.
- Moraes, F. P., & Colla, L. M. (2006). Alimentos Funcionais E Nutracêuticos: Definições, Legislação E Benefícios À Saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3(2), 14.

- <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5216/ref.v3i2.2082>
- Mühling, M., Belay, A., & Whitton, B. A. (2005). Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. *Journal of Applied Phycology*, 17(2), 137–146. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-7213-9>
- Noello, C., Carvalho, A. G. S., Silva, V. M., & Hubinger, M. D. (2016). Spray dried microparticles of chia oil using emulsion stabilized by whey protein concentrate and pectin by electrostatic deposition. *FRIN*, 89, 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.003>
- Ohse, S., Derner, R. B., Ozório, R. Á., Braga, M. V. D. C., Cunha, P., Lamarca, C. P., & Santos, M. E. Dos. (2009). Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. *Ciência Rural*, 39(6), 1760–1767. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000600019>
- Özyurt, G., Uslu, L., Yuvka, I., Gökdoğan, S., Atci, G., Ak, B., & Işık, O. (2015). Evaluation of the Cooking Quality Characteristics of Pasta Enriched with *Spirulina Platensis*. *Journal of Food Quality*, 38(4), 268–272. <https://doi.org/10.1111/jfq.12142>
- Pablo, J., Saboya, D. S., Ariévilho, J., Rodrigues, G., Ronald, W., & Farias, L. (2017). Extração de ficocianinas de *Spirulina platensis*: opções metodológicas, 5, 62–69. <https://doi.org/10.2312/ActaFish.2017.5.2.62-69>
- Paliwal, C., Bhayani, K., Maurya, R., & Mishra, S. (2015). Antioxidant, anti-nephrolithe activities and in vitro digestibility studies of three different cyanobacterial pigment extracts, 5384–5401. <https://doi.org/10.3390/md13085384>
- Pan-utai, W., Kahapana, W., & Iamtham, S. (2018). Extraction of C-phycoyanin from *Arthrospira* (*Spirulina*) and its thermal stability with citric acid. *Journal of Applied Phycology*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1155-x>
- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia (2015). Regulamento (UE) 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de novembro de 2015. Jornal Oficial da União Europeia.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., & Ghosh, P. K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, 40(2), 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.028>
- Peanparkdee, M., Iwamoto, S., & Yamauchi, R. (2016). Microencapsulation: a Review

- of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries. *Reviews in Agricultural Science*, 4(0), 56–65. <https://doi.org/10.7831/ras.4.56>
- Pereira, E., Barros, L., Barreira, J. C. M., Carvalho, A. M., Antonio, A. L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Electron beam and gamma irradiation as feasible conservation technologies for wild *Arenaria montana* L.: Effects on chemical and antioxidant parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.012>
- Petropoulos, S., Fernandes, Â., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of Mediterranean okra genotypes in relation to harvest stage. *Food Chemistry*, 242(September 2017), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.082>
- Pulz, M. O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65, 635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Rangel-Yagui, C. D. O., Danesi, E. D. G., De Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2004). Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.09.002>
- Raya, I., Anshar, A. M., Mayasari, E., Dwiyan, Z., & Asdar, M. (2016). *Chorella vulgaris* and *Spirulina platensis* : Concentration of protein, Docosahexaenoic Acid *Chorella* (DHA), Eicosapentaenoic Acid (EPA) and variation concentration of maltodextrin via microencapsulation method. *International Journal of Applied Chemistry*, 12(4), 539–548.
- Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 33(6), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>
- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J. C., Dias, M. M., Barros, L., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, 188, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.061>
- Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34(SUPPL. 2). [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(02\)80176-1](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80176-1)

- Roca, M., Chen, K., & Pérez-Gálvez, A. (2016). Chlorophylls. In R. Carle & R. M. Schweiggert (Eds.), *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages Industrial Applications for Improving*. Elsevier.
- Rutz, J. K., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., Crizel-Cardozo, M. M., Kuck, L. S., & Noreña, C. P. Z. (2017). Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. *Food Chemistry*, 220, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.194>
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P. Y. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 523–529. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9886-1>
- Santiago-morales, I. S., Trujillo-valle, L., & Márquez-rocha, F. J. (2018). Tocopherols , Phycocyanin and Superoxide Dismutase from Microalgae : as Potential Food Antioxidants. *Applied Food Biotechnology*, 5(1), 19–27.
- Saran, S., Puri, N., Jasuja, N. D., & Sharma, G. (2016). Optimization , Purification and characterization of Phycocyanin from *Spirulina platensis*, (June), 15–21.
- Sarmiento, A., Barros, L., Fernandes, Â., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Valorization of traditional foods : nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L . and *Lathyrus sativus* L . pulses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 179–185. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6702>
- Selmi, C., Leung, P. S. C., Fischer, L., German, B., Yang, C. Y., Kenny, T. P., ... Gershwin, M. E. (2011). The effects of *Spirulina* on anemia and immune function in senior citizens. *Cellular and Molecular Immunology*, 8(3), 248–254. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.76>
- Selmo, M. S., & Salas-Mellado, M. M. (2014). Technological quality of bread from rice flour with *Spirulina*. *International Food Research Journal*, 21(4), 1523–1528.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sharoba, A. . (2014). Nutritional Value o f *Spirulina* and its Use in the Preparation of Some Complementary Baby Food Formulas. *J. Food and Dairy Science*, 5(8), 517–538.
- Silva, P. T. da, Fries, L. L. M., Menezes, C. R. de, Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., ... Silva, C. de B. da. (2014). Microencapsulation: concepts,

- mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7), 1304–1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>
- Singh, A. K. (2016). Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles. In *Engineered Nanoparticles: Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity*. Mica Haley.
- Small, E. (2011). Spirulina - food for the universe. *Biodiversity*, 12(4), 255–265. <https://doi.org/10.1080/14888386.2011.642735>
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., & Madamwar, D. (2006). Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, 41(9), 2017–2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 69, 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134(1), 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.086>
- Tan, C. H., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., & Lan, J. C. W. (2015). Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: A recent review. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.013>
- Tańska, M., Konopka, I., & Ruszkowska, M. (2017). Sensory, Physico-Chemical and Water Sorption Properties of Corn Extrudates Enriched with Spirulina. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0628-z>
- Taofiq, O., Martins, A., Filomena, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites, 50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.005>
- Teijeiro, M., Pérez, P. F., Antoni, G. L. De, & Golowczyc, M. A. (2018). Suitability of kefir powder production using spray drying. *Food Research International*, 112(June), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.023>
- Wan, D., Wu, Q., & Kuča, K. (2016). Spirulina. In *Nutraceuticals* (pp. 569–583). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00042-5>

- Wayne, K., Ying, J., Loke, P., Hui, N., Ching, J., Chuan, T., ... Chang, J. (2017). Bioresource Technology Microalgae biorefinery : High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- Wen, J., Chen, G., & Alany, R. G. (2014). Theories and Concepts of Nano Materials, Nano- and microencapsulation. In H.-S. Kwak (Ed.), *Nano-and micoencapsulation for foods*. Coreia: Wiley Blackwell.
- WHO/FAO/UNU. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organization Technical Report Series*, (935), 1–265. <https://doi.org/ISBN 92 4 120935 6>
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Archives of Toxicology*, 90(8), 1817–1840. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- Yamashita, C., Chung, M. M. S., dos Santos, C., Mayer, C. R. M., Moraes, I. C. F., & Branco, I. G. (2017). Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.) by-product extract by freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.063>
- Zhao, L., Temelli, F., & Chen, L. (2017). Encapsulation of anthocyanin in liposomes using supercritical carbon dioxide: Effects of anthocyanin and sterol concentrations. *Journal of Functional Foods*, 34, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.021>
- Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., Mccarty, M. F., Fujii, M., ... Phycocyanin, T. R. (2012). Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 304, 110–120. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00648.2011>
- Zielinski, A. A. F., Haminiuk, C. W. I., Alberti, A., Nogueira, A., Demiate, I. M., & Granato, D. (2014). A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International*, 60, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.010>

Capítulo 6
Anexos

6. ANEXOS

Anexo A: Microscopia eletrônica de varrimento com ampliação 5000x.

Tabela 28: Microscopia eletrônica de varrimento com ampliação 5000x das amostras de microesferas

Amostra	5000x
SM	
SMA	
MA	