



Microalgas como fonte de emulsionantes para aplicação alimentar

Thayná Domingues de Almeida

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito do programa de Dupla Diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientado por

Prof^a Doutora Filomena Barreiro

Doutora Ângela Sofia Feitor Fernandes

Prof^a Doutora Eliane Colla

Bragança

2020

*À minha querida avó Laura Almeida Ramos (in memoriam),
que estará para sempre em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Pedro e Fátima, por todo o investimento na minha educação e por não medirem esforços para a realização desse sonho. Agradeço sobretudo à minha irmã, Tatiana, que considero minha segunda mãe e minha maior inspiração. A vocês devo tudo.

À Professora Dra. Filomena Barreiro, Dra. Ângela Fernandes e Dra. Eliane Colla agradeço pela oportunidade, incentivo e por todo conhecimento e auxílio transmitido. À Samara Cristina, por sempre se fazer presente, acompanhar e auxiliar durante todo o desenvolvimento deste trabalho, sou eternamente grata.

Um agradecimento especial às minhas amigas de infância, Shirley Araújo, Samantha Araújo e Paula Louzada, que mesmo de longe, sempre se fizeram presentes. Às minhas amigas que me acompanham desde o início da graduação, Mellide Zanchettin e Luciana Tessaro, agradeço por todo apoio prestado nos momentos mais importantes da minha vida. Aos amigos que fizeram parte da minha jornada em Portugal, especialmente Elizandra Ardohain e Johicy Parra, por toda motivação, companheirismo e apoio. Vocês se tornaram parte da minha família.

Agradeço também à empresa A4F (Algae for future) situada em Lisboa, Portugal, que gentilmente cedeu as biomassas das microalgas utilizadas neste estudo.

Por fim, agradeço a toda comunidade do Instituto Politécnico de Bragança (Portugal) e da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Brasil) por todo suporte no âmbito do programa de Dupla Diplomação, e a todos os professores de ambas as instituições, que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional. Sou muito grata em estudar em instituições com alta qualidade de ensino.

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e FEDER no âmbito do programa PT2020 - apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
<i>Motivação e objetivos</i>	xii
<i>Estrutura da dissertação</i>	xiii
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1. MICROALGAS.....	2
1.1.1. <i>Arthrospira platensis</i> (Spirulina)	2
1.1.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	3
1.1.3. <i>Nannochloropsis oceanica</i>	4
1.2. MICROALGAS COMO FONTE DE INGREDIENTES NATURAIS	5
1.2.1. Proteínas.....	7
1.2.1.1. Funcionalidade tecnológica das proteínas	9
1.2.1.2. Técnicas para extração de proteínas	10
1.2.1.2.1. Ultrassons como tecnologia para extração de proteínas.....	13
1.3. APLICAÇÕES DE MICROALGAS.....	14
1.4. EMULSÕES	16
1.4.1. Emulsionantes naturais	17
1.4.2. Microalgas como fonte de emulsionantes naturais	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1. PADRÕES E REAGENTES	21
2.2. AMOSTRAS DE MICROALGAS.....	21
2.3. EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA.....	21

2.3.1.	Rendimento global e proteico	24
2.3.2.	Microscopia óptica.....	24
2.4.	CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS, BIOMASSAS DESENGORDURADA E DOS EXTRATOS PROTEICOS	24
2.4.1.	Valor nutricional e energético.....	25
2.4.2.	Solubilidade	25
2.4.2.1.	Análise espectrofotométrica dos extratos	26
2.4.3.	Análise de cor	26
2.4.4.	Identificação de grupos funcionais por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.5.6.	Capacidade de absorção de água ($CA_{\text{água}}$) e óleo ($CA_{\text{óleo}}$).....	27
2.5.8.	Capacidade de formação e estabilidade de espuma (CF_{espuma} e E_{espuma})..	27
2.5.9.	Quantificação da ficocianina.....	28
2.5.	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES... 29	
2.5.1.	Planeamento Fatorial Fracionado (PFF 2^{4-1})	29
2.5.2.	Potencial zeta	29
2.5.3.	Tamanho de partícula.....	30
2.5.4.	Avaliação da estabilidade das emulsões por inspeção visual	30
2.5.5.	Análise de cor.....	30
2.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA	33
3.1.1.	Rendimento global e proteico	33
3.1.2.	Microscopia óptica.....	34
3.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS, BIOMASSAS DESENGORDURADAS E DOS EXTRATOS PROTEICOS.....	37
3.2.1.	Valor nutricional e energético.....	37
3.2.2.	Solubilidade	40

3.2.2.1. Análise espectrofotométrica dos extratos	41
3.2.3. Análise de cor	42
3.2.4. Identificação de grupos funcionais por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	43
3.3.6. Capacidade de absorção de água (CA _{água}) e de óleo (CA _{óleo})	46
3.3.8. Capacidade de formação e estabilidade de espuma (CF _{espuma} e E _{espuma})..	47
3.3.9. Quantificação da ficocianina	49
3.3. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES COM EXTRATO PROTEICO DA <i>Arthrospira platensis</i>	49
3.3.1. Planeamento Fatorial Fracionado (2 ⁴⁻¹)	49
3.3.1.1. Potencial zeta	52
3.3.1.2. Tamanho de partícula	53
3.3.2. Estabilidade visual e análise microscópica das emulsões	55
3.3.3. Análise de cor.....	58
4. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO	60
5. REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microalga <i>Arthrospira platensis</i>	3
Figura 2: Microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	4
Figura 3: Microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i>	5
Figura 4: Imagem microscópica da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	11
Figura 5: (a) Configuração de ultrassom tipo sonda (b) Configuração de ultrassom tipo banho	13
Figura 6: Formação de emulsão tipo óleo em água.....	16
Figura 7: Fluxograma do processo de extração e obtenção dos extratos proteicos das biomassas de <i>A. platensis</i> , <i>C. vulgaris</i> e <i>N. oceanica</i>	23
Figura 8: Extratos proteicos de <i>C. vulgaris</i> , <i>A. platensis</i> e <i>N. oceanica</i> , respectivamente.	34
Figura 9: Imagens de microscopia óptica durante o processo de obtenção do extrato proteico de <i>A. platensis</i>	35
Figura 10: Imagens de microscopia óptica durante o processo de obtenção do extrato proteico de <i>C. vulgaris</i> e <i>N. oceanica</i> por tratamento ultrassónico em equipamento tipo sonda.....	36
Figura 11: Comportamento da solubilidade dos extratos proteicos expostos a diferentes pHs.....	40
Figura 12: Espectro UV-VIS e observação visual dos extratos proteicos após centrifugação em diferentes pHs.	42
Figura 13: Espectros de infravermelho obtidos para as biomassas e extratos proteicos de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i>	45
Figura 14: Capacidade de absorção de água dos extratos proteicos	46
Figura 15: Capacidade de absorção de óleo dos extratos proteicos	47
Figura 16: Capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma, respectivamente, dos extratos proteicos	48
Figura 17: Tamanho de partícula em número e volume, respetivamente, das emulsões analisadas no dia 0.....	54
Figura 18: Tamanho de partícula em número e volume, respetivamente, das emulsões analisadas no dia 7.....	54

Figura 19: Tamanho de partícula em número e volume, respectivamente, das emulsões analisadas no dia 14.....	55
Figura 20: Imagens microscópicas das emulsões nos dias 0, 7 e 14.....	56
Figura 21: Observação do creaming index das emulsões.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da biomassa de espécies de microalgas, expressa em porcentagem de matéria seca (%).....	6
Tabela 2: Perfil de aminoácidos de fontes proteicas convencionais e microalgas, expressa em g/100g de matéria seca.....	8
Tabela 3: Estudos de técnicas de extração de proteínas de microalgas.....	12
Tabela 4: Aplicação de microalgas em produtos alimentícios.....	15
Tabela 5: Metodologias para produção de emulsões estabilizadas por proteínas de diferentes espécies de microalgas.....	18
Tabela 6: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no PFF 2 ⁴⁻¹	29
Tabela 7: Rendimento global e proteico da obtenção do extrato proteico de microalgas.....	33
Tabela 8: Valor nutricional e energético das biomassas, biomassas desengorduradas e extratos proteicos das microalgas.....	39
Tabela 9: Análise de cor das biomassas, biomassas desengorduradas e extratos proteicos de microalgas.....	43
Tabela 10: Matriz do PFF 2 ⁴⁻¹ com valores reais e codificados das variáveis dependentes e independentes para o desenvolvimento de emulsões com extrato proteico de <i>A. platensis</i>	50
Tabela 11: Efeito dos fatores estudados no PFF 2 ⁴⁻¹ sobre os resultados de potencial zeta e tamanho de partícula em número e volume.....	51
Tabela 12: Análise de cor das emulsões.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	<i>Arthrospira platensis</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> – Reflexão Total Atenuada
BD	Biomassa desengordurada
CA_{água}	Capacidade de absorção de água
CA_{óleo}	Capacidade de absorção de óleo
CF	Concentração de ficocianina
CF_{espuma}	Capacidade de formação de espuma
CI	<i>Creaming index</i>
cm	Centímetro
CV	<i>Chlorella vulgaris</i>
E_{espuma}	Estabilidade da espuma
EP (BU)	Extrato proteico obtido por tratamento ultrassónico em banho de ultrassons
EP (US)	Extrato proteico obtido por tratamento ultrassónico em equipamento tipo sonda
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
g	Gramas
Kcal	Quilocaloria
KHz	Quilohertz
L	Litro
m	Massa
M	Molaridade
min	Minuto
mL	Mililitro
Mpa	Megapascal
nm	Nanómetro
O/A	Óleo/água
PE	Pureza da ficocianina
PFF	Planejamento Fatorial Fracionado
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
UV VIS	Ultravioleta visível

RESUMO

A indústria de alimentos depende do uso de emulsões e agentes emulsionantes, para a produção de cremes, molhos para salada, maionese e sopas. As emulsões óleo em água são formadas a partir da homogeneização destas duas fases na presença de um ou mais emulsionantes, tais como proteínas, que possuem caráter anfifílico. Grande parte dos emulsionantes utilizados pela indústria alimentar são de origem sintética, fato que tem gerado uma busca pela utilização de ingredientes naturais e sustentáveis, além de incentivar o estudo das propriedades reológicas das microalgas. As microalgas são fonte de biomoléculas, como proteínas, que tem apresentado excelentes capacidades emulsionantes. Entre estas microalgas, podemos destacar a *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oceanica*, que podem conter de 18 a 77% de proteína. A extração desse composto a partir das microalgas tem sido feito por meio de diversas técnicas de ruptura celular, como por exemplo a tecnologia de ultrassons. As ondas ultrassônicas facilitam a ruptura e diminuição das partículas das células microalgais, além de melhorar a eficiência dos processos para a extração de proteínas. Entre os sistemas atualmente disponíveis, os ultrassons tipo sonda e banho são os mais utilizados. Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu na extração de proteínas a partir da biomassa desidratada das microalgas *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, por meio de tratamento ultrassônico usando equipamento tipo sonda e banho, concomitante com a agitação em meio alcalino, caracterização do extrato proteico (rendimento global e proteico, valor nutricional e energético, FTIR), avaliação das suas propriedades funcionais (solubilidade, $CA_{\text{água}}$, $CA_{\text{óleo}}$, CF_{espuma} , E_{espuma}) e sua utilização como emulsionante. A *A. platensis* apresentou os melhores resultados em termos de rendimento global e proteico para ambos os métodos de extração. Contudo, o extrato obtido em banho de ultrassons apresentou maior concentração de ficocianina (116,14 $\mu\text{g/mL}$), que é um pigmento fotossintético presente num conteúdo de 15 a 20% na composição proteica desta microalga, além de ter apresentado um menor teor de lípidos (0,44 g/100g ms). Devido aos melhores resultados, o extrato proteico obtido em banho de ultrassons foi utilizado para preparar emulsões, procedimento para o qual foi aplicado um PFF (2^{4-1}) para a avaliação do efeito de 4 variáveis do processo (razão óleo/água, concentração de extrato proteico, pH e tempo de armazenamento) na estabilidade das

emulsões formadas (potencial zeta, tamanho de partícula, *creaming index*, microscopia óptica). Todas as emulsões se mostraram estáveis por até 14 dias.

ABSTRACT

The food industry depends on the use of emulsions and emulsifying agents for the production of creams, salad dressings, mayonnaise, and soups. Oil-in-water emulsions are formed by the homogenization of these two phases in the presence of one or more emulsifiers, e.g. proteins, compounds that have an amphiphilic character. Most of the emulsifiers used by the food industry are synthetic, motivating the searches for more natural and sustainable ingredients, apart from incentivising the study of the rheological properties of microalgae. Microalgae are a source of biomolecules, such as proteins, which have shown excellent emulsifying capabilities. Among microalgae, we can highlight *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Nannochloropsis oceanica*, which may contain 18 to 77% protein. The extraction of this compound from the microalgae has been done through several techniques of cell disruption, such as ultrasound technology. Ultrasonic waves facilitate the breakdown and reduction of microalgal cell particles helping to improve the efficiency of the processes for protein extraction. Ultrasound probe and bath are the most widely used techniques among the ones currently available. Therefore the objective of this work is the extraction of proteins from the dehydrated biomass of the microalgae *A. platensis*, *C. vulgaris* and *N. oceanica*, using ultrasonic treatment with a probe and trough a bath equipment, combined with stirring in alkaline medium, characterization of the protein extract (total and protein yield, nutritional and energetic value, FTIR), evaluation of their functional properties (solubility, water and oil absorption capacity, foaming capacity, foam stability) and test of their use as an emulsifier. *A. platensis* showed the best results in terms of total and protein yield for both extraction methods. However, the extract obtained by ultrasound bath showed the higher concentration of phycocyanin (116,14 µg/mL), which is a photosynthetic pigment present at a content of 15 to 20% in this microalgae protein composition, also having the lower lipid content (0,44 g/100g ms). Due to the observed best results, the protein extract obtained by ultrasound bath was used to prepare emulsions, for which a procedure PFF (24-1) was applied to evaluate the effect of 4 process variables (oil/water ratio, concentration of protein extract, pH, and storage time) on the stability of the formed emulsions (zeta potential, particle size, creaming index, optical microscopy). All the prepared emulsions remain stable for up to 14 days.

Motivação e objetivos

Atualmente, grande parte dos emulsionantes utilizados pela indústria alimentar são de origem sintética, fato que tem gerado uma demanda pela utilização de ingredientes naturais e sustentáveis. Esse interesse tem incentivado o estudo das propriedades emulsionantes de componentes das microalgas.

As microalgas são fonte de biomoléculas, como proteínas, que têm-se mostrado excelentes agentes emulsionantes devido ao seu caráter anfifílico. Entre estas microalgas, podemos destacar a *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oceanica*, que podem conter de 18 a 77% de conteúdo proteico. Além do elevado conteúdo proteico, são fonte de nutrientes que incluem antioxidantes, vitaminas e minerais. Apesar do seu elevado valor nutritivo, as microalgas secas ainda não são muito utilizadas como alimento, devido a características como a coloração e odor característico de peixe, que limitam a sua incorporação em alimentos convencionais.

A extração de proteínas a partir das microalgas tem sido feita por meio de diversas técnicas de rompimento celular, como por exemplo as tecnologias de ultrassons, que facilitam a ruptura e diminuição das partículas das células microalgais, além de melhorar a eficiência dos processos para extração de proteínas.

Desta forma, a extração de proteínas microalgais permite que sejam utilizadas como agente emulsionante em produtos alimentares, atribuindo maior atratividade ao produto por se tratar de uma proteína vegetal com ótima disponibilidade de nutrientes.

Objetivo geral:

O objetivo geral do presente trabalho consistiu na extração de proteínas a partir da biomassa desidratada das microalgas *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, por meio de tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda e banho de ultrassons, concomitante com a agitação em meio alcalino, para caracterização do extrato proteico, avaliação das suas propriedades funcionais e teste na preparação de emulsões.

Objetivos específicos:

- Extrair a fração proteica das microalgas *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, por meio de tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda e banho de ultrassons, concomitante com agitação em meio alcalino, e avaliar o rendimento global e proteico;
- Caracterizar as biomassas desidratadas, as biomassas desengorduradas e os extratos proteicos em relação ao valor nutricional, valor energético, cor e por FTIR. Adicionalmente, avaliar as propriedades funcionais dos extratos proteicos, nomeadamente a solubilidade, capacidade de absorção de água e óleo, capacidade de formação e estabilidade de espuma e quantificação da ficocianina (no extrato proteico de *A. platensis*);
- Aplicar um PFF (2^{4-1}) para a avaliação do efeito de 4 variáveis sobre o processo de preparo de emulsões a partir do extrato proteico que revelou melhores resultados, e avaliar a estabilidade das emulsões formadas através da avaliação do potencial zeta, tamanho de partícula, *creaming index* e microscopia óptica.

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 extração de proteínas, sua caracterização, a preparação das emulsões e a avaliação da sua estabilidade.

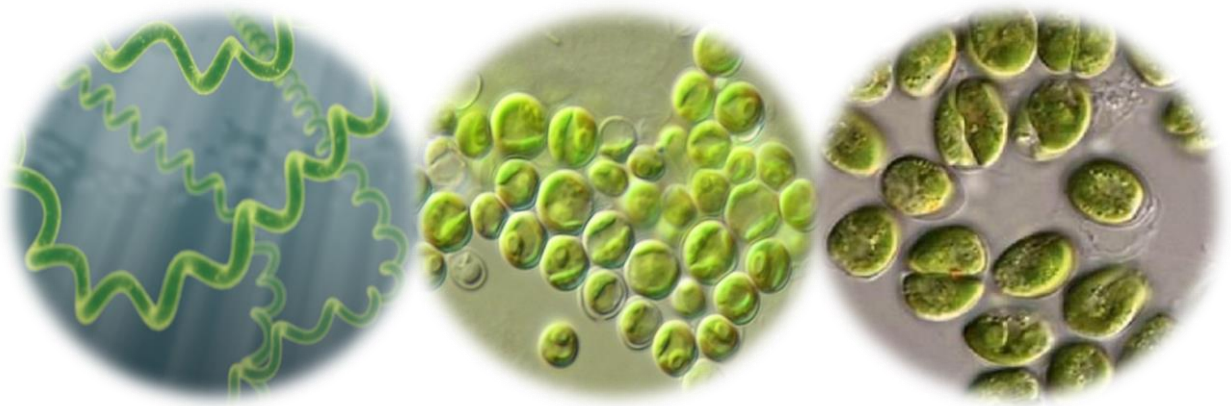
O capítulo 3 centra-se na apresentação e discussão dos resultados obtidos.

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

Finalmente, o capítulo 5 reúne as referências bibliográficas utilizadas neste estudo.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica



1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. MICROALGAS

As microalgas são um grupo de microrganismos que apresentam uma elevada taxa de crescimento de sua biomassa e uma alta eficiência fotossintética. Constituem uma fonte de nutrientes que incluem antioxidantes, vitaminas, minerais e proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais (Kim et al., 2015).

O cultivo de microalgas teve início há poucas décadas, porém, estas já são utilizadas na alimentação humana há vários séculos. Atualmente, estas microalgas têm dominado o mercado como fonte de alimento humano, devido aos seu elevado conteúdo proteico e valor nutritivo. Diversas espécies de microalgas são comercializadas na forma de comprimidos, cápsulas e líquidos, entre estas, as mais conhecidas e utilizadas são as do género *Arthrospira* e *Chlorella* (Sathasivam et al., 2019).

Além de sua importância nutricional, a grande quantidade de biopolímeros estruturais presente nas microalgas, tais como proteínas e carboidratos, são de grande interesse para aplicação em produtos alimentares, devido às suas funcionalidades tecnológicas, nomeadamente potencial estabilizante, corante e emulsionante (Bernaerts et al., 2019).

A extração de compostos de interesse a partir das microalgas impulsiona a sua utilização como uma fonte importante para produção de biocompostos em larga escala. Por este motivo, muitas técnicas de rompimento celular têm sido utilizadas, como por exemplo as tecnologias de ultrassons, agitação mecânica, extração com líquidos-iônicos, homogeneização de alta pressão, aplicação de campo elétrico pulsado e combinação de várias técnicas, para o aumento da eficiência do processo de extração (Gerde et al., 2012; Grimi et al., 2014; Rashid et al., 2013; Wang & Zhang, 2012).

1.1.1. *Arthrospira platensis* (Spirulina)

Arthrospira platensis Gomont 1892, também conhecida como Spirulina, pertence à classe *Cyanophyceae* e à família *Microcoleaceae* (Guiry, 2010). É considerada uma cianobactéria com coloração verde-azulada, filamentosa, multicelular e de natureza espiral (Figura 1) (Chronakis et al., 2000; Rangel-Yagui et al., 2004). A incidência de luz

solar, altas temperaturas, presença de águas salinas e condições alcalinas, são fatores que favorecem o crescimento da Spirulina (Wan et al., 2016).

A sua forma em espiral é característica do género, porém, as suas dimensões variam mesmo dentro da mesma espécie. Seus filamentos são compostos de células cilíndricas dispostas em tricomas helicoidais não ramificados. O tricoma pode variar de 6 a 12 μm e o diâmetro da hélice de 30 a 70 μm . A reprodução da *A. platensis* ocorre por fissão binária transversal, pela formação do tricoma que se destaca e origina um novo filamento (Vonshak, 1997).

A organização celular da *A. platensis* é típica de organismos procarióticos (ou seja, seu núcleo não é morfologicamente limitado), e apresentam uma camada externa do tipo gram negativa, denominada por parede celular. A parede celular possui cerca de 40 a 60 nm de espessura e é formada por camadas, sendo uma delas composta por peptidoglicanos. Os tricomas são ainda envolvidos por uma camada fina de cerca de 0,5 μm de espessura, que possui uma estrutura fibrilar em forma de rede (Vonshak, 1997).

A. platensis foi a primeira cianobactéria a ser cultivada comercialmente com biotecnologia moderna. A primeira unidade de produção comercial da Spirulina foi estabelecida no final dos anos 1970, sendo a produção mundial anual de biomassa, em 2000, estimada em cerca de 2000 toneladas. A biomassa de Spirulina é comercializada mundialmente, com maior produção localizada na região da Ásia (Oceano Pacífico) (Hu, 2004).

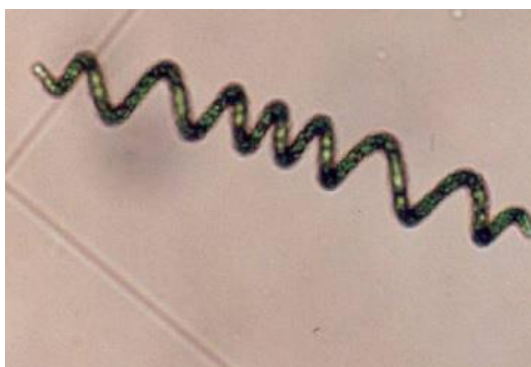


Figura 1: Microalga *Arthrospira platensis*
Fonte: Şeker et al., (2008)

1.1.2. *Chlorella vulgaris*

A *Chlorella* pertence à classe *Trebouxiophyceae* e à família *Chlorellaceae*, e neste género, a espécie de maior importância é a *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 (Figura 2) (Guiry, 2010). É uma microalga verde que cresce em água doce, eucariótica e esférica,

com diâmetro médio de 2 a 10 μm , possuindo elementos estruturais semelhantes às plantas (Yamamoto et al., 2004).

A *C. vulgaris* reproduz-se assexuadamente, de modo que, em condições ideais, são formadas quatro células filhas dentro da parede celular da célula mãe. Com a maturação das células recém formadas, a parede celular da célula mãe se rompe e libera as células filhas, que consomem os resíduos restantes da célula mãe como alimento (Yamamoto et al., 2004; Yamamoto et al., 2005) .

A parede celular desta microalga varia de acordo com cada fase de crescimento. A espessura da parede celular da célula filha aumenta gradualmente, podendo atingir 17 a 21 nm após a maturação, onde é formada uma camada microfibrilar resistente composta por glucosamina. A célula adulta não possui espessura e composição constantes porque estas variam de acordo com o crescimento e as condições ambientais do cultivo (Yamamoto et al., 2004; Yamamoto et al., 2005) .

A *Chlorella* têm sido amplamente utilizada como alimento nutricional para consumo humano, sendo geralmente encontrada na forma de pó seco, comprimidos e cápsulas. O Japão e Taiwan são os principais produtores de *Chlorella*, com uma produção anual de cerca de 3.500 toneladas (Richmond & Hu, 2013).

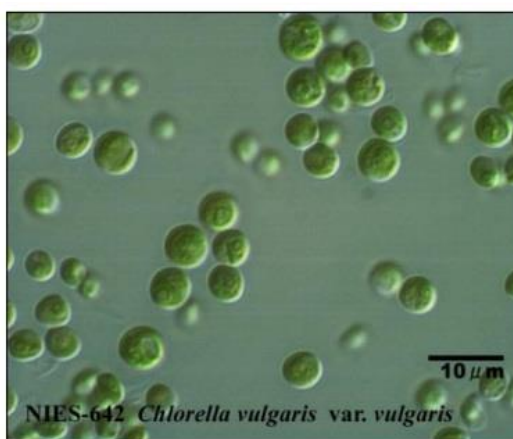


Figura 2: Microalga *Chlorella vulgaris*
Fonte: Mori et al., (2002)

1.1.3. *Nannochloropsis oceanica*

A *Nannochloropsis* pertence à classe *Eustigmatophyceae* e à família *Eustigmataceae*, e neste género, uma das espécies conhecidas é a *Nannochloropsis oceanica* Suda & Miyashita 2002 (Figura 3) (Guiry, 2010). Este género de microalgas são unicelulares e não móveis, com diâmetros variando de 2 a 8 μm (Ma et al., 2016).

As espécies de *Nannochloropsis* são geralmente encontradas em águas doces, salobras e oceânicas e reproduzem-se assexuadamente, onde a célula mãe se divide em duas células filhas. Possuem plastídeos que se assemelham a células vegetais, além de uma gota lipídica que funciona como depósito de energia, e que pode aumentar de tamanho sob condições de estresse (Ma et al., 2016; Scholz et al., 2014).

A grande dificuldade em relação à caracterização morfológica das espécies de *Nannochloropsis*, deve-se principalmente ao fato da sua morfologia ser extremamente simples. Porém, estudos relatam que a sua parede celular contém *algaenan*, um biopolímero altamente resistente à hidrólise alcalina, hidrólise ácida e solubilização. Também apresentam em sua composição hidrocarbonetos alifáticos, que são geralmente associados a espécies de plantas resistentes à seca (Gelin et al., 1997; Scholz et al., 2014).

O elevado interesse biotecnológico desse gênero deve-se à sua estabilidade no cultivo ao ar livre e ao elevado teor de lípidos, sendo que algumas espécies os acumulam em mais de 60% do seu peso de células secas (Rodolfi et al., 2009). Adicionalmente, são utilizadas na aquicultura como alimento e na produção comercial de ácido eicosapentaenóico (Suda et al., 2002).

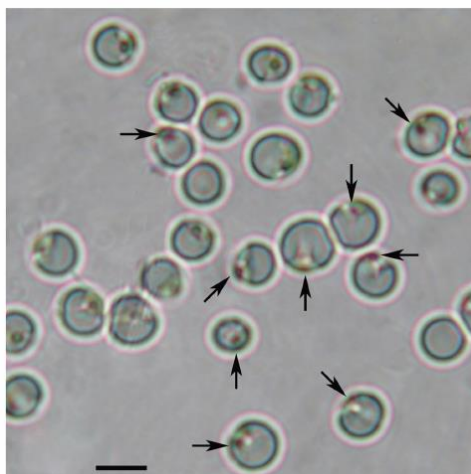


Figura 3: Microalga *Nannochloropsis oceanica*.
As setas indicam a mancha ocular.
Fonte: Bongiovani et al., (2014)

1.2. MICROALGAS COMO FONTE DE INGREDIENTES NATURAIS

As microalgas são uma fonte interessante para a produção sustentável de diversos produtos a nível industrial, pois apresentam taxas de crescimento elevadas, eficiência fotossintética e possibilidade de otimização de processos, quando comparadas a plantas

terrestres convencionais. O cultivo de microalgas vem atingindo um grande crescimento mundial, sendo que a sua biomassa pode ser aplicada na produção de concentrados de proteínas, lípidos, produção de clorofila, carotenoides, enzimas, ésteres, hidrocarbonetos, antibióticos e vitaminas (Cohen, 1999; Günerken et al., 2015).

Na literatura podem ser encontrados dados sobre a composição de diversas microalgas. Estas podem conter 9-77% de proteínas, 6-54% de carboidratos e 4-74% de lípidos, sendo esta variação atribuída ao facto de que com as diferentes condições de cultivo (temperatura, luz, nutrientes) e a diversidade de espécies, a composição nutricional pode ser alterada (Hu, 2004). A Tabela 1 apresenta uma visão geral do conteúdo em termos dos principais constituintes (proteína, carboidratos e lípidos) de algumas microalgas.

Tabela 1: Composição da biomassa de espécies de microalgas, expressa em percentagem de matéria seca (%)

Microalga	Proteína (%)	Carboidratos (%)	Lípidos (%)
<i>Spirulina platensis</i>	43-77	8-22	4-14
<i>Chlorella vulgaris</i>	38-53	8-27	5-28
<i>Tetraselmis</i> sp.	14-58	12-43	8-33
<i>Dunaliella</i> sp.	27-57	14-41	6-22
<i>Scenedesmus</i> sp.	31-56	6-28	8-21
<i>Schizochytrium</i> sp.	10-14	12-24	46-74
<i>Nannochloropsis</i> sp.	18-47	7-40	7-48

Fonte: Adaptado de Bernaerts et al., (2019)

As microalgas apresentam concentrações de lípidos que podem servir de matéria-prima para a produção de cosméticos, medicamentos, detergentes, borracha, aditivos alimentares e tecidos, sendo essas aplicações interessantes para a diminuição do uso de derivados do petróleo. O consumo de ômega-3 derivados de microalgas é benéfico ao desenvolvimento neural, e pode prevenir problemas coronários, diabetes, artrites, asma, depressão e esquizofrenia (Bertoldi, 2017).

Os carboidratos são encontrados nas microalgas na sua parede celular que é composta principalmente por celulose e hemicelulose, e no citoplasma, onde também armazenam moléculas de polissacarídeos. Algumas cepas de cianobactérias (como *Arthrospira* sp.), estão envoltas por um polímero composto maioritariamente por polissacarídeos que conferem uma camada protetora à célula. O potencial biotecnológico deste polímero tem atraído cada vez mais atenção de indústrias farmacêuticas, de bioplásticos e alimentares (Khanra et al., 2018).

Além de macronutrientes, o corpo humano necessita de micronutrientes, que geralmente atuam como coenzimas e portadores de prótons e elétrons no processo de decomposição dos macronutrientes, para a sua sobrevivência. Entre estes micronutrientes, podemos citar as vitaminas, que desempenham um papel importante no metabolismo energético, e que em baixas concentrações no corpo humano, podem ser responsáveis por doenças como raquitismo, escorbuto e beribéri (Depeint et al., 2006).

As microalgas são fontes importantes de vitaminas que agregam valor à sua biomassa, tais como as vitaminas K e E, que são encontradas em quase todas as espécies. As vitaminas B1, B2, B3 e C também podem ser encontradas nas biomassas de microalgas, porém, fatores ambientais e tratamentos pós colheita podem diminuir consideravelmente a concentração destas (Richmond & Hu, 2013).

Algumas espécies de *Chlorella* contêm vitamina B7 em concentração elevada. Cerca de 9 a 18% de suas cepas, são fonte de vitamina B12 e apresentam melhor biodisponibilidade, em comparação com algumas espécies de *Arthrospira*. As frutas e legumes são fontes pobres em vitamina B12, o que explica a deficiência desta vitamina em pessoas que são adeptas do vegetarianismo ou veganismo. Portanto, a ingestão de alimentos adicionados de microalgas, principalmente espécies de *Chlorella*, são essenciais para indivíduos que seguem esta opção alimentar (Watanabe et al., 2002).

Apesar do seu valor nutritivo elevado, as microalgas secas ainda não são muito utilizadas como alimento, devido principalmente à sua coloração e odor característico a peixe, o que limita a sua incorporação em alimentos convencionais. No entanto, preparações de microalgas podem ser encontradas em mercados de alimentos saudáveis geralmente na forma de comprimidos, cápsulas e líquidos, ou incorporadas em massas, salgadinhos, gomas e bebidas (Becker, 2007; Spolaore et al., 2006).

1.2.1. Proteínas

O elevado teor de proteínas em diversas espécies de microalgas foi um dos principais motivos para considerar estes microrganismos como fonte de alimento. Estas proteínas são encontradas na célula (na forma solúvel), no citoplasma e/ou associadas ao cloroplasto. Um exemplo são as ficobiliproteínas que são pigmentos acessórios fotossintéticos presentes nos tilacoides de cianobactérias e microalgas vermelhas (Safi et al., 2014; Richmond & Hu, 2013).

Os valores publicados na literatura sobre as concentrações de proteínas microalgais (Tabela 1), são geralmente baseados em estimativas da chamada proteína bruta, que é obtida medindo o nitrogênio total e multiplicando pelo fator 6,25. Porém, esse cálculo pode gerar erros, devido ao fato de que as microalgas possuem outros constituintes que apresentam nitrogênio em sua composição, como ácidos nucleicos, amins, glucosamidas e materiais da parede celular (Richmond & Hu, 2013). Por este motivo, diversos autores determinam diferentes fatores para microalgas, a fim de mais se aproximarem do valor real da concentração de proteínas. Como por exemplo López et al., (2010), que determinou o fator de 5,95 para *A. platensis*, Gerde et al., (2013) determinou para *N. oceanica* o fator de 4,35 e Ursu et al., (2014) que determinou o fator de 5,47 para *C. vulgaris*.

A qualidade nutricional das proteínas é determinada principalmente pelo conteúdo, proporção e disponibilidade de aminoácidos que compõem as proteínas. As proteínas são formadas por longas cadeias de aminoácidos, essenciais e não essenciais, ligados por ligações peptídicas. Os aminoácidos são fundamentais para o funcionamento do organismo, e muitas espécies de microalgas são excelentes fontes destes compostos. Apesar de fornecerem informações importantes sobre a qualidade nutricional das proteínas, não distinguem a quantidade e a disponibilidade de um determinado aminoácido. A lisina, por exemplo, tende a formar compostos com carboidratos redutores durante armazenamento prolongado ou calor excessivo, o que resulta na sua indisponibilidade (Richmond & Hu, 2013; Wu, 2016). A Tabela 2 compara os perfis de aminoácidos de fontes convencionais ricas em proteínas, com a de algumas microalgas de interesse.

Tabela 2: Perfil de aminoácidos de fontes proteicas convencionais e microalgas, expressa em g/100g de matéria seca

Fonte	Ovo	Peito de frango	Soja	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Arthrospira platensis</i>
Aminoácidos essenciais						
Histidina	2.4	4.5	2.6	2.0	2.6	2.2
Isoleucina	6.6	3.24	5.3	3.8	4.7	6.7
Leucina	8.8	6.4	7.7	8.8	9.4	9.8
Lisina	5.3	7.9	6.4	8.4	6.8	4.8
Metionina	3.2	2.5	1.3	2.2	2.3	2.5

Fonte	Ovo	Peito de frango	Soja	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Arthrospira platensis</i>
Fenilalanina	5.8	3.2	5.0	5.0	5.5	5.3
Treonina	5.0	3.7	4.0	4.8	4.8	6.2
Triptofano	1.7	-	1.4	2.1	-	0.3
Valina	7.2	3.46	5.3	5.5	6.0	7.1
Aminoácidos não essenciais						
Tirosina	4.2	3.65	3.7	3.4	3.9	5.3
Alanina	-	4.7	5.0	7.9	6.8	9.5
Arginina	6.2	5.8	7.4	6.4	6.0	9.5
Asparagina	11.0	7.8	1.3	9.0	9.1	7.3
Glutâmico	12.6	11.2	19.0	11.6	13.8	10.3
Glicina	4.2	3.4	4.5	5.8	5.2	5.7
Prolina	4.2	3.2	5.3	4.8	8.3	4.2
Serina	6.9	3.4	5.8	4.1	4.2	5.1
Cistina	2.3	1.1	1.9	1.4	0.1	0.9

Fonte: Adaptado de Koyande et al., (2019)

1.2.1.1. Funcionalidade tecnológica das proteínas

A escolha de alimentos pelos consumidores está diretamente relacionada com os seus atributos sensoriais, tais como a textura, cor e aparência, o que pode ser influenciado pelas proteínas presentes e suas propriedades funcionais e tecnológicas, como por exemplo a solubilidade, gelificação, propriedades espumantes e emulsionantes, capacidade de absorção de água e de óleo, dentre outras (Damodaran et al., 2007).

Muitos alimentos naturais e processados são espumas ou emulsões. Os sistemas dispersos tornam-se estáveis com a presença de uma substância anfifílica na interface entre as duas fases. Devido ao seu caráter anfifílico e alto peso molecular, as proteínas formam uma película viscoelástica na interface, o que pode suportar choques mecânicos durante a manipulação e armazenamento. Deste modo, espumas e emulsões estabilizadas por proteínas tendem a ser mais estáveis quando comparadas a surfactantes de baixo peso molecular, e por isso, são mais utilizadas para esse fim (Damodaran et al., 2007).

As propriedades como tamanho, forma, estrutura, composição em aminoácidos, razão hidrofobicidade/hidrofilicidade, e capacidade de interagir ou reagir com outros componentes, influenciam na funcionalidade da proteína. Portanto, é difícil determinar a contribuição de cada uma destas componentes na funcionalidade das proteínas

(Damodaran et al., 2007). Por este motivo, vários estudos têm relatado funcionalidades tecnológicas promissoras das microalgas, visto que as suas proteínas podem ter propriedades interessantes para a indústria alimentar. Chen et al. (2019) ao analisarem os isolados proteicos de *Chlorella pyrenoidosa*, *A. platensis* e *N. oceanica*, observaram que as suas conformações estruturais e as condições de pH do meio, influenciaram as propriedades físico-químicas e funcionais. Adicionalmente, concluíram que os extratos proteicos de *Chlorella pyrenoidosa* e *A. platensis* apresentaram menor solubilidade, menor capacidade de formação e estabilidade de espuma, e capacidade emulsionante inferior, quando próximo dos seus pontos isoelétricos (pH ~4). Entre as três microalgas analisadas, a *A. platensis* apresentou melhores resultados de solubilidade, capacidade de absorção de óleo, capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma.

Menegotto et al. (2019), ao estudarem as funcionalidades tecnológicas do concentrado proteico de *A. platensis*, obtiveram resultados comparáveis aos da proteína da clara do ovo em relação à capacidade de formação de espuma. Buchmann, Bertsch, et al. (2019), ao avaliarem as propriedades de formação de espuma, observaram que o isolado proteico de *A. platensis* revelou melhores resultados em comparação com a biomassa de *A. platensis* e com o isolado de proteína de soro de leite. Portanto, como as proteínas da clara do ovo e do soro de leite são amplamente aplicadas na formação de espumas alimentares, validam a importância do estudo da aplicação de proteínas microalgais em produtos alimentares.

1.2.1.2. Técnicas para extração de proteínas

As metodologias utilizadas para a extração de compostos presentes em culturas terrestres, como a soja, não são efetivas para as microalgas, devido às diferenças morfológicas. As células das microalgas apresentam uma estrutura complexa e pouco compreendida, são pequenas e com uma parede celular relativamente espessa (como é possível observar na Figura 4), sendo que a maior parte dos compostos de interesse estão localizados em glóbulos ou ligados às membranas celulares, o que torna ainda mais difícil a extração destes produtos intracelulares (Gerken et al., 2013; Scholz et al., 2014).



Figura 4: Imagem microscópica da *microalga* *Chlorella sorokiniana*
Fonte: Vojvodić et al., (2020)

A eficiência da ruptura da célula é uma etapa essencial para maximizar o rendimento do produto extraído a partir da biomassa de microalgas. Algumas células microalgais são mais fáceis de romper, portanto, técnicas mais eficientes do ponto de vista energético, podem ser escolhidas. O método mais adequado para a ruptura da célula deve ser estabelecido para garantir um baixo custo operacional, alta recuperação e maior qualidade do produto. Estes métodos são geralmente divididos em dois grupos principais, tendo por base o mecanismo de trabalho de ruptura celular, nomeadamente métodos mecânicos e não mecânicos (Günerken et al., 2015).

A ruptura da parede celular através de forças mecânicas pode ser obtida por meio de forças de cisalhamento em fase sólida (moinho de esferas e homogeneização de alta velocidade), forças de cisalhamento em fase líquida (homogeneização de alta pressão e microfluidização), transferência de energia através de ondas (ultrassom e microondas), correntes elétricas (campo elétrico pulsado) e calor (termólise e autoclave) (Günerken et al., 2015).

O uso de tecnologias de campo elétrico pulsado não afetam a integridade das proteínas citoplasmáticas e proporcionam o aumento da permeabilidade da membrana celular pela aplicação de pulsos elétricos curtos, sem utilizar temperaturas elevadas (Coustets et al., 2015).

Os métodos não mecânicos envolvem, geralmente, lise celular com agentes químicos, enzimas ou choque osmótico. Esses métodos são considerados benignos por apenas perfurarem ou permeabilizarem as células, e não fragmentá-las (Günerken et al., 2015).

Além destes métodos, o uso de líquidos iônicos, representados por sais líquidos à temperatura ambiente e de baixo ponto de fusão, tem atraído bastante atenção nos processos de separação de materiais bioativos de plantas, incluindo proteínas, porém, a sua elevada viscosidade pode afetar negativamente no processo de transferência de massa e energia (Marsh et al., 2004; Tang et al., 2012). O método de extração por fluídos supercríticos, tem também recebido atenção como uma forma alternativa para a extração, uma vez que é responsável por promover uma elevada eficiência de extração (Mendiola et al., 2007).

Após a ruptura da célula é necessário que a fração proteica seja concentrada. Na maior parte das vezes, esse processo é baseado no ponto isoelétrico das proteínas, porém tal pode ser também realizado de forma distinta, nomeadamente pela aplicação de ultrafiltração tangencial (Ursu et al., 2014). A Tabela 3 apresenta alguns estudos de extração de proteínas de microalgas por meio da aplicação de diferentes técnicas de extração.

Tabela 3: Estudos de técnicas de extração de proteínas de microalgas

Microalga	Técnica	Resultados	Referência
<i>Arthrospira platensis</i>	Ondas ultrassônicas e agitação mecânica.	Rendimento proteico de 38%	(Menegotto et al., 2019)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Campo elétrico pulsado	Permitiu a extração de 96,6±4,8 % da proteína livre disponível	(Buchmann, Brändle, et al., 2019)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Microondas	Rendimento proteico de 63,2%	(Chew et al., 2019)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Homogeneização de alta pressão; Tratamento enzimático; Campo elétrico pulsado.	Aproximadamente 50% de liberação de proteínas totais; Aproximadamente 35% de liberação de proteínas totais; Aproximadamente 10% de liberação de proteínas totais;	(Safi et al., 2017)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Homogeneização de alta pressão;	Aproximadamente 91 % de extração de proteína	(Grimi et al., 2014)

1.2.1.2.1. Ultrassons como tecnologia para extração de proteínas

As ondas ultrassônicas são ondas mecânicas que se propagam através da amostra por meio de compressão e rarefação, além de causar uma pressão negativa no solvente. Quando uma pressão de ondas sonoras de alta intensidade se propaga por meio de um solvente, ocorre a formação de bolhas que são preenchidas com vapor de gás ou água, gerando um crescimento ou encolhimento dessas bolhas até o colapso, o que resulta em cavitação. Adicionalmente, fornece um efeito mecânico que proporciona maior penetração do solvente na amostra, resultando numa difusão mais rápida da fase sólida na fase líquida. Quando aplicada para a extração de compostos presentes em microalgas, as ondas ultrassônicas facilitam a ruptura e diminuição das partículas das células microalgais, além de melhorar a eficiência dos processos para a extração de proteínas (Hossain et al., 2012; Luo et al., 2014; Ojha et al., 2020).

Entre os sistemas atualmente disponíveis, os ultrassons tipo sonda e banho são os mais utilizados. Ambos utilizam um transdutor eletromagnético como fonte de energia, porém esse dispositivo é utilizado de formas distintas em cada sistema. Na conformação de banho (Figura 5b), o transdutor é geralmente disposto por baixo de um tanque de aço inoxidável. A potência fornecida deve ser o suficiente para causar cavitação no interior do recipiente colocado no banho. A conformação tipo sonda (Figura 5a) é capaz de fornecer uma potência até cem vezes maior que o sistema de banho, devido ao fato de que a energia é introduzida diretamente no recipiente. No entanto, este sistema gera uma excessiva quantidade de calor durante seu funcionamento, sendo necessário que o recipiente seja arrefecido (Bendicho & Lavilla, 2000).

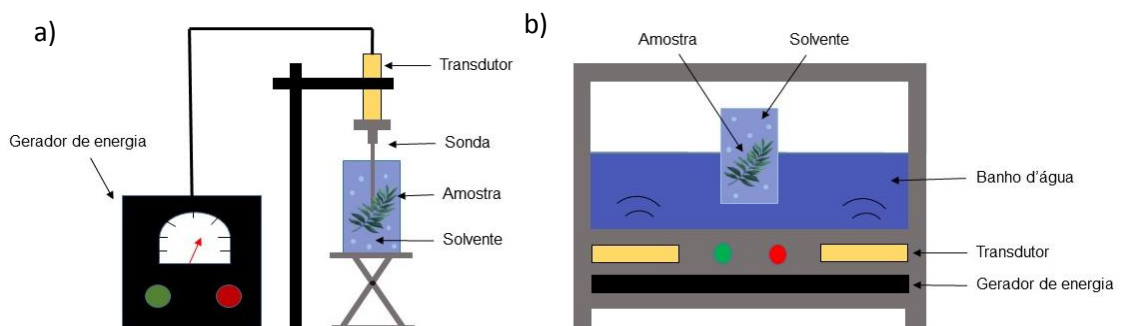


Figura 5: (a) Configuração de ultrassom tipo sonda (b) Configuração de ultrassom tipo banho.
Fonte: Adaptado de OJHA et al., (2020)

Essa técnica apresenta vantagens como a redução do tempo de trabalho, maior segurança do processo (pela possibilidade de trabalhar à temperatura ambiente), menor necessidade de solvente, formação de uma mistura mais homogênea, utilização de equipamentos menores e maior controle do processo (Chemat et al., 2011; Gogate & Kabadi, 2009).

Porém, algumas das desvantagens podem estar relacionadas com a dificuldade em renovar o solvente durante o processo e a necessidade de adicionar etapas após a extração, tais como a separação e a lavagem (que geram perdas e contaminação do produto). Além disso, o uso da configuração de banho de ultrassom, pode gerar falta de uniformidade e redução da distribuição de energia fornecida (Luque-García & Luque De Castro, 2003).

1.3. APLICAÇÕES DE MICROALGAS

A incorporação de compostos bioativos na alimentação humana pode ser feita por meio da sua adição em alimentos amplamente aceitos ou consumidos regularmente. Devido à presença destes compostos em microalgas, estas têm sido usadas como ingredientes alimentares para diferentes finalidades (Caporgno & Mathys, 2018).

Em produtos lácteos, a incorporação de microalgas como *Arthrospira sp.* pode estimular o crescimento de bactérias probióticas que são desejáveis em iogurtes e leite fermentado, devido a presença de compostos bioativos como oligoelementos e vitaminas (Beheshtipour et al., 2013).

A incorporação de *Arthrospira sp.* em pães e snacks extrusados aumentou significativamente o teor de proteínas e melhorou a qualidade nutricional do pão devido a presença de aminoácidos essenciais. Porém, a digestibilidade da proteína diminuiu de acordo com o aumento do conteúdo de microalgas (Lucas et al., 2018; Marco et al., 2014).

Algumas características das microalgas limitam sua incorporação em produtos alimentícios. Por exemplo, apesar da presença de antioxidantes em espécies de *Chlorella* e *Arthrospira*, alterações de cor e sabor nos alimentos são percebidos como indesejáveis pelos consumidores (Beheshtipour et al., 2013). Em massas por exemplo, percepção de cor não é afetada pelo consumidor, devido à atual disponibilidade desse produto em diversas cores no mercado, porém, um leve sabor a peixe foi percebido negativamente em alguns produtos adicionados com microalgas (Fradique et al., 2013). Na Tabela 4, podemos observar alguns exemplos de incorporação de diferentes espécies de microalgas em produtos alimentícios e quais os seus benefícios para a saúde.

Tabela 4: Aplicação de microalgas em produtos alimentícios

Microalga	Produto	Composto bioativo	Benefício para a saúde
<i>Chlorella sp.</i>	Leite	Proteína	Risco reduzido de anemia
<i>Arthrospira platensis</i>	Iogurte	Ficocianina	Anticancerígeno, antioxidante e antiinflamatório.
<i>Arthrospira platensis e Chlorella sp.</i>	Queijo	Proteína e carboidratos	Anticancerígeno, risco reduzido de úlceras gástricas, constipação, anemia, hipertensão, diabetes, desnutrição infantil e neurose.
<i>Dunaliella salina</i>	Massa	Proteína e carotenoides	Atividade antioxidante.
<i>Chlorella sp., Schizochytrium sp. e Thraustochytrium sp.</i>	Suplemento alimentar	Proteínas e ácidos gordos poliinsaturados-ômega 3	Prevenção da constipação e indução da saciedade.
<i>Arthrospira maxima, Diacronena volkianum e Haematococcus pluvialis</i>	Géis de comida vegetariana	Ácidos gordos poliinsaturados-ômega 3, ácido eicosapentaenóico, ácido docosahexaenóico, ácido gama-linolênico e carotenóides	Atividade antioxidante.

Fonte: Adaptado de Camacho & Macedo, (2019)

Os extratos de microalgas também são utilizados pela indústria cosmética na formulação de diversos produtos de rosto, pele, cabelos e proteção solar. A incorporação de componentes de microalgas nesses produtos deve-se principalmente às suas propriedades antioxidantes, espessantes e agentes de ligação à água. Alguns fabricantes já incorporam estes compostos em seus produtos comerciais, tal como o extrato de *Arthrospira sp.* como agente antienvhecimento, o extrato de *C. vulgaris* para estimulação e produção de colagénio na pele, auxílio na regeneração de tecidos e na redução da formação de rugas. Já o extrato de *D. salina* promove o crescimento celular e aumenta o metabolismo energético da pele (Rizwan et al., 2018).

A crescente demanda por corantes naturais, especialmente em alimentos e cosméticos, têm atraído atenção para as microalgas. As cianobactérias possuem compostos como carotenoides, clorofila e ficocianina na sua composição. A ficocianina apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, além da sua aplicação ser segura por ser atóxica e não cancerígena. A sua principal aplicação é como

marcador fluorescente de células e macromoléculas em estudos biomédicos e em técnicas de fluorescência sensíveis (Kuddus et al., 2013).

As microalgas são também reconhecidas como matéria-prima para produção de biocombustíveis como o bioetanol, biodiesel, biohidrogênio e biometano, devido a vantagens como alta eficiência fotossintética e fácil cultivo em grandes quantidades. São comparadas a plantações convencionais para a produção de bioetanol, o que é considerado um combustível limpo e sustentável, por ser atóxico, biodegradável e pouco poluente. Para a produção de bioetanol, as microalgas possuem ainda a vantagem do seu conteúdo em carboidratos ser, principalmente, na forma de amido e celulose, sendo portanto facilmente transformados em açúcares fermentáveis (Kee et al., 2018).

1.4. EMULSÕES

A indústria de alimentos depende em grande escala do uso de emulsões e agentes emulsionantes para a produção de produtos como cremes, molhos para salada, maionese e sopas. As emulsões óleo em água (O/A) (Figura 6) são formadas a partir da homogeneização dessas duas fases na presença de um ou mais agentes emulsionantes. Os agentes emulsionantes são absorvidos nas superfícies das gotículas formadas e reduzem a tensão superficial (facilitando também a ruptura das gotículas). Adicionalmente, formam uma espécie de camada protetora à volta destas gotículas o que ajuda a evitar a agregação, gerando interações repulsivas (Guzey & McClements, 2006).

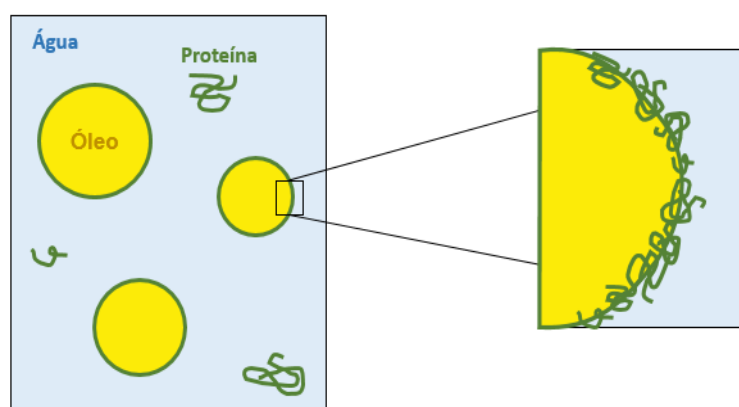


Figura 6: Formação de emulsão tipo óleo em água
Fonte: Adaptado de Schröder et al., (2017)

Alguns dos emulsionantes mais usados na indústria de alimentos são proteínas, polissacarídeos, surfactantes e fosfolipídios (Guzey & McClements, 2006). A interface óleo/água das gotículas que formam as emulsões são amplamente estabilizadas por proteínas, por possuírem um caráter anfifílico. A capacidade das proteínas em causar interações repulsivas entre as gotículas de óleo e a formação de uma membrana interfacial (Figura 6), desempenham um papel importante na estabilização das gotículas contra a floculação e a coalescência durante o armazenamento (McClements, 2004).

A eficácia da aplicação de um emulsionante inclui características como a quantidade mínima necessária para produzir uma emulsão estável, a capacidade de produzir pequenas gotas durante a homogeneização e a capacidade de impedir que essas gotas se agregam com o tempo. Condições ambientais como pH, força iônica, tipo de íão, tipo de óleo, interações dos ingredientes, temperatura, agitação mecânica e o alimento no qual o emulsionante está presente, influenciam diretamente nas características da emulsão (McClements, 2015).

A maioria das proteínas podem ser emulsionantes eficientes quando utilizadas num valor de pH afastado do seu ponto isoelétrico. Nas condições no ponto isoelétrico as proteínas são pouco solúveis, estando desprovidas de forças repulsivas eletrostáticas (carga global nula), fazendo com que a formação de emulsões seja desfavorecida (Damodaran et al., 2007).

1.4.1. Emulsionantes naturais

Atualmente, grande parte dos emulsionantes utilizados pela indústria alimentar são de origem sintética, tais como ésteres de sorbitano, etoxilatos de álcool gordo e ésteres de sacarose. A demanda pela utilização de ingredientes naturais e sustentáveis tem crescido devido à busca por uma alimentação saudável, pela sustentabilidade ambiental e pela necessidade em atender a indivíduos com restrições dietéticas específicas (como veganos e vegetarianos). Por este motivo, muitos fabricantes de alimentos tem buscado alternativas ao uso de emulsionantes sintéticos e a substituição de ingredientes de origem animal por ingredientes de origem vegetal (McClements et al., 2017).

Fontes de proteína animal, tal como leite (proteínas do soro e caseínas) ou ovos, são comumente utilizadas, porém, causam um elevado impacto na produção de CO₂. As proteínas vegetais, devido às menores emissões associadas, são consideradas fontes mais

sustentáveis, sendo uma boa alternativa às de origem animal (Poore & Nemecek, 2018; Van Der Goot et al., 2016).

1.4.2. Microalgas como fonte de emulsionantes naturais

As microalgas são uma fonte de biomoléculas, por exemplo proteínas, que têm mostrado ser excelentes emulsionantes. As suas membranas celulares são bicamadas, compostas principalmente por lípidos polares, que são ativos à superfície. Nas células, os triacilgliceróis são armazenados como gotículas lipídicas circundadas por lípidos polares intercalados com proteínas estruturais hidrofóbicas, que podem continuar a estabilizar as gotículas lipídicas mesmo após ocorrer ruptura celular (Mnif & Ghribi, 2015; Schwenzfeier et al., 2011).

A busca por fontes sustentáveis de espessantes para o processamento de produtos alimentícios tem incentivado o estudo das propriedades reológicas das microalgas (Saha & Bhattacharya, 2010). Benelhadj et al. (2016), ao estudar as propriedades emulsionantes do isolado proteico de *A. platensis*, observou que a pH próximo do ponto isoelétrico, houve menor solubilidade das proteínas e menor estabilização da interface óleo/água, o que acarretou a diminuição da capacidade de formação de emulsão. Ursu et al., (2014) investigou a capacidade emulsionante da parte proteica da *C. vulgaris*, e concluiu ser competitiva com emulsionantes comerciais.

É evidente que as propriedades funcionais das proteínas das microalgas, nomeadamente a capacidade emulsionante, são importantes no ponto de vista tecnológico. No entanto, não existem metodologias oficiais das condições ideais de produção de emulsões estabilizadas por proteínas de microalgas. A Tabela 5 apresenta um conjunto de trabalhos que foca diferentes abordagens na produção de emulsões.

Tabela 5: Metodologias para produção de emulsões estabilizadas por proteínas de diferentes espécies de microalgas

Microalga	Condições	Referência
<i>Arthrospira maxima</i>	0,025 a 1 mg de isolado proteico por mL de solução de NaCl 10 mM;	Teuling et al., (2019)
<i>Nannochloropsis gaditana</i> e <i>Tetraselmis impellucida</i> .	1% de óleo de girassol; pH 8,0.	
<i>Arthrospira platensis</i>	10 g de concentrado proteico por L de solução tampão fosfato 0,05 mol/L;	Shimada et al., (2017)

Microalga	Condições	Referência
<i>Chlorella prototecoides</i>	10% de fase oleosa; pH 6,0 e 8,0. 1 a 5% de hidrolisado proteico em água deionizada; Razão 1:9 de <i>Miglyol</i> ; Em seu próprio pH (~ 6,7).	Dai et al., (2020)

Capítulo 2

Materiais e Métodos



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PADRÕES E REAGENTES

O kit Pierce™ Modified Lowry Protein Assay e o padrão de albumina foram adquiridos da Thermo Fisher.

O óleo utilizado para determinação da capacidade de absorção de óleo foi adquirido no comércio local de Bragança – Portugal.

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

2.2. AMOSTRAS DE MICROALGAS

As amostras de biomassa de microalgas, nomeadamente *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica* foram gentilmente cedidas pela empresa A4F (Algae for future) situada em Lisboa, Portugal. As amostras foram armazenadas em congelador (-22°C) e protegidas da luz.

2.3. EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA

O procedimento e as condições utilizadas, foram baseadas no trabalho de Menegotto et al., (2019), com algumas modificações. Inicialmente, foram extraídos os lípidos das amostras, visto que esta fração pode ser utilizada pela indústria farmacêutica, alimentar, cosmética e na produção de biocombustíveis. A extração foi feita com hexano (50-60°C), utilizando um sistema de extração tipo Soxhlet (AOAC, 2016).

As biomassas desengorduradas foram diluídas em água ultrapura e as dispersões obtidas foram ajustadas com NaOH 2 mol/L para os seguintes pHs: 9 para *A. platensis* (Menegotto et al., 2019) e 10 para *C.* e *N. oceanica* (Gerde et al., 2013).

As dispersões foram submetidas à sonicação em banho de ultrassons (25 Hz, 30 °C, 45 minutos, 30 g/L) (Menegotto et al., 2019) ou em ultrassom tipo sonda (20 kHz, 250

W, 30s ON/30s OFF, 30 °C, 50 g/L) 45 min para *C.vulgaris* e *N. oceanica*, e 15 min para *A. platensis* (utilizando banho de gelo para o controle da temperatura) (Kulkarni & Nikolov, 2018).

Posteriormente, as dispersões foram submetidas a agitação mecânica em banho (80 rpm, 30 °C), permanecendo durante 50 minutos as amostras expostas ao banho de ultrassom e 30 minutos as amostras expostas ao ultrassom tipo sonda. Seguidamente, foram centrifugadas (7500 g, 25 °C, 15 min). O sobrenadante foi coletado e o seu pH ajustado com HCl 2 mol/L para o ponto isoelétrico das proteínas das microalgas (3,0 para *A. platensis* (Chronakis et al., 2000), 4,5 para *C.vulgaris* (Phusunti & Cheirsilp, 2020) e 3,2 para *N. oceanica* (Gerde et al., 2013)), e deixado em repouso durante 30 minutos a 10 °C, para que ocorresse a precipitação.

Após essa etapa, as dispersões foram centrifugadas (7500 g, 25 °C, 15 min), os precipitados, ricos em proteína, foram recolhidos e lavados três vezes com água ultrapura seguidos de centrifugação. Por fim, os mesmos foram neutralizados (pH 7) com NaOH 2 mol/L e submetidos a secagem em liofilizador (48 horas). A Figura 7 apresenta o fluxograma para obtenção dos extratos proteicos segundo as duas vias (banho de ultrassons e ultrassom tipo sonda) a partir das biomassas de *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*.

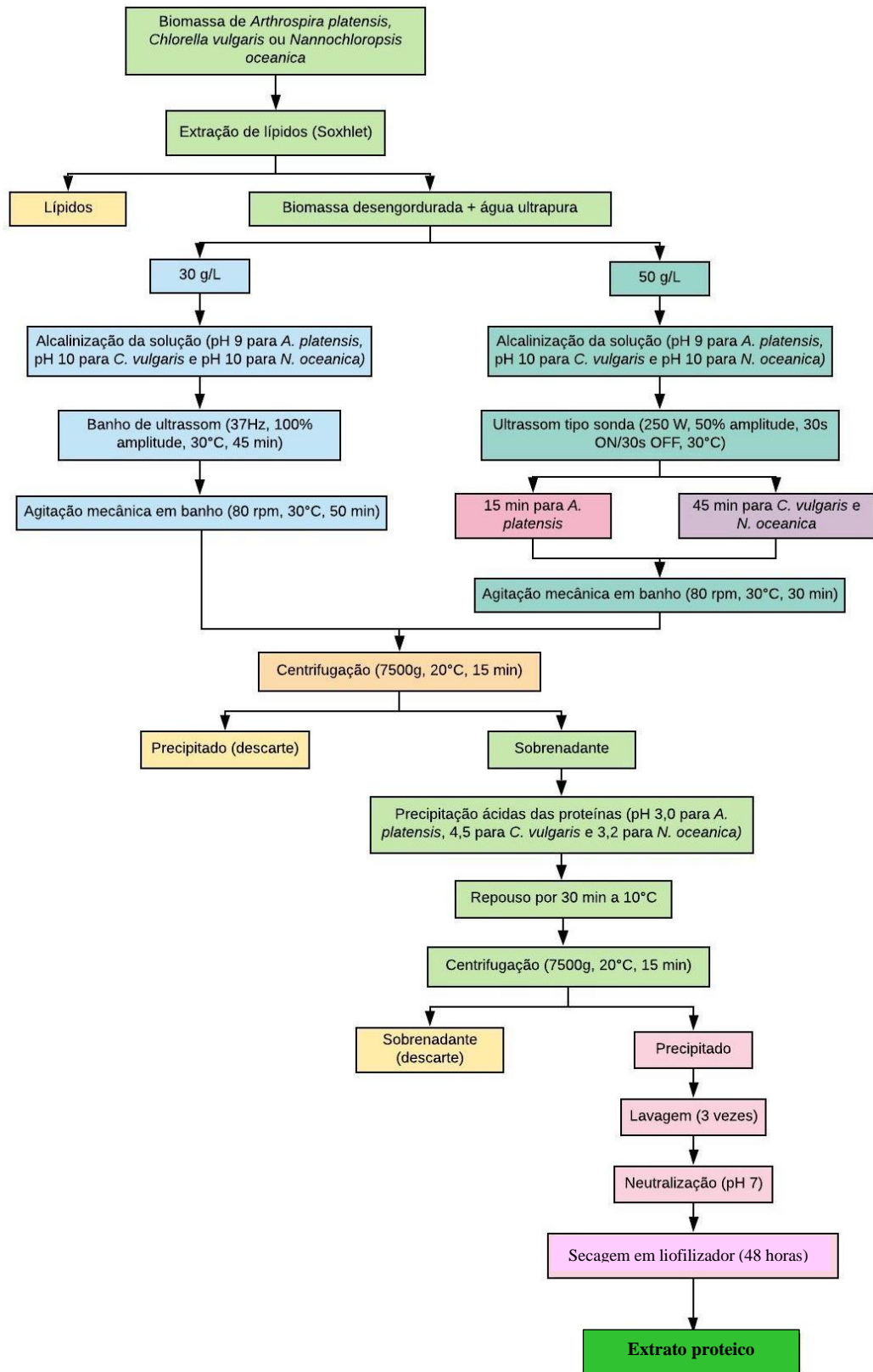


Figura 7: Fluxograma do processo de extração e obtenção dos extratos proteicos das biomassas de *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*.

2.3.1. Rendimento global e proteico

O rendimento global do processo de obtenção dos extratos proteicos obtidos através das biomassas de *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, foi calculado conforme a Equação 1.

$$\text{Rendimento global (\%, m/m)} = \frac{\text{massa}_{EP}}{\text{massa}_{BD}} \times 100 \quad [1]$$

Onde massa_{EP} é a massa do extrato proteico obtido, e massa_{BD} é a massa da biomassa desengordurada utilizada. Ambos os valores são expressos em gramas.

O rendimento proteico dos extratos obtidos através das biomassas de *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, foi determinado por meio da Equação 2, de acordo com a metodologia descrita por Selling et al. (2013).

$$\text{Rendimento proteico (\%, m/m)} = \frac{(\text{massa}_{EP} \times \text{PT}_{EP})}{(\text{massa}_{BD} \times \text{PT}_{BD})} \times 100 \quad [2]$$

Onde PT_{EP} é a percentagem de proteína total no extrato proteico, e PT_{BD} é a percentagem de proteína total na biomassa desengordurada. O percentual de proteínas foi determinado segundo o método de macro-Kjeldahl (AOAC, 2016) assim como descrito na Seção 2.4.1.

2.3.2. Microscopia óptica

Os aspetos morfológicos das microalgas durante e após o processo de extração, foram analisadas por microscopia óptica, utilizando microscópio Ni-U Nikon equipado com câmara digital e software para tratamento de dados Nis Elements Deconvolution.

2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS, BIOMASSAS DESENGORDURADA E DOS EXTRATOS PROTEICOS

2.4.1. Valor nutricional e energético

A composição em macronutrientes das biomassas, biomassas desengorduradas e extratos proteicos das microalgas foram determinadas segundo métodos oficiais de análise de alimentos descritos pela AOAC (2016). Para isso, determinou-se o teor de proteína, lípidos, glúcidos, cinzas e energia.

O teor de proteínas foi obtido pelo método de macro-Kjeldahl pela conversão do azoto total. Os fatores de correção foram adaptados para cada espécie de microalga, sendo N x 5,95 para *A. platensis* (López et al., 2010), N x 5,47 para *C. vulgaris* (Ursu et al., 2014) e N x 4,35 para *N. oceanica* (Gerde et al., 2013).

Os lípidos foram determinados por meio da extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, em um aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração em mufla a 550±15°C. Os glúcidos foram calculados por diferença através da Equação 3, e a energia total de acordo com a Equação 4.

$$\text{Glúcidos (g/100g de massa seca)} = 100 - (g_{\text{lípidos}} + g_{\text{proteínas}} + g_{\text{cinzas}}) \quad [3]$$

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

2.4.2. Solubilidade

O teor de proteínas solúveis foi determinado conforme descrito por Menegotto et al. (2019). Foram dispersos 0,1 g do extrato proteico em 20 mL de água destilada (m/v) e a solução foi agitada em agitador magnético durante 10 min. Em seguida, o pH foi ajustado de 2 a 10, adicionando HCl 2,0 mol/L e NaOH 2,0 mol/L e cada uma das soluções foram centrifugadas (4100 g, 25 °C, 15 min). Foi elaborado uma amostra controle que não teve o pH ajustado e não foi centrifugada. A concentração de proteínas solúveis (g/L) foi determinada utilizando o kit Pierce™ Modified Lowry Protein Assay e a albumina foi utilizada como padrão. A curva de calibração foi construída utilizando a albumina (BSA) (1,5 g/L) e uma equação polinomial foi encontrada $y = 298,05 x^4 - 236,75 x^3 + 57,111x^2 - 2,4694x + 0,0204$ (onde y é a concentração em g/L e x a absorbância); $R^2 = 0,9923$. As

absorbâncias foram medidas em espectrofotómetro a 750 nm, e os resultados expressos através do percentual de proteínas solúveis presente nas amostras, conforme Equação 5.

$$PS(\%) = \frac{\text{proteína solúvel no sobrenadante (g/L)}}{\text{proteína solúvel na solução controlo (g/L)}} \times 100 \quad [5]$$

2.4.2.1. Análise espectrofotométrica dos extratos

As soluções obtidas na Secção 2.4.2. foram analisadas por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-VIS) na gama de 190 a 1100 nm. O equipamento utilizado foi um espectrómetro modelo Jasco V-730 UV- Visible Spectrophotometer (Tokyo, Japan).

2.4.3. Análise de cor

Com o intuito de avaliar a diferença de coloração das biomassas e das biomassas desengorduradas de *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, e dos extratos proteicos obtidos a partir destas, foi utilizado um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc.), para medição dos parâmetros L*, a* e b* (CIELAB), onde 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). Os resultados foram registados pelo software de dados “Spectra Magic Nx” (versão CM-S100W 2.03.0006).

2.4.4. Identificação de grupos funcionais por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As biomassas e os extratos proteicos foram analisados por FTIR utilizando o equipamento MB300 (ABB) em modo de ATR (Refletância Total Atenuada) com um acessório equipado com um cristal de diamante. As análises foram realizadas com os seguintes parâmetros: resolução de 16 cm⁻¹, 32 scans e na gama espectral de 4000-550 cm⁻¹. Os espetros foram obtidos e tratados com o software Horizon MB versão 3.4.

2.5.6. Capacidade de absorção de água ($CA_{\text{água}}$) e óleo ($CA_{\text{óleo}}$)

A $CA_{\text{água}}$ e $CA_{\text{óleo}}$ foi determinada de acordo com a metodologia de Chen et al. (2019) e Menegotto et al. (2019), com modificações. Para $CA_{\text{água}}$ foram feitas dispersões de 0,05 g de cada amostra de extrato proteico em 10 g de água ultrapura. Em seguida, a amostra foi agitada durante 2 minutos em Vortex, deixada em repouso durante 80 minutos e centrifugada (1800 g, 25° C, 15 minutos). O sobrenadante obtido foi escorrido cuidadosamente e pesado. Os resultados foram determinados conforme a Equação 6.

$$CA_{\text{água}} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{\text{massa}_{\text{água}} - \text{massa}_{\text{sobrenadante}}}{\text{massa}_{\text{extrato proteico}}} \quad [6]$$

A $CA_{\text{óleo}}$ foi determinada de acordo com a metodologia de Chen et al., (2019) e Menegotto et al., (2019), com modificações. Foram feitas dispersões de 0,05g de cada amostra de extrato proteico em 10g de óleo. Seguidamente, foi realizada a agitação das amostras durante 2 minutos em Vortex, seguido de repouso de 30 minutos e centrifugação (1800g, 25°C, 15 minutos). O sobrenadante obtido foi escorrido cuidadosamente e pesado. A $CA_{\text{óleo}}$ foi determinada de acordo com a Equação 7.

$$CA_{\text{óleo}} (g/g) = \frac{\text{massa}_{\text{óleo}} - \text{massa}_{\text{sobrenadante}}}{\text{massa}_{\text{extrato proteico}}} \quad [7]$$

2.5.8. Capacidade de formação e estabilidade de espuma (CF_{espuma} e E_{espuma})

A CF_{espuma} e E_{espuma} foram determinadas segundo a metodologia de Timilsena et al., (2016), com modificações. Foram preparadas soluções contendo 3% de extrato proteico em água destilada. De seguida, as soluções foram mantidas sob agitação em agitador magnético durante 10 minutos. A espuma foi formada usando Ultra Turax a 10.000 rpm por 1 minuto seguindo-se um período de repouso de 30 minutos. Os resultados foram determinados conforme a Equação 8 e Equação 9.

$$CF_{\text{espuma}} = \frac{V2 - V1}{V1} \times 100 \quad [8]$$

$$E_{espuma} = \frac{V2 - V3}{V2 - V1} \times 100 \quad [9]$$

Onde, V1 é o volume da solução após agitação em agitador magnético; V2 o volume após a formação de espuma no Ultra Turax e V3 o volume após 30 minutos em repouso.

2.5.9. Quantificação da ficocianina

Para a quantificação da ficocianina, 1 mg de extrato proteico de *A. platensis* foi diluído em 1 mL de água destilada e submetido a centrifugação a 6000 rpm durante 15 minutos. Foram medidas as absorbâncias em triplicata a 615 nm, 652 nm e 280 nm. A concentração de ficocianina (CF) foi determinada de acordo com a Equação 10, recomendada por Bennett & Bogorad, (1973).

$$CF = \frac{(Abs_{615} - 0,474 Abs_{652})}{5,43} \quad [10]$$

Onde, CF é a concentração de ficocianina em mg/mL e Abs₆₁₅ e Abs₆₅₂ são as absorbâncias do sobrenadante a 615 nm e 652 nm, respectivamente.

A pureza da ficocianina (PE) foi determinada através da relação entre a absorbância do sobrenadante a 615 nm e 280 nm (Equação 11), uma vez que a 615 nm determina-se a ficocianina e a 280 nm determinam-se outros tipos de pigmentos presentes na solução (Abalde et al., 1998).

$$PE = \frac{Abs_{615}}{Abs_{280}} \quad [11]$$

Onde, PE é a pureza da ficocianina e Abs₆₁₅ e Abs₂₈₀ são as absorbâncias do sobrenadante a 615 nm e 280 nm, respectivamente.

2.5. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

2.5.1. Planeamento Fatorial Fracionado (PFF 2^{4-1})

Visando a determinação das melhores condições para o preparo de emulsões a partir do extrato proteico de *A. platensis*, foi aplicado um PFF (2^{4-1}) (2 pontos centrais, 10 ensaios), para o estudo do efeito de 4 variáveis do processo (razão óleo/água, concentração do extrato proteico (%), pH e tempo de armazenamento (dias)) nas seguintes propriedades das emulsões: potencial zeta e tamanho de partícula em número e volume. Os níveis reais e codificados das variáveis estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no PFF 2^{4-1}

Variáveis/Níveis	-1	0	1
x1 (o/a)	10/90	20/80	30/70
x2 (%)	1	2,5	4
x3 (pH)	3	5	7
x4 (dias)	0	7	14

Os ensaios foram conduzidos conforme a metodologia descrita por Schreiner et al., (2020), com algumas modificações. O extrato proteico foi incorporado numa solução de tampão fosfato 0,1M (conforme pH indicado no planeamento) e agitado em agitador magnético durante 5 minutos. A dispersão obtida foi adicionada à fração de óleo numa proveta, agitada em Ultra Turrax (11.000 rpm) durante 3 minutos seguida de homogeneização em Homogeneizador de Alta Pressão (6 ciclos a 100 MPa).

2.5.2. Potencial zeta

A estabilidade das emulsões foi avaliada por meio da determinação das características de carga superficial das partículas através de um instrumento de eletroforese (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As amostras foram diluídas de 1:100 a 1:300 com água destilada antes da análise para evitar efeitos de espalhamento tendo a análise sido realizada em triplicado.

2.5.3. Tamanho de partícula

A caracterização do tamanho da partícula das emulsões obtidas na Secção 2.5.1. foi realizada num equipamento Malvern Mastersizer 3000 equipado com uma unidade de dispersão Hydro MV, utilizando água destilada como meio dispersante. Os dados foram obtidos e tratados com o software Mastersizer versão 3.10.

2.5.4. Avaliação da estabilidade das emulsões por inspeção visual

A avaliação da estabilidade das emulsões seguiu a metodologia descrita por Pongsawatmanit et al., (2006) com adaptações. Essa avaliação foi feita através da observação visual das emulsões preparadas na Secção 2.5.1., que foram transferidas para provetas graduadas de 15 mL à temperatura de 4°C. O “creaming index” (CI) é utilizado para quantificar a instabilidade sendo definido como a razão entre a altura da camada de sérum (HS) e a altura total (HT), sendo que a fase designada por sérum corresponde à formação de uma fase aquosa no fundo da proveta. O CI foi determinado através da Equação 12.

$$CI (\%) = \frac{HS}{HT} \times 100 \quad [12]$$

Onde CI é o “creaming index” em percentagem, HS é a altura da camada de sérum e HT a altura total.

Os aspetos morfológicos das emulsões formadas a partir do extrato proteico de *A. platensis*, foram também analisadas por microscopia óptica, conforme procedimento descrito na Secção 2.3.2.

2.5.5. Análise de cor

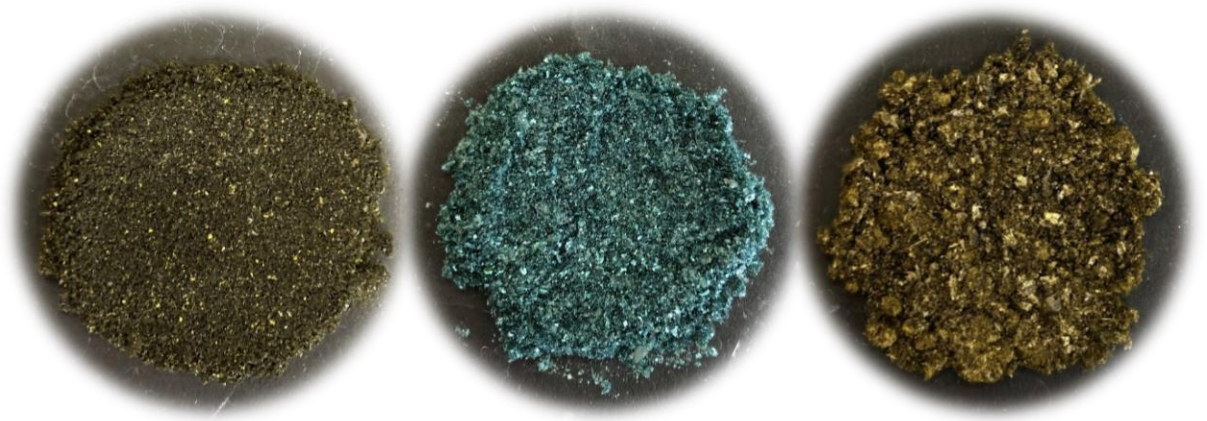
A fim de avaliar a coloração das emulsões preparadas na Secção 2.5.1., estas foram analisadas conforme procedimento descrito na Secção 2.4.3.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em cada tabela os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, preservando os números significativos permitidos pela magnitude do desvio padrão. Os ensaios do planejamento experimental fatorial fracionado foram realizados aleatoriamente e os resultados foram analisados utilizando o *software* Statistica 10.0 (Statsoft Inc, USA). Para a análise dos efeitos utilizou-se um nível de significância de 90 % ($p \leq 0,1$). O software Origin 8.0 (OriginLab, USA) foi utilizado para a construção dos gráficos e o Microsoft Excel para a análise de dados e cálculo do desvio padrão.

Capítulo 3

Resultados e Discussão



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO PROTEICA

3.1.1. Rendimento global e proteico

O rendimento global do processo de obtenção do extrato proteico a partir da biomassa desengordurada de *A. platensis* por tratamento ultrassônico e agitação mecânica em meio alcalino foi de 41% em banho de ultrassons e 49% quando se utilizou ultrassom tipo sonda. A diferença entre os dois processos de extração, nomeadamente a obtenção de um maior rendimento com o ultrassom tipo sonda, notou-se ainda mais para a obtenção do extrato proteico de *C. vulgaris* e *N. oceanica*, como mostram os resultados tabelados na Tabela 7. Este resultado pode ser justificado pelas características das paredes celulares destas microalgas. Enquanto a *A. platensis* possui uma parede celular mais frágil e fácil de ser rompida, a *C. vulgaris* e a *N. oceanica* possuem uma parede celular altamente resistente e necessitam de um método de extração que forneça uma maior energia para provocar a sua ruptura.

Devido ao baixo rendimento do extrato proteico obtido através da biomassa desengordurada de *C. vulgaris* e *N. oceanica* por tratamento ultrassônico em banho de ultrassons, não foi possível determinar seu rendimento proteico. Assim como o rendimento global, o rendimento proteico de *A. platensis* também foi superior no caso de se utilizar o tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda.

Tabela 7: Rendimento global e proteico da obtenção do extrato proteico de microalgas

Microalga	Rendimento global em % (m/m)		Rendimento proteico em % (m/m)	
	EP (BU)	EP (US)	EP (BU)	EP (US)
<i>A. platensis</i>	40,99 ± 1,29	49,04 ± 0,36	43,9 ± 1,16	52,34 ± 0,41
<i>C. vulgaris</i>	3,68 ± 0,10	31,77 ± 0,55	nd	59,9 ± 1,01
<i>N. oceanica</i>	0,28 ± 0,06	6,17 ± 0,41	nd	9,25 ± 0,15

Resultados expressos em média ± desvio padrão. EP (BU): extrato proteico obtido através de tratamento ultrassônico em banho de ultrassons; EP (US): extrato proteico obtido através de tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda.

Na Figura 8 é possível observar os extratos proteicos de *C. vulgaris* e *N. oceanica* obtidos por tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda e o extrato de *A. platensis* obtido por tratamento ultrassônico em banho de ultrassons.

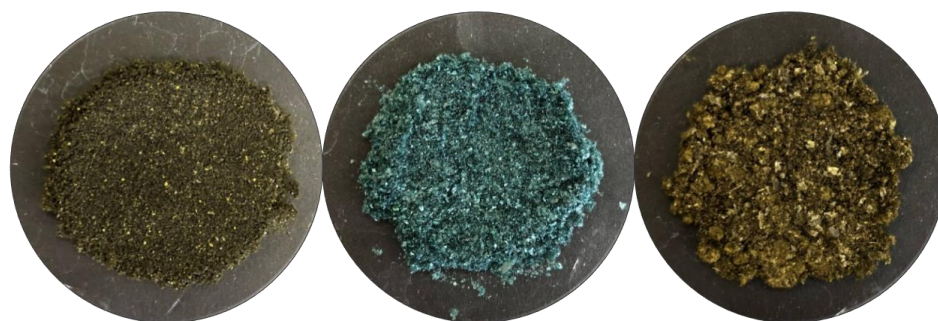


Figura 8: Extratos proteicos de *C. vulgaris*, *A. platensis* e *N. oceanica*, respectivamente.

O rendimento verificado para *A. platensis* foi superior ao obtido por Menegotto et al. (2019), que sob condições semelhantes, obtiveram um rendimento global de 18,33% e proteico de 23,38%. Hildebrand et al. (2020), ao extraírem as proteínas de *C. vulgaris*, obtiveram um rendimento proteico de $79,1 \pm 5,3\%$. Contudo, Gerde et al. (2013), obtiveram um rendimento global superior (56,9%) para o extrato proteico de *Nannochloropsis spp.* em comparação com o registrado no presente estudo, porém o rendimento proteico foi inferior (16%).

3.1.2. Microscopia óptica

A Figura 9 mostra as imagens de *A. platensis* obtidas por microscopia óptica durante o processo de obtenção do extrato proteico. Nas imagens (a), obtidas para ambos os métodos de extração, é possível observar a microalga na sua forma característica em espiral e também alguns fragmentos que podem ser resultado do processo de secagem por spray-drying e/ou do processo de extração dos lípidos. Nas imagens (b), observa-se a influência do tipo de sonicação aplicada na ruptura da célula. Para a amostra tratada em banho de ultrassons observam-se fragmentos ligeiramente menores e bem definidos comparado a amostra tratada em ultrassom tipo sonda. Como a energia fornecida é superior, é possível observar a ruptura da célula em fragmentos muito pequenos, o que pode ter ocasionado a perda da estrutura de algumas proteínas, causando a sua desnaturação (Bendicho & Lavilla, 2000). Após a agitação mecânica (c), os fragmentos

da amostra tratada em ultrassom tipo banho apresentam-se menores, porém, ainda bem definidos.

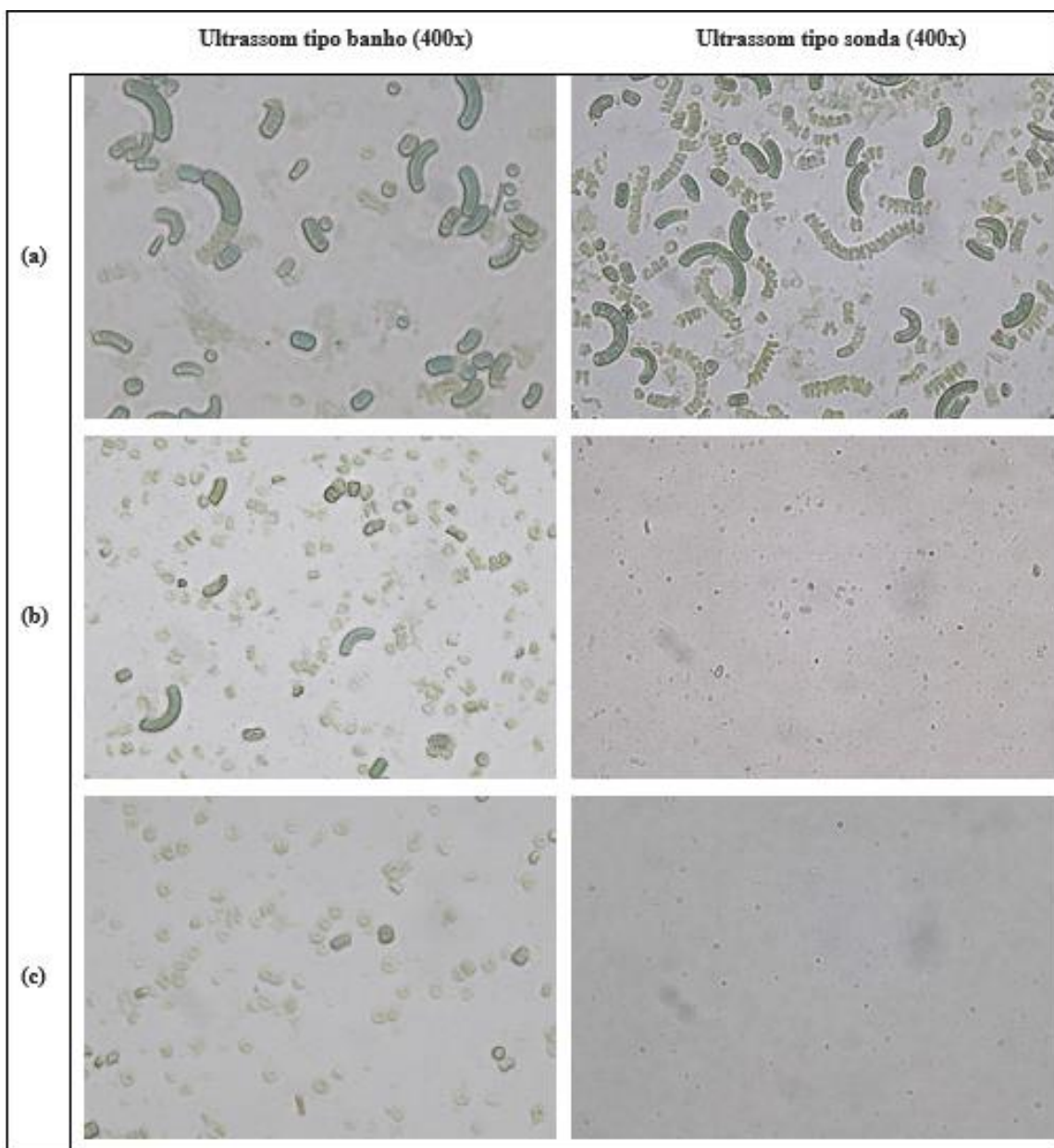


Figura 9: Imagens de microscopia óptica durante o processo de obtenção do extrato proteico de *A. platensis* (a): amostra de microalga diluída em água ultrapura; (b): após o tratamento ultrassônico; (c): após agitação mecânica.

A Figura 10 mostra as imagens de *C. vulgaris* e *N. oceanica* obtidas por microscopia óptica durante o processo de obtenção do extrato proteico. A utilização do ultrassom tipo sonda mostrou-se mais eficiente para a ruptura celular destas duas microalgas. Isso deve-se ao fato de *C. vulgaris* e *N. oceanica* possuírem uma parede celular altamente resistente e difícil de ser rompida, necessitando de maior energia para o seu rompimento. Nas imagens (a) de ambas as microalgas, é possível observar a sua forma arredondada

conjuntamente com poucos fragmentos o que pode ser resultado do processo de obtenção da biomassa desidratada e/ou do processo de extração dos lípidos. Nas imagens (b) e (c), é possível observar a rutura de algumas células de *C. vulgaris*, enquanto que no caso de *N. oceanica* muitas células continuam intactas.

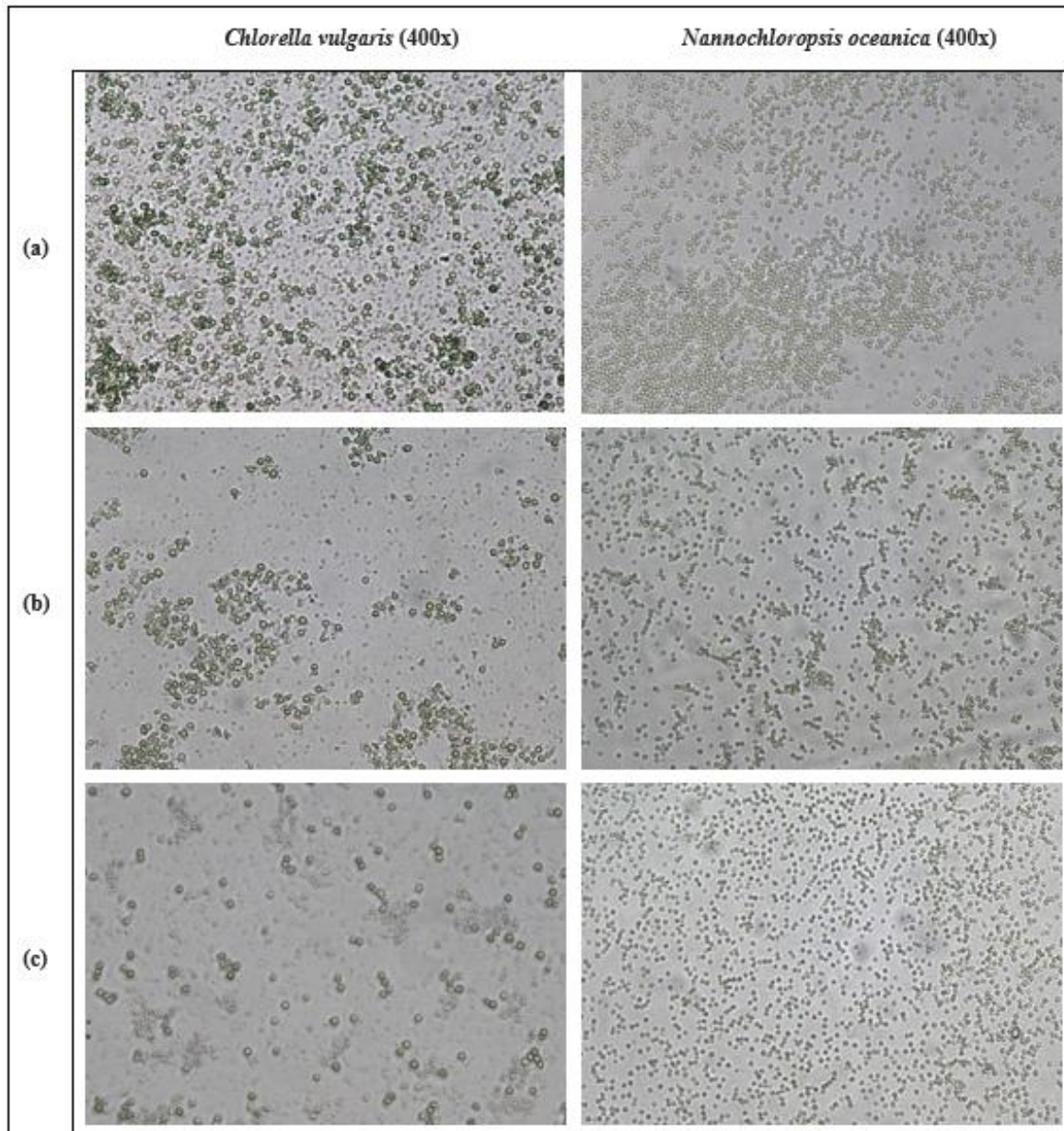


Figura 10: Imagens de microscopia óptica durante o processo de obtenção do extrato proteico de *C. vulgaris* e *N. oceanica* por tratamento ultrassónico em equipamento tipo sonda.
(a): amostra de microalga diluída em água ultrapura; (b): após o tratamento ultrassónico; (c): após agitação mecânica.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS, BIOMASSAS DESENGORDURADAS E DOS EXTRATOS PROTEICOS

3.2.1. Valor nutricional e energético

A caracterização das biomassas, biomassas desengorduradas e dos extratos proteicos das microalgas *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, nomeadamente no que respeita ao valor nutricional e energético, estão apresentados na Tabela 8. Como esperado, a biomassa de *A. platensis* apresentou o maior teor de proteínas ($59,27 \pm 3,11$ g/100g ms), seguido da *C. vulgaris* ($28,63 \pm 0,52$ g/100g ms) e da *N. oceanica* ($21,03 \pm 0,07$ g/100g ms). O maior teor de cinzas foi obtido para a biomassa de *N. oceanica* ($19,98 \pm 1,16$ g/100g ms) e o menor teor para o extrato proteico de *A. platensis* obtido usando tratamento ultrassónico em equipamento tipo sonda ($1,87 \pm 2,15$ g/100g ms). O maior teor de glúcidos foi obtido para a biomassa de *C. vulgaris* ($59,95 \pm 0,12$ g/100g ms) e o menor para a biomassa de *A. platensis* ($28,27 \pm 4,57$ g/100g ms). De acordo com estes resultados foi possível observar que a extração de lípidos das biomassas por Soxhlet foi eficaz, uma vez que os resultados de lípidos obtidos pelas biomassas desengorduradas foi inferior ao das biomassas antes do processo de extração. O maior valor energético foi obtido para o extrato proteico de *A. platensis* obtido por meio de tratamento ultrassónico em equipamento tipo sonda ($406,54 \pm 6,20$ kcal/100g ms), enquanto a biomassa desengordurada de *N. oceanica* apresentou o menor valor energético ($326,68 \pm 0,98$ kcal/100g ms).

Da Silva et al. (2019), ao avaliarem a biomassa de *A. platensis*, obtiveram resultados de $0,65 \pm 0,04$ g/100g ms para lípidos, $17,5 \pm 0,3$ g/100g ms para glúcidos, $6,19 \pm 0,06$ g/100g ms para cinzas, $75,6 \pm 0,3$ g/100g ms para proteínas e valor energético de $378,5 \pm 0,03$ kcal/100g ms. Alavijeh et al. (2020), para a biomassa de *C. vulgaris*, obtiveram $25,1 \pm 0,0$ g/100g ms para lípidos, $35,0 \pm 0,1$ g/100g ms para glúcidos, $2,0 \pm 0,3$ g/100g ms para cinzas e $20,0 \pm 0,4$ g/100g ms para proteínas. E Ashour et al. (2019), para a biomassa de *N. oceanica*, obtiveram $37,71 \pm 4,27$ g/100g ms para lípidos, $18,93 \pm 2,19$ g/100g ms para glúcidos e $22,81 \pm 3,71$ g/100g ms para proteínas.

Através dos dados apresentados, podemos observar variações entre os resultados obtidos através do presente estudo e a literatura. Essa variação pode ser atribuída às

diferentes condições de cultivo das microalgas, que influenciam diretamente em sua composição nutricional (Hu, 2004).

Tabela 8: Valor nutricional e energético das biomassas, biomassas desengorduradas e extratos proteicos das microalgas.

Valor nutricional (g/100g ms)	<i>Arthrospira platensis</i>				<i>Chlorella vulgaris</i>			<i>Nannochloropsis oceanica</i>		
	Biomassa	BD	EP (US)	EP (BU)	Biomassa	BD	EP (US)	Biomassa	BD	EP (US)
Cinzas	8,97 ± 0,86	9,38 ± 0,01	1,87 ± 2,15	3,43 ± 0,80	10,83 ± 0,63	11,88 ± 0,02	4,09 ± 2,49	19,98 ± 1,16	19,05 ± 0,17	nd
Glúcidos	28,27 ± 4,57	28,29 ± 0,06	28,95 ± 2,66	29,57 ± 1,20	59,95 ± 0,12	58,89 ± 0,92	38,27 ± 2,85	56,89 ± 1,75	58,87 ± 0,88	nd
Lípidos	3,49 ± 0,59	0,15 ± 0,06	2,80 ± 0,48	0,44 ± 0,10	0,60 ± 0,01	0,10 ± 0,01	2,70 ± 0,16	2,10 ± 0,52	0,58 ± 0,06	nd
Proteínas	59,27 ± 3,11	62,19 ± 0,01	66,38 ± 0,04	66,56 ± 0,31	28,63 ± 0,52	29,13 ± 0,89	54,94 ± 0,19	21,03 ± 0,07	21,50 ± 0,77	32,24 ± 0,46
Energia (kcal/100g ms)	381,58 ± 0,48	363,23 ± 0,23	406,54 ± 6,20	388,47 ± 2,72	359,67 ± 2,53	352,97 ± 0,01	397,15 ± 9,16	330,56 ± 2,04	326,68 ± 0,98	nd

Valores expressos em média ± desvio padrão. BD: biomassa desengordurada; EP (BU): extrato proteico obtido através de tratamento ultrassônico em banho de ultrassons; EP (US): extrato proteico obtido através de tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda; nd: não determinável.

3.2.2. Solubilidade

A solubilidade de uma proteína refere-se ao equilíbrio termodinâmico entre interações proteína-proteína e proteína-solvente, sendo estas interações principalmente de natureza iônica e hidrofóbica. O estudo da solubilidade é importante porque esta costuma afetar as propriedades funcionais da proteína, além de que as proteínas insolúveis possuem poucas aplicações em alimentos (Damodaran et al., 2007). Jambrak et al., (2008), ao estudarem o isolado proteico de soro de leite, concluíram que as mudanças na conformação e na estrutura das proteínas causadas pelo ultrassom, influenciaram diretamente na sua solubilidade. O modo como a solubilidade do extrato proteico de *A. platensis* e o extrato proteico de *C. vulgaris* se comportam quando expostos a diferentes pHs está representado na Figura 11.

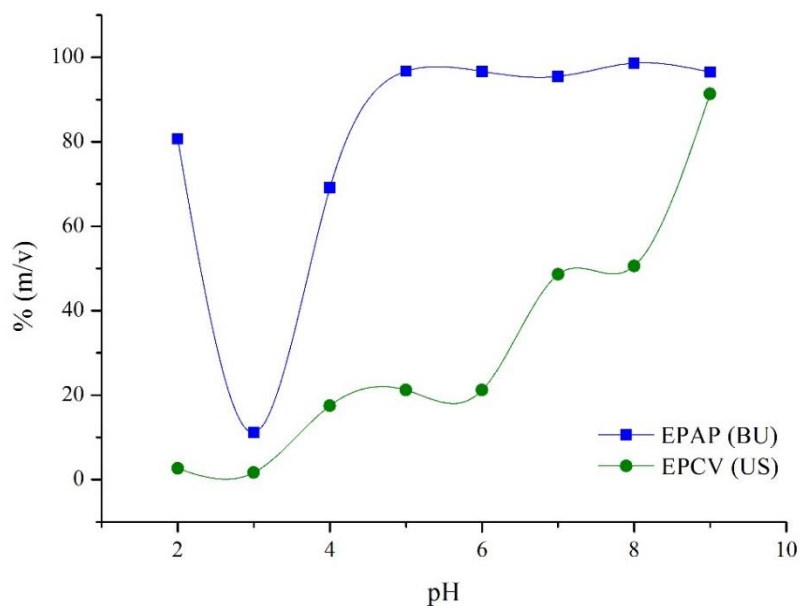


Figura 11: Comportamento da solubilidade dos extratos proteicos expostos a diferentes pHs. EPAP (BU): extrato proteico de *A. platensis* obtido por tratamento ultrassônico em banho de ultrassons; EPCV (US): extrato proteico de *C. vulgaris* obtido por tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda.

A mínima solubilidade encontrada para os extratos proteicos foi de 11% para *A. platensis* e 1,7% para *C. vulgaris*, ambas a pH 3. A menor solubilidade é observada próximo ao ponto isoelétrico das proteínas, devido principalmente à falta de repulsão eletrostática, que provoca a agregação e precipitação através de interações hidrofóbicas (Damodaran et al., 2007). A máxima solubilidade, porém, foi de 96% para *A. platensis* e 91,3% para *C. vulgaris*, ambas observadas a pH 9. Embora as duas microalgas tenham apresentado seus valores superiores e inferiores de solubilidade nos mesmos pHs, as

curvas indicam comportamentos diferentes. A *A. platensis* mostrou-se altamente solúvel a partir de pH 5 (97%), enquanto a *C. vulgaris* só atingiu um valor próximo deste a pH 9 (91,3%).

Benelhadj et al. (2016), ao estudarem o isolado proteico de *A. platensis*, identificaram as condições de máxima solubilidade a pH 10 e mínima solubilidade a pH 3. Ursu et al. (2014), ao estudarem proteínas extraídas a partir da biomassa de *C. vulgaris*, verificaram que a máxima solubilidade ocorria a pH 12 e a mínima a pH 4 tendo concluído que o processo de extração escolhido influencia no rendimento de solubilização das proteínas.

3.2.2.1. Análise espectrofotométrica dos extratos

Através da análise de UV-VIS, foi possível relacionar os picos de absorção observados em função do pH com a presença de alguns pigmentos característicos existentes nos extratos proteicos das microalgas, tal como pode ser observado nos registos da Figura 12. No extrato proteico de *C. vulgaris* obtido por meio de tratamento ultrassónico em equipamento tipo sonda, foi possível observar a presença de picos correspondentes à clorofila b (680 e 430 nm), ambos apresentando maior absorbância a pH 9. Entretanto, como as cianobactérias carecem de clorofila b, o extrato proteico de *A. platensis* obtido por tratamento ultrassónico em banho de ultrassons, apresentou picos na região próxima de 620 nm, o que corresponde à presença de ficocianina (uma ficobiliproteína utilizada pela célula para otimizar a captação de energia da luz). Estes picos apresentaram maior absorbância a pH 5, e menor a pH 3 (Hsieh-Lo et al., 2019). Adicionalmente, foi também possível visualizar a relação entre o pH e a presença de proteínas na solução. Em ambos os extratos proteicos, foi possível observar picos na região próxima a 280 nm, o que corresponde à presença de proteínas. Esses picos apresentaram valores superiores de absorbância a pH 8 para *A. platensis* e a pH 9 para *C. vulgaris*. Os valores inferiores de absorbância foram obtidos a pH 3 para ambos os concentrados proteicos (Chen et al., 2019). Os valores obtidos nesta análise foram semelhantes aos apresentados na Secção 3.2.2.

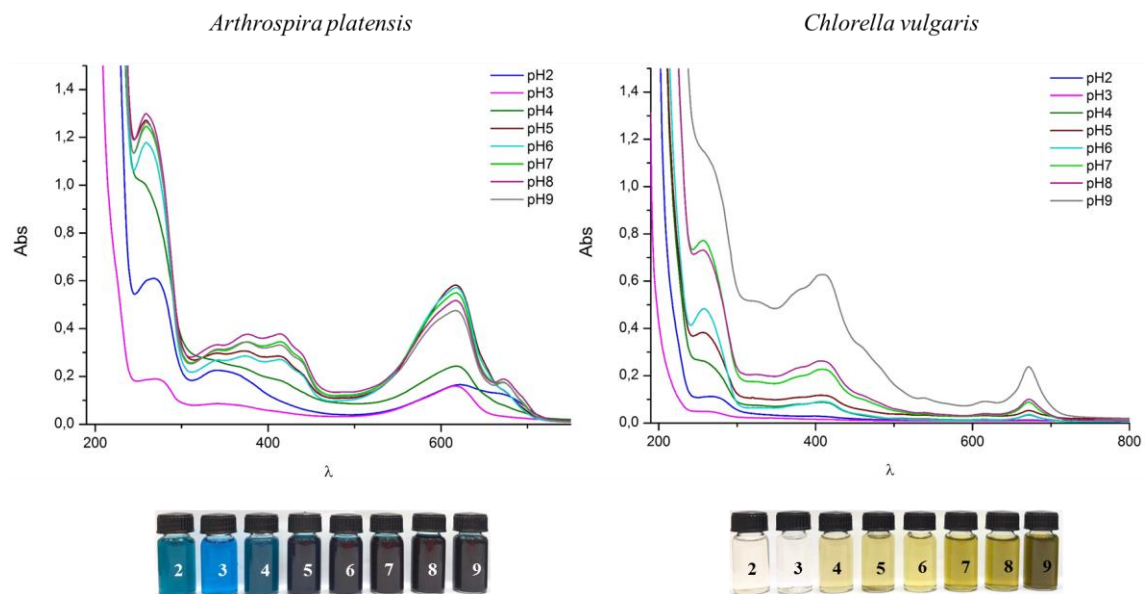


Figura 12: Espectro UV-VIS e observação visual dos extratos proteicos após centrifugação em diferentes pHs.

3.2.3. Análise de cor

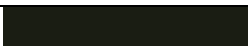
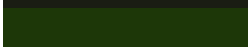


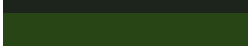
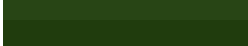

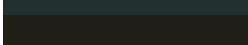
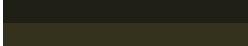
A cor é um dos primeiros parâmetros de qualidade analisados pelo consumidor sendo essencial na aceitação do alimento, pois possibilita a percepção de anomalias ou defeitos que podem influenciar na sua escolha (León et al., 2006). As biomassas de *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, tal como recebidas, apresentavam textura aveludada, forma de pó, e no geral, uma forte coloração verde, como se pode observar na Tabela 9. A *C. vulgaris* apresentou os resultados mais baixos em a^* (verde), devido à sua capacidade de acumular 1 a 2% de clorofila de seu peso seco, o que pode mascarar a cor de outros pigmentos menos concentrados, como os carotenoides (Safi et al., 2015). Já o aumento do valor de a^* para *A. platensis*, deve-se principalmente à presença de ficobiliproteínas que são proteínas que apresentam coloração vermelha e azul (Hsieh-Lo et al., 2019).

As biomassas de *A. platensis*, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, apresentaram uma mudança em relação à sua coloração verde após a etapa de extração de lípidos com hexano, como é possível observar através da diminuição dos valores de a^* apresentados na Tabela 9. Pelo fato do hexano não dissolver os pigmentos solúveis em água (por exemplo a clorofila), o processo pode ter causado o aumento da concentração desse pigmento na biomassa desengordurada (Bai et al., 2011). Adicionalmente, as biomassas

desengorduradas não mostraram grandes diferenças quando comparadas às biomassas antes da extração de lípidos.

Os extratos proteicos de *C. vulgaris* e *N. oceanica* (obtidos por tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda) apresentaram um aumento dos valores de a^* , o que resultou na perda da coloração verde característica, comportamento diferente do observado para a *A. platensis* (obtida por tratamento ultrassônico em banho de ultrassons), que não apresentou mudança em relação a este parâmetro. Os extratos apresentaram diminuição dos valores de b^* , o que para *A. platensis* resultou na revelação da coloração azul característica da ficocianina (Hsieh-Lo et al., 2019). Matile et al. (1999) relataram que a clorofila pode ser degradada rapidamente quando as células entram em colapso, o que pode justificar a perda da coloração verde após o tratamento ultrassônico. Porém, ainda é necessário o desenvolvimento de pesquisas que relacionem a degradação da clorofila com o tratamento ultrassônico.

Tabela 9: Análise de cor das biomassas, biomassas desengorduradas e extratos proteicos de microalgas.

Microalga	L*	a*	b*	Cor
Biomassa				
<i>A. platensis</i>	10,12 ± 0,37	-3,28 ± 0,08	6,02 ± 0,11	
<i>C. vulgaris</i>	20,04 ± 0,32	-17,39 ± 0,16	24,07 ± 0,23	
<i>N. oceanica</i>	15,12 ± 0,42	-13,11 ± 0,09	19,34 ± 0,31	
Biomassa desengordurada				
<i>A. platensis</i>	13,3 ± 0,99	-5,16 ± 0,15	3,95 ± 0,04	
<i>C. vulgaris</i>	26,12 ± 0,10	-19,04 ± 0,07	24,70 ± 0,11	
<i>N. oceanica</i>	22,26 ± 0,53	-18,43 ± 0,30	24,50 ± 0,39	
Extrato proteico				
<i>A. platensis</i>	18,64 ± 0,60	-5,41 ± 0,11	-2,27 ± 0,06	
<i>C. vulgaris</i>	11,8 ± 0,58	-1,12 ± 0,06	6,71 ± 0,06	
<i>N. oceanica</i>	20,16 ± 0,15	-1,23 ± 0,02	13,65 ± 0,03	

Valores expressos em média ± desvio padrão.

3.2.4. Identificação de grupos funcionais por 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 que fornece informações

sobre a estrutura molecular do composto analisado. A Figura 13 apresenta os espectros das biomassas das microalgas *C. vulgaris* (CV) e *A. platensis* (AP), bem como dos seus respectivos extratos proteicos (CVUS, APBU e APUS).

De uma forma geral, os espectros das biomassas de *C. vulgaris* (CV) e *A. platensis* (AP) apresentam bandas que caracterizam a presença de lípidos, carboidratos e proteínas. Para ambas as biomassas, observa-se a presença de uma banda larga em 3278 cm^{-1} associada à contribuição dos grupos O-H e N-H. A presença dos lípidos pode ser identificada pelos estiramentos a 2923 cm^{-1} para CV e AP (C-H) e a 1735 cm^{-1} para CV e 1743 cm^{-1} para AP (C=O). Os dois estiramentos com maior intensidade foram identificados em 1650 cm^{-1} para CV e 1635 cm^{-1} para AP (amida I) e 1535 cm^{-1} (CV e AP) (amida II), caracterizados pela presença de proteínas. Duygu et al. (2012) também encontraram no seu estudo estas duas bandas características da presença de proteínas como as de maior intensidade na microalga *C. vulgaris*. Outro estudo feito por Menegotto et al. (2019) identificaram no espectro da *A. platensis* estas mesmas regiões como as de maior intensidade e características de amidas I e II. A região compreendida entre $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ corresponde à presença dos carboidratos, nomeadamente deformações dos grupos C-O assinalado em 1141 cm^{-1} (polissacáridos), além de estiramentos de grupos C-H (Çelekli et al., 2010; Duygu et al., 2012).

Os extratos proteicos obtidos a partir da *C. vulgaris* (CVUS) e da *A. platensis* por banho de ultrassons (APBU) e ultrassom tipo sonda (APUS) apresentam as mesmas bandas do espectro das biomassas (CV e AP) (Figura 13), porém, nota-se uma diferença de intensidade em alguns estiramentos que são mais evidentes nas biomassas que nos extratos. Um exemplo é a vibração a 1735 cm^{-1} para AP e CV atribuída aos grupos C=O (ésteres) característicos dos lípidos e as vibrações a 1141 cm^{-1} (CV) e 1018 cm^{-1} para CV e 1034 cm^{-1} para SP atribuídas aos grupos C-O e C-H, característicos dos polissacáridos. A diminuição da intensidade destes picos relaciona-se com o fato de que no extrato há uma diminuição de lípidos e carboidratos devido à extração dos mesmos durante o processo de obtenção da fração proteica. Esta evidência também é observada nos extratos proteicos obtidos por meio da *A. platensis* (APBU e APUS). O estiramento que caracteriza a presença da amida primária, 1650 cm^{-1} (CV) e 1635 cm^{-1} (AP), foi um pouco mais intenso nas biomassas do que nos respectivos extratos proteicos. A presença deste grupo funcional na estrutura proteica pode provocar a interação das proteínas com a água mediante ligações de hidrogénio, permitindo um melhor desempenho quanto a propriedades como a capacidade de absorção de água (Menegotto et al., 2019).

Relativamente ao estiramento que caracteriza a amida secundária (1535 cm^{-1}), esse pico foi mais intenso para a biomassa de *A. platensis* e menos intenso em seu extrato proteico APBU. Na biomassa e no extrato proteico de *C. vulgaris* não houve diferença entre a intensidade observada para este pico.

Assim, conclui-se que a maioria dos compostos presentes nas biomassas foram conservados nos extratos, havendo apenas uma diminuição da intensidade de alguns dos estiramentos que caracterizam compostos extraídos durante o processo de obtenção da fração proteica.

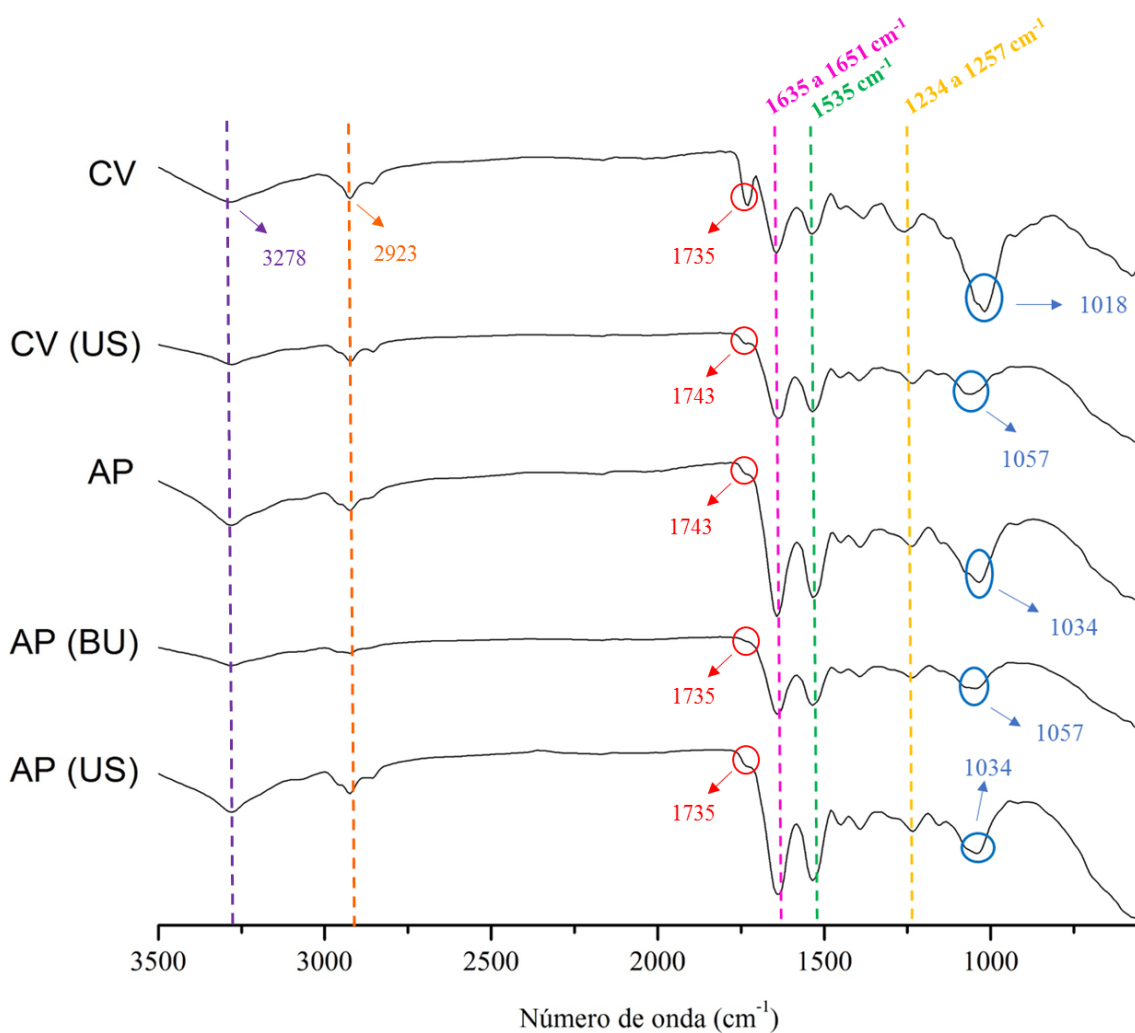


Figura 13: Espectros de infravermelho obtidos para as biomassas e extratos proteicos de *A. platensis* e *C. vulgaris*. CV: biomassa de *C. vulgaris*; CV (US): extrato proteico de *C. vulgaris* obtido através de tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda; AP: biomassa de *A. platensis*; AP (BU): extrato proteico de *A. platensis* obtido através de tratamento ultrassônico em banho de ultrassons; AP (US): extrato proteico de *A. platensis* obtido através de tratamento ultrassônico em equipamento tipo sonda.

3.3.6. Capacidade de absorção de água ($CA_{\text{água}}$) e de óleo ($CA_{\text{óleo}}$)

A capacidade de absorção de água das proteínas é uma propriedade física que permite avaliar a capacidade de evitar que a água seja liberada da estrutura proteica. Esta propriedade desempenha um papel fundamental na formação de textura, cor e nas propriedades sensoriais dos alimentos, especialmente em produtos cárneos e massas cozidas, devido à sua influência nas propriedades funcionais relevantes das proteínas, nomeadamente solubilidade, propriedades emulsionantes, viscosidade e gelificação (Zayas, 2012).

A $CA_{\text{água}}$ dos extratos proteicos de *A. platensis* e *C. vulgaris* estão apresentados na Figura 14. A maior $CA_{\text{água}}$ foi de $19,13 \pm 2,00$ g de água/g de proteína para *C. vulgaris*, enquanto a menor foi de $10,31 \pm 0,50$ g de água/g de proteína para *A. platensis*. Esse resultado pode ser afetado pela conformação da proteína, equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico dos aminoácidos e outras características intrínsecas (Chen et al., 2019).

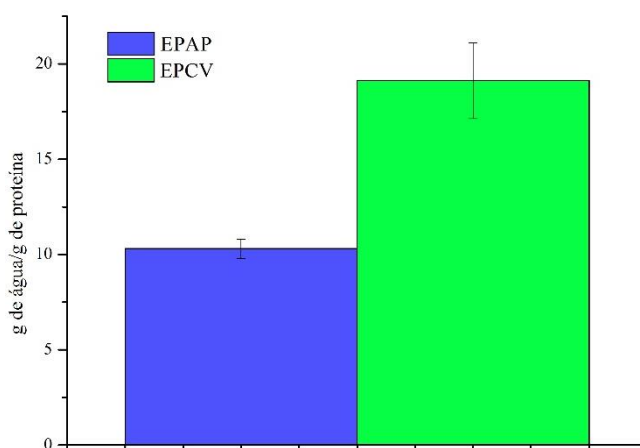


Figura 14: Capacidade de absorção de água dos extratos proteicos EPAP: extrato proteico de *A. platensis*; EPCV: extrato proteico de *C. vulgaris*.

Benelhadj et al. (2016), ao estudarem as proteínas de *A. platensis*, obtiveram o valor de $3,35 \pm 0,19$ g de água/g de proteína para $CA_{\text{água}}$ a pH 7 e 1 % (m/v) de extrato proteico, enquanto Menegotto et al. (2019) obtiveram $16,58 \pm 0,16$ g de água/g de proteína a pH 5 e 0,4 % (m/v) de extrato proteico. Chen et al. (2019), também para as proteínas de *A. platensis*, encontraram valores de $2,81 \pm 0,04$ g de água/g de proteína, e $2,02 \pm 0,05$ g de água/g de proteína para a *Chlorella pyrenoidosa*, ambas sem mudança do pH e 5 % (m/m) de extrato proteico.

A capacidade de absorção de óleo é uma propriedade física atribuída ao aprisionamento do óleo pelas proteínas. A ligação do óleo é feita principalmente com proteínas e carboidratos e influencia diretamente as propriedades texturais e sensoriais dos alimentos, como por exemplo em produtos emulsionados (Zayas, 2012).

A $CA_{\text{óleo}}$ dos extratos proteicos de *A. platensis* e *C. vulgaris* estão apresentados na Figura 15. A maior $CA_{\text{óleo}}$ foi de $21,73 \pm 3,32$ g de óleo/g de proteína para *A. platensis*, enquanto a menor foi de $10,71 \pm 0,45$ g de óleo/g de proteína para *C. vulgaris*. A absorção de óleo é influenciada pela composição da proteína, disponibilidade de grupos lipofílicos, tamanho de partícula e temperatura (Zayas, 2012).

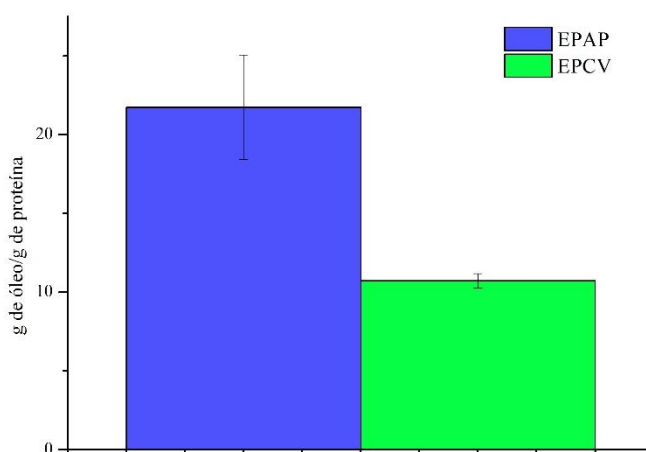


Figura 15: Capacidade de absorção de óleo dos extratos proteicos EPAP: extrato proteico de *A. platensis*; EPCV: extrato proteico de *C. vulgaris*.

Benelhadj et al. (2016), ao estudarem as proteínas de *A. platensis*, obtiveram o valor de $2,53 \pm 0,10$ g de óleo/g de proteína para $CA_{\text{óleo}}$ a pH7 e 1 % (m/v). Chen et al. (2019), também para as proteínas de *A. platensis*, encontraram valores de $8,37 \pm 1,45$ g de óleo/g de proteína e $6,68 \pm 0,41$ g de água/g de proteína de *Chlorella pyrenoidosa*, ambas sem mudança do pH e 5 % (m/m) de extrato proteico.

3.3.8. Capacidade de formação e estabilidade de espuma (CF_{espuma} e E_{espuma})

As espumas são dispersões de bolhas de gás numa fase líquida ou semissólida contínua. Em alimentos, essas bolhas de gás são responsáveis pela textura característica de produtos como milk-shakes, chantilly, sorvete, merengue, bolos e pão, o que torna o

conhecimento das características da espuma um critério importante de qualidade alimentar. A CF_{espuma} é a propriedade referente à dimensão da área interfacial que pode ser criada pela proteína durante a formação de espuma, medida através do aumento do volume. Esta propriedade é afetada principalmente pela hidrofobicidade superficial da proteína. Já a E_{espuma} é uma propriedade referente à resistência da espuma, e depende principalmente da flexibilidade e da resistência mecânica do filme de proteína que envolve a bolha de ar. As espumas podem ser desestabilizadas pela ação da gravidade, pressão, evaporação, calor, e pela difusão do gás das bolhas menores para as maiores (Sikorski, 2001).

A CF_{espuma} e E_{espuma} dos extratos proteicos de *A. platensis* e *C. vulgaris* estão apresentados na Figura 16. O maior valor de CF_{espuma} foi de $59,66 \pm 4,83$ % para *A. platensis*, enquanto o menor foi de $35,03 \pm 9,77$ % para *C. vulgaris*, ao contrário da E_{espuma} , que mostrou melhor resultado para o extrato proteico de *C. vulgaris* ($22,65 \pm 0,60$ %), comparativamente ao extrato proteico de *A. platensis* ($18,43 \pm 5,37$ %).

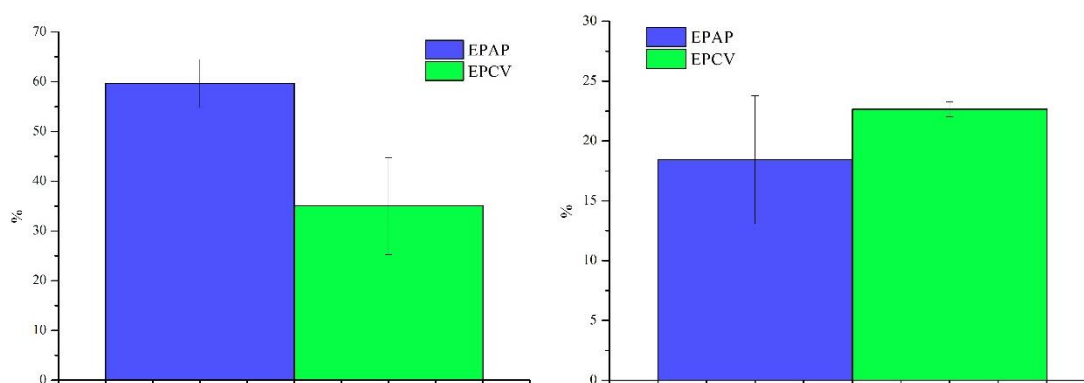


Figura 16: Capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma, respectivamente, dos extratos proteicos EPAP: extrato proteico de *A. platensis*; EPCV: extrato proteico de *C. vulgaris*.

Chen et al. (2019), analisaram a CF_{espuma} de proteínas microalgais em diferentes pHs, e verificaram que o valor máximo se observou a pH 3 ($54,02 \pm 6,57$ %) para *A. platensis* e a pH 9 ($36,88 \pm 6,15$ %) para *Chlorella pyrenoidosa*. Além disso, concluíram que os resultados foram inferiores para as proteínas de amendoim e soja. Menegotto et al. (2019) também analisaram a CF_{espuma} e E_{espuma} do extrato proteico de *A. platensis* em diferentes pHs e, por meio de outra metodologia, registraram o valor máximo a pH 8 para ambas as propriedades ($CF_{\text{espuma}} = 226,46 \pm 7,49$ % e $E_{\text{espuma}} = 80,38 \pm 2,03$ %). Adicionalmente, os resultados foram comparados à proteína da clara do ovo, que é comumente utilizada na indústria alimentar.

3.3.9. Quantificação da ficocianina

Cerca de 15 a 20% das proteínas presentes na biomassa de *Arthrospira spp.* são compostas por ficobiliproteínas, entre estas, a ficocianina (um pigmento fotossintético de cor azul) é o pigmento encontrado na concentração superior. O principal interesse comercial neste composto deve-se ao seu elevado rendimento proteico e à sua fácil extração, para além de exibir propriedades biológicas como antioxidante, hepatoprotetora, anti-inflamatória e neuro-protetora (Chentir et al., 2018; Hsieh-Lo et al., 2019).

Através da análise realizada, o extrato proteico de *A. platensis* obtido por meio de tratamento ultrassónico em banho de ultrassons apresentou uma maior concentração de ficocianina que também revelou ser de maior pureza ($116,14 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ e $0,23 \pm 0,01$, respectivamente), enquanto o extrato proteico obtido por meio de tratamento ultrassónico em ultrassom tipo sonda obteve concentração de ficocianina de $95,77 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ e pureza de $0,19 \pm 0,01$.

Considerando que da Silva et al. (2019), para a biomassa de *A. platensis*, obtiveram uma concentração de $1,44 \text{ mg/mL} \pm 0,01$ de ficocianina e pureza de $0,33 \pm 0,01$, podemos concluir que o extrato proteico obtido neste estudo, apresentou concentração inferior de ficocianina em relação a biomassa desidratada. A baixa concentração encontrada pode ser justificada pelo fato de o extrato proteico ter passado por processos severos (como por exemplo a extração de lípidos por solvente e tratamento ultrassónico), o que pode ter acarretado a perda de quantidades significativas de ficocianina.

3.3. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES COM EXTRATO PROTEICO DA *Arthrospira platensis*

3.3.1. Planeamento Fatorial Fracionado (2^{4-1})

Para o desenvolvimento das emulsões, foi escolhida a microalga que apresentou maior rendimento proteico, ou seja, a *A. platensis*. Entretanto, apesar do extrato proteico obtido por tratamento ultrassónico em equipamento tipo sonda ter conduzido a um rendimento global e proteico superiores, o extrato obtido por banho de ultrassons apresentou teor em

ficocianina superior, para além de uma baixa quantidade de lípidos, indicando que este extrato tem no global uma qualidade superior.

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas e as respostas de potencial zeta e tamanho de partícula estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10: Matriz do PFF 2⁴⁻¹ com valores reais e codificados das variáveis dependentes e independentes para o desenvolvimento de emulsões com extrato proteico de *A. platensis*.

Ensaio	x ₁ ^a	x ₂ ^b	x ₃ ^c	x ₄ ^d	y ₁ ^e	y ₂ ^f	y ₃ ^g
1	-1 (10/90)	-1 (1)	-1 (4)	-1 (0)	-45,52	0,10	0,38
2	1 (30/70)	-1(1)	-1 (4)	1 (14)	-34,68	0,02	1,14
3	-1 (10/90)	1 (4)	-1 (4)	1 (14)	-40,78	0,02	0,15
4	1 (30/70)	1 (4)	-1 (4)	-1 (0)	-55,06	0,05	0,33
5	-1 (10/90)	-1 (1)	1 (7)	1 (14)	-38,86	0,15	0,50
6	1 (30/70)	-1 (1)	1 (7)	-1 (0)	-49,66	0,43	1,17
7	-1 (10/90)	1 (4)	1 (7)	-1 (0)	-48,72	0,02	0,15
8	1 (30/70)	1 (4)	1 (7)	1 (14)	-38,60	0,05	0,36
9	0 (20/80)	0 (2,5)	0 (5,5)	0 (7)	-43,44	0,17	6,12
10	0 (20/80)	0 (2,5)	0 (5,5)	0 (7)	-45,92	0,14	1,81

^a Razão óleo/água; ^b Concentração de extrato proteico (%); ^c pH; ^d Tempo de armazenamento (dias); ^e Potencial zeta (mV); ^f Tamanho de partícula em número (µm); ^g Tamanho de partícula em volume (µm).

Através da análise dos resultados da Tabela 10 foi possível calcular os efeitos das quatro variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 11. Verificou-se que a variável tempo de armazenamento apresentou efeito significativo ($p \leq 0,10$) sobre a resposta potencial zeta. Quanto à resposta tamanho de partícula em número e em volume, nenhuma variável foi significativa.

Tabela 11: Efeito dos fatores estudados no PFF 2⁴⁻¹ sobre os resultados de potencial zeta e tamanho de partícula em número e volume

Fatores	Potencial zeta (mV)				Tamanho de partícula em número D ₅₀ (µm)				Tamanho de partícula em volume D ₅₀ (µm)			
	Efeito	Erro Padrão	t (4)	p - valor	Efeito	Erro Padrão	t (4)	p - valor	Efeito	Erro Padrão	t (4)	p - valor
Média	-44,0	1,14	-38,54	0,0000*	0,10	0,04	2,76	0,0508*	0,52	0,54	0,96	0,3897
Curvatura	-1,39	5,10	-0,27	0,7988	0,09	0,17	0,57	0,5992	6,88	2,43	2,84	0,0470*
x₁^a	-1,03	2,28	-0,45	0,6752	0,06	0,07	0,86	0,4366	0,45	1,08	0,42	0,6975
x₂^b	-3,61	2,28	-1,58	0,1889	-0,14	0,07	-1,86	0,1358	-0,55	1,08	-0,51	0,6372
x₃^c	0,05	2,28	0,02	0,9836	0,12	0,07	1,55	0,1955	0,05	1,08	0,04	0,9672
x₄^d	11,5	2,28	5,04	0,0073*	-0,09	0,07	-1,19	0,3001	0,03	1,08	0,03	0,9799

^a Razão óleo/água; ^b Concentração de extrato proteico (%); ^c pH; ^d Tempo de armazenamento (dias); * p ≤ 0,10.

A razão óleo/água não apresentou efeito significativo para as três respostas avaliadas, possuindo um efeito negativo para a resposta de potencial zeta e efeito positivo para ambas as respostas definidas para o tamanho de partícula. Esse resultado permite concluir que a emulsão possa ser efetuada com uma menor concentração de óleo, fato que é interessante para a indústria alimentar.

A concentração de extrato proteico não apresentou efeito significativo para as três respostas avaliadas, possuindo um efeito negativo. Esse resultado indica que a emulsão efetuada com uma maior concentração de extrato proteico, apresenta menores valores de potencial zeta e tamanho de partícula (em número e volume).

O pH não exerceu efeito significativo em nenhuma das respostas estudadas, possuindo efeito positivo para todas. Esse resultado permite que a emulsão seja produzida em vários pHs, nomeadamente no pH próprio do extrato obtido (~7,0), o que pode acarretar simplificações do processo de produção das emulsões.

O tempo de armazenamento foi significativo para o potencial zeta, porém não exerceu efeito significativo para ambas as respostas associadas ao tamanho de partícula. Para a resposta tamanho de partícula em número, esta variável apresentou efeito negativo, enquanto que para as respostas potencial zeta e tamanho de partícula em volume apresentou efeito positivo. A influência do tempo de armazenamento no potencial zeta pode estar relacionada com a composição da amostra. É possível que a quantidade de emulsionante utilizada não tenha sido suficiente para estabilizar a quantidade de óleo usada, causando com a evolução do tempo separação de fases (Schreiner et al., 2020).

3.3.1.1. Potencial zeta

A compreensão das interações de carga elétrica são essenciais no desenvolvimento de sistemas alimentares por afetarem propriedades como textura, reologia, sabor e cor, sendo determinantes para a estrutura e estabilidade do alimento. A estabilidade e/ou instabilidade é influenciada pelas propriedades da camada adsorvida formada na superfície das gotículas da emulsão, sendo que a estrutura desta camada está relacionada com a composição e concentração do emulsionante presente. Através da aplicação de um campo elétrico, é possível estudar as cargas das partículas através da migração em direção aos eletrodos. A carga superficial (potencial zeta) da gota, assim como a interação interfacial de energia livre, são os parâmetros que determinam a estabilidade. Geralmente,

a estabilidade da emulsão tem sido associada a valores em torno de ± 30 mV (Cano-Sarmiento et al., 2018; Wiacek & Chibowski, 1999).

As emulsões analisadas no dia 14 (Ensaio 2, 3, 5 e 8) apresentaram os menores valores em módulo de potencial zeta (-34,68 mV, -40,78 mV, -38,86 mV e 38,60 mV, respectivamente). Todas as emulsões analisadas no dia 0 (Ensaio 1, 4, 6 e 7) e no dia 7 (Ensaio 9 e 10) apresentaram valores inferiores a -40 mV. O melhor valor obtido observou-se para o Ensaio 4 (-55,06 mV), que corresponde ao dia 0. Shimada et al. (2017) observaram potencial zeta de -20 mV para uma emulsão preparada a partir do extrato proteico de *A. platensis*. A emulsão foi preparada a partir de 10 g/L de extrato proteico, a um pH 6 e usando uma razão óleo/água de 10/90.

Através dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que todas as emulsões preparadas dão a indicação de serem estáveis, devido ao fato de terem apresentado valores de potencial zeta inferiores a -30 mV.

3.3.1.2. Tamanho de partícula

A estabilidade de uma emulsão pode ser medida através da taxa à qual ocorre a formação de creme, floculação ou coalescência. A taxa destas mudanças pode ser medida através da determinação do tamanho e distribuição das gotículas de óleo na emulsão, sendo que quanto menor a gota, maior é a estabilidade da emulsão em relação à separação gravitacional. A análise foi realizada através da técnica de difração a laser, onde um raio laser atravessa a amostra e os fótons são difratados. A luz difratada é detectada em uma faixa de ângulos que estão relacionados com o tamanho das partículas (McClements, 2015).

A Tabela 10 mostra a distribuição do tamanho de partícula em volume e em número expresso em D_{50} , que corresponde ao tamanho máximo da partícula para 50% em número ou volume, respectivamente. Foi possível observar que as emulsões apresentaram uma distribuição de tamanhos em número que variou de 0,02 a 0,43 μm , tendo o menor valor sido atribuído ao Ensaio 2 e o maior valor ao Ensaio 6. A distribuição de tamanhos em volume variou de 0,15 a 6,12 μm , onde o menor valor foi verificado para o Ensaio 3 e o maior valor para o Ensaio 9.

Pela observação da Figura 17, verifica-se que as distribuições em número e em volume para as emulsões do dia 0 apresentaram comportamentos diferentes. O Ensaio 7

apresentou tamanhos inferiores em ambas as distribuições (número e volume), enquanto para o Ensaio 6 correspondeu a tamanhos superiores.

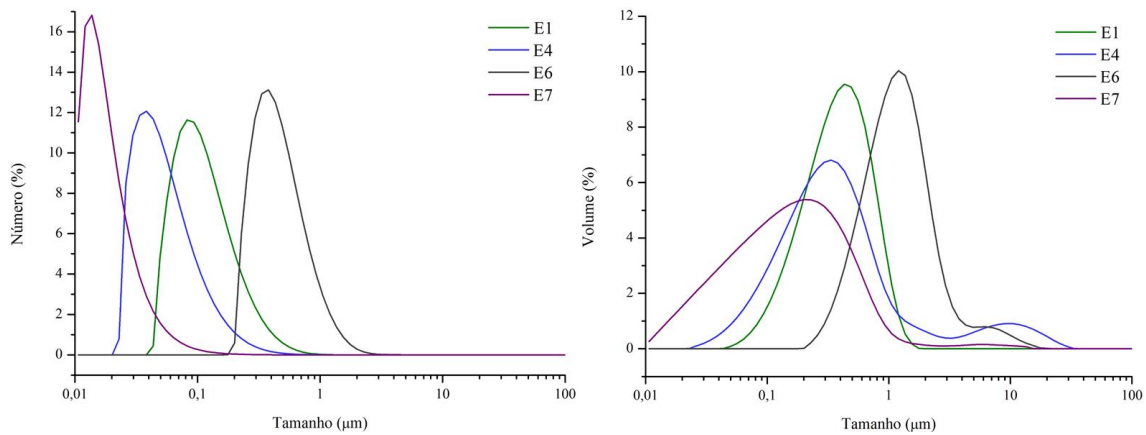


Figura 17: Tamanho de partícula em número e volume, respectivamente, das emulsões analisadas no dia 0.

Através da Figura 18, observa-se que as distribuições em número e em volume para as emulsões do dia 7 apresentaram comportamentos semelhantes.

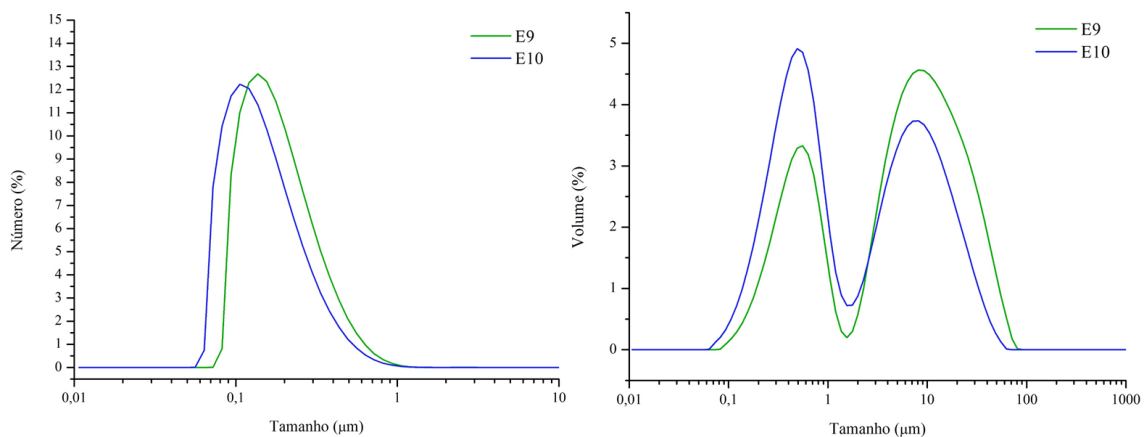


Figura 18: Tamanho de partícula em número e volume, respectivamente, das emulsões analisadas no dia 7.

Pela observação da Figura 19, verifica-se que as distribuições em número e em volume para as emulsões do dia 14 apresentaram comportamentos diferentes. Para a distribuição de número, os Ensaio 2 e 3 apresentaram tamanhos inferiores, enquanto que para o Ensaio 5 apresentou tamanhos superiores. Entretanto, para a distribuição de volume, o Ensaio 2 tamanhos superiores, enquanto o Ensaio 3 ainda apresentou tamanhos inferiores.

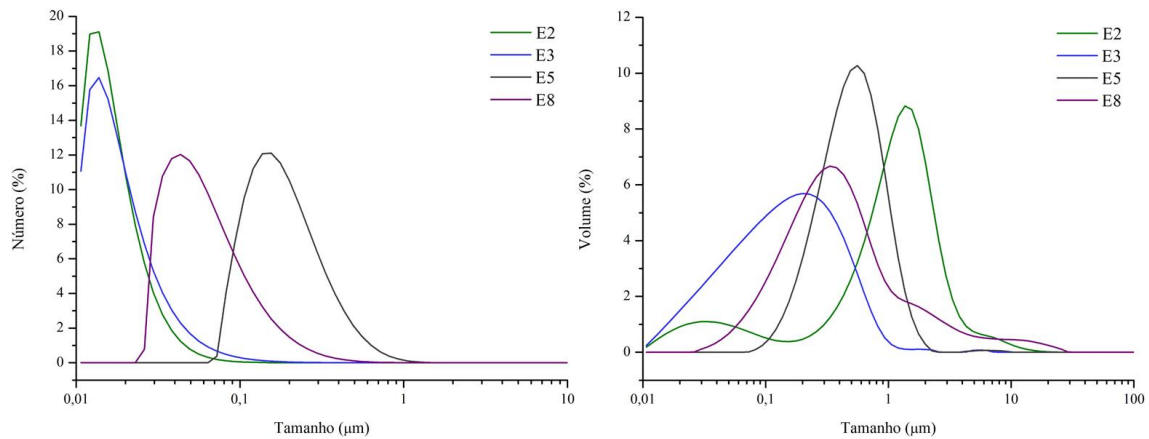


Figura 19: Tamanho de partícula em número e volume, respectivamente, das emulsões analisadas no dia 14.

3.3.2. Estabilidade visual e análise microscópica das emulsões

A Figura 20 reúne a análise microscópica realizada para os tempos selecionados. A observação de um tamanho inferior para as gotículas indica uma emulsão mais estável. Em contrapartida, o aumento do tamanho das gotículas e a falta de homogeneidade indicam a ocorrência de processos de coalescência, ou seja, processos que levam à instabilidade da emulsão (McClements, 2015). Todas as emulsões apresentaram gotículas de pequenas dimensões. Contudo as emulsões analisadas no dia 7 (Ensaio 9 e 10), revelaram uma baixa homogeneidade o que pode indicar o início de um processo de coalescência. Também foi possível observar um ligeiro aumento do tamanho das gotículas ao longo do tempo (através das análises realizadas no dia 14).

A Figura 21 mostra o registo fotográfico do ensaio efetuado para a avaliação do *creaming index*, nomeadamente todos os ensaios avaliados nos dias 0, 7 e 14, a fim de analisar a ocorrência de mudanças visuais relacionadas a estabilidade das emulsões. Os ensaios não apresentaram a formação de sêrum na faixa de tempo analisada (14 dias). Nos Ensaio 2, 6, 9 e 10, foi possível observar a formação de uma fina camada azul no fundo das provetas a partir do dia 14. Nos Ensaio 1, 2, 5 e 6, foi possível observar a formação de uma camada oleosa no topo da emulsão a partir do dia 7. Todos os ensaios revelaram visualmente estabilidade no dia 0.

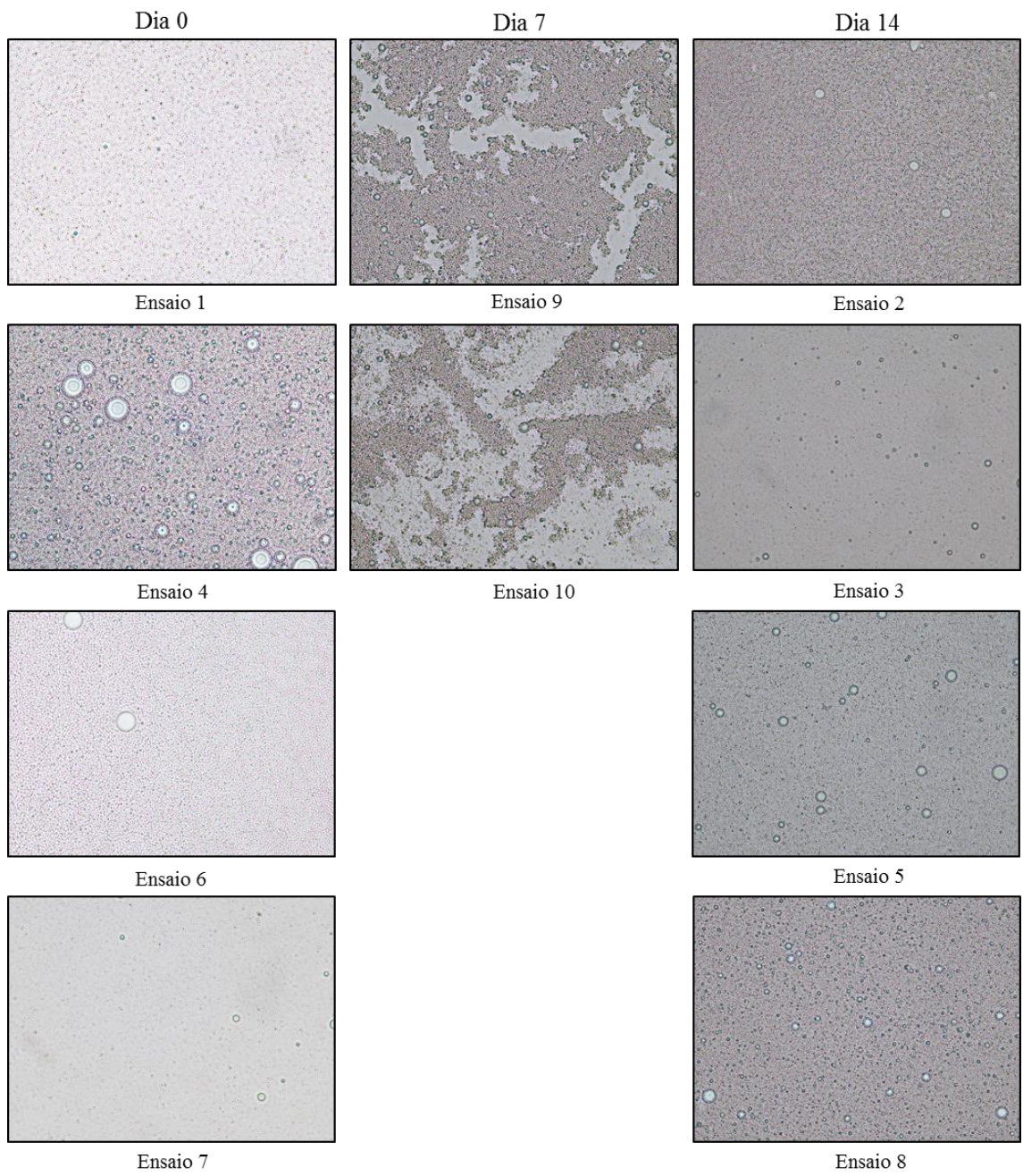


Figura 20: Imagens microscópicas (400x) das emulsões nos dias 0, 7 e 14.

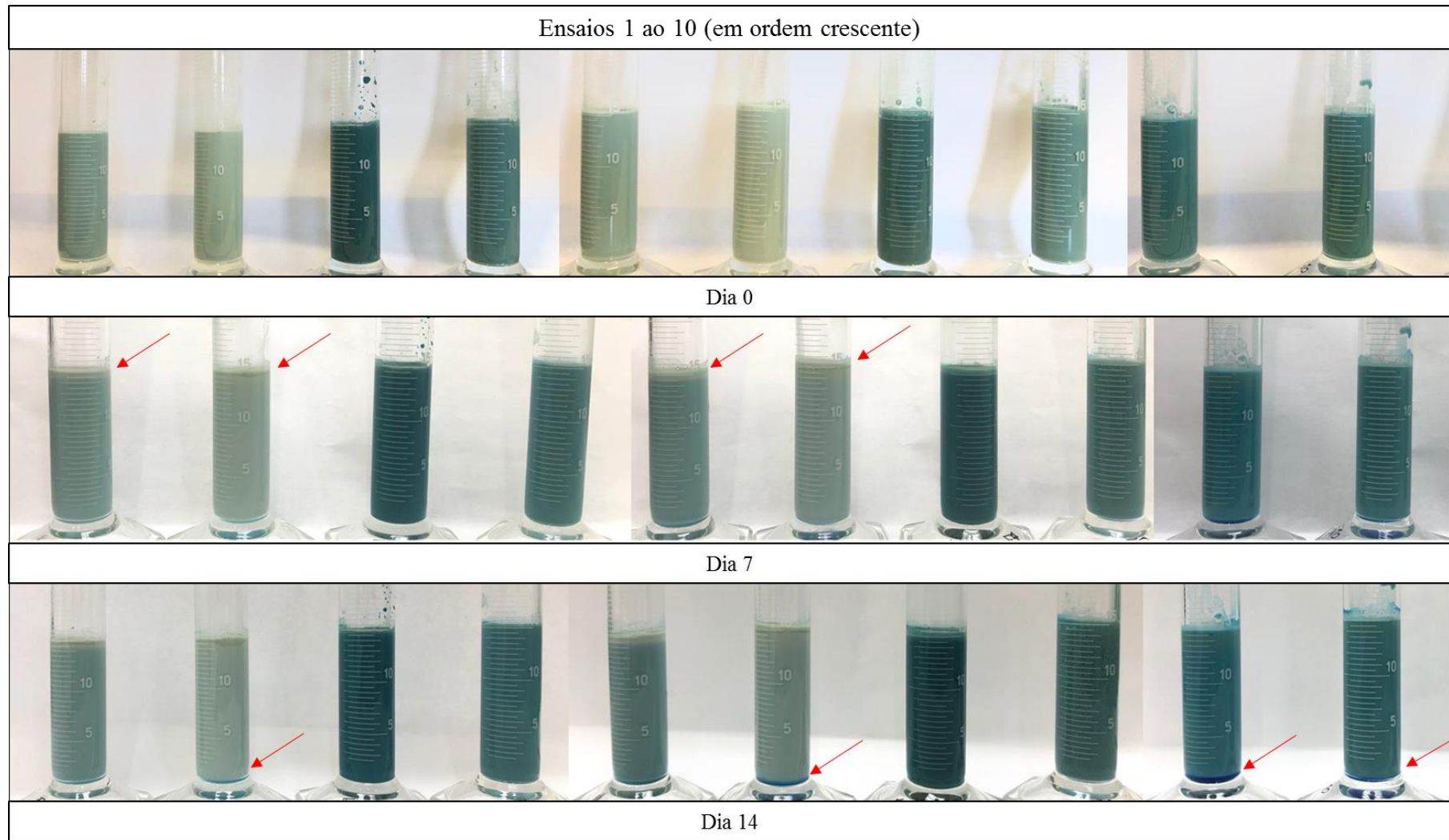


Figura 21: Observação do creaming index das emulsões.

3.3.3. Análise de cor

As emulsões formadas a partir do extrato proteico de *A. platensis* apresentaram textura pouco viscosa e uma coloração verde azulada característica desta microalga, como pode ser observado na Tabela 12. Não houve grande alteração nos valores de L*, a* e b* dos ensaios em função do tempo e com a variação de pHs na gama estudada. Contudo, a coloração verde-azulada do extrato proteico de *A. platensis* influenciou a coloração final da emulsão, sendo que quanto maior a concentração de extrato proteico, menores foram os valores de L*, a* e b*, ou seja, mais escura, mais verde e mais azul a emulsão se tornou. Também foi possível observar a dependência da razão óleo/água na coloração da emulsão, sendo que com o aumento da óleo/água, maiores foram os valores de L*, a* e b*, ou seja, menos escura, menos verde e menos azul a emulsão.

Tabela 12: Análise de cor das emulsões.

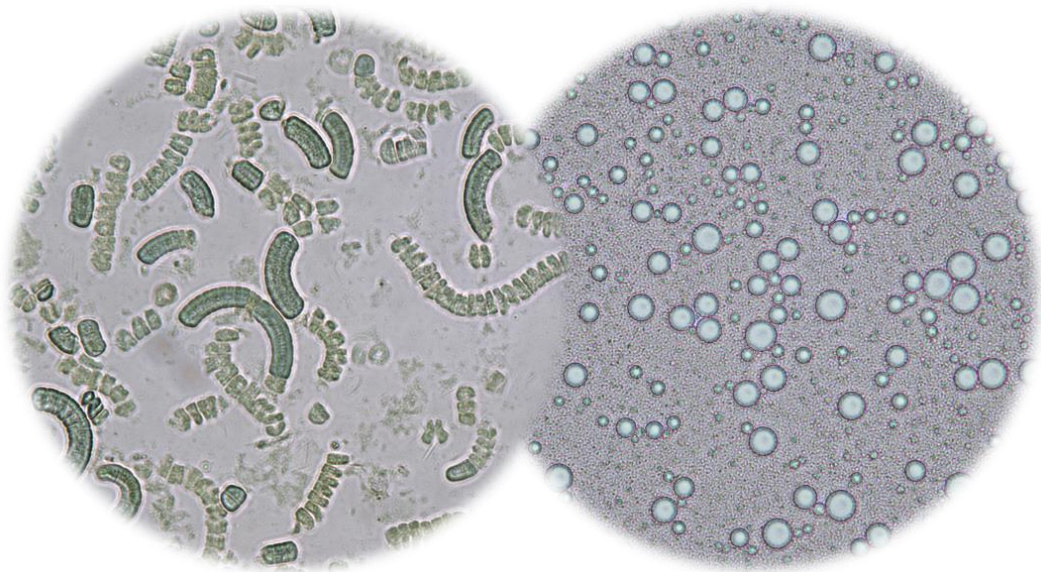
Ensaio	Dia 0				Dia 7				Dia 14			
	L*	a*	b*	Cor	L*	a*	b*	Cor	L*	a*	b*	Cor
1	58,82 ± 0,01	-6,38 ± 0,01	-2,42 ± 0,01		59,91 ± 0,02	-6,80 ± 0,00	-2,44 ± 0,02		60,75 ± 0,00	-6,93 ± 0,02	-2,55 ± 0,01	
2	64,94 ± 0,00	-5,87 ± 0,01	0,66 ± 0,00		66,30 ± 0,05	-5,97 ± 0,02	1,27 ± 0,04		65,54 ± 0,07	-6,44 ± 0,04	-0,87 ± 0,11	
3	41,43 ± 0,02	-6,70 ± 0,03	-7,94 ± 0,02		41,97 ± 0,02	-6,82 ± 0,02	-8,87 ± 0,00		42,41 ± 0,01	-6,96 ± 0,02	-9,44 ± 0,01	
4	49,87 ± 0,00	-7,63 ± 0,02	-6,00 ± 0,01		50,83 ± 0,03	-7,72 ± 0,01	-6,21 ± 0,02		51,32 ± 0,02	-7,92 ± 0,01	-6,65 ± 0,01	
5	57,02 ± 0,05	-5,81 ± 0,01	-3,92 ± 0,03		57,12 ± 0,05	-6,25 ± 0,01	-4,67 ± 0,04		58,28 ± 0,01	-6,33 ± 0,00	-4,34 ± 0,01	
6	63,62 ± 0,01	-4,66 ± 0,01	-1,50 ± 0,01		64,41 ± 0,00	-4,93 ± 0,01	-1,52 ± 0,02		64,91 ± 0,02	-5,17 ± 0,01	-1,45 ± 0,06	
7	41,70 ± 0,03	-6,79 ± 0,02	-5,95 ± 0,03		42,24 ± 0,01	-6,95 ± 0,01	-6,68 ± 0,01		42,43 ± 0,01	-7,19 ± 0,03	-7,01 ± 0,01	
8	51,91 ± 0,01	-6,36 ± 0,02	-4,57 ± 0,03		52,44 ± 0,01	-6,73 ± 0,01	-4,79 ± 0,02		52,81 ± 0,01	-6,91 ± 0,02	-4,82 ± 0,01	
9	47,93 ± 0,09	-9,04 ± 0,02	-7,77 ± 0,00		48,47 ± 0,12	-8,68 ± 0,03	-8,89 ± 0,06		48,83 ± 0,05	-8,45 ± 0,03	-9,97 ± 0,08	
10	49,45 ± 0,05	-9,38 ± 0,02	-6,04 ± 0,02		49,84 ± 0,05	-9,33 ± 0,03	-6,65 ± 0,01		49,85 ± 0,13	-9,20 ± 0,04	-7,07 ± 0,01	

Valores expressos em média ± desvio padrão.

Capítulo 4

Conclusão e Trabalho

Futuro



4. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO

O presente trabalho teve como objetivo extrair as proteínas das microalgas *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oceanica*, visando sua utilização como emulsionantes. A extração foi realizada através de tratamento ultrassônico em dois equipamentos, nomeadamente banho e sonda, utilizando agitação em meio alcalino. Afim de avaliar qual o melhor método de extração para cada microalga, foi realizada a caracterização de suas biomassas, biomassas desengorduradas e do extrato proteico. Através desta caracterização, foi possível obter o rendimento global e proteico de cada extração, além de se observar um aumento da concentração de proteínas e uma diminuição da concentração de lípidos para todos os extratos proteicos, indicando que o processo de extração de proteínas através do tratamento ultrassônico e o processo de extração de lípidos por Soxhlet foram eficazes. Como esperado, a *A. platensis* apresentou os melhores resultados de rendimento proteico. Entre as duas técnicas utilizadas, o extrato proteico obtido através de tratamento ultrassônico em banho de ultrassons apresentou menor teor de lípidos e maior quantidade de ficocianina, indicando uma melhor qualidade do extrato.

Ao analisar as funcionalidades tecnológicas dos extratos proteicos, foi possível concluir que o de *C. vulgaris* apresenta maior capacidade de absorção de água e estabilidade de espuma, enquanto que o de *A. platensis* apresenta maior capacidade de absorção de óleo e formação de espuma. Também foi possível concluir que ambos os extratos apresentam um ponto isoelétrico próximo de pH 3 e uma solubilidade máxima num pH próximo de 9. Por meio da análise de FTIR, foi possível concluir que a maioria dos compostos presentes nas biomassas foram conservados nos extratos, havendo apenas uma diminuição da intensidade de alguns dos estiramentos que caracterizam compostos extraídos durante o processo de obtenção da fração proteica.

O Planejamento Fatorial Fracionado permitiu concluir que a variável tempo de armazenamento apresentou um efeito positivo sobre a resposta potencial zeta. Os ensaios não mostraram uma separação da fase aquosa aparente, apresentaram valores de potencial zeta inferiores a -30 mV, tamanho de partícula em número de 0,02 a 0,43 μm e em volume de 0,15 a 6,12 μm .

Em síntese, é possível concluir que o extrato proteico de *A. platensis* é uma alternativa promissora para a substituição de emulsionantes sintéticos e/ou de origem animal,

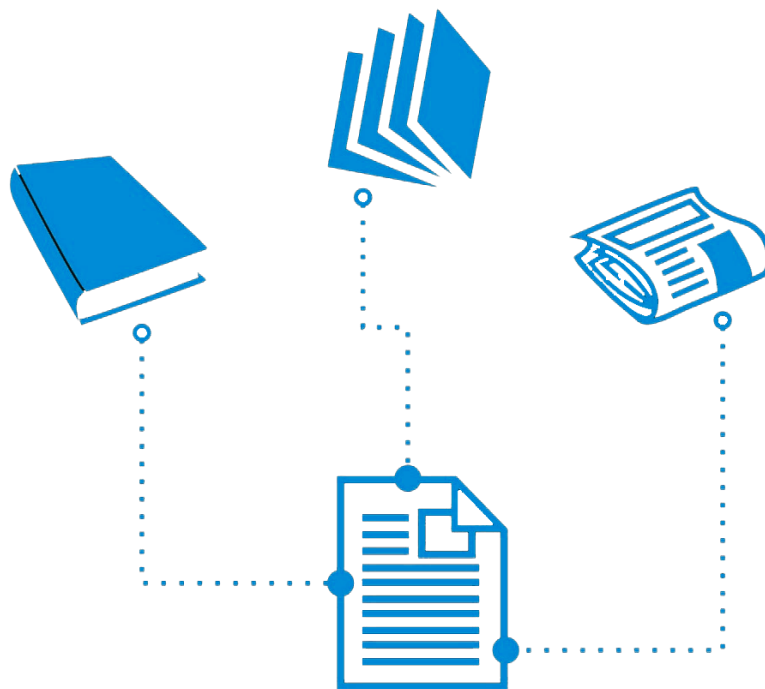
apresentando-se como um ótimo emulsionante, capaz de manter a estabilidade da emulsão por pelo menos 14 dias (período analisado).

O presente estudo consistiu num estudo inicial sobre a utilização do extrato proteico de microalgas como agente emulsionante, podendo ainda ser explorado em trabalhos futuros. Alguns exemplos incluem:

- Dar continuidade aos estudos da aplicação do extrato proteico de *A. platensis* como agente emulsionante, através da otimização do processo de desenvolvimento das emulsões, além da aplicação alimentar e análise sensorial para avaliação da aceitação do consumidor;
- Estudar técnicas de extração efetiva para as proteínas de *C. vulgaris* e *N. oceanica*. Um exemplo pode ser através da aplicação de uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais para determinação das melhores condições de extração;
- Estudar a aplicação de extratos proteicos de outras microalgas como agentes emulsionantes, a fim de compará-los aos resultados obtidos no presente estudo.

Capítulo 5

Referências



5. REFERÊNCIAS

- Abalde, J. and, Betancourt, Liliana and Torres, E. and, Cid, A. and, & Barwell, C. (1998). Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, *136*, 109–120.
- Alavijeh, R. S., Karimi, K., Wijffels, R. H., van den Berg, C., & Eppink, M. (2020). Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource Technology*, *309*, 123321.
- Ashour, M., Elshobary, M. E., El-Shenody, R., Kamil, A. W., & Abomohra, A. E. F. (2019). Evaluation of a native oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed. *Biomass and Bioenergy*, *120*, 439–447.
- AOAC. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. USA: AOAC INTERNATIONAL.: (D. G. W. L. Jr; Ed.) (20th ed.).
- Bai, M. Der, Cheng, C. H., Wan, H. M., & Lin, Y. H. (2011). Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *42*, 783–786.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, *25*, 207–210.
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., & Khosravi-Darani, K. (2013). Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* Algae into Probiotic Fermented Milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*.
- Bendicho, C., & Lavilla, I. (2000). Ultrasound extractions. *Encyclopedia of Separation Science*, *56*, 1448--1454.
- Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H., & Ghorbel, D. (2016). Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protein isolate. *Food Chemistry*, *194*, 1056–1063.
- Bennett, A. and, & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a

filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58, 419–435.

Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Loey, A. M. Van. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food : A review. *Biotechnology Advances*, 37, 107419.

Bertoldi, F. C. (2017). *REVIEW : MICROALGAE BIOTECHNOLOGY. January 2008.*

Bongiovani, N., Virginia Sanchez-Puerta, M., Popovich, C., & Leonardi, P. (2014). Identificación molecular y filogenética de una cepa oleaginosa de *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) aislada de la costa atlántica suroeste (Argentina). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49, 615–623.

Buchmann, L., Bertsch, P., Böcker, L., Krähenmann, U., Fischer, P., & Mathys, A. (2019). Adsorption kinetics and foaming properties of soluble microalgae fractions at the air/water interface. *Food Hydrocolloids*, 97, 105182.

Buchmann, L., Brändle, I., Haberkorn, I., Hiestand, M., & Mathys, A. (2019). Pulsed electric field based cyclic protein extraction of microalgae towards closed-loop biorefinery concepts. *Bioresource Technology*, 291, 121870.

Camacho, F., & Macedo, A. (2019). *Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries : A Short Review. i.*

Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D. I., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M., Figueroa-Hernández, C. Y., García-Armenta, E., Alamilla-Beltrán, L., García, H. S., & Gutiérrez-López, G. F. (2018). Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Reviews*, 10, 113–138.

Caporgno, M. P., & Mathys, A. (2018). Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. *Frontiers in Nutrition*, 5, 58.

Çelekli, A. and, Yavuzatmaca, M. and, & Bozkurt, H. (2010). An eco-friendly process : Predictive modelling of copper adsorption from aqueous solution on *Spirulina platensis*. *Journal of Hazardous Materials*, 173, 123–129.

Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813–835.

- Chen, Y., Chen, J., Chang, C., Chen, J., Cao, F., Zhao, J., Zheng, Y., & Zhu, J. (2019). Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species. *Food Hydrocolloids*, *96*, 510–517.
- Chentir, I., Hamdi, M., Li, S., Doumandji, A., Markou, G., & Nasri, M. (2018). Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain. *Algal Research*, *35*, 395–406.
- Chew, K. W., Chia, S. R., Lee, S. Y., Zhu, L., & Show, P. L. (2019). Enhanced microalgal protein extraction and purification using sustainable microwave-assisted multiphase partitioning technique. *Chemical Engineering Journal*, *367*, 1–8.
- 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*, 181–192.
- Cohen, Z. (1999). *Chemicals from microalgae*. CRC Press.
- Coustets, M., Joubert-Durigneux, V., Hérault, J., Schoefs, B., Blanckaert, V., Garnier, J. P., & Teissié, J. (2015). Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. *Bioelectrochemistry*, *103*, 74–81.
- da Silva, S. C., Fernandes, I. P., Barros, L., Fernandes, Â., José Alves, M., Calhella, R. C., Pereira, C., Barreira, J. C. M., Manrique, Y., Colla, E., Ferreira, I. C. F. R., & Filomena Barreiro, M. (2019). Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. *Journal of Functional Foods*, *60*.
- Dai, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2020). Emulsifying properties of acid-hydrolyzed insoluble protein fraction from *Chlorella protothecoides*: Formation and storage stability of emulsions. *Food Hydrocolloids*, *108*.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2007). *Fennema's food chemistry*. CRC press.
- Depeint, F., Bruce, W. R., Shangari, N., Mehta, R., & O'Brien, P. J. (2006). Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, *163*, 94–112.

- Duygu, D. Y., Udoh, A. U., Ozer, T. B., Akbulut, A., Acikgoz, I., Yildiz, K., & Guler, D. (2012). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. *African Journal of Biotechnology*, *11*, 3817–3824.
- Fradique, M., Paula, A., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2013). LWT - Food Science and Technology *Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT - Food Science and Technology*, *50*, 312–319.
- Gelin, F., Volkman, J. K., De Leeuw, J. W., & Sinninghe Damsté, J. S. (1997). Mid-chain hydroxy long-chain fatty acids in microalgae from the genus *Nannochloropsis*. *Phytochemistry*, *45*, 641–646.
- Gerde, J. A., Montalbo-Lomboy, M., Yao, L., Grewell, D., & Wang, T. (2012). Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, *125*, 175–181.
- Gerde, J. A., Wang, T., Yao, L., Jung, S., Johnson, L. A., & Lamsal, B. (2013). Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. *Algal Research*, *2*, 145–153.
- Gerken, H. G., Donohoe, B., & Knoshaug, E. P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, *237*, 239–253.
- Gogate, P. R., & Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, *44*, 60–72.
- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology*, *153*, 254–259.
- Guiry, M. (2010). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National university of ireland, Galway. <http://www.algaebase.org/>.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, *33*, 243–260.

- Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128–130, 227–248.
- Hildebrand, G., Poojary, M. M., O'Donnell, C., Lund, M. N., Garcia-Vaquero, M., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, 32, 1709–1718.
- Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 582–590.
- Hsieh-Lo, M., Castillo, G., Ochoa-Becerra, M. A., & Mojica, L. (2019). Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research*, 42, 101600.
- Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 1, 83–93.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86, 281–287.
- Kee, C., Chyuan, H., Chen, W., Chuan, T., & Poh, E. (2018). Overview : Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 173, 81–94.
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 60–84.
- Kim, S., Vu, H., Kim, J., Yeol, E., & Chul, H. (2015). Pyrolysis of microalgae residual biomass derived from *Dunaliella tertiolecta* after lipid extraction and carbohydrate saccharification. *CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 263, 194–199.
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T., & Show, P.-L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8, 16–24.

- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-hazimi, A. (2013). *Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. 2013.*
- Kulkarni, S., & Nikolov, Z. (2018). Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 35, 185–193.
- León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39, 1084–1091.
- López, C. V. G., del Carmen Cerón García, M., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101, 7587–7591.
- Lucas, B. F., Morais, M. G. De, Santos, T. D., Alberto, J., & Costa, V. (2018). LWT - Food Science and Technology Spirulina for snack enrichment : Nutritional , physical and sensory evaluations. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 270–276.
- Luo, J., Fang, Z., & Smith, R. L. (2014). Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 41, 56–93.
- Luque-García, J. L., & Luque De Castro, M. D. (2003). Ultrasound: A powerful tool for leaching. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22, 41–47.
- Ma, X., Chen, T., Yang, B., Liu, J., & Chen, F. (2016). *Lipid Production from Nannochloropsis*. 3.
- Marco, E. R. De, Steffolani, M. E., Martínez, C. S., & León, A. E. (2014). LWT - Food Science and Technology Effects of spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 58, 102–108.
- Marsh, K. N., Boxall, J. A., & Lichtenthaler, R. (2004). Room temperature ionic liquids and their mixtures - A review. *Fluid Phase Equilibria*, 219, 93–98.
- Matile, P., Stefan, H., & Thomas, H. (1999). CHLOROPHYLL DEGRADATION Chloroplast to Gerontoplast Transition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 67–95.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 305–313.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC

press.

McClements, D. J., Bai, L., & Chung, C. (2017). Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 205–236.

Mendiola, J. A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., & Señoráns, F. J. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 102, 1357–1367.

Menegotto, A. L. L., de Souza, L. E. S., Colla, L. M., Costa, J. A. V., Sehn, E., Bittencourt, P. R. S., Flores, É. L. de M., Canan, C., & Colla, E. (2019). LWT - Food Science and Technology Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. *LWT - Food Science and Technology*, 114, 108267.

Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers*, 104, 129–147.

Mori, Fumi and Erata, M and Watanabe, M. (2002). Cryopreservation of cyanobacteria and green algae [*Chlorophyceae*] in the NIES-collection [Japan]. *Microbiology and Culture Collections (Japan)*.

Ojha, K. S., Aznar, R., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 122.

Phusunti, N., & Cheirsilp, B. (2020). Integrated protein extraction with bio-oil production for microalgal biorefinery. *Algal Research*, 48, 101918.

Pongsawatmanit, R., Harnsilawat, T., & McClements, D. J. (2006). Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 287, 59–67.

Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360, 987–992.

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, 133–141.

Rashid, N., Rehman, M. S. U., & Han, J. I. (2013). Recycling and reuse of spent microalgal biomass for sustainable biofuels. *Biochemical Engineering Journal*, 75, 101–107.

Richmond, A., & Hu, Q. (2013). *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. John Wiley & Sons.

Rizwan, M., Mujtaba, G., Ahmed, S., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394–404.

Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). *Microalgae for Oil : Strain Selection , Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor*. 102, 100–112.

Safi, C., Cabas Rodriguez, L., Mulder, W. J., Engelen-Smit, N., Spekking, W., van den Broek, L. A. M., Olivieri, G., & Sijtsma, L. (2017). Energy consumption and water-soluble protein release by cell wall disruption of *Nannochloropsis gaditana*. *Bioresource Technology*, 239, 204–210.

Safi, Carl, Frances, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Pouzet, C., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P. Y. (2015). Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Research*, 8, 61–68.

Safi, Carl, Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, 61–65.

Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 47, 587–597.

Scholz, M. J., Weiss, T. L., Jinkerson, R. E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M. C., & Gerken, H. G. (2014). Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic Cell*, 13, 1450–1464.

Schreiner, T. B., Santamaria-Echart, A., Ribeiro, A., Peres, A. M., Dias, M. M., Pinho, S. P., & Barreiro, M. F. (2020). Formulation and optimization of nanoemulsions using the

natural surfactant saponin from Quillaja bark. *Molecules*, 25.

Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., & Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 73, 129–140.

Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 102, 9121–9127.

Şeker, A., Shahwan, T., Eroğlu, A. E., Yilmaz, S., Demirel, Z., & Dalay, M. C. (2008). Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies for the biosorption of aqueous lead (II), cadmium (II) and nickel (II) ions on *Spirulina platensis*. *Journal of Hazardous Materials*, 154, 973–980.

Selling, G. W., Hojilla-evangelista, M. P., Evangelista, R. L., Isbell, T., Price, N., & Doll, K. M. (2013). Extraction of proteins from pennycress seeds and press cake &. *Industrial Crops & Products*, 41, 113–119.

Shimada, R. T., Fonseca, M. S., & Petri, D. F. S. (2017). The role of hydroxypropyl methylcellulose structural parameters on the stability of emulsions containing *Spirulina* biomass. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 529, 137–145.

Sikorski, Z. E. (2001). Functional properties of proteins in food systems. *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*, 113–135.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87–96.

Suda, S., Atsumi, M., & Miyashita, H. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (*Eustigmatophyceae*). *Phycologia*, 41, 273–279.

Tang, B., Bi, W., Tian, M., & Row, K. H. (2012). Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 904, 1–21.

Teuling, E., Schrama, J. W., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2019). Characterizing

emulsion properties of microalgal and cyanobacterial protein isolates. *Algal Research*, 39, 101471.

Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648–656.

Ursu, A. V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 157, 134–139.

Van Der Goot, A. J., Pelgrom, P. J. M., Berghout, J. A. M., Geerts, M. E. J., Jankowiak, L., Hardt, N. A., Keijer, J., Schutyser, M. A. I., Nikiforidis, C. V., & Boom, R. M. (2016). Concepts for further sustainable production of foods. *Journal of Food Engineering*, 168, 42–51.

Vojvodić, S., Luković, J. D., Zechmann, B., Jevtović, M., Pristov, J. B., Stanić, M., Lizzul, A. M., Pittman, J. K., & Spasojević, I. (2020). The effects of ionizing radiation on the structure and antioxidative and metal-binding capacity of the cell wall of microalga *Chlorella sorokiniana*. *Chemosphere*, 260.

Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press.

Wan, D., Wu, Q., & Kuča, K. (2016). Chapter 42 - Spirulina. In R. C. Gupta (Ed.), *Nutraceuticals* (pp. 569–583). Academic Press.

Wang, X., & Zhang, X. (2012). Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. *Bioresource Technology*, 126, 307–313.

Watanabe, F., Takenaka, S., Kittaka-Katsura, H., Ebara, S., & Miyamoto, E. (2002). Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 48, 325–331.

Wiacek, A., & Chibowski, E. (1999). Zeta potential, effective diameter and multimodal size distribution in oil/water emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 159, 253–261.

Wu, G. (2016). Dietary protein intake and human health. *Food & Function*, 7, 1251–1265.

Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117, 257–264.

Yamamoto, M., Kurihara, I., & Kawano, S. (2005). Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta*, 221, 766–775.

Zayas, J. F. (2012). *Functionality of proteins in food*. Springer science & business media.