



**Estudo da capacidade de gelificação e formação de hidrogéis a partir da biomassa
integral da microalga *Spirulina platensis***

Leandro Lima Aquino

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de
Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientadores

Professora Doutora Maria Filomena F. Barreiro

Doutora Arantzazu Santamaria-Echart

Professora Doutora Eliane Colla

Bragança

Outubro 2023

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) no âmbito do apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020 e UIDP/00690/2020) e SusTEC (LA/P/0007/2020) através de fundos nacionais FCT/MCTES (PIDDAC).



Agradecimentos

Quero expressar meu profundo agradecimento a todos que fizeram parte desta jornada, tanto de forma direta como indireta. Agradeço a Deus por iluminar meus passos durante todo o caminho e pelo incentivo daqueles que estiveram ao meu lado, seja orientando, aconselhando ou simplesmente com uma palavra de afeto.

Às minhas professoras orientadoras, Prof. Doutora Maria Filomena F. Barreiro, Doutora Arantzazu Santamaria-Echart e Prof. Doutora Eliane Colla, quero expressar minha gratidão por toda a orientação, suporte, conselhos e oportunidades que investiram em mim. Agradeço pelos ensinamentos valiosos que pude adquirir ao longo deste projeto. À Prof. Dra. Elsa Ramalhosa pelo apoio nos ensaios com o texturómetro, e o conhecimento compartilhado. À Dra. Rebeca Hernández pelos ensinamentos e experiências compartilhadas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Também ao meu professor André Sandmann, que se tornou um querido amigo e conselheiro. Ele me orientou desde o início da minha graduação e viu o meu potencial, confiando-me desafios e oportunidades que contribuíram para o meu crescimento tanto como profissional quanto como ser humano.

Gostaria de agradecer ao Centro de Investigação da Montanha (CIMO-IPB) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros (ICTP-CSIC) pela disponibilidade dos equipamentos e reagentes para realização dessa pesquisa, e pelo auxílio de toda a equipa do CIMO-IPB e NanoPoly&Gels Group do ICTP pelos conhecimentos compartilhados. Agradeço ao Programa Erasmus+ pelo estágio concedido.

Aos amigos que estiveram ao meu lado no Brasil, Larissa Granado, Maira Ribeiro, Larissa Pereira, Vitória Sousa, Adrielly Motta, Lidia Mantovi, Marcleilton Rufino, Tairone Silva, Sara Beatriz, Dionathan Santos, Lucas Henrique e Pedro Streithorst, meu profundo agradecimento. Seja nos momentos de risadas ou compartilhando sentimentos, todos tiveram um papel importante em minha vida e nessa jornada. Foram anos de amizade que o tempo e a distância não podem apagar.

Aos amigos que encontrei em Bragança e que desempenharam um papel fundamental em minha jornada, incluindo Alex Nunes, Regina Soares, Letícia Binda, Mathias Giordani, Daniela Elsenbach, Helena Colonna, Bárbara Rezende, Letícia Vitória, Lucas Pinheiro e Ives Santos, quero agradecer pelo apoio, momentos de alegria e por estarem ao meu lado nos momentos de angústia. Com vocês, o tempo se tornou mais leve e autêntico, permitindo-me experimentar sentimentos como felicidade, paz e amizade, que permanecerão gravados em minha memória e em meu coração.

Um agradecimento especial à minha família, em especial à minha mãe, Léia Lima, ao meu irmão, Matheus L. Aquino, ao meu padrasto, Marcelo B. Madeira, e ao meu pai, Saturnino R. Aquino. Sem o apoio de vocês, não seria possível realizar este trabalho. Mesmo à distância, vocês fizeram o impossível e não mediram esforços para que esse sonho se concretizasse. Amor, paciência, compreensão, carinho, apoio e abrigo são palavras que encontro como sinônimos para tentar representar um sentimento indescritível que é tê-los ao meu lado.

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha mãe, Léia Lima,
ao meu padrasto Marcelo B. Madeira,
ao meu pai Saturnino R. Aquino
e ao meu irmão Matheus Lima Aquino.*

RESUMO

Os hidrogéis são materiais com elevada capacidade de absorção de água, formados por redes tridimensionais capazes de reter água sem dissolução. Esta característica confere aos hidrogéis a possibilidade de variadas aplicações na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética, apresentando capacidade gelificante e espessante. A microalga *Spirulina platensis* é uma cianobactéria amplamente estudada devido ao seu alto teor proteico, bem como às suas características nutracêuticas, considerando os compostos bioativos presentes na sua biomassa, como ficobiliproteínas, vitaminas, minerais e compostos com capacidade antioxidante.

Este trabalho teve como objetivo o estudar da capacidade de gelificação e formação de hidrogel da biomassa integral de *S. platensis*. Inicialmente foi aplicado um Planejamento Fatorial Fracionado (PFF) para a avaliação dos efeitos de seis variáveis do processo (concentração de biomassa, temperatura, pH, tempo de aquecimento, tempo e velocidade de agitação) nas seguintes respostas do hidrogel formado: firmeza, consistência, coesividade e trabalho de coesão. Seguidamente aplicou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) usando apenas as variáveis significativas (pH e concentração de biomassa).

A partir das análises estatísticas dos planejamentos experimentais, foi possível maximizar o processo de formação do hidrogel de acordo com suas características de textura, e a análise de sinérese realizada demonstrou que os géis formados com maiores concentrações de biomassa apresentaram uma menor perda de água devido à presença de uma maior concentração de proteínas. Com a análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para a amostra com os fatores maximizados no planejamento, foi possível identificar as principais bandas dos grupos funcionais presentes na biomassa e no hidrogel, demonstrando que os grupos presentes na biomassa podem influenciar na formação do gel e na capacidade de absorção de água, devido às interações estabelecidas entre os mesmos.

A análise por microscopia eletrônica de varrimento (MEV) e estabilidade térmica demonstraram que o gel é, possivelmente, formado por agregados de moléculas de biomassa de *S. platensis* gerando o que é designado por hidrogel particulado. As análises de reologia e viscosidade foram realizadas visando comparar as propriedades mecânicas dos géis, um preparado com 22% de biomassa e pH 5,6 (ponto ótimo nos planejamentos) e outro com 12% de biomassa e pH 5,6. Os géis analisados apresentaram módulo de carga superior ao módulo de perda para o teste de varrimento de frequência, apresentando propriedade elásticas. O teste de recuperação realizado nas amostras, aplicando ciclos de baixa e alta taxa de cisalhamento, demonstram uma recuperação de aproximadamente 30% para a amostra de maior concentração

de biomassa (22%), contudo superior à obtida para a amostra com 12% de biomassa que foi de 25%, demonstrando uma baixa resistência da estrutura da amostra.

Testes preliminares de impressão 3D foram realizados para determinar a viabilidade de impressão, demonstrando-se que o sistema desenvolvido tem características promissoras para ser processado por esta tecnologia. Porém, são necessários ainda mais estudos para melhorar as propriedades mecânicas, principalmente no que respeita à recuperação do material.

Palavras-chave: Biopolímeros; Proteínas microbianas; Compostos bioativos; Propriedades tecnológicas.

ABSTRACT

Hydrogels are water-absorbent polymers structured in three-dimensional networks capable of retaining water without dissolving. This characteristic gives hydrogels vast applications in the food, pharmaceutical and cosmetics industries, as they have gelling and thickening capabilities. The microalga *Spirulina platensis* is a widely studied cyanobacterium due to its high protein content, as well as its nutraceutical characteristics, considering the bioactive compounds present in its biomass, such as phycobiliproteins, vitamins, minerals and compounds with antioxidant capacity.

The aim of this work was to study the gelling capacity and hydrogel formation of whole *S. platensis* biomass. Initially, a Fractional Factorial Design (FFD) was applied to assess the effects of six process variables (biomass concentration, temperature, pH, heating time, stirring time and speed) on the responses of firmness, consistency, cohesiveness and work of cohesion for the formation of gels; subsequently, a Rotational Central Composite Design (RCCD) was applied with the significant variables (pH and biomass concentration).

From the statistics analyses of the experimental plans, it was possible to maximise the hydrogel formation process according to its textural characteristics, and the analysis of syneresis showed that the gels formed with higher concentrations of biomass showed less water loss due to the higher concentration of proteins. With the Fourier transform infrared analysis (FTIR) for the sample with the maximised planning factors, it was possible to identify the main bands of the functional groups present in the biomass and the hydrogel, demonstrating the groups that can influence gel formation and water absorption capacity, due to their interactions.

Scanning electron microscopy and thermal stability analyses showed that the gel is possibly formed by aggregates of *S. platensis* biomass molecules generating the so called particulate hydrogel. Rheology and viscosity analyses were carried to compare the mechanical properties of two gels, namely a first one with a concentration of biomass of 22% and pH 5.6 (the optimal point in the plans) and the second with a concentration of biomass of 12% and pH 5.6. The analysed gels showed a load modulus higher than the loss modulus for the frequency sweep test, corroborating their elastic properties. The recovery test carried out on the samples, applying low and high shear rate cycles, showed a low recovery, namely of approximately 30 % for the sample with the highest concentration (22%) and 25% for the sample with the lowest concentration (12%), demonstrating low resistance of the formed gel structure.

Preliminary 3D printing tests were carried out to determine the feasibility of printing, showing that the developed system has promising characteristics to be processed by this technology.

However, studies are still needed to improve the mechanical properties, especially in what concerns the recovery of the material.

Keywords: Biopolymers; Microbial proteins; Bioactive compounds; Technological properties

Índice

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
LISTA DE EQUAÇÕES	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
Motivação e objetivos.....	1
Objetivo geral	2
Objetivos Específicos	2
1. Revisão bibliográfica.....	3
1.1. Microalgas na alimentação humana.....	3
1.2. <i>Spirulina platensis</i> : histórico e classificação	4
1.3. Composição nutricional da <i>Spirulina platensis</i>	4
1.3.1. Carboidratos e proteínas da microalga <i>Spirulina platensis</i>	5
1.4. Aplicações da biomassa e da fração proteica da <i>Spirulina platensis</i>	6
1.5. Propriedades funcionais-tecnológicas da biomassa e da fração proteica de <i>Spirulina platensis</i>	7
1.6. Hidrogéis.....	8
1.6.1. Classificação e formação de hidrogéis	8
1.6.2. Aplicações de hidrogéis.....	10
1.7. Técnica de impressão 3D	12
2. Metodologia.....	14
2.1. Matéria prima e reagentes	15
2.2. Testes preliminares	15
2.3. Estudo do processo de formação de hidrogéis.....	16
2.4. Caracterização dos hidrogéis	17
2.4.1. Análise de textura	17

2.4.2.	Sinérese.....	18
2.4.3.	Capacidade de absorção de água	18
2.4.4.	Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	19
2.4.5.	Microscopia eletrônica de varrimento (MEV).....	19
2.4.6.	Estabilidade térmica	19
2.4.7.	Viscosidade e comportamento reológico.....	19
2.5.	Testes preliminares de impressão 3D	20
2.6.	Análise estatística	21
3.	Resultados e discussão	22
3.1.	Estudo das variáveis de formação do hidrogel	22
3.2.	Delineamento composto central rotacional.....	24
3.3.	Sinérese.....	31
3.4.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
3.5.	Capacidade de absorção de água.....	33
3.6.	Análise estrutural da biomassa e do gel de <i>S. platensis</i> por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	34
3.7.	Análise da estabilidade térmica do hidrogel	36
3.8.	Reologia e viscosidade.....	37
3.8.1.	Viscosidade do gel.....	37
3.8.2.	Testes oscilatórios dinâmicos	38
3.9.	Testes preliminares de impressão 3D	42
4.	Conclusões.....	45
5.	Trabalhos futuros.....	46
6.	Referências bibliográficas	47
7.	Anexos	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Tricoma da cianobactéria <i>Spirulina platensis</i>	4
Figura 2 - Classificação de hidrogéis com base em diferentes propriedades	9
Figura 3 – Representação esquemática do processo de gelificação térmica de proteínas globulares	10
Figura 4 - Resumo gráfico da metodologia utilizada e respectivas amostras empregadas	14
Figura 5 – A: Preparação dos géis, B: amostra com 4% de biomassa, C: amostra com 6% de biomassa, D: amostra com 8% de biomassa.....	15
Figura 6 – Teste de inversão de frascos (A: amostra com 16% de biomassa, B: amostra com 20% de biomassa).....	16
Figura 7 - Texturómetro empregado para avaliação de textura dos hidrogéis de <i>S. platensis</i> .	18
Figura 8 - Reómetro acoplado a geometria de placas paralelas	20
Figura 9 - Protótipo de impressora 3D por extrusão (A) por motor ou pistão, (B) pneumática ou pressão	20
Figura 10 - Superfície de resposta e curva de contorno para Firmeza (g) dos géis de <i>S. platensis</i>	27
Figura 11 - Superfície de resposta e curva de contorno para Consistência (g.sec) dos géis de <i>S. platensis</i>	27
Figura 12 - Superfície de resposta e curva de contorno para Coesividade (g) dos géis de <i>S. platensis</i>	28
Figura 13 - Superfície de resposta e curva de contorno para Trabalho de coesão (g.sec) dos géis de <i>S. platensis</i>	28
Figura 14 - Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o DCCR	29
Figura 15 - Análise de sinérese para os hidrogéis de <i>S. platensis</i> em diferentes tempos	31
Figura 16 - Microscopia da superfície da biomassa de <i>S. platensis</i> seca ampliada em (A) 65x e (B) 200x.....	32
Figura 17 - Microscopia da superfície do hidrogel de <i>S. platensis</i> liofilizado ampliado em (A) e (B) 200x e (C) e (D) 1000x.....	33
Figura 18 - Capacidade de absorção de água do hidrogel de <i>S. platensis</i>	34
Figura 19 - Espectro de absorção do infravermelho para a biomassa e hidrogel de <i>S. platensis</i>	35
Figura 20 – Curvas de perda de massa e DTG da análise termogravimétrica do hidrogel de <i>S. platensis</i>	36

Figura 21 - Gráfico da variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento	37
Figura 22 - Comportamento reológico do hidrogel em função da tensão de oscilação.	39
Figura 23 - Comportamento reológico do hidrogel em função da variação da frequência.	39
Figura 24 - Principais categorias mecânicas de matrizes alimentares semi-sólidas; (a) solução diluída, (b) solução emaranhada, (c) gel forte, (d) gel fraco	40
Figura 25 - Curvas obtidas para o teste de recuperação do módulo de carga e perda sob baixa e elevada taxa de cisalhamento em função do tempo.....	41
Figura 26 - Teste de formação de filamento do gel.....	42
Figura 27 - Teste de impressão de malha por extrusão por motor	43
Figura 28 - Teste de impressão de malha por extrusão pneumática.....	44
Figura 29 - Teste de impressão de cilindros por extrusão por motor	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de diferentes microalgas em base seca	3
Tabela 2 - Quantidade de ácidos gordos (mg/100g) presentes em diferentes espécies de microalgas em base seca.....	5
Tabela 3 - Quantidade de monossacarídeos presentes em estruturas da <i>Spirulina platensis</i>	6
Tabela 4 - Propriedades de hidrogéis utilizados em embalagens alimentares.....	11
Tabela 5 - Comparação entre os fatores que afetam a impressão 3D.....	13
Tabela 6 - Níveis codificados e reais das variáveis do PFF 2 ⁶⁻² para avaliação da capacidade de formação de gel da biomassa integral de <i>Spirulina platensis</i>	17
Tabela 7 - Níveis codificados e reais das variáveis do DCCR 2 ² para avaliar a formação de gel da biomassa integral de <i>Spirulina platensis</i>	17
Tabela 8 - Matriz do PFF 2 ⁶⁻² com níveis codificados das variáveis e repostas para avaliação da capacidade de formação de gel a partir da biomassa integral de <i>Spirulina platensis</i>	22
Tabela 9 - Efeito das variáveis estudadas sobre as respostas de y_1 – firmeza (g) e y_2 – consistência (g.sec).....	23
Tabela 10 - Efeito das variáveis estudadas sobre as respostas de y_3 – Coesividade (g) e y_4 – Trabalho de coesão (g.sec)	23
Tabela 11 - Matriz do DCCR 2 ² com níveis codificados e (reais) das variáveis e repostas para avaliação da capacidade de formação de gel	24
Tabela 12 - Coeficientes de regressão do DCCR 2 ² para as respostas de firmeza e consistência dos géis	25
Tabela 13 - Coeficientes de regressão do DCCR 2 ² para as respostas de coesividade e trabalho de coesão.....	26
Tabela 14 - ANOVA dos modelos DCCR 2 ² para os fatores analisados dos géis	26
Tabela 15 - Valores de firmeza experimentais, previsto pelo modelo e desvios do planeamento	29
Tabela 16 - Valores de consistência experimentais, previsto pelo modelo e desvios do planeamento.....	30
Tabela 17 - Valores de coesividade experimentais, previsto pelo modelo e desvios do planeamento.....	30
Tabela 18 - Valores de trabalho de coesão experimentais, previsto pelo modelo e desvios do planeamento.....	30

Tabela A. 1 - Coeficientes de regressão reparametrizados do DCCR 2² para as respostas de firmeza e consistência..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela A. 2 - Coeficientes de regressão reparametrizados do DCCR 2² para as respostas de coesividade e trabalho de coesão..... 54

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Capacidade de absorção de água (%)	18
Equação 2 – Sinerése (%)	18
Equação 3 – Firmeza (g).....	25
Equação 4 – Consistência (g.sec)	25
Equação 5 – Coesividade (g)	26
Equação 6 – Trabalho de coesão (g.sec)	26

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Manufatura aditiva
ANOVA	Análise de variância
CAA	Capacidade de absorção de água
CIMO	Centro de Investigação da Montanha
CSIC	Conselho Superior de Investigações Científicas
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DTG	Derivada da curva da decomposição térmica
EC	Substâncias poliméricas extracelulares
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
G'	Módulo de carga ou módulo elástico
G''	Módulo de perda ou módulo viscoso
GL	Graus de liberdade
ICTP	Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros
LVR	Região viscoelástica linear
m/m	Relação massa/massa
m/v	Relação massa/volume
MEV	Microscopia eletrónica de varrimento
MQ	Média dos quadrados
MUFAs	Ácidos gordos monoinsaturados
PC	Polissacarídeos da parede celular
PFF	Planeamento Fatorial Fracionário
pH	Potencial hidrogeniónico
PUFAs	Ácidos gordos polinsaturados
rpm	Rotações por minuto
SFAs	Ácidos gordos saturados
SLS	Impressão por sinterização seletiva
SQ	Soma dos quadrados
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
η	Viscosidade dinâmica

Motivação e objetivos

O enriquecimento de alimentos com microalgas é uma vertente atual de pesquisa, devido, especialmente, ao seu alto teor proteico e perfil de aminoácidos essenciais completo (Menegotto et al., 2019). As proteínas presentes na biomassa possuem propriedades funcionais e tecnológicas importantes para a indústria de alimentos, tais como a capacidade de formação de gel e de atuar como espessante.

O estudo das propriedades de gelificação pode gerar resultados importantes visando a aplicação da biomassa integral da *Spirulina platensis* ou da sua fração proteica isolada em alimentos para fins específicos e terapêuticos. Alguns exemplos incluem preparações infantis e o seu uso como espessante/estabilizante de matrizes alimentares, agregando valor nutricional a estes produtos.

Quanto às questões sensoriais, as proteínas da *S. platensis* podem contribuir para obter produtos com características mais atrativas para os consumidores dado a cor azul-esverdeada presente nas ficobiliproteínas, podendo ser uma alternativa para substituir corantes artificiais presentes em diversos produtos. Adicionalmente, os hidrogéis apresentam propriedades espessantes, que quando adicionados podem fornecer ao produto final características sensoriais melhoradas.

Assim, a aplicação de hidrogéis à base de proteínas vegetais e de microalgas tende a ser uma via promissora devido à sua capacidade nutricional, biodisponibilidade e baixo custo de produção, comparativamente à obtenção de proteínas animais sendo a produtividade do cultivo de microalgas significativamente superior por exigir menor área de cultivo (Cleber Bertoldi et al., 2008) A versatilidade de aplicação de hidrogéis torna-se também um fator que motiva o presente estudo, visto que a sua aplicação tem interesse para diversas áreas, tal como a alimentar (agregando valor nutricional e alterando as propriedades físicas do produto), farmacêutica (servindo como matriz para a distribuição de fármacos de interesse no tratamento de lesões ou doenças), e cosmética (como carregador de compostos bioativos, nomeadamente antioxidantes).

Objetivo geral

Avaliar a formação e estabilidade de hidrogéis obtidos a partir da biomassa integral da microalga *Spirulina platensis*, tendo em vista a avaliação do seu potencial tecnológico para aplicação em matrizes alimentares e outros produtos.

Objetivos Específicos

- Estudar a formação de hidrogéis a partir da biomassa integral frente a diferentes concentrações de biomassa de *S. platensis*, temperatura, pH, tempo de aquecimento, tempo e velocidade de homogeneização durante o processo de gelificação. Para o efeito serão utilizadas estratégias sequenciais de planeamento experimental;
- Avaliar o comportamento reológico e as propriedades de textura dos hidrogéis formados bem como sua estabilidade;
- Avaliar a microestrutura dos hidrogéis através da análise por técnicas de microscopia eletrónica de varrimento (MEV);
- Testes preliminares de impressão 3D das amostras de hidrogéis mais promissoras.

1. Revisão bibliográfica

1.1. Microalgas na alimentação humana

As microalgas têm sido estudadas devido ao seu potencial nutracêutico e funcional, antioxidante, e como coadjuvante no tratamento contra obesidade (Ambrosi et al., 2008; Moraes et al., 2013), além de ser um componente que favorece o aumento da biodisponibilidade de nutrientes em matrizes alimentares. A Tabela 1 apresenta diferentes microalgas e suas composições químicas de acordo com o estudo desenvolvido por Molino et al. (2018).

Tabela 1 - Composição química de diferentes microalgas em base seca

Microalga	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lípidos (%)	Fibra alimentar total (%)
<i>Spirulina platensis</i>	46.76 ± 0.95	3.32 ± 0.05	1.40 ± 0.12	42.82 ± 1.20
<i>Chlorella vulgaris</i>	45.64 ± 1.20	5.30 ± 0.50	3.13 ± 0.21	35.04 ± 1.60
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	12.93 ± 0.69	4.51 ± 0.41	2.05 ± 0.12	22.60 ± 1.50
<i>Dunaliella salina</i>	10.03 ± 0.57	25.31 ± 1.55	3.49 ± 0.10	8.97 ± 0.50
<i>Nannochloropsis</i> sp.	26.67 ± 1.10	32.05 ± 0.70	15.30 ± 0.24	17.67 ± 0.80

Fonte: (Molino et al., 2018)

O consumo de algas pelos humanos data de bastante tempo atrás. Registos mostram que a *Spirulina* foi encontrada em regiões da África em meados de 1960, em expedições realizadas na região, sendo a alga consumida por tribos locais que habitavam nas proximidades dos lagos com água alcalina de Níger e Chade. Mais tarde outros relatos mostraram que a alga estava presente em lagos também na região do México (Vonshak, 1997).

A procura por alimentos mais saudáveis por parte dos consumidores tem crescido consideravelmente nos últimos anos devido à mudança de hábitos alimentares da população em geral, que pretendem um estilo de vida mais saudável. Nos últimos anos, microalgas de diferentes espécies tem sido identificadas sendo comercializadas em diversas formas tais como comprimidos, cápsulas ou na forma de pó (Sampaio et al., 2016), motivando também o aumento da sua produção em larga escala.

Ainda a produção e incorporação de microalgas em alimentos tem sido desenvolvido com o intuito de acrescentar valor nutricional em produtos comuns como em pães, biscoitos, massas e bebidas. Adicionalmente, várias pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar o comportamento da adição da biomassa e componentes de microalgas em matrizes alimentares, nomeadamente quanto às suas qualidades sensoriais e propriedades tecnológicas (Kusmayadi et al., 2021).

1.2. *Spirulina platensis*: histórico e classificação

A *Spirulina* ou *Arthrospira platensis* é considerada a planta viva mais antiga da Terra com cerca de 3,6 bilhões de anos e uma das primeiras formas de vida fotossintéticas produtoras de oxigênio (Soni et al., 2017). De acordo com a sua taxonomia pertence ao filo das Cyanobacteria, classe Cyanophyceae, ordem Oscillatoriales, família Microcoleaceae e gênero Arthrospira (Algae Base, 2019).

É uma cianobactéria de coloração verde-azulada, possui característica filamentosa com tricomas que podem variar de 200 - 300 μm de comprimento e 5 – 10 μm de largura, apresentado na Figura 1. Sua reprodução ocorre através de fissão binária onde um hormogônio gera um novo tricoma e origina um novo filamento (Sampaio et al., 2016).



Figura 1 - Tricoma da cianobactéria *Spirulina platensis*
Fonte: (Borowitzka, 2018)

1.3. Composição nutricional da *Spirulina platensis*

A *Spirulina* possui uma elevada concentração de proteínas, cerca de 60-70% de sua massa seca, sendo esta considerada um dos maiores teores de proteínas encontradas em alimentos naturais (Chaiklahan et al., 2011). Além disso, um ponto importante a se considerar sobre esta microalga é que possui uma alta digestibilidade devido à sua parede celular ser composta por polissacarídeos (Iersel & Flammini, 2010) e não apresentar celulose, proporcionando uma maior biodisponibilidade de compostos orgânicos.

A *S. platensis* possui cerca de 5% de lípidos, compostos principalmente de ácidos gordos saturados que representam 81,6% (Morais & Costa, 2008), conteúdo que pode ainda

variar de acordo com as condições de produção da biomassa, como o meio de cultivo. Os ácidos gordos polinsaturados principais presentes na biomassa são o alfa-linolénico e o gama-linolénico, estes dois representam cerca de 1% da sua massa seca total (Borba & Ferreira Camargo, 2018). A Tabela 2 apresenta a quantidade de ácidos gordos em algumas microalgas, percebe-se que a biomassa de *Spirulina platensis* possui a menor quantidade do componente dentre as outras.

Tabela 2 - Quantidade de ácidos gordos (mg/100g) presentes em diferentes espécies de microalgas em base seca

Microalga	SFAs	MUFAs	PUFAs
<i>Spirulina platensis</i>	387,64 ± 1,61	553,10 ± 1,75	115,31 ± 0,98
<i>Chlorella vulgaris</i>	661,37 ± 4,32	442,35 ± 1,26	1266,40 ± 0,47
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	349,11 ± 4,58	235,42 ± 2,80	532,25 ± 1,00
<i>Dunaliella salina</i>	1532,68 ± 1,70	567,56 ± 1,29	1055,97 ± 0,75
<i>Nannochloropsis</i> sp.	2316,54 ± 2,02	3639,30 ± 2,77	5043,91 ± 3,28

SFAs (ácidos gordos saturados); MUFAs (ácidos gordos monoinsaturados); PUFAs (ácidos gordos polinsaturados).

Fonte: Molino et al. (2018)

Atualmente a *S. platensis* está disponível como suplemento alimentar, pelas propriedades que incluem uma variedade de bioatividades, como propriedades antialérgicas, antioxidante e antibacterianas (Chen et al., 2016; Finamore et al., 2017; Nuhu, 2013)

1.3.1. Carboidratos e proteínas da microalga *Spirulina platensis*

Os carboidratos são uma fração importante da composição das microalgas sendo possível distinguir os carboidratos de armazenamento e os estruturais. Entre os carboidratos de armazenamento existem cinco tipos, amido, amido florideano, glicogénio, crisolaminarina e paramilo. Os carboidratos estruturais, fazem parte da parede celular, e são geralmente compostos por múltiplos tipos de resíduos de monossacarídeos (Bernaerts et al., 2019).

Existem poucos estudos sobre os carboidratos da parede celular presentes em microalgas, sendo comum encontrar apenas a determinação dos carboidratos totais. Um estudo realizado por Bernaerts et al. (2018) avaliou a concentração de polissacarídeos de armazenamento, polissacarídeos de parede celular e extracelulares além de substâncias poliméricas extracelulares, em 10 microalgas, particularmente, estando na Tabela 3 apresentada composição em monossacarídeos dos polissacarídeos da parede celular (PC) e das substâncias poliméricas extracelulares (EC) da *Spirulina platensis*.

Tabela 3 - Quantidade de monossacarídeos presentes em estruturas da *Spirulina platensis*

Monossacarídeo	PC (%)	EC (%)
Glicose	49.8 ± 5.8	11.8 ± 0.4
Galactose	3.8 ± 0.3	11.1 ± 0.6
Xilose	ND	2.7 ± 0.3
Manose	29.8 ± 3.7	1.7 ± 0.1
Ramnose	6.7 ± 0.9	29.1 ± 1.4
Arabinose	ND	ND
Fucose	ND	8.9 ± 0.2
Ribose	ND	25.8 ± 0.8
Glucosamina	2.1 ± 0.3	ND

*PC (polissacarídeos da parede celular); EC (substâncias poliméricas extracelulares)

Fonte: (Bernaerts et al., 2018)

Alem da presença de carboidratos na biomassa a *Spirulina* possui grande concentração de proteínas na biomassa, a qual se torna ainda de maior valor devido à sua biomassa conter todos os aminoácidos essenciais, correspondendo a cerca de 47% da massa total de proteínas (Soni et al., 2017)

A microalga *S. platensis* possui na sua composição proteica ficobiliproteínas, pigmentos com função de "captar" luz para a realização da fotossíntese (Lupatini, 2016). As ficobiliproteínas das microalgas são classificadas em três grupos: ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina (Santiago-Santos et al., 2004). De destacar que estes compostos bioativos têm grande valor para diversas indústrias como a alimentar, farmacêutica, cosmética, entre outras (Rodrigues, 2017)

O alto teor proteico e diversidade de aminoácidos presente na biomassa da *Spirulina* sugere que a mesma apresenta propriedades funcionais e tecnológicas de interesse para o mercado, o que pode ser potenciado quando combinado com os carboidratos presentes. Mesmo assim, existem poucos estudos descritos na literatura que explorem estas propriedades.

1.4. Aplicações da biomassa e da fração proteica da *Spirulina platensis*

Devido ao seu potencial, a biomassa da *Spirulina platensis* tem sido alvo de diversos estudos. Na indústria alimentar é bastante utilizada como fonte para desenvolver novos produtos com propriedades nutracêuticas, acompanhando a tendência do mercado onde a procura por alimentos mais saudáveis com maior teor de proteínas e compostos bioativos tem aumentado (Almeida et al., 2021).

No trabalho realizado por Atik et al. (2021), os autores desenvolveram um produto alimentar denominado kefir vegano fortificado com a biomassa de *S. platensis*. O kefir foi produzido a partir de leite de amêndoas e de soja incorporado com *Spirulina* em pó. O produto final demonstrou que a adição de *S. platensis* possui efeito promotor na produção de *Lactobacillus sp.* e *Lactococcus sp.* durante o período em que permanece refrigerado. Adicionalmente, apresentou também um aumento do conteúdo fenólico total devido ao aumento da proporção de *Spirulina* adicionada, demonstrando que a microalga pode ser utilizada como suplemento alimentar para melhorar as características nutricionais do produto.

Na pesquisa realizada por Silva et al. (2022), foi analisada a obtenção de um extrato proteico de *S. platensis* e avaliado o seu potencial emulsionante na produção de emulsões óleo-água, tendo-se realizado para o efeito um planejamento experimental sequencial. Os autores demonstraram que as emulsões com melhor estabilidade foram obtidas a partir da formulação com 4% em massa do concentrado proteico para a razão óleo/água de 30/70 (m/m) e pH 7,0. Concluiu-se assim que o extrato proteico da microalga pode ser proposto como um emulsionante natural para substituir proteínas de origem animal e sintéticas.

No trabalho desenvolvido por Blanco-Vieites et al. (2022) foram utilizadas diferentes microalgas como ferramenta de biorremediação sustentável para tratar efluentes da indústria siderúrgica. Os autores reportaram uma redução de 97,5% da concentração inicial de ferro presente nas águas residuais.

No estudo desenvolvido por Aydınoglu & Ünal (2019), estudou-se a influência da biomassa de *Spirulina platensis* na produção de hidrogéis de quitosana reticulados com genipina para facilitar o transporte de fármacos. Os resultados indicaram que a adição da biomassa gerou um hidrogel promissor para atuar como sistema transportador de fármacos.

1.5. Propriedades funcionais-tecnológicas da biomassa e da fração proteica de *Spirulina platensis*

As microalgas fotoautotróficas possuem biopolímeros estruturais, como proteínas e polissacarídeos de armazenamento, estando estes relacionados com a parede celular. Estes podem ser utilizados para modificar as propriedades reológicas de produtos alimentares enriquecidos (Bernaerts et al., 2019); nomeadamente, modular as propriedades gelificantes e espessantes, aspetos de elevado interesse para vários setores industriais.

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com a fração proteica isolada da biomassa de microalgas. Chronakis (2001) estudou as propriedades reológicas de *S. platensis* tendo

observado um aumento da viscosidade devido à desnaturação proteica acima de 50 °C, tendo sido possível formar géis por aquecimento a 90 °C quando o isolado proteico é utilizado em baixas concentrações (1,5% - 2,5%).

Lupatini (2016) estudou as propriedades funcionais-tecnológicas para o concentrado proteico de *S. platensis*. O concentrado apresentou solubilidade mínima a pH 3 e máxima a pH 9. A capacidade de absorção de água foi maior para concentrações menores do concentrado, com valores de 1658,39% para 0,4% do concentrado proteico. Para a capacidade de formação de gel, observou-se que é necessária uma concentração superior de concentrado proteico (mínimo 12%), para que ocorra maior penetração de água nas moléculas e se forme a rede do hidrogel.

Existem poucos estudos na literatura apresentando as propriedades funcionais-tecnológicas da biomassa integral da *S. platensis*. O trabalho desenvolvido por Devi & Venkataraman (1984), apresentou as propriedades funcionais da biomassa integral e do concentrado proteico de *S. platensis*. A avaliação da capacidade de absorção de água foi maior na biomassa integral quando comparado com o concentrado proteico o que sugere, segundo os autores, que os componentes hidrofílicos presentes na biomassa contribuam positivamente para a funcionalidade da mesma.

A ruptura celular da biomassa de *S. platensis* pode libertar compostos intracelulares aprisionados no interior das células da microalga, tornando desta forma os compostos disponíveis para formar agregados de partículas o que pode resultar numa viscosidade superior e numa melhor estrutura de rede. Adicionalmente, podem aumentar a biodisponibilidade desses compostos bioativos (Bernaerts et al., 2019).

1.6. Hidrogéis

1.6.1. Classificação e formação de hidrogéis

Segundo Beaumont et al. (2021), um hidrogel pode ser definido como uma rede tridimensional formada por cadeias poliméricas hidrofílicas unidas por reticulação. As propriedades de ligação presentes na matéria prima do hidrogel determinam a capacidade de formação aumentando de volume ao absorver água, mas não se solubilizando na mesma. A Figura 2 apresenta as principais classificações de hidrogéis e as diferentes propriedades que estes podem assumir.

Nos hidrogéis podem-se definir duas formas de reticulação principais, tais como apresentado na Figura 2, a física e a química. Nos géis formados por reticulação física, aplicam-

se processos físicos como temperatura, alta pressão, concentração salina ou pH. Cao & Mezzenga (2020) reportou que a reticulação física forma géis através do estabelecimento de pontes de hidrogénio, forças electrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Os hidrogéis reticulados quimicamente por sua vez apresentam ligações covalentes, formadas por reações catalisadas por enzimas ou condensação de diversos grupos funcionais.

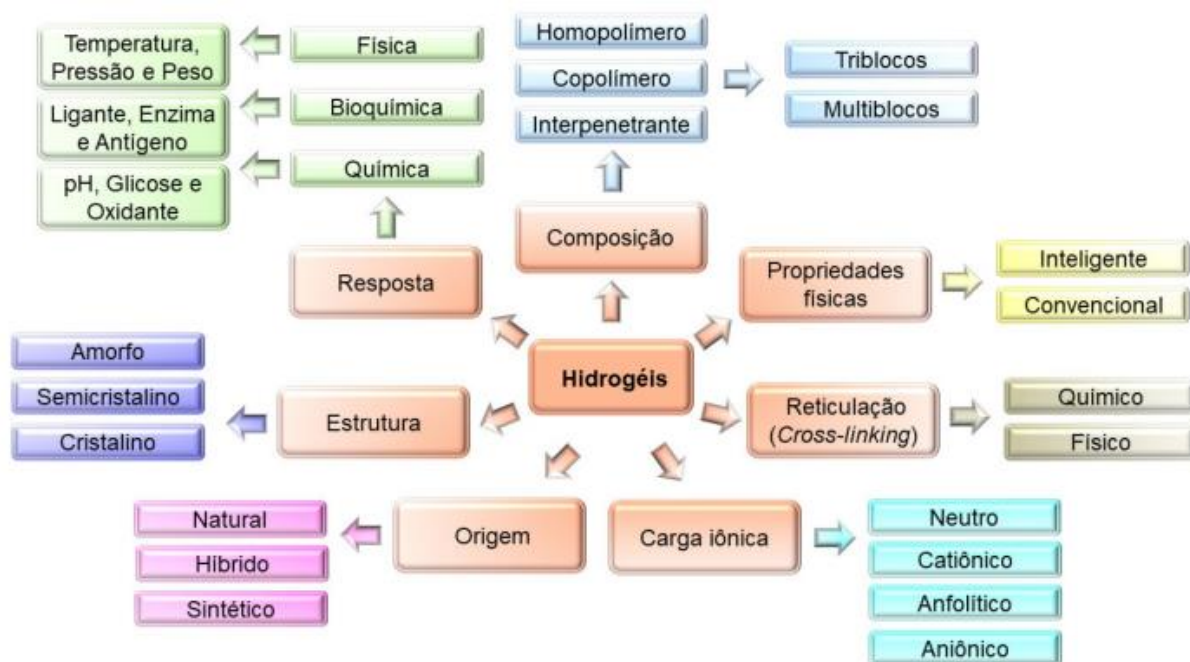


Figura 2 - Classificação de hidrogéis com base em diferentes propriedades

Fontes: (A. de Almeida & de F. Gimenez, 2022)

Os hidrogéis obtidos a partir de proteínas vegetais possuem uma formação específica, pois a maioria das proteínas derivadas de plantas são proteínas globulares (Cao & Mezzenga, 2020). A gelificação dessas proteínas ocorre através de uma força motriz que desdobra as cadeias da proteína na sua conformação globular original. Este desdobramento pode ser motivado por um fenómeno térmico, ocorrendo a associação e dissociação de proteínas e posterior agregação podendo envolver interações hidrofóbicas, e interações entre outras moléculas para formar uma rede tridimensional (Baier & McClements, 2005).

A Figura 3 representa a gelificação térmica das proteínas globulares, tanto pela via de formação através de aquecimento como pela via de arrefecimento, demonstrando o processo de dissociação-associação gerando a desnaturação parcial da proteína seguida da agregação das moléculas.

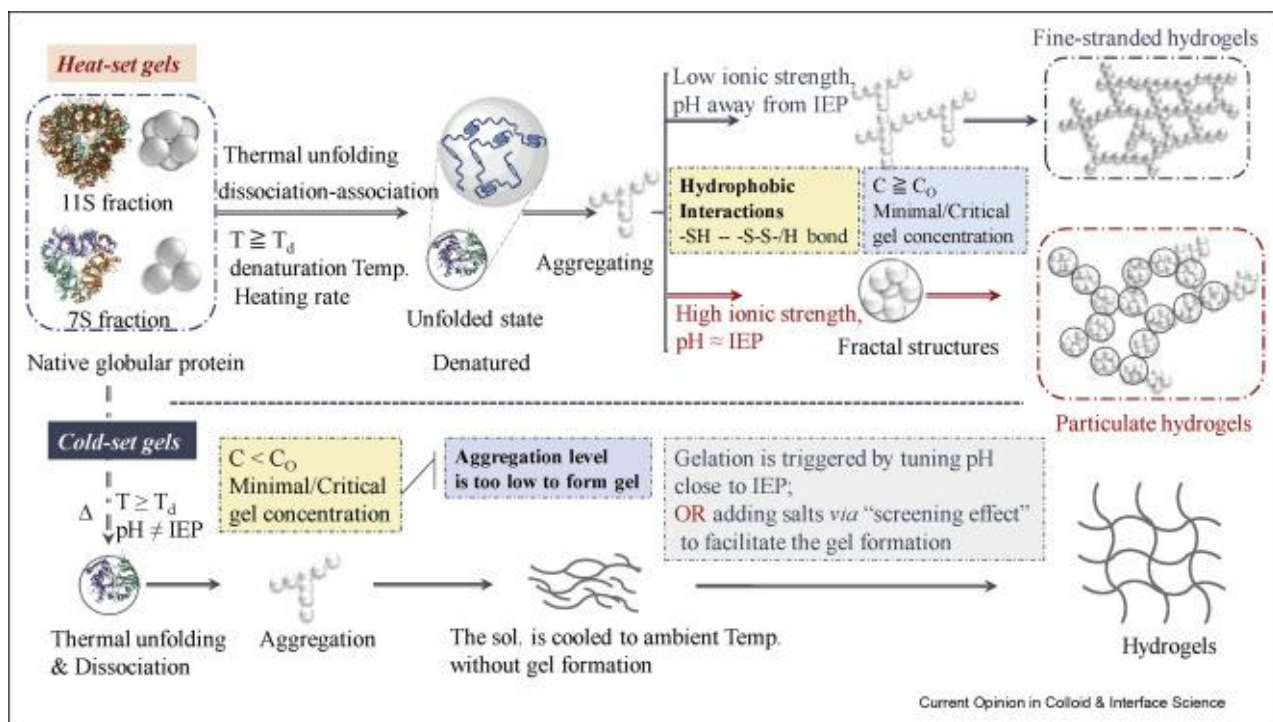


Figura 3 – Representação esquemática do processo de gelificação térmica de proteínas globulares

Fonte: (Zhong et al., 2021)

1.6.2. Aplicações de hidrogéis

Na indústria farmacêutica e de cosmética, os hidrogéis podem ser utilizados como transportadores de compostos bioativos de interesse enquanto que na área médica são utilizados para aplicações tópicas no tratamento de queimaduras ou feridas superficiais. Como exemplo, o trabalho desenvolvido por Hu et al. (2022), onde foi desenvolvido um hidrogel bioativo com capacidade de adesão e biocompatibilidade carregando componentes ativos de berberina e da *S. platensis* resultando num produto final que apresentou uma boa atividade bactericida sinérgica e de antivirulência.

Um exemplo estudado, e com interesse para a indústria cosmética, é o trabalho realizado por Ioannou & Labrou (2022), onde se desenvolveu um hidrogel estável com potencial em cosmetologia como agente esfoliante da pele, utilizando enzimas proteolíticas da *S. platensis*. Adicionalmente, os autores descrevem que o uso das enzimas da *S. platensis* é condizente com a procura por produtos mais sustentáveis e fontes sustentáveis.

Na indústria alimentar podemos citar várias aplicações dos hidrogéis. Uma delas é o tofu, um hidrogel formado principalmente à base de proteína de soja (Wu et al., 2016). No estudo desenvolvido por Alves & Domingues (2017), foi elaborado um hidrogel energético com a adição de extrato de hibisco. Os hidrogéis foram elaborados com base na combinação

proteína/carboidrato, nomeadamente proteína de arroz e amido de arroz em diferentes proporções, para além de formulações com adição de pectina com o intuito de reduzir a sinérese do gel. No final do estudo o produto desenvolvido apresentou propriedades antioxidantes e energéticas, tornando o produto atrativo para um nicho de consumidores, como por exemplo pessoas praticantes de atividade física intensa.

Outra aplicação na indústria alimentar onde os hidrogéis assumem um papel relevante, é o uso de hidrogéis para formar embalagens biodegradáveis com polímeros naturais, resultando em vantagens tais como baixa geração de resíduos poluentes. A Tabela 4 apresenta um conjunto de diferentes tipos de hidrogéis de base natural e respetivas aplicações.

Tabela 4 - Propriedades de hidrogéis utilizados em embalagens alimentares

Polímero	Material	Origem	Solubilidade	Vantagens	Desvantagens	Referências
Polissacarídeos	Amido	Plantas	Água	Alta biocompatibilidade com polímeros	Altamente hidrofílico, quebradiço	(J. Zhang, 2015)
	Chiclete	Resinas	Água	Propriedades emulsionantes.	Propriedades de barreira mecânicas instáveis e fracas	(Nouri et al., 2018)
	Alginato	alga marinha	Água, etanol	Propriedades autocurativas, barreira ao vapor de água.	Instabilidade contra radiação ou manuseio	(Parreidt et al., 2018)
	Celulose bacteriana	Bactérias	Água	Versatilidade formadora de filme, ótima barreira, propriedades mecânicas e térmicas.	Processo laborioso de isolamento	(Saha et al., 2019)
Proteína	Zeína	Milho	Etanol, acetona	Propriedades formadoras de filme	Frágil	(Moreno et al., 2019)
	Isolado de proteína de soja	Soja	Água, etanol	Propriedades de barreira a gases, filmes responsivos a pH e temperatura	Resistência à água, rígida e quebradiça	(H. Zhang et al., 2014)
	Gelatina	Colágeno	Água	Grande capacidade de gelificação, filmes responsivos ao pH e à temperatura	Altamente hidrofílico	(Said et al., 2023)
Lipídios	Acetoglicerídeos	Ácido graxo	Água por emulsão	Propriedades de estiramento, permeabilidade reduzida ao vapor de água	Baixa resistência mecânica, baixa permeabilidade ao oxigênio	(Ramos et al., 2012)
Outro	Lignina	Madeira	Água, etanol	Capacidade antioxidante, altas propriedades mecânicas	Altamente hidrofílico, quebradiço.	(Morales et al., 2022)
	Ácido poliláctico	Biomassa de milho	Solventes orgânicos	Ótimas propriedades mecânicas	Filmes frágeis e fracos	(Stefaniak & Masek, 2021)

Fonte: adaptado de (Leyva-Jiménez et al., 2023)

No trabalho realizado por Moreira et al. (2011), os autores desenvolveram hidrogéis energéticos com sabor de limão com adição de *S. platensis*, os ingredientes para elaboração dos hidrogéis foram selecionados com base em produtos similares encontrado em mercados da região e na legislação vigente. Como resultados obtidos, formaram-se hidrogéis com concentrações de *Spirulina platensis* de 0,1%, 0,25% e 0,4%, a formulação que teve maior adição da microalga foram os géis que obtiveram maior aceitação, demonstrando uma aplicação dos hidrogéis de maneira direta na alimentação humana.

1.7. Técnica de impressão 3D

A impressão 3D também conhecida como manufatura aditiva (AM) é uma técnica que tem sido amplamente investigada no setor alimentar, pois permite a personalização do design de alimentos, facilitando a cadeia de abastecimento visto que se pode manipular o seu formato.

A impressão 3D de alimentos pode ainda ampliar as fontes alimentares da população, pois permite o uso de fontes não-convencionais como biomassa de insetos, fibras alimentares vegetais e subprodutos da indústria alimentar (Payne et al., 2016; Tran, 2016). Tal torna-se uma oportunidade para a indústria pois a técnica pode ser utilizada na área alimentar em alimentos com requisitos específicos como alimentos militares, espaciais, idosos e alimentos de confeitaria (Liu et al., 2017; Pan et al., 2022).

Atualmente existem quatro técnicas principais de impressão 3D: impressão baseada em extrusão, impressão por sinterização seletiva (SLS), jato de encardenação e impressão a jato de tinta (Liu et al., 2017). As vantagens e desvantagens da aplicação destas técnicas estão apresentados na Tabela 5.

A metodologia de impressão de maior interesse para o trabalho é a baseada na extrusão, mais especificamente em impressora de extrusão baseadas em seringas. Neste tipo de impressão alguns aspetos essenciais são a reologia do fluido/material e fatores de impressão como o fluxo, altura entre camadas e diâmetro da peça a imprimir.

As impressões de materiais alimentares por extrusão utilizados podem ser divididas em 3 categorias. No primeiro grupo podemos considerar materiais que são prontos para impressão tais como o chocolate e o queijo. No segundo materiais que necessitam de um tratamento prévio para impressão, tais como vegetais, carnes e frutas; estes tratamentos tem a função de melhorar as condições de extrusão. No terceiro e último grupo, incluímos ingredientes alternativos tais como fontes alternativas de proteínas, algas e fungos (Pan et al., 2022).

Tabela 5 - Comparação entre os fatores que afetam a impressão 3D

	Impressão baseada em extrusão	Sinterização seletiva a laser	Jateamento de encardenação	Impressão a jato de tinta	
Fatores que afetam a precisão da impressão	Propriedades dos materiais	Propriedades reológicas, resistência mecânica, Tg	Temperatura de fusão, fluidez, tamanho de partícula, molhabilidade, Tg	Fluidez, tamanho de partícula, molhabilidade e viscosidade e tensão superficial do ligante	Compatibilidade, propriedades reológicas da tinta, propriedades de superfície
	Fatores de processamento	Altura de impressão, diâmetro do bico, taxa de impressão, taxa de movimento do bico	Tipos de laser, potência, densidade de energia, velocidade de digitalização, diâmetro do ponto e espessura do laser	Tipos de cabeçote, taxa de impressão, diâmetro do bico, espessura da camada	Temperatura, taxa de impressão, diâmetro do bico, altura de impressão
	Pós-processamento	Aditivo, controle da formulação	Remoção de peças em excesso	Aquecimento, cozimento, revestimento de superfície, remoção de peças em excesso	Não é necessário

Tg: temperatura de transição vítrea.

Fonte: adaptado de Liu et al. (2017)

2. Metodologia

O trabalho foi dividido em diversas etapas, cujo resumo é apresentado na Figura 4, evidenciando as análises realizadas e as amostras utilizadas em cada ensaio. As etapas incluíram desde os testes preliminares para validar a formação de gel, o estudo (baseado em planeamentos experimentais) das formulações e parâmetros do processo de formação de gel e a sua caracterização. As amostras mais promissoras foram caracterizadas em maior profundidade, relativamente à sua estrutura, morfologia, e comportamento reológico.

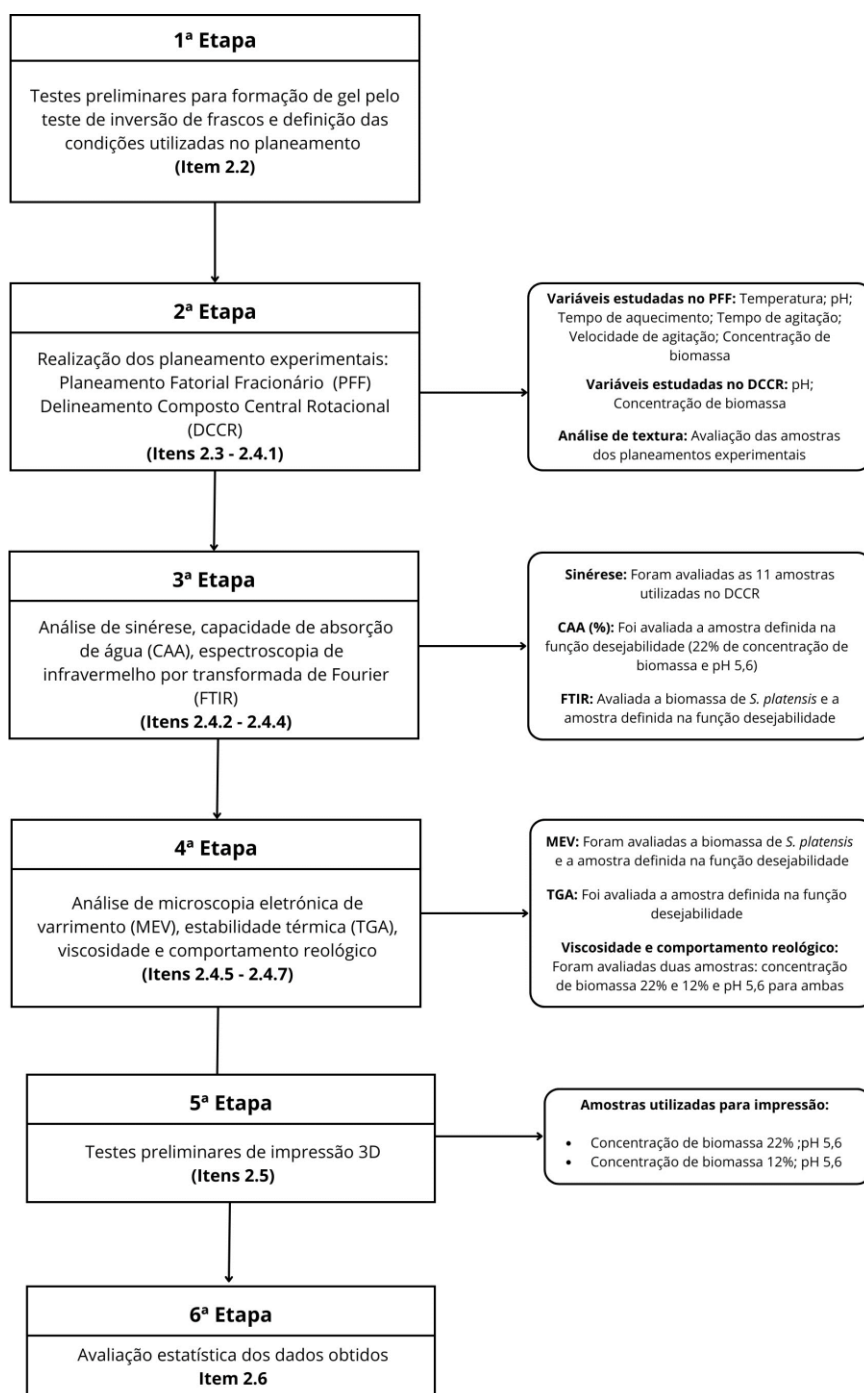


Figura 4 - Resumo gráfico da metodologia utilizada e respetivas amostras empregadas

2.1. Matéria prima e reagentes

A biomassa de *Spirulina platensis* foi adquirida em comércios locais em Portugal (Pingo Doce). Corresponde a uma amostra da empresa *Shine - SuperFoods* com as seguintes características: teor de proteínas 69g/100g; lípidos 6,4g/100g e carboidratos 4,4g/100g. A amostra foi armazenada sob refrigeração para posterior utilização. O ácido acético utilizado com grau de pureza $\geq 99,8\%$ foi adquirido na Honeywell Fluka, o hidróxido de sódio com grau de pureza $\geq 98\%$ foi adquirido na Sigma-Aldrich.

2.2. Testes preliminares

Tendo por base uma pesquisa bibliográfica inicial no que respeita à produção de géis a partir de microalgas e alguns testes preliminares de produção de géis, foram definidas as variáveis relevantes a ser consideradas no planeamento fatorial fracionário.

Para definir a gama de concentrações a utilizar para a biomassa, foram realizados testes de inversão de frascos. Para esta avaliação, após o processo de produção das amostras o frasco é invertido para observar o comportamento; se a amostra permanecer ao seu estado inicial (sem escoar pelo frasco) é um indicativo de formação de gel. Para a produção dos géis foi utilizada uma escala em volume de 10 mL (água destilada) à qual foi adicionada biomassa nas concentrações 4%, 6%, 8% (m/v), calculada relativamente ao volume da água. Foram utilizadas as seguintes condições: pH 6,8, sem agitação prévia e temperatura de 85°C. O aspeto das amostras obtidas é apresentado na Figura 5.

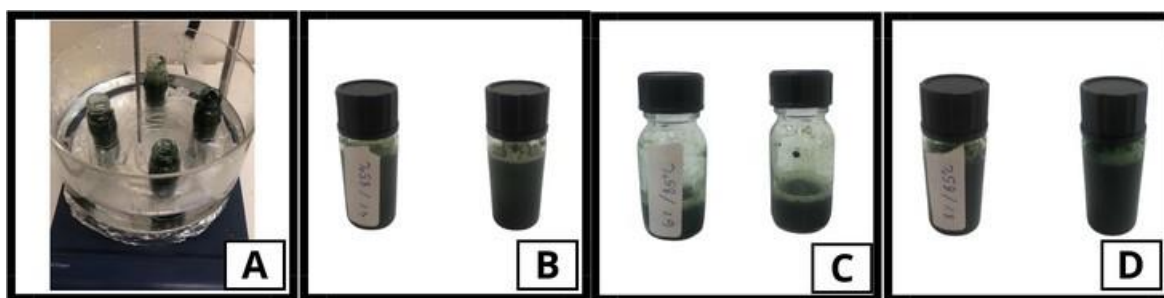


Figura 5 – A: Preparação dos géis, B: amostra com 4% de biomassa, C: amostra com 6% de biomassa, D: amostra com 8% de biomassa.

Os resultados mostram que não houve formação de géis nas concentrações de biomassa integral de *S. platensis* inicialmente testadas (4%, 6% e 8%). Desta forma, foram realizados testes com concentrações superiores (16 e 20% de biomassa), adicionando também um tratamento mecânico prévio com Ultraturrax (CAT Scientific, Unidrive X1000D) com o

objetivo de romper a parede celular da microalga e libertar compostos que podem auxiliar na formação de gel.

A Figura 6 apresenta os resultados dos testes preliminares realizados para as amostras com 16 e 20% de biomassa que mostraram, após o aquecimento e refrigeração, um aspeto mais sólido e firme em relação aos testes anteriores com concentração inferior de biomassa.

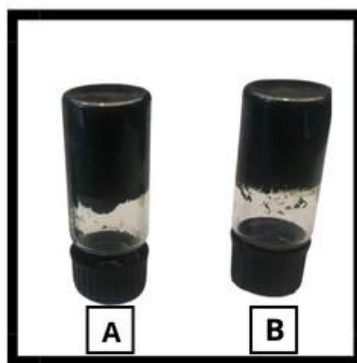


Figura 6 – Teste de inversão de frascos (A: amostra com 16% de biomassa, B: amostra com 20% de biomassa).

A partir dos testes realizados, foram definidas as variáveis a estudar no planeamento fatorial fracionário (PFF), apontadas na seção 2.3, relacionadas com o processo de formação do hidrogel. Adicionalmente, estes ensaios preliminares permitiram definir a concentração de biomassa numa gama entre 12 e 20%, pois com o aumento da concentração de biomassa observou-se o comportamento característico de gel pelo teste de inversão de frascos.

2.3. Estudo do processo de formação de hidrogéis

Para estudar o processo de formação de hidrogéis a partir da biomassa integral de *Spirulina platensis*, foi aplicada uma estratégia sequencial de planeamento experimental. Inicialmente, foi utilizado um Planeamento Fatorial Fracionário (PFF) 2^{6-2} para estudar os efeitos de seis variáveis sendo x_1 a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), x_2 o pH, x_3 o tempo de aquecimento (min), x_4 o tempo de agitação (min), x_5 a velocidade de agitação (rpm) e x_6 a concentração de biomassa (%). Como respostas, foram analisadas a firmeza (g), consistência (g.sec), coesividade (g) e trabalho de coesão (g.sec). Os níveis reais e codificados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Níveis codificados e reais das variáveis do PFF 2⁶⁻² para avaliação da capacidade de formação de gel da biomassa integral de *Spirulina platensis*.

Níveis/ Variáveis	Temperatura (°C)	pH	Tempo de aquecimento (min)	Tempo de agitação (min)	Velocidade de agitação (rpm)	Concentração de biomassa (%)
-1	85	6	30	5	6500	12
0	90	8	45	10	8000	16
1	95	10	60	15	9500	20

Os ensaios foram conduzidos conforme a metodologia de preparação utilizada nos estudos preliminares, o que incluiu o tratamento homogeneização por ultraturrax, conforme os níveis definidos na Tabela 6. As amostras de biomassa foram pesadas, a água destilada adicionada, seguida de ajuste do pH. Este foi feito recorrendo a soluções de ácido acético e hidróxido de sódio 0,1 M. As amostras foram depois submetidas ao tratamento mecânico com ultraturrax (CAT Scientific, Unidrive X1000D Homogenizer Drive, Germany), posteriormente aquecidas, de acordo com a temperatura e intervalo de tempo definidos. Na etapa final, as amostras são deixadas em repouso por 8 a 12 h a 4 °C.

Após definidas as variáveis significativas para a firmeza, consistência, coesividade e trabalho de coesão no delineamento PFF, sendo estas o pH e a concentração de biomassa, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² utilizando 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central totalizando 11 ensaios. O resumo dos níveis codificados e reais das variáveis para realizar os ensaios são apresentadas na Tabela 7. A temperatura foi fixada em 90°C, o tempo de aquecimento em 30 minutos, o tempo de agitação em 10 minutos e a velocidade de agitação em 8000 rpm.

Tabela 7 - Níveis codificados e reais das variáveis do DCCR 2² para avaliar a formação de gel da biomassa integral de *Spirulina platensis*

Variáveis / Níveis	-1,41	-1,00	0,00	1,00	1,41
pH	5,00	5,29	6,00	6,71	7,00
Concentração de biomassa (%)	16,00	16,87	19,00	21,13	22,00

2.4. Caracterização dos hidrogéis

2.4.1. Análise de textura

Para determinar a capacidade de formação de gel foi utilizada a metodologia descrita por Lupatini (2016) com adaptações. As amostras obtidas nos ensaios foram submetidas a análise em texturómetro (Stable Micro Systems, TA.HDPlus Texture Analyser, Inglaterra)

utilizando o *probe* A/BE – d 35 (Figura 7), com uma compressão da amostra de 40 mm e velocidade de 1 mm.s⁻¹, obtendo como resposta a firmeza (g), consistência (g.sec), coesividade (g) e trabalho de coesão (g.sec) que foram utilizados como parâmetros de resposta nos planeamentos experimentais.



Figura 7 - Texturómetro empregado para avaliação de textura dos hidrogéis de *S. platensis*

2.4.2. Sinérese

O procedimento para a determinação da sinérese foi adaptado de Amaya-Llano et al. (2008). Para o efeito, pesaram-se 1,5 g de amostra para um tubo de centrífuga, o qual foi depois submetido a centrifugação a uma velocidade de 2000 rpm durante 30 minutos. Após este tempo retirou-se o sobrenadante e o frasco foi pesado novamente. A sinérese (%) foi determinada de acordo com Equação 1.

$$\text{Sinérese (\%)} = \frac{\text{Massa inicial da amostra} - \text{Massa final da amostra}}{\text{Massa inicial da amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

2.4.3. Capacidade de absorção de água

Para determinar a capacidade de absorção de água (CAA), aproximadamente 0,5 g do gel liofilizado foram pesadas para tubos de ensaio, seguido da adição de 1 mL de água destilada. Após o tempo definido o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma seringa e o conteúdo do tubo pesado novamente. A CAA foi avaliada em diferentes tempos (15, 30, e 45 min e 1, 1,5, 2 e 24 h) e determinada a partir da Equação 2.

$$\text{CAA (\%)} = \frac{\text{Massa final da amostra} - \text{Massa inicial da amostra}}{\text{Massa inicial da amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

2.4.4. Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier da biomassa de *Spirulina platensis* e gel (22% de biomassa de *S. platensis*, pH 5,6) foi efetuada usando um Espectrômetro FT-IR MB3000 equipado com o software Horizon MB FTIR (ABB). Os espectros foram registados na gama de 550 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} utilizando uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 varrimentos.

2.4.5. Microscopia eletrónica de varrimento (MEV)

A morfologia da superfície dos hidrogéis e biomassa foi analisada através de microscopia eletrónica de varrimento (MEV), utilizando um microscópio eletrónico PHILIPS - Modelo XL30. As amostras foram recobertas com uma fina camada de metal e as condições de análise foram as seguintes: aceleração de voltagem de 25 kV em vácuo e a faixa de ampliação de 16 a 10000 vezes.

2.4.6. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica do hidrogel foi analisada por análise termogravimétrica (TGA) utilizando o equipamento NETZSCH TG modelo 209F3 Tarsus. A partir desta análise é possível entender o comportamento de degradação e desidratação do hidrogel ao longo de um intervalo de temperatura. No presente estudo foi utilizado 0°C a 800°C a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em atmosfera de azoto (N_2).

2.4.7. Viscosidade e comportamento reológico

Os testes para a determinação da viscosidade e avaliação do comportamento reológico foram efetuados num reómetro AR-G2 (TA Instruments) a 25°C usando uma geometria de placa paralela com 20 mm de diâmetro (Figura 8) e espaçamento de 1 mm. Para determinação da viscosidade, foram realizadas medidas na faixa de taxa de cisalhamento de 0,001 a 1000,0 s^{-1} . Os testes de varrimento de amplitude foram realizados a uma frequência angular constante de 1,0 Hz, com a deformação por cisalhamento variando na gama de 0,01 a 100%. A partir destas medidas, a faixa de viscoelasticidade linear foi obtida, tendo-se definido uma deformação constante de $\gamma_0 = 0,1\%$ e uma faixa de 0,01 Hz – 100 Hz para realizar os testes de varredura de frequência.



Figura 8 - Reómetro acoplado a geometria de placas paralelas

2.5. Testes preliminares de impressão 3D

Para analisar o potencial dos hidrogéis produzidos na área da impressão 3D foram realizados testes preliminares com as amostras mais promissoras. Na Figura 9 é apresentado o protótipo de impressora utilizada para o processo. A impressora mostrada na Figura 9A corresponde a um protótipo de impressora 3D com extrusão por motor e na Figura 9B é mostrada uma adaptação para extrusão pneumática.

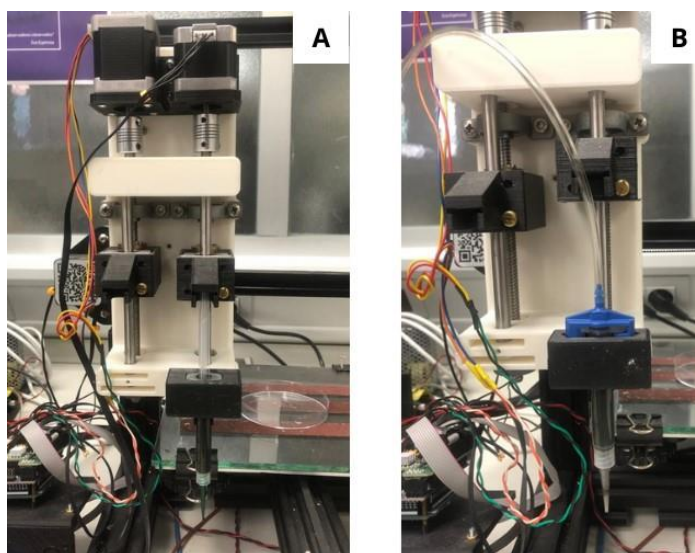


Figura 9 - Protótipo de impressora 3D por extrusão (A) por motor ou pistão, (B) pneumática ou pressão

Os testes foram realizados para dois modelos de impressão, formato de malha e cilindro. Foram testadas diferentes condições para impressão: velocidade de impressão 1mm/s, fluxo entre 55% - 60% e capilares de diâmetro 0,84 mm e 1,2 mm.

2.6. Análise estatística

Todos os ensaios dos planejamentos foram realizados aleatoriamente e os resultados tratados com o programa STATISTICA 11.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). A adequação dos modelos foi avaliada através de análise de variância (ANOVA), e o teste de Tukey foi usado para avaliar as diferenças entre as médias considerando-se um valor- $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.

Para definir as melhores condições do processo de formação de gel com base nas respostas de firmeza, consistência, coesividade, e trabalho de coesão, foram utilizadas as funções de desejabilidade, com valores para o intervalo entre 0 e 1, sendo 0 um valor indesejável (minimização da resposta) e 1 um valor desejável (maximização da resposta).

3. Resultados e discussão

3.1. Estudo das variáveis de formação do hidrogel

Os resultados obtidos no PFF podem ser visualizados na Tabela 8. Analisando-se os resultados foram calculados os efeitos das variáveis (temperatura, pH, tempo de aquecimento, tempo e velocidade de agitação e concentração de biomassa), os quais estão apresentados nas Tabelas 9 (firmeza e consistência) e 10 (coesividade e trabalho de coesão).

Tabela 8 - Matriz do PFF 2^{6-2} com níveis codificados das variáveis e repostas para avaliação da capacidade de formação de gel a partir da biomassa integral de *Spirulina platensis*

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	16,28	268,53	-7,81	-2,42
2	1	-1	-1	-1	1	-1	25,11	322,81	-7,02	-2,12
3	-1	1	-1	-1	1	1	82,27	1345,99	-87,21	-147,85
4	1	1	-1	-1	-1	1	105,61	1738,54	-108,4	-179,17
5	-1	-1	1	-1	1	1	150,18	2644,72	-143,69	-239,43
6	1	-1	1	-1	-1	1	110,4	1793,53	-108,22	-173,83
7	-1	1	1	-1	-1	-1	32,28	533,86	-23,38	-32,78
8	1	1	1	-1	1	-1	27,08	467,61	-21,86	-29,43
9	-1	-1	-1	1	-1	1	99,68	1842,14	-119,07	-206,22
10	1	-1	-1	1	1	1	194,77	3425,2	-170,98	-256,17
11	-1	1	-1	1	1	-1	26,52	463,5	-27,33	-39,44
12	1	1	-1	1	-1	-1	54,57	826,5	-36,59	-64,3
13	-1	-1	1	1	1	-1	95,39	1566,6	-83,35	-118,96
14	1	-1	1	1	-1	-1	55,49	945,12	-44,22	-68,96
15	-1	1	1	1	-1	1	59,29	1021,12	-66,21	-115,09
16	1	1	1	1	1	1	57,65	966,54	-63,78	-109,85
17	0	0	0	0	0	0	78,8	1275,8	-78,73	-115,05
18	0	0	0	0	0	0	89,5	1391,36	-73,85	-116,25
19	0	0	0	0	0	0	108,8	1909,17	-91,52	-155,55

x₁ – temperatura (°C); x₂ - pH; x₃ – tempo de aquecimento (min); x₄ – tempo de agitação (min); x₅ – velocidade de agitação (rpm); x₆ - concentração de biomassa (%); y₁ – firmeza (g); y₂ – consistência (g.seg); y₃ – coesividade (g); y₄ – trabalho de coesão (g.seg)

Tabela 9 - Efeito das variáveis estudadas sobre as respostas de y_1 – firmeza (g) e y_2 – consistência (g.sec)

Fatores	Firmeza				Consistência			
	Efeito	Erro Padrão	t (11)	p-valor	Efeito	Erro Padrão	t (11)	p-valor
Média	77,36	7,66	10,10	0,0000*	1302,56	134,04	9,72	0,0000*
x₁	8,59	16,69	0,51	0,6163	99,92	292,14	0,34	0,7382
x₂	-37,74	16,69	-2,26	0,0431*	-680,62	292,14	-2,33	0,0381*
x₃	-2,12	16,69	-0,12	0,901	-36,76	292,14	-0,13	0,9019
x₄	11,76	16,69	0,7	0,4946	242,64	292,14	0,83	0,4224
x₅	15,66	16,69	0,94	0,3666	279,20	292,14	0,96	0,3581
x₆	65,88	16,69	3,95	0,0019*	1172,91	292,14	4,01	0,0017*

*Valor significativo (p-valor < 0,05); x_1 – temperatura (°C); x_2 - pH; x_3 – tempo de aquecimento (min); x_4 – tempo de agitação (min); x_5 – velocidade de agitação (rpm); x_6 - concentração de biomassa (%)

Tabela 10 - Efeito das variáveis estudadas sobre as respostas de y_3 – Coesividade (g) e y_4 – Trabalho de coesão (g.sec)

Fatores	Coesividade				Trabalho de coesão			
	Efeito	Erro Padrão	t (11)	p-valor	Efeito	Erro Padrão	t (11)	p-valor
Média	-71,74	6,32	-11,35	0,0000*	-114,36	9,90	-11,55	0,0000*
x₁	-0,38	13,77	-0,03	0,97859	2,295	21,58	0,11	0,91706
x₂	31,2	13,77	2,26	0,0428*	43,775	21,58	2,03	0,06528
x₃	1,21	13,77	0,09	0,93131	1,17	21,58	0,05	0,95765
x₄	-12,99	13,77	-0,94	0,36418	-21,495	21,58	-0,99	0,33884
x₅	-11,41	13,77	-0,83	0,42346	-12,56	21,58	-0,58	0,57129
x₆	-77	13,77	-5,59	0,0001*	-133,65	21,58	-6,19	0,0000*

*Valor significativo (p-valor < 0,05); x_1 – temperatura (°C); x_2 - pH; x_3 – tempo de aquecimento (min); x_4 – tempo de agitação (min); x_5 – velocidade de agitação (rpm); x_6 - concentração de biomassa (%)

As variáveis que tiveram efeitos significativos sobre as respostas de firmeza e consistência foram x_2 (pH) e x_6 (concentração de biomassa). O efeito do pH sobre a firmeza e consistência foi negativo dentro da faixa estudada, indicando que quanto menor o pH, maiores são os valores de firmeza e consistência. Tal pode ser justificado pelo facto de as proteínas (componente maioritário da biomassa de *S. platensis*) terem uma carga global que altera com o pH, podendo ocorrer repulsões electrostáticas que influenciam as características do gel, tal como descrito por Renard & Lefebvre (1992).

Para x_6 (concentração de biomassa) o efeito foi positivo o que demonstra que o aumento desta variável melhora as respostas de firmeza e consistência dos géis. O aumento da concentração da biomassa, aumenta a quantidade de sólidos totais em suspensão, e pode intensificar as interações entre as moléculas.

Para as respostas coesividade e trabalho de coesão, a análise é feita a partir da área na região negativa do gráfico. Com o objetivo de melhorar a análise destas repostas, os efeitos foram considerados com sinal inverso, portanto, para y_3 (coesividade) os géis passam a ser mais

coesos se houver aumento da biomassa (x_6) e diminuição do pH (x_2). O efeito mais significativo para o trabalho de coesão foi apenas a concentração de biomassa, sugerindo que para concentrações superiores há um aumento deste fator.

A temperatura não teve efeito significativo em nenhuma das respostas para a faixa estudada (85 °C – 95 °C), porém apresentou efeito positivo para 3 respostas. Considerando que a biomassa apresenta maioritariamente proteínas na sua composição, e para a formação do gel é necessário que ocorra a desnaturação destas (temperaturas superiores a 70°C), a variável foi fixada no ponto central (90 °C).

O tempo de aquecimento não demonstrou efeito significativo para nenhuma das respostas. Desta forma fixou-se o tempo no valor intermédio analisado (30 minutos), para que a amostra pudesse ter um aquecimento homogéneo e desta forma as proteínas sofrerem desnaturação para iniciar o processo de formação da rede de gel.

A velocidade e o tempo de agitação não tiveram efeito significativo nas repostas analisadas, considerando que o pré-tratamento da biomassa auxilia na rutura celular facilitando a libertação de compostos de interesse para a formação do gel, tais como carboidratos estruturais e proteínas do conteúdo celular, tendo-se fixado estas variáveis no ponto central estudado.

3.2. Delineamento composto central rotacional

Para o desenvolvimento do delineamento composto central rotacional (DCCR), foram utilizados os resultados do planeamento anterior, tendo-se considerado apenas as variáveis significativas (pH, concentração de biomassa). Na Tabela 11 pode-se visualizar as variáveis e níveis utilizados no DCCR 2² com 3 pontos centrais, juntamente com as respostas de firmeza, consistência, coesividade e trabalho de coesão.

Tabela 11 - Matriz do DCCR 2² com níveis codificados e (reais) das variáveis e respostas para avaliação da capacidade de formação de gel

Ensaio	x_1	x_2	y_1	y_2	y_3	y_4
1	-1 (5,3)	-1 (16,9)	105,26	1757,94	-60,33	-78,17
2	1 (6,7)	-1 (16,9)	74,82	1281,03	-64,84	-115,08
3	-1 (5,3)	1 (21,1)	130,08	2372,33	-119,57	-217,67
4	1 (6,7)	1 (21,1)	122,15	2197,15	-104,45	-187,25
5	-1,41 (5)	0 (19,0)	112,07	1976,11	-100,08	-166,60
6	1,41 (7)	0 (19,0)	84,78	1352,18	-83,13	-124,73
7	0 (6)	-1,41 (16)	62,48	986,04	-30,98	-46,21
8	0 (6)	1,41 (22)	152,19	2520,06	-142,40	-208,07

9	0 (6)	0 (19,0)	121,66	2148,93	-99,97	-166,34
10	0 (6)	0 (19,0)	115,76	2038,54	-94,50	-157,03
11	0 (6)	0 (19,0)	119,76	2192,85	-111,77	-188,20

x_1 – pH; x_2 - concentração de biomassa (%); y_1 – firmeza (g); y_2 – consistência (g.sec); y_3 – coesividade (g); y_4 – trabalho de coesão (g.sec)

Pela análise da Tabela 11 é possível observar que a amostra que conduziu a valores inferiores para as respostas estudadas corresponde ao ensaio 7. Este utilizou a menor concentração de biomassa (16%); os maiores valores foram obtidos para o ensaio 8 que utilizou a maior concentração de biomassa (22%).

Analisando os resultados do DCCR foi possível determinar os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 12 para a firmeza e consistência e na Tabela 13 para coesividade e trabalho de coesão. É possível perceber que todos os percentuais de variação são adequados para o modelo com um R^2 superior a 89%. Desta forma foi possível concretizar os modelos de superfície de resposta para as respostas avaliadas.

Tabela 12 - Coeficientes de regressão do DCCR 2² para as respostas de firmeza e consistência dos géis

Fatores	Firmeza				Consistência			
	CR	Erro Padrão	t (5)	p-valor	CR	Erro Padrão	t (5)	p-valor
Média	119,06	5,46	21,82	0,00*	2126,77	98,39	21,62	0,00*
x_1 (L)	-19,24	6,68	-2,88	0,03*	-191,81	60,25	-3,18	0,02*
x_1 (Q)	-18,04	7,95	-2,27	0,07	-182,94	71,71	-2,55	0,05
x_2 (L)	49,75	6,68	7,45	0,00*	462,49	60,25	7,68	0,00*
x_2 (Q)	-9,13	7,95	-1,15	0,30	-138,48	71,71	-1,93	0,11
$x_1 \cdot x_2$	11,26	9,45	1,19	0,29	75,43	85,20	0,89	0,42

*Valor significativo (p-valor < 0,05); x_1 – pH; x_2 - concentração de biomassa (%).

Adicionalmente, os resultados da Tabela 12 confirmaram os obtidos no PFF onde os efeitos, negativo do pH e positivo da concentração de biomassa, foram significativos para a formação de gel, melhorando as suas características de firmeza e consistência. Considerando coeficientes de regressão significativos (p-valor < 0,05), a partir dos coeficientes reparametrizados apresentados na Tabela A. 1 no Anexo A, obteve-se as Equações 3 e 4 para a firmeza e consistência dos géis, respetivamente. Os termos quadráticos da análise foram considerados dado o seu valor ser próximo do p-valor a 0,10, permitindo assim obter um melhor ajuste dos dados.

$$Firmeza (g) = 119,06 - 9,62 \times x_1 - 9,02 \times x_1^2 + 24,88x_2 - 4,56x_2^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$Consistência (g \cdot \text{seg}) = 2126,77 - 191,81x_1 - 182,94x_1^2 + 462,49x_2 - 138,48x_2^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

Tabela 13 - Coeficientes de regressão do DCCR 2² para as respostas de coesividade e trabalho de coesão

Fatores	Coesividade				Trabalho de coesão			
	CR	Erro Padrão	t (5)	p-valor	CR	Erro Padrão	t (5)	p-valor
Média	102,08	6,41	15,93	0,00*	170,52	9,78	17,44	0,00*
x1 (L)	-4,32	3,92	-1,10	0,32	-6,59	5,99	-1,10	0,32
x1 (Q)	-5,70	4,67	-1,22	0,28	-9,14	7,13	-1,28	0,26
x2 (L)	32,05	3,92	8,17	0,00*	55,07	5,99	9,20	0,00*
x2 (Q)	-8,16	4,67	-1,75	0,14	-18,41	7,13	-2,58	0,05
x1.x2	-4,91	5,55	-0,88	0,42	-16,83	8,47	-1,99	0,10

*Valor significativo (p-valor < 0,05); x₁ – pH; x₂ - concentração de biomassa (%).

Da análise da Tabela 13, pode verificar-se que apenas a componente linear da variável concentração de biomassa foi significativa (p-valor < 0,05). Adicionalmente, tal como nas equações anteriores os termos quadráticos foram considerados e a partir dos coeficientes reparametrizados apresentados na Tabela A. 2 no Anexo A foi obtido as Equações 5 e 6 para a coesividade e trabalho de coesão.

$$\text{Coesividade (g)} = 96,72 + 32,05x_2 - 6,48x_2^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{Trabalho de coesão (g \cdot \text{seg})} = 161,92 + 55,07x_2 - 15,72x_2^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

Para o cálculo da análise de variância (ANOVA) os parâmetros não significativos foram incorporados. Desta forma foi possível determinar se os modelos matemáticos explicam bem os dados experimentais, analisando a significância a partir do p-valor (p-valor < 0,05) e se o F_{calculado} (F_{cal}) > F_{tabelado} (F_{tab}). Analisando os resultados da Tabela 14 percebe-se que todos os modelos tiveram um adequado ajuste aos dados, indicando que as superfícies de resposta podem representar o processo envolvido.

Tabela 14 - ANOVA dos modelos DCCR 2² para os fatores analisados dos géis

Fonte de Variação	Firmeza (g)						
	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	p-valor	R ² (%)
Regressão	6173,33	4,00	1543,33	16,16	4,53	0,002	91,50
Resíduos	573,12	6,00	95,52				
Total	6746,45	10,00					
Fonte de Variação	Consistência (g.seg)						
	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	p-valor	R ² (%)
Regressão	6173,33	4,00	1543,33	16,16	4,53	0,002	93,02
Resíduos	573,12	6,00	95,52				
Total	6746,45	10,00					
Fonte de Variação	Coesividade (g)						
	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	p-valor	R ² (%)
Regressão	8478,67	2,00	4239,33	32,45	4,46	0,0001	89,02
Resíduos	1045,28	8,00	130,66				
Total	9523,95	10,00					
Fonte de Variação	Trabalho de coesão (g.seg)						
	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	p-valor	R ² (%)

Regressão	25790,35	2,00	12895,17	30,46	4,46	0,0002	92,27
Resíduos	3387,08	8,00	423,38				
Total	29177,42	10,00					

Analisando os gráficos das Figuras 10 e 11 pode-se concluir que para concentrações de biomassa superiores formam-se géis com maior firmeza e consistência. Tal pode ser justificado pelo facto de uma maior concentração de sólidos na amostra e, conseqüentemente, maior concentração de proteínas e outros compostos da biomassa poderem tornar as interações proteína-proteína, proteína-água e outras mais facilitadas dado a maior quantidade de grupos disponíveis (Mangino, 1984).

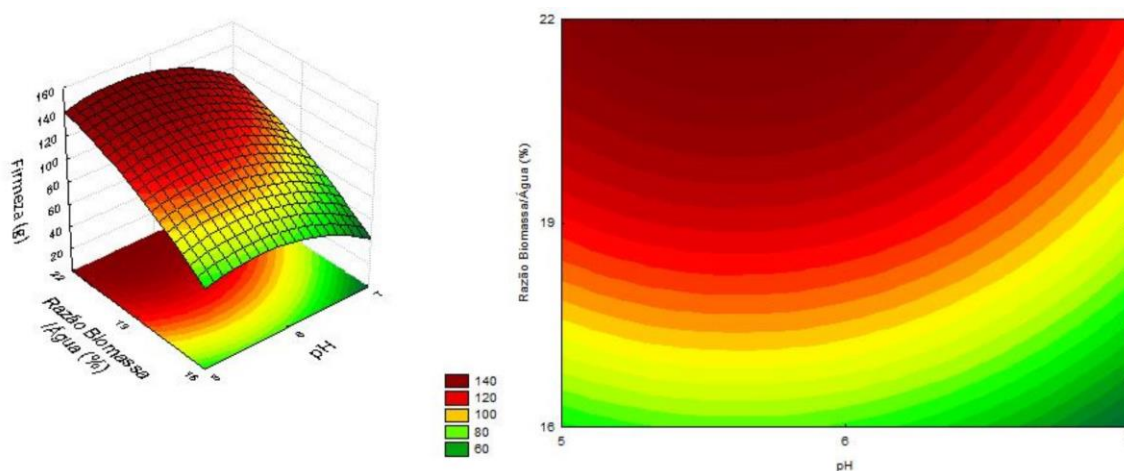


Figura 10 - Superfície de resposta e curva de contorno para Firmeza (g) dos géis de *S. platensis*

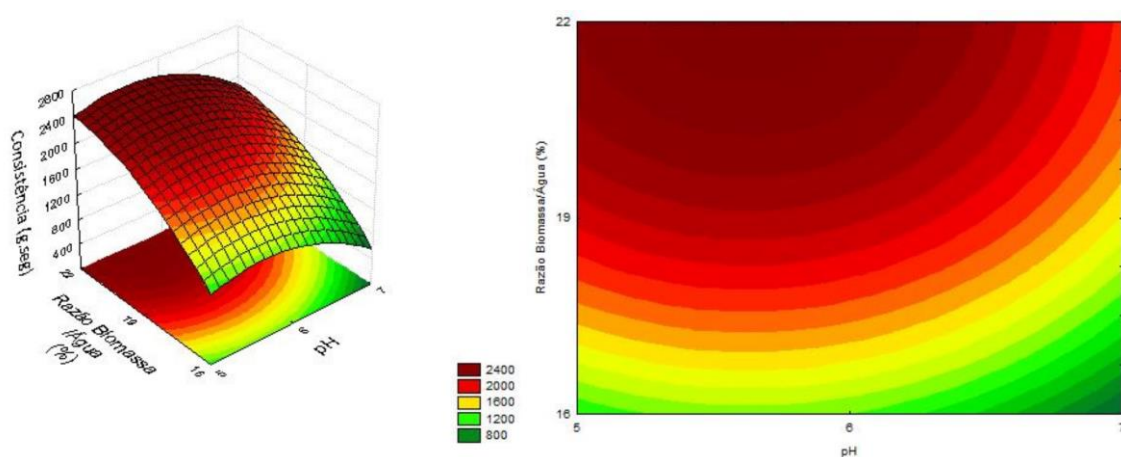


Figura 11 - Superfície de resposta e curva de contorno para Consistência (g.sec) dos géis de *S. platensis*

Nas Figuras 12 e 13 apresentam-se as superfícies de resposta e curvas de contorno para a coesividade e trabalho de coesão. Tal como demonstrado nos modelos matemáticos a única

variável que teve influência neste parâmetro foi a concentração de biomassa (%). Níveis superiores aos da faixa estudada de concentração de biomassa (22%), poderiam tornar o processo inviável devido à dificuldade de solubilização e homogeneização da biomassa, não favorecendo a obtenção de resultados confiáveis.

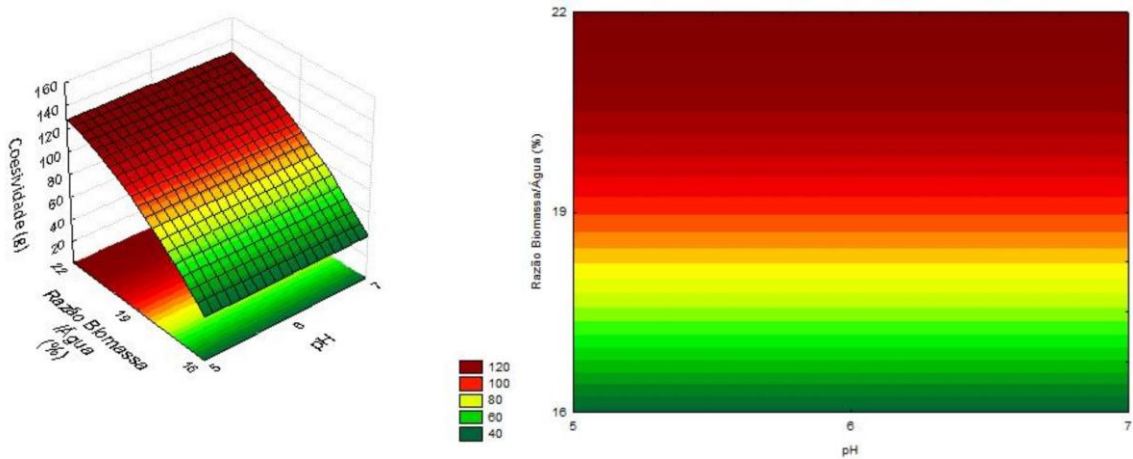


Figura 12 - Superfície de resposta e curva de contorno para Coesividade (g) dos géis de *S. platensis*

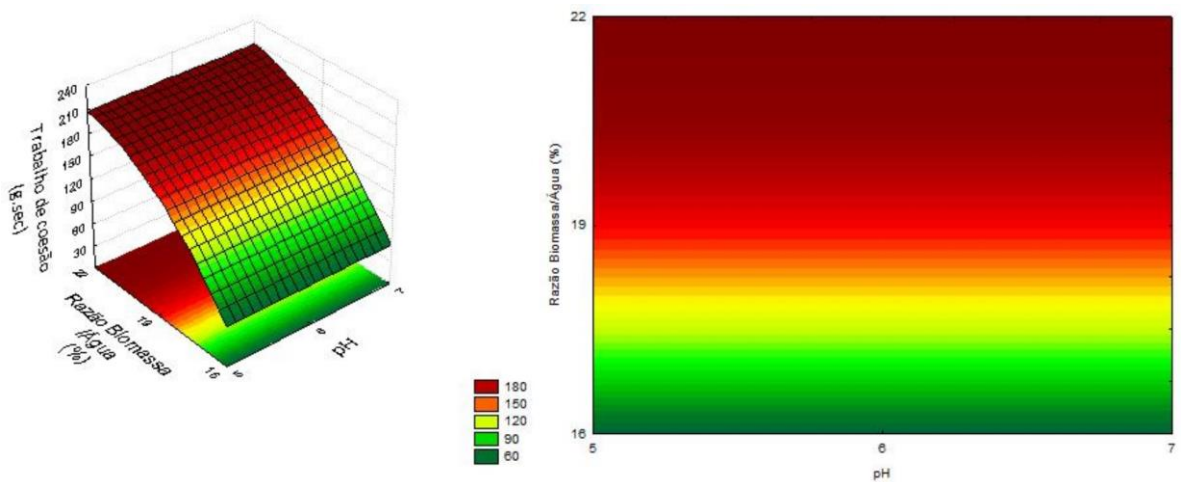


Figura 13 - Superfície de resposta e curva de contorno para Trabalho de coesão (g.sec) dos géis de *S. platensis*

Foi realizada a análise da função desejabilidade (Figura 14) para as respostas avaliadas e pode-se observar que a condição de pH mais favorável para as respostas avaliadas corresponde ao valor codificado de -0,56 (corresponde ao valor real de 5,6); para a concentração de biomassa o valor codificado é no ponto axial superior do DCCR (1,41) (corresponde a concentração de 22%), ponto em que os géis são mais firmes e consistentes.

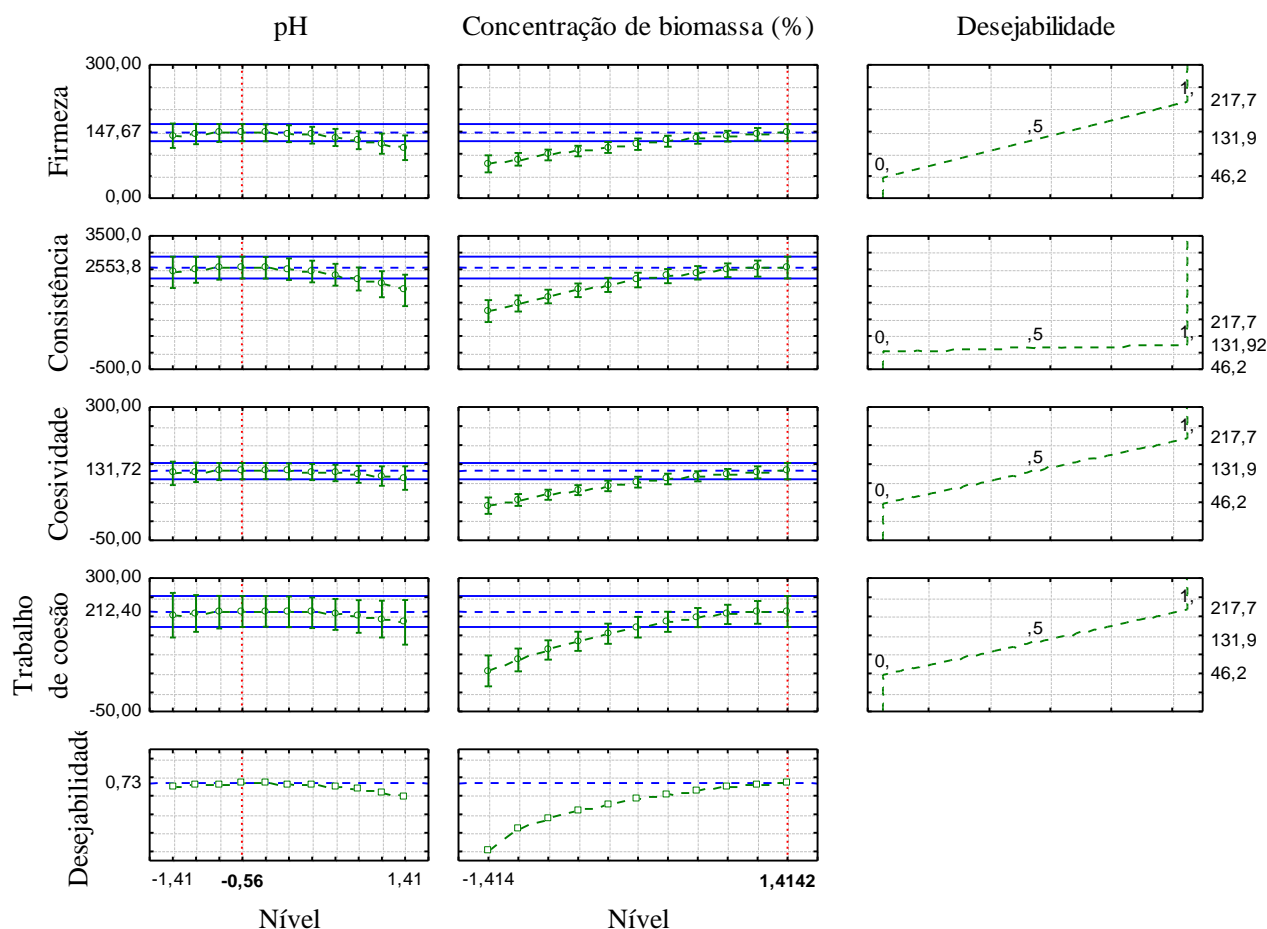


Figura 14 - Perfil dos valores previstos/otimizizados e da desejabilidade para o DCCR

Nas Tabelas 15, 16, 17 e 18 pode-se verificar os resultados das respostas previstas pelo modelo assim como os respectivos desvios absoluto e relativo. Pode-se inferir que os desvios obtidos na região maximizada foram relativamente baixos, e que o processo tendeu a desvios maiores quando condições como pH extremos são apresentados ou ainda uma concentração de biomassa baixa, pois não se atinge uma concentração crítica para formação de gel.

Tabela 15 - Valores de firmeza experimentais, previsto pelo modelo e desvios do planejamento

Ensaio	Resultado experimental	Previsão Modelo	Desvio absoluto	Desvio relativo
1	105,26	90,22	-15,04	-14,29
2	74,82	70,98	-3,84	-5,13
3	130,08	139,98	9,90	7,61
4	122,15	120,74	-1,41	-1,16
5	112,07	114,70	2,63	2,34
6	84,78	87,57	2,79	3,29
7	62,48	74,91	12,43	19,90
8	152,19	145,07	-7,12	-4,68
9	121,66	119,06	-2,60	-2,14
10	115,76	119,06	3,30	2,85
11	119,76	119,06	-0,70	-0,58

Tabela 16 - Valores de consistência experimentais, previsto pelo modelo e desvios do planeamento

Ensaio	Resultado experimental	Previsão Modelo	Desvio absoluto	Desvio relativo
1	1757,94	1534,67	-223,27	-12,70
2	1281,03	1151,05	-129,98	-10,15
3	2372,33	2459,66	87,33	3,68
4	2197,15	2076,04	-121,11	-5,51
5	1976,11	2033,53	57,42	2,91
6	1352,18	1492,63	140,45	10,39
7	986,04	1199,34	213,30	21,63
8	2520,06	2503,57	-16,49	-0,65
9	2148,93	2126,77	-22,16	-1,03
10	2038,54	2126,77	88,23	4,33
11	2192,85	2126,77	-66,08	-3,01

Tabela 17 - Valores de coesividade experimentais, previsto pelo modelo e desvios do planeamento

Ensaio	Resultado experimental	Previsão Modelo	Desvio absoluto	Desvio relativo
1	60,33	58,18	-2,15	-2,15
2	64,84	58,18	-6,66	-6,66
3	119,57	122,29	2,72	2,72
4	104,45	122,29	17,84	17,84
5	100,08	96,72	-3,36	-3,36
6	83,13	96,72	13,59	13,59
7	30,98	38,64	7,66	7,66
8	142,40	129,02	-13,38	-13,38
9	99,97	96,72	-3,25	-3,25
10	94,50	96,72	2,22	2,22
11	111,77	96,72	-15,05	-15,05

Tabela 18 - Valores de trabalho de coesão experimentais, previsto pelo modelo e desvios do planeamento

Ensaio	Resultado experimental	Previsão Modelo	Desvio absoluto	Desvio relativo
1	78,17	91,13	12,96	16,58
2	115,08	91,13	-23,95	-20,81
3	217,67	201,27	-16,40	-7,53
4	187,25	201,27	14,02	7,49
5	166,60	161,92	-4,68	-2,81
6	124,73	161,92	37,19	29,81
7	46,21	53,02	6,81	14,73
8	208,07	208,32	0,25	0,12
9	166,34	161,92	-4,42	-2,66
10	157,03	161,92	4,89	3,11
11	188,20	161,92	-26,28	-13,97

Após este estudo pode-se concluir que a combinação dos fatores que levam a uma textura do gel mais firmes, consistentes e coesos foram os seguintes: concentração de biomassa de 22% e pH 5,6.

3.3. Sinérese

Segundo Van Dijk & Walstra (1984) um gel formado por reticulação física entre macromoléculas ou partículas sólidas, como é o caso do gel formado pela biomassa de *S. platensis*, pode sofrer o processo de sinérese, pois a agregação das moléculas não é homogênea e reticulação adicional pode ser formada após o processo de gelificação. Ou seja, a contração do hidrogel pode resultar na expulsão de água do mesmo.

O gráfico apresentado na Figura 15 mostra a evolução da sinérese ao longo do tempo, nomeadamente logo após a formação do hidrogel, após 7 dias e após 14 dias. Ao analisar o gráfico, percebeu-se que a taxa de sinérese varou com o tempo, o que se deve à estabilização das interações moleculares resultantes do processo de gelificação.

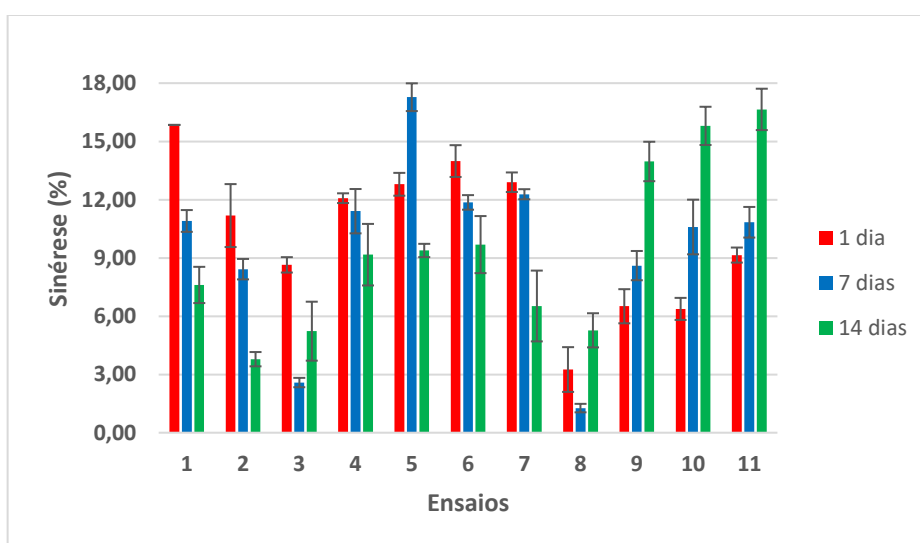


Figura 15 - Análise de sinérese para os hidrogéis de *S. platensis* em diferentes tempos

As amostras que apresentaram menor taxa de sinérese foram os ensaios 3 e 8, o que se justifica devido à maior concentração de biomassa. No trabalho desenvolvido por Laranjim (2014), foi avaliada a adição de gelatina em géis de amido de mandioca. Os resultados da sinérese demonstraram que em sistemas com elevada concentração de proteína, há uma tendência a diminuir a sinérese. Tal pode ser explicado pela menor mobilidade molecular, e, consequentemente, haver uma limitação ao desenvolvimento de instabilidade dos géis e, assim,

à liberação de água. Neste sentido, as amostras incorporando concentrações superiores de biomassa, e em consequência de proteínas, tal como as amostras 3 e 8, apresentaram menor sinérese. Este fator foi de encontro com os resultados apresentados no DCCR, onde amostras com maior concentração de biomassa e produzidas com pH entre 5 e 6 possuíam maior firmeza e consistência.

3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varrimento (MEV) é uma técnica utilizada para a caracterização de diversos materiais, entre eles, hidrogéis poliméricos. A análise por MEV permite examinar a microestrutura resultante da reticulação física das cadeias de polímero.

A Figura 16 apresenta, inicialmente, a estrutura da biomassa de *S. platensis* seca sem tratamento. Possui formato de esferas irregulares e tamanhos variáveis, com estrutura rígida e sem presença de poros. Estruturas parecidas com estas foram observadas no estudo desenvolvido por Dotto et al. (2013), onde foram observadas partículas de *S. platensis* de forma e tamanhos variados e com superfícies rugosas.

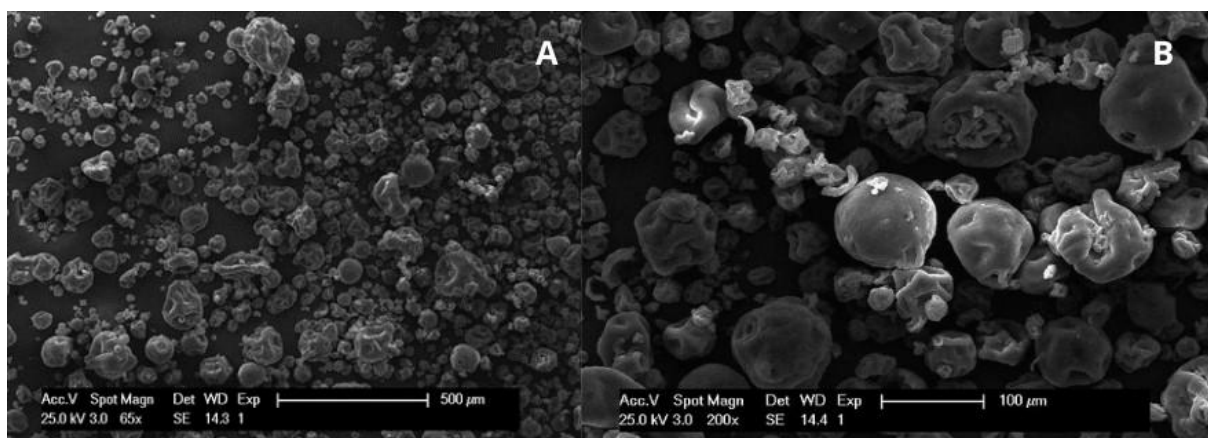


Figura 16 - Microscopia da superfície da biomassa de *S. platensis* seca ampliada em (A) 65x e (B) 200x

A Figura 17 apresenta a análise microscópica efetuada ao hidrogel liofilizado (formulação: 22% de biomassa e pH 5,6), considerada uma das mais promissoras após o delineamento experimental). É importante ressaltar que a liofilização do hidrogel fez com que o mesmo colapsasse, desta forma perdendo parte da sua estrutura e forma original.

Na microscopia apresentada na Figura 17 é possível ver a superfície do hidrogel de *S. platensis*. É possível inferir que a amostra apresentou superfícies rugosas com alguma homogeneidade. Na Figura 17C e 17D é possível observar alguns agregados, característica

típica de géis particulados. No trabalho realizado por Wang et al. (2019), foram obtidas estruturas similares para géis de proteína de soro de leite produzidos a pH 5,2. Para estas condições a amostra formava géis particulados compostos por partículas grosseiramente agregadas, demonstrando, portanto, que as proteínas se agregaram em estruturas maiores porem com menos coesão.

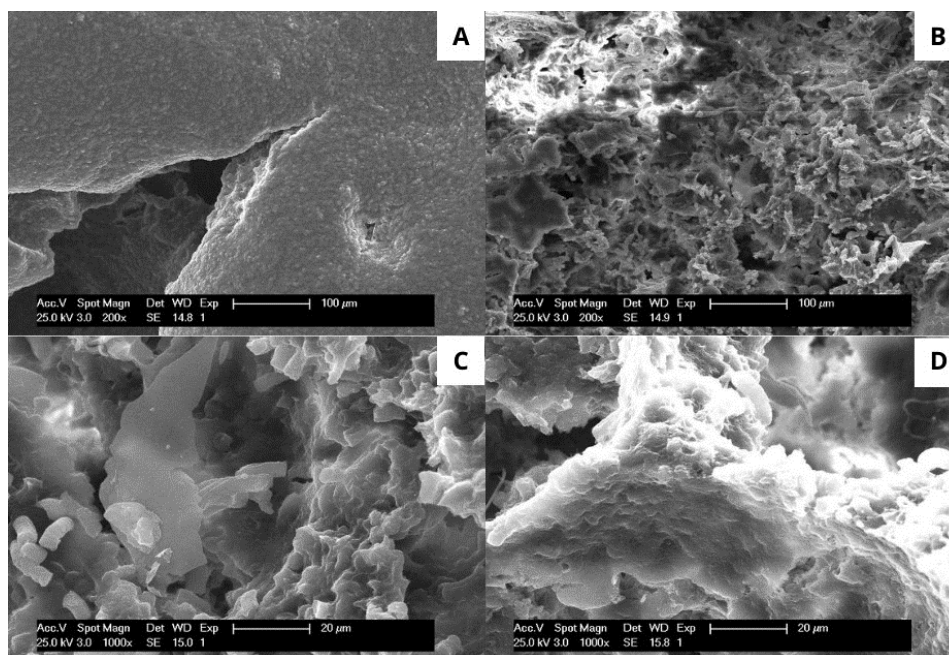


Figura 17 - Microscopia da superfície do hidrogel de *S. platensis* liofilizado ampliado em (A) e (B) 200x e (C) e (D) 1000x

Desta forma é possível concluir que a liofilização do hidrogel tornou inviável uma análise mais aprofundada, dada a natureza quebradiça do material que resulta na perda parcial da sua estrutura. Esta análise mostra que a aplicação do gel poderia ser mais interessante para aplicações onde o mesmo se utilize húmido sem a necessidade do processo de secagem.

3.5. Capacidade de absorção de água

Uma característica importante dos hidrogéis é a sua capacidade de reter grandes quantidades de água. A Figura 18 apresenta a curva de absorção de água do hidrogel a partir de uma amostra liofilizada (formulação com 22% de biomassa e pH 5,6).

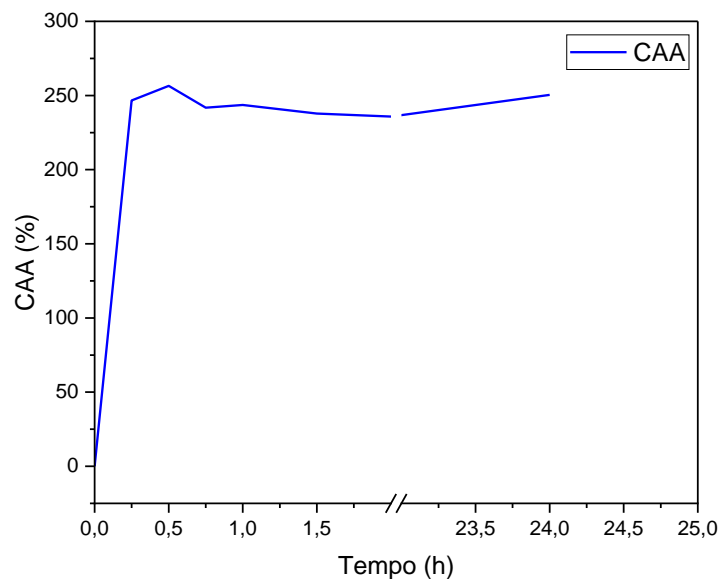


Figura 18 - Capacidade de absorção de água do hidrogel de *S. platensis*

Pode-se inferir que a maior absorção de água ocorreu na primeira hora de exposição do gel seco à água. Esta tendeu depois a estabilizar, o que é um comportamento esperado para os hidrogéis. Neste âmbito, Devi & Venkataraman (1984) estudaram a capacidade de absorção de água pela biomassa de *S. platensis* e de seu concentrado proteico, obtendo como resultado uma absorção de 220 g e 109 g/100g de amostra, valores inferiores aos apresentados neste estudo, que são de aproximadamente 250%. Os autores ressaltam ainda que outros componentes da biomassa para além das proteínas, tais como os carboidratos, que constituem boa parte da matéria seca total, podem auxiliar nesta funcionalidade. A análise demonstrou que o gel possui elevada capacidade de absorção de água quando comparado com outros sistemas desenvolvidos baseados em *S. platensis* e derivados, tal como apresentado no estudo de Devi & Venkataraman (1984).

3.6. Análise estrutural da biomassa e do gel de *S. platensis* por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Na Figura 19 apresenta-se o espectro de FTIR da biomassa e do hidrogel formado a partir de *S. platensis*.

A análise do espectro FTIR apresentou bandas pronunciadas a 1076 cm^{-1} e 1026 cm^{-1} que podem estar associadas aos carboidratos presentes na biomassa da *S. platensis*, visto que foi utilizada a biomassa integral. Esta gama de vibrações associada aos carboidratos pode também observar-se para as proteínas (Xin et al., 2014). As bandas a 1647 cm^{-1} e 1627 cm^{-1}

correspondentes à biomassa e o hidrogel de *S. platensis*, respectivamente, estão associadas ao grupo amida I (estiramento da ligação dos grupos carbonilo, C=O) das ligações peptídicas. Esta estrutura está correlacionada com a formação de gel, pois favorece a interação das moléculas com a água favorecendo a formação de pontes de hidrogénio.

As bandas identificadas a 1541 cm^{-1} e 1527 cm^{-1} , são características do grupo amida II, nomeadamente do estiramento C–N e dobramento N–H (Lupatini et al., 2018). As outras bandas com maior intensidade, tais como as observadas a 2958 cm^{-1} e 2923 cm^{-1} resultam do estiramento da ligação C–H, a banda 3274 cm^{-1} resulta da deformação axial da ligação N–H o que está associado às amins secundárias (Soni et al., 2021).

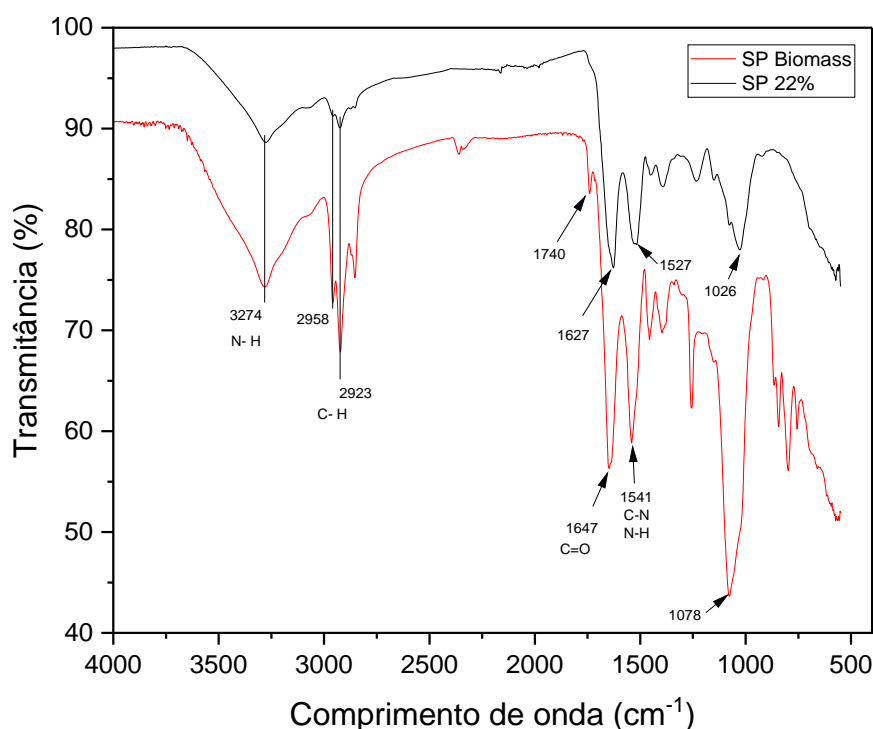


Figura 19 - Espectro de absorção do infravermelho para a biomassa e hidrogel de *S. platensis*

Resultados semelhantes foram reportados por Ramírez-Rodrigues et al. (2021), analisando o espectro de FTIR das proteínas de *S. platensis*, identificando as seguintes bandas características: Amida I para 1600-1700 cm^{-1} e amida II para 1550 cm^{-1} . Ainda Bataller & Capareda (2018) identificaram as bandas amida I resultantes da ligação C=O nos peptídeos na faixa entre 1774-1583 cm^{-1} e para amida II na faixa entre 1583-1484 cm^{-1} . Identificaram ainda as bandas características de carboidratos pelo alongamento de C–O e C–C em 955-1186 cm^{-1} .

No espectro de FTIR apresentado por Lencina (2013) para síntese de hidrogéis de alginato e n-isopilacrilamida, verificou-se que os picos correspondentes ao C=O (1740 cm^{-1})

apresentaram uma redução significativa na frequência das bandas quando se formam géis, justificado devido a formação de ligações de hidrogénio no estado sólido o que reduz a frequência dessas vibrações. Resultados similares foram encontrados neste estudo, onde se verificou que as bandas características do grupo carbonilo se deslocaram para menores frequências no hidrogel se comparado a biomassa de *S. platensis* (1647 para 1627 cm^{-1}), verificando-se também o desaparecimento da banda a 1740 cm^{-1} .

3.7. Análise da estabilidade térmica do hidrogel

O termograma obtido por TGA do hidrogel (concentração de biomassa 22% e pH 5,6) preparado e liofilizado é mostrado na Figura 20. A curva DTG representa a derivada da curva da decomposição térmica e representa a velocidade de perda de massa da amostra em função da temperatura analisada.

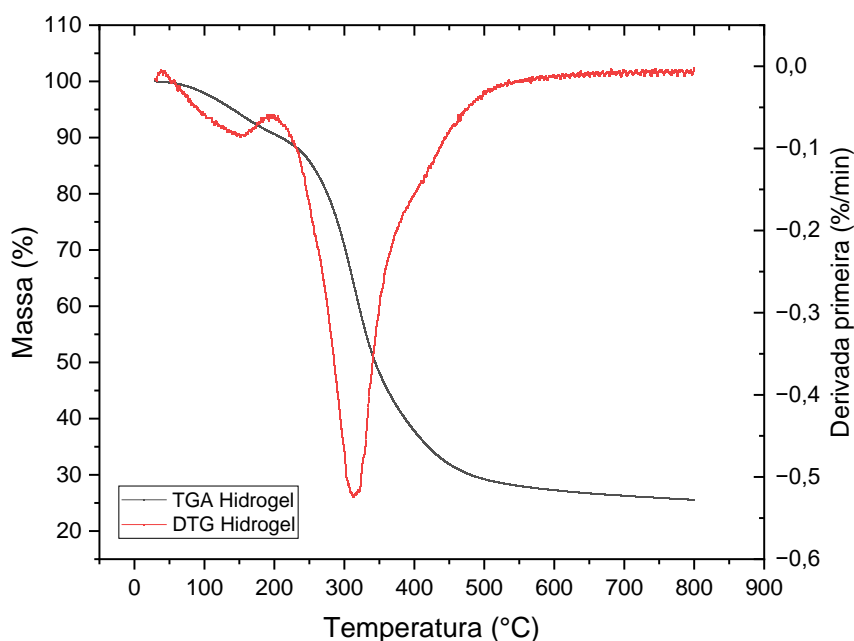


Figura 20 – Curvas de perda de massa e DTG da análise termogravimétrica do hidrogel de *S. platensis*

Foram observados três estágios, um primeiro evento entre 30 °C e 147 °C que foi associado à perda de água pela amostra (aproximadamente 7 %). O segundo estágio de interesse ocorreu na gama de temperaturas entre 160 °C e 460 °C, onde foi observada a maior perda de massa para o gel devido à degradação dos compostos orgânicos presentes no mesmo (aproximadamente 61%), o que é esperado visto que o hidrogel é formado apenas pela biomassa integral de *S. platensis*. O terceiro e último estágio ocorre a partir de 460 °C até 800 °C onde se

observou uma perda de massa baixa que se pode, possivelmente, atribuir à decomposição de componentes carbonáceos (aproximadamente 5%). A massa residual após a degradação foi de 25 %. Resultados semelhantes foram descritos por Azizi et al (2017) que analisou a degradação térmica da biomassa de *S. platensis*.

3.8. Reologia e viscosidade

Para estas análises foram utilizadas duas amostras para comparar as características mecânicas, uma amostra com textura mais firme e consistente produzida na condição otimizada previamente definida (22%; pH 5,6) e outra com menor concentração de biomassa de *S. platensis* com textura menos firme e consistente (12%; pH 5,6).

3.8.1. Viscosidade do gel

Foram realizados testes de “*flow curve*”, para determinar a viscosidade do gel, variando a taxa de cisalhamento (Figura 21). A partir deste teste, também, foi definido o valor de amplitude de tensão a ser usado nos testes oscilatórios a ser apresentados posteriormente na secção 3.8.2.

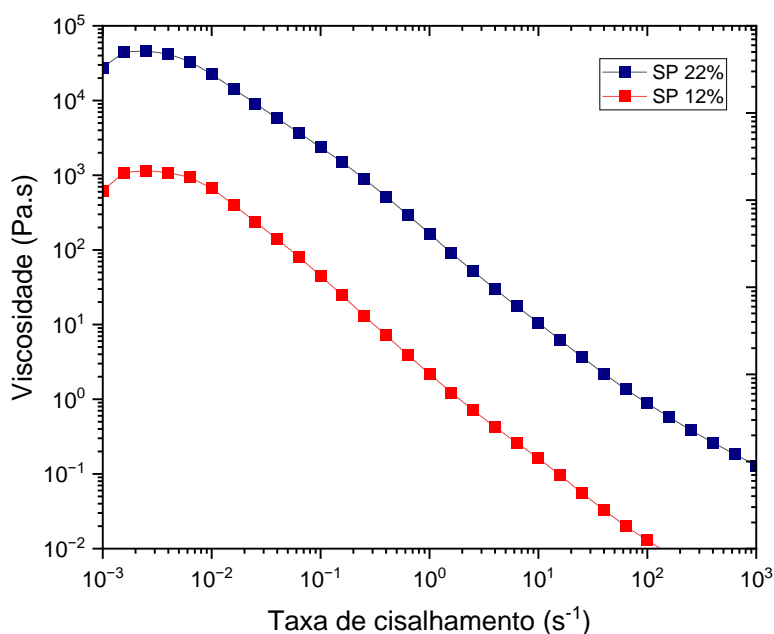


Figura 21 - Gráfico da variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento

De acordo com os resultados apresentados na Figura 21 os fluidos apresentaram comportamento não-newtoniano, particularmente indicaram um comportamento pseudoplástico, isto porque que a viscosidade aparente observada diminuiu com a taxa de cisalhamento aplicada na amostra (Oliveira et al., 2018). Para a amostra produzida nas condições otimizadas neste trabalho, a viscosidade foi superior à da amostra produzida com menor concentração de *S. platensis*, tal como seria de esperar devido à maior concentração de sólidos na amostra, 22% comparativamente com 12% .

3.8.2. Testes oscilatórios dinâmicos

O teste de oscilação da tensão mede a estabilidade mecânica da amostra e consiste na medição do módulo de carga ou módulo elástico (G') e do módulo de perda ou módulo viscoso (G'') aplicando uma tensão gradual a uma frequência constante. Desta forma, a deformação é exercida na amostra evidenciando o ponto em que as ligações entre as moléculas ou agregados são destruídos, sendo parte da energia libertada como calor (Moura, 2014).

Na Figura 22 apresenta-se o resultado do teste de oscilação variando a tensão a uma frequência constante de 10^{-1} Hz. Estes resultados permitiram obter informações importantes como a tensão crítica, indicando o momento em que o gel passa a se comportar como um fluido. Adicionalmente definir a região viscoelástica linear, região em que a amostra se comporta como um gel (sólido aparente) e, portanto, a região de interesse para realizar a análise de variação de frequência.

Para as duas amostras testadas o G' foi maior que o G'' , indicando que estas possuem propriedades elásticas. Observou-se ainda que o G' é superior para a amostra produzida com uma concentração de biomassa de 22%, comparativamente à de 12%, o que ocorre devido à estrutura do gel mais efetiva que deriva da maior concentração de biomassa na amostra. Em uma tensão de 0,01% a aproximadamente 0,22%, as amostras encontram-se na região viscoelástica linear (LVR), uma faixa onde a tensão é insuficiente para causar ruturas na estrutura da amostra. Assim, foi fixada uma tensão de 0,1% para o teste de oscilação de frequência.

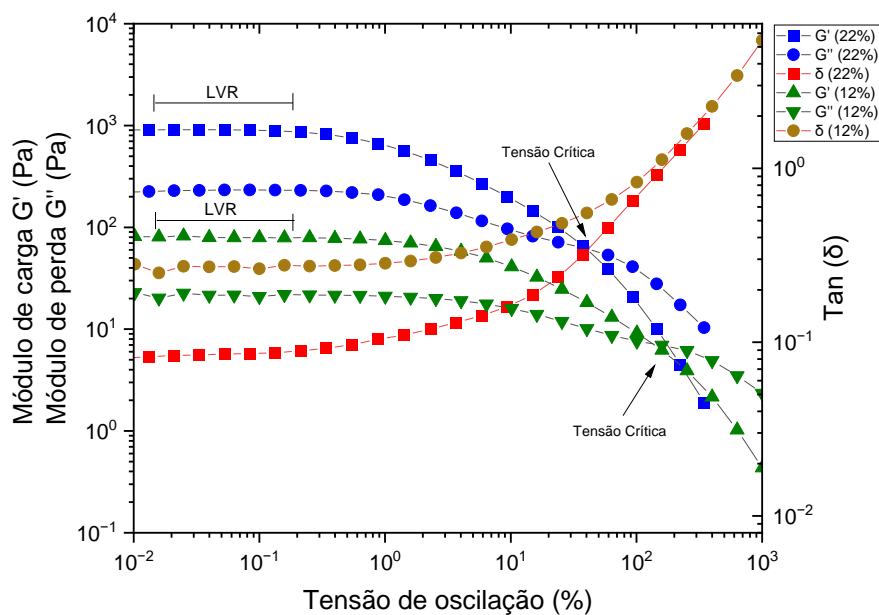


Figura 22 - Comportamento reológico do hidrogel em função da tensão de oscilação.

Na figura 23 apresenta-se o resultado do teste de oscilação da frequência. A partir do gráfico foi possível definir que a amostra possuiu um comportamento de gel devido ao módulo de carga (G') ser maior que o módulo de perda (G''). Adicionalmente, este comportamento é independente da tangente (δ) até se atingir uma frequência de 10^{-1} Hz.

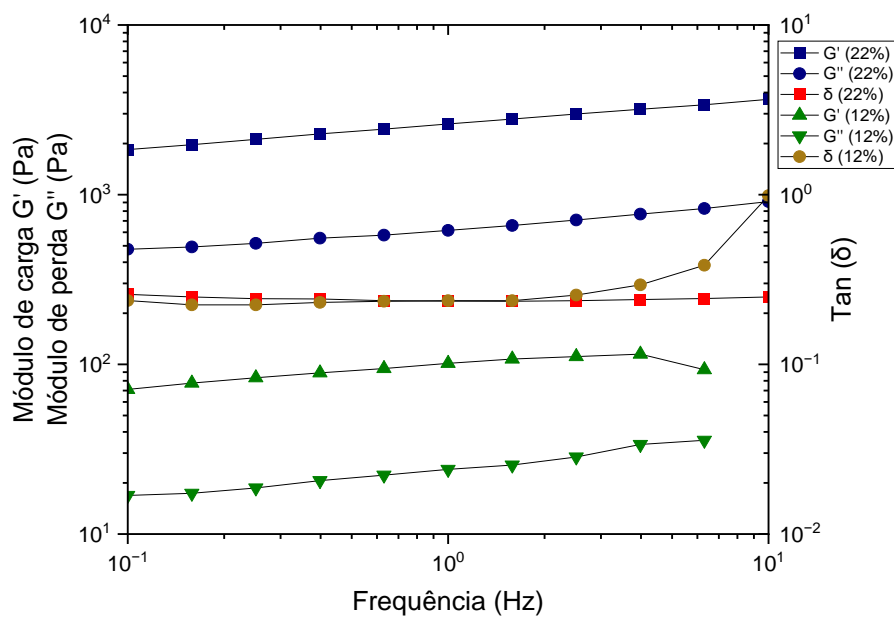


Figura 23 - Comportamento reológico do hidrogel em função da variação da frequência.

A amostra com concentração de biomassa de 22% apresentou um módulo de carga superior ao módulo de perda demonstrando um comportamento característico de gel. Apesar da amostra com concentração de 12% de biomassa de *S. platensis* apresentar também um comportamento reológico característico de gel, mesmo após o tratamento térmico para a sua formação, esta não apresentou o carácter de forma sólida, o que pode ser justificado devido à menor concentração de sólidos na preparação, nomeadamente por não atingir a concentração crítica necessária.

Segundo Kasapis & Bannikova (2017) existem quatro categorias principais para os comportamentos observados para os materiais alimentares semi-sólidos quanto aos parâmetros mecânicos. Exemplos desses comportamentos são o leite, sumo de frutas, sopa de amido, geleia, ketchup, entre outros. Na figura 24 apresenta-se, as curvas dos módulos de carga e de perda em função da frequência para os comportamentos típicos de matrizes alimentares semi-sólidas.

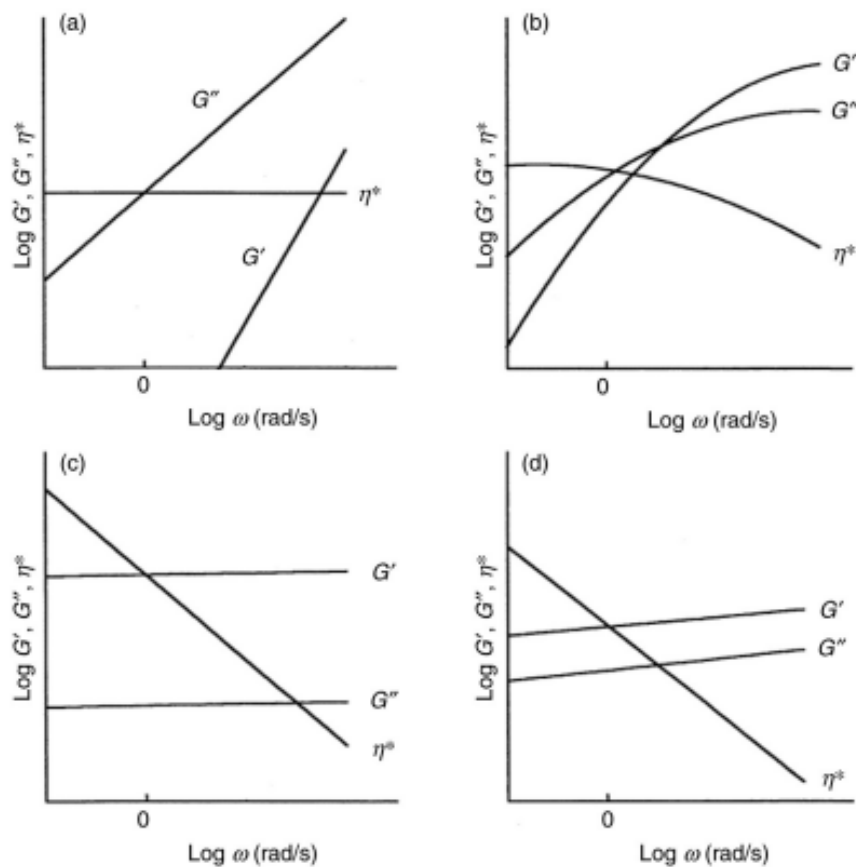


Figura 24 - Principais categorias mecânicas de matrizes alimentares semi-sólidas; (a) solução diluída, (b) solução emaranhada, (c) gel forte, (d) gel fraco

Fonte: Adaptado de Kasapis & Bannikova (2017)

Comparando os registos gráficos das Figuras 22 e 23, podemos perceber uma tendência das amostras para um comportamento de gel fraco na faixa de frequência analisada. Esta característica é comumente observada em sistemas reticulados fisicamente pois são descritos no geral como géis com fraca estabilidade estrutural e propriedades mecânicas reduzidas (Moura, 2014).

Na Figura 25 apresenta-se o teste de recuperação da amostra produzida com 22% de biomassa. Inicialmente foi aplicada uma taxa de cisalhamento baixa (0,1%) durante 200s, seguida de 200s sob uma taxa de cisalhamento elevada (200%), visando simular a quebra da estrutura da amostra, e finalmente voltou-se a aplicar uma taxa de cisalhamento de 0,1% para demonstrar as propriedades de recuperação da estrutura do material, o processo foi repetido duas vezes.

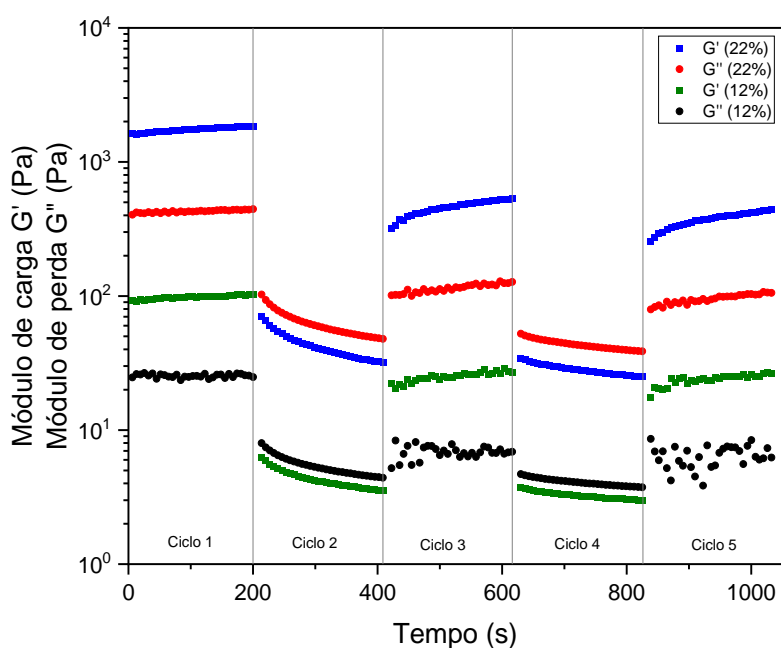


Figura 25 - Curvas obtidas para o teste de recuperação do módulo de carga e perda sob baixa e elevada taxa de cisalhamento em função do tempo.

Quando a amostra é submetida a uma taxa de cisalhamento elevada esta adquire um comportamento “mais líquido” ($G'' > G'$). Ao retornar ao processo de menor taxa, a amostra volta a demonstrar um comportamento “mais sólido” ($G' > G''$). Este comportamento foi observado nos testes descritos na Figura 25. As amostras inicialmente comportaram-se como sólidos a baixas taxas de cisalhamento (ciclo 1), passando depois a comportar-se como líquidos a altas taxas de cisalhamento (ciclo 2 e 4). Quando se reverte para baixa taxa de cisalhamento

(ciclo 3 e 5, respetivamente) as amostras voltam a assumir um comportamento mais sólido, demonstrando uma recuperação parcial da estrutura do material (aproximadamente 30%). A amostra com concentração de 12% possui uma taxa de recuperação ainda menor de aproximadamente 25%.

3.9. Testes preliminares de impressão 3D

Para avaliar se as amostras de géis podem ser impressas por extrusão foi realizado o teste de formação de filamento apresentado na Figura 26. Este foi positivo apenas para a amostra produzida com 22% de biomassa. Para a amostra com 12% de biomassa, não foi possível formar filamento dado esta possuir características muito fluidas, não sendo, portanto, possível imprimir.



Figura 26 - Teste de formação de filamento do gel

Na Figura 27 apresenta-se a impressão de malhas a partir do gel da biomassa de *S. platensis* com concentração de 22%. A figura 27A e 27B mostram as malhas impressas com uma capilar de diâmetro 0,84 mm, velocidade de impressão de 1mm/s e distância entre camadas de 1 mm, sendo o fluxo de 55% (malha da Figura 27A) e 60% (malha da Figura 27B). É possível perceber que na figura 27A o filamento produzido foi fino resultando em descontinuidades no processo de impressão. Este facto poderia ser devido às características do material e ao baixo fluxo.

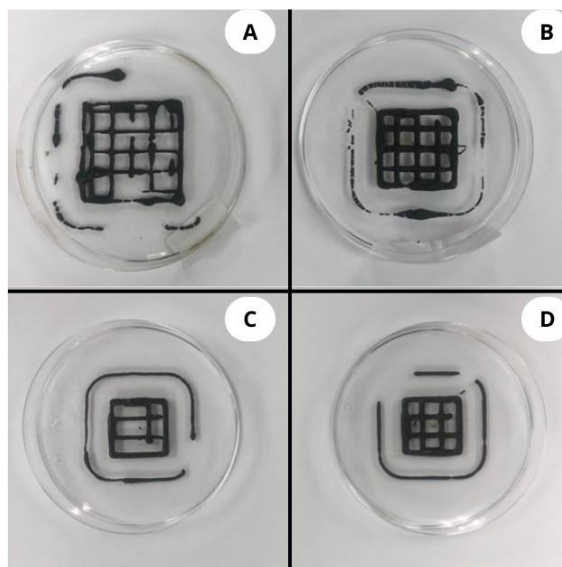


Figura 27 - Teste de impressão de malha por extrusão por motor

Para as impressões registadas nas Figuras 27C e 27D, foi utilizada a ponta de um capilar de diâmetro superior (1,2 mm) tendo-se obtido amostras com um filamento de maior espessura, porém com maior continuidade do filamento produzido durante o processo de impressão.

As amostras apresentadas na Figura 28 demonstram a impressão de uma malha com a extrusão pneumática, tendo-se utilizado os seguintes parâmetros: ponta da seringa de 1,2 mm velocidade de impressão de 1mm/s, altura entre camadas de 1mm e fluxo a 60 %. O ajuste da pressão foi feito manualmente (0,8 bar) para que a amostra fluísse pela ponta da seringa.

Na figura 28A mostra-se o teste inicial realizado para determinar a pressão para a qual se iniciava o fluxo da amostra. Houve dificuldades no controle da mesma visto que o material apresenta uma queda brusca da viscosidade com o aumento do stress aplicado, de acordo com os dados dos estudos reológicos, dificultando desta forma o controle manual da pressão para impressão. A malha formada na figura 28B possuiu filamentos grossos, com baixa resolução e fidelidade de impressão, devido também à dificuldade do controle da pressão de ar para o fluxo da amostra pela seringa.

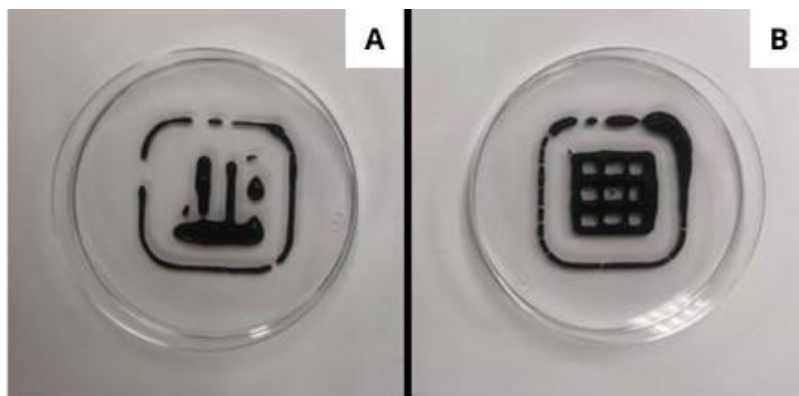


Figura 28 - Teste de impressão de malha por extrusão pneumática

A partir dos testes realizados foi definido que a impressão por extrusão com motor era a mais adequada para a amostra do gel produzido devido às suas propriedades reológicas e aos resultados de impressão. Desta forma, foram impressos cilindros com diâmetro 15 mm e 1 cm de altura. A distância entre camadas foi de 1mm (Figura 29A) e de 1,7mm (Figura 29B).

É possível perceber pelo registo fotográfico da Figura 29A que o cilindro impresso não possuiu uma altura de 1 cm. Tal resultou do facto de a distância entre camadas ser de 1 mm não permitindo à ponta da seringa posicionar-se a uma altura suficiente para imprimir a outra camada sem danificar a anterior. Para a amostra registada na Figura 29B a distância entre camadas foi ajustada permitindo imprimir um cilindro que no final do processo mantinha sua estrutura.

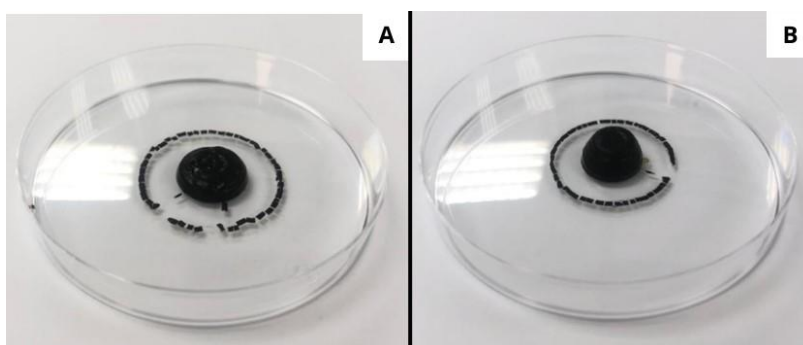


Figura 29 - Teste de impressão de cilindros por extrusão por motor

4. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de gelificação e formação de hidrogel da biomassa integral de *S. platensis*. Para o efeito, o trabalho iniciou-se com a realização de testes preliminares de formação de gel a partir da biomassa integral de *S. platensis*. Estes permitiram concluir que não ocorre a formação de gel para baixas concentrações de biomassa, tal como verificado pelo teste da inversão de frascos. Outras variáveis selecionadas para a realização inicial do Planeamento Fatorial Fracionado foram a temperatura, pH, tempo de aquecimento, tempo e velocidade de agitação e a concentração de biomassa, tendo as mesmas sido selecionadas com base em estudos anteriores disponíveis na literatura.

A partir dos resultados do Planeamento Fatorial Fracionário foi possível concluir que as variáveis significativas, entre as avaliadas para o processo de formação de gel pela biomassa integral de *S. platensis*, foram o pH e a concentração de biomassa. Assim, o Delineamento Composto Central Rotacional permitiu estudar o processo, possibilitando a determinação das condições ótimas para formação dos géis (concentração de biomassa 22% e pH 5,6), visando maior firmeza e consistência.

Os géis, mais promissores foram caracterizados por diversas técnicas. A microscopia eletrónica de varrimento, permitiu observar que o gel colapsa quando liofilizado, demonstrando assim maior potencial para aplicações diretas sem a necessidade de secagem, como por exemplo na sua adição como componente alimentar, aplicações farmacêuticas e impressão 3D. A análise da estabilidade térmica permitiu verificar que o início da degradação do material se inicia à temperatura aproximada de 160°C.

A caracterização por FTIR, nomeadamente a análise dos grupos funcionais, permitiu identificar padrões típicos associados à formação dos géis e desenvolvimento de interações que favorecem a captação de água (deslocação das bandas correspondentes aos grupos carbonilo para frequências mais baixas, associadas ao desenvolvimento de ligações de hidrogénio com a água), o que foi corroborado com a análise de absorção de água, onde se verificou que o hidrogel apresentou uma capacidade elevada (superior a 250% da sua massa).

A partir da análise de viscosidade identificou-se que o hidrogel possui um comportamento tipo pseudoplástico. Os testes oscilatórios demonstraram ainda que a amostra possui comportamento sólido para a faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz, tendo o teste de recuperação indicado uma baixa recuperação da estrutura do material (aproximadamente 30%).

Para finalizar o trabalho, e visando a avaliação do processamento dos géis formados por impressão 3D, foram realizados testes preliminares de impressão do gel produzido com uma

concentração de biomassa de 22% de biomassa e pH 5,6. As amostras impressas demonstraram boa estabilidade após a impressão mantendo sua estrutura, o que foi associado à elevada viscosidade e módulo elástico do material.

5. Trabalhos futuros

Face aos resultados obtidos propõe-se para continuidade deste trabalho as seguintes atividades:

- Elucidar os mecanismos de formação do gel baseado na biomassa integral de *S. platensis*, visto que são escassos os trabalhos focados neste tema;
- Avaliar a adição de outros compostos (por exemplo amido) para investigar o comportamento da formação do gel e como estes podem afetar a sua estrutura e estabilidade e melhorar aspetos reológicos e de textura;
- Analisar as bioatividades do hidrogel produzido, para comprovar a funcionalidade do gel;
- Estudar a viabilidade da aplicação do gel em matrizes alimentares e/ou em outros setores como em produtos de cosmética e na área farmacêutica.

6. Referências bibliográficas

- A. de Almeida, Y., & de F. Gimenez, I. (2022). Recent Advances in Polypyrrole Hydrogels: A Brief Review. *Revista Virtual de Química*, 14(4), 587–603. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20220016>
- Algae Base. (2019). AlgaeBase. World-wide electronic publication. *World-wide electronic publication*. https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=24749
- Almeida, L. M. R., Cruz, L. F. da S., Machado, B. A. S., Nunes, I. L., Costa, J. A. V., Ferreira, E. de S., Lemos, P. V. F., Druzian, J. I., & Souza, C. O. de. (2021). Effect of the addition of *Spirulina* sp. biomass on the development and characterization of functional food. *Algal Research*, 58, 102387. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102387>
- Alves, E. de S., & Domingues, R. G. (2017). *ELABORAÇÃO DE HIDROGEL ENERGÉTICO ADICIONADO DE EXTRATO DE HIBISCO (Hibiscus sabdariffa)*.
- Amaya-Llano, S. L., Martínez-Alegría, A. L., Zazueta-Morales, J. J., & Martínez-Bustos, F. (2008). Acid thinned jicama and maize starches as fat substitute in stirred yogurt. *LWT*, 41(7), 1274–1281. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.012>
- Ambrosi, M. A., Reinehr, ; Bertolin, ; Costa, ; & Colla, ; (2008). *Propriedades de saúde de Spirulina spp.*
- Atik, S. D., Gürbüz, B., Bölük, E., & Palabıyık, İ. (2021). Development of vegan kefir fortified with *Spirulina platensis*. *Food Bioscience*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101050>
- Aydinoğlu, D., & Ünal, M. (2019). Evaluation of the influence of spirulina microalgae on the drug delivery characteristics of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(17), 1020–1033. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1525545>
- Azizi, K., Keshavarz Moraveji, M., & Abedini Najafabadi, H. (2017). Characteristics and kinetics study of simultaneous pyrolysis of microalgae *Chlorella vulgaris*, wood and polypropylene through TGA. *Bioresource Technology*, 243, 481–491. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.06.155>
- Baier, S. K., & McClements, D. J. (2005). Influence of Cosolvent Systems on the Gelation Mechanism of Globular Protein: Thermodynamic, Kinetic, and Structural Aspects of Globular Protein Gelation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(3), 43–54. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2005.TB00072.X>
- Bataller, B. G., & Capareda, S. C. (2018). A rapid and non-destructive method for quantifying biomolecules in *Spirulina platensis* via Fourier transform infrared – Attenuated total

- reflectance spectroscopy. *Algal Research*, 32, 341–352.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.023>
- Beaumont, M., Tran, R., Vera, G., Niedrist, D., Rousset, A., Pierre, R., Shastri, V. P., & Forget, A. (2021). Hydrogel-Forming Algae Polysaccharides: From Seaweed to Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 22(3), 1027–1052.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01406>
- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & van Loey, A. M. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. Em *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Número 8). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107419>
- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2018). Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Research*, 32, 150–161.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.017>
- Blanco-Vieites, M., Suárez-Montes, D., Delgado, F., Álvarez-Gil, M., Battez, A. H., & Rodríguez, E. (2022). Removal of heavy metals and hydrocarbons by microalgae from wastewater in the steel industry. *Algal Research*, 64.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102700>
- Borba, V. I. de A., & Ferreira Camargo, L. S. (2018). *CIANOACTÉRIA Arthrospira (Spirulina) platensis: BIOTECNOLOGIA E APLICAÇÕES*.
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of Microalgae. *Microalgae in Health and Disease Prevention*, 23–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
- Cao, Y., & Mezzenga, R. (2020). Design principles of food gels. *Nature Food*, 1(2), 106–118.
<https://doi.org/10.1038/s43016-019-0009-x>
- Chen, Y. H., Chang, G. K., Kuo, S. M., Huang, S. Y., Hu, I. C., Lo, Y. L., & Shih, S. R. (2016). Well-tolerated Spirulina extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep24253>
- Chronakis, I. S. (2001). Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain Pacifica): Thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 888–898.
<https://doi.org/10.1021/jf0005059>

- Cleber Bertoldi, F., Sant, E., & Luiz Barcelos Oliveira, J. (2008). *REVISÃO: BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS* (Vol. 26, Número 1).
- Devi, M. A., & Venkataraman, L. V. (1984). *Functional Properties of Protein Products of Mass Cultivated Blue-Green Alga Spirulina P/ &en&*.
- Dotto, G. L., Vieira, M. L. G., Esquerdo, V. M., & Pinto, L. A. A. (2013). EQUILIBRIUM AND THERMODYNAMICS OF AZO DYES BIOSORPTION ONTO *Spirulina platensis*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(01), 13–21. www.abeq.org.br/bjche
- Finamore, A., Palmery, M., Bensehaila, S., & Peluso, I. (2017). Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly *Spirulina*. Em *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/3247528>
- Hu, H., Zhong, D., Li, W., Lin, X., He, J., Sun, Y., Wu, Y., Shi, M., Chen, X., Xu, F., & Zhou, M. (2022). Microalgae-based bioactive hydrogel loaded with quorum sensing inhibitor promotes infected wound healing. *Nano Today*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101368>
- Iersel, S. van, & Flammini, A. (2010). *Algae based biofuel, applications and coproducts*.
- Ioannou, E., & Labrou, N. E. (2022). Development of Enzyme-Based Cosmeceuticals: Studies on the Proteolytic Activity of *Arthrospira platensis* and Its Efficient Incorporation in a Hydrogel Formulation. *Cosmetics*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cosmetics9050106>
- Kasapis, S., & Bannikova, A. (2017). Rheology and Food Microstructure. Em *Advances in Food Rheology and Its Applications* (pp. 7–46). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100431-9.00002-4>
- Kusmayadi, A., Leong, Y. K., Yen, H. W., Huang, C. Y., & Chang, J. S. (2021). Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans – Biotechnological and environmental aspects. *Chemosphere*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129800>
- Laranjim, C. N. (2014). Efeito da adição de gelatina nas propriedades termodinâmicas e nas características de géis e películas biodegradáveis obtidos a partir de amido de mandioca [Trabalho de Conclusão de Curso]. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Lencina, M. M. S. (2013). *Universidad nacional del sur síntesis y caracterización de hidrogelos de alginato y n-isopropilacrilamida para aplicaciones biomédicas maría malvina soledad lencina*. Universidad nacional del sur.

- Leyva-Jiménez, F. J., Oliver-Simancas, R., Castangia, I., Rodríguez-García, A. M., & Alañón, M. E. (2023). Comprehensive review of natural based hydrogels as an upcoming trend for food packing. *Food Hydrocolloids*, *135*, 108124. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.108124>
- Liu, Z., Zhang, M., Bhandari, B., & Wang, Y. (2017). 3D printing: Printing precision and application in food sector. *Trends in Food Science & Technology*, *69*, 83–94. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.08.018>
- Lupatini, A. L. (2016). *Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de Spirulina platensis e caracterização da fração proteica*.
- Lupatini, A. L., Bispo, L. O., Emanuele, L., Souza, S., Sehn, E., Canan, C., & Colla, E. (2018). *Avaliação das propriedades secundárias das proteínas de Spirulina platensis por ftir*.
- Mangino, M. E. (1984). Physicochemical Aspects of Whey Protein Functionality. *Journal of Dairy Science*, *67*(11), 2711–2722. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81629-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81629-X)
- Menegotto, L. A. L., Souza, L. E. S. de, Colla, L. M., Costa, J. A. V., Sehn, E., Bittencourt, P. R. S., Moraes Flores, É. L. de, Canan, C., & Colla, E. (2019). Investigation of techno-functional and physicochemical properties of Spirulina platensis protein concentrate for food enrichment. *LWT*, *114*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108267>
- Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., Rimauro, J., & Musmarra, D. (2018). Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>
- Moraes, I. de O., Oliveira, R., Arruda, M., Maresca, N. R., Antunes, A. de O., & Moraes, R. de O. (2013). Spirulina platensis: process optimization to obtain biomass Spirulina platensis: otimização de processo para a obtenção de biomassa. Em *Ciênc. Tecnol. Aliment*.
- Morais, M. G. De, & Costa, J. A. V. (2008). *Fatty acids profile of microalgae cultivated with carbon dioxide* (Vol. 32).
- Morales, A., Labidi, J., & Gullón, P. (2022). Impact of the lignin type and source on the characteristics of physical lignin hydrogels. *Sustainable Materials and Technologies*, *31*, e00369. <https://doi.org/10.1016/J.SUSMAT.2021.E00369>
- Moreira, J. B., Siqueira De Carvalho, C. H., Costa, M., & Vieira Costa, J. A. (2011). *Avaliação sensorial de géis energéticos sabor limão elaborados com adição da microalga spirulina*. <https://www.researchgate.net/publication/268393230>

- Moreno, M. A., Orqueda, M. E., Gómez-Mascaraque, L. G., Isla, M. I., & López-Rubio, A. (2019). Crosslinked electrospun zein-based food packaging coatings containing bioactive chilito fruit extracts. *Food Hydrocolloids*, 95, 496–505. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.05.001>
- Moura, M. J. C. de. (2014). *Preparação e caracterização de hidrogéis de quitosano para administração por via injetável* [Tese de Doutorado]. Universidade de Coimbra.
- Nouri, A., Tavakkoli Yaraki, M., Ghorbanpour, M., & Wang, S. (2018). Biodegradable κ -carrageenan/nanoclay nanocomposite films containing *Rosmarinus officinalis* L. extract for improved strength and antibacterial performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 227–235. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.04.051>
- Nuhu, A. A. (2013). Spirulina (*Arthrospira*) : An Important Source of Nutritional and Medicinal Compounds . *Journal of Marine Biology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/325636>
- Oliveira, A. C., Bacelar, C. P., Caires, G. A., & de Oliveira, H. P. (2018). FLUIDOS PSEUDOPLÁSTICOS. *REVISTA ACADÊMICA UNIVERSO SALVADOR*, 1(2). <http://www.revista.universo.edu.br/index.php?journal=1UNIVERSOSALVADOR2&page=article&op=view&path%5B%5D=5717>
- Pan, H., Pei, F., Ma, G., Ma, N., Zhong, L., Zhao, L., & Hu, Q. (2022). 3D printing properties of *Flammulina velutipes* polysaccharide-soy protein complex hydrogels. *Journal of Food Engineering*, 334, 111170. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2022.111170>
- Parreidt, T. S., Müller, K., & Schmid, M. (2018). Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods 2018*, Vol. 7, Page 170, 7(10), 170. <https://doi.org/10.3390/FOODS7100170>
- Payne, C. L. R., Dobermann, D., Forkes, A., House, J., Josephs, J., McBride, A., Müller, A., Quilliam, R. S., & Soares, S. (2016). Insects as food and feed: European perspectives on recent research and future priorities. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0011>, 2(4), 269–276. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0011>
- Ramírez-Rodrigues, M. M., Estrada-Beristain, C., Metri-Ojeda, J., Pérez-Alva, A., & Baigts-Allende, D. K. (2021). Spirulina platensis protein as sustainable ingredient for nutritional food products development. *Sustainability (Switzerland)*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/su13126849>
- Ramos, Ó. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2012). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical

- and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 533–552. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500528>
- Renard, D., & Lefebvre, J. (1992). *Gelation of globular proteins: effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation. A simple model and its application to B-lactoglobulin heat-induced gelation.*
- Rodrigues, R. D. P. (2017). *Extração e purificação de ficobiliproteínas de Spirulina (Arthrospira) platensis com líquidos iônicos próticos.*
- Saha, N., Zaandra, O., Bandyopadhyay, S., & Saha, P. (2019). Bacterial Cellulose Based Hydrogel Film for Sustainable Food Packaging. *Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials*, 237–245. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9804-0_11/COVER
- Said, N. S., Howell, N. K., & Sarbon, N. M. (2023). A Review on Potential Use of Gelatin-based Film as Active and Smart Biodegradable Films for Food Packaging Application. *Food Reviews International*, 39(2), 1063–1085. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1929298>
- Sampaio, U. M., Siqueira, K. F., Starling, C. A., & Araújo, F. I. R. O. (2016). Aspectos gerais de cultivo, métodos de secagem e características da Cianobacteria Spirulina Platensis. *Revista Processos Químicos*, 10(20), 133–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.19142/rpq.v10i20.358>
- Santiago-Santos, M. C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2004). Extraction and purification of phycocyanin from Calothrix sp. *Process Biochemistry*, 39(12), 2047–2052. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.007>
- Silva, S. C., Almeida, T., Colucci, G., Santamaria-Echart, A., Manrique, Y. A., Dias, M. M., Barros, L., Fernandes, Â., Colla, E., & Barreiro, M. F. (2022). Spirulina (Arthrospira platensis) protein-rich extract as a natural emulsifier for oil-in-water emulsions: Optimization through a sequential experimental design strategy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 648. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129264>
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina – From growth to nutritional product: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 69, pp. 157–171). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2021). Biochemical and thermal analysis of spirulina biomass through FTIR, TGA, CHN. *Energy Engineering: Journal of the Association of Energy Engineering*, 118(4), 1045–1056. <https://doi.org/10.32604/EE.2021.016082>

- Stefaniak, K., & Masek, A. (2021). Green Copolymers Based on Poly(Lactic Acid)—Short Review. *Materials* 2021, Vol. 14, Page 5254, 14(18), 5254. <https://doi.org/10.3390/MA14185254>
- Tran, J. L. (2016). 3D-Printed Food. *Minnesota Journal of Law, Science and Technology*, 17. <https://heinonline.org/HOL/Page?handle=hein.journals/mipr17&id=871&div=&collection=>
- Van Dijk, H. J. M., & Walstra, P. (1984). Theoretical and Experimental Study of One-dimensional Syneresis of a Protein Gel. *Em The Chemical Engineering Journal* (Vol. 28).
- Wang, Y., Zhao, J., Zhang, W., Liu, C., Jauregi, P., & Huang, M. (2019). *Modification of heat-induced whey protein gels by basic amino acids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105397>
- Xin, H., Zhang, Y., Wang, M., Li, Z., Wang, Z., & Yu, P. (2014). Characterization of protein and carbohydrate mid-IR spectral features in crop residues. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129, 565–571. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.009>
- Zhang, H., Wang, S., Zheng, X., Jiang, L., Lv, X., Shi, Y., & Li, L. (2014). Effect of glycosylation on the mechanical properties of edible soy protein packaging film. *European Food Research and Technology*, 238(6), 1049–1055. <https://doi.org/10.1007/S00217-014-2190-3/FIGURES/6>
- Zhang, J. (2015). *Bioactive Films and Hydrogels Based on Potato Starch and Phenolic Acids Using Subcritical Water Technology* [Master thesis]. University of Alberta.
- Zhong, Y., Zhao, J., Dai, T., McClements, D. J., & Liu, C. (2021). The effect of whey protein-puerarin interactions on the formation and performance of protein hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106444>

7. Anexos

Anexo A: Tabelas com as variáveis reparametrizadas estudadas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Tabela A. 1 - Coeficientes de regressão reparametrizados do DCCR 2² para as respostas de firmeza e consistência

Fatores	Firmeza				Consistência			
	Efeito	Erro Padrão	t (6)	p-valor	Efeito	Erro Padrão	t (6)	p-valor
Média	119,06	5,64	21,10	0,00*	2126,77	96,60	22,02	0,00*
x1 (L)	-9,62	3,46	-2,78	0,03*	-191,81	59,15	-3,24	0,02*
x1 (Q)	-9,02	4,11	-2,19	0,07	-182,94	70,41	-2,60	0,04*
x2 (L)	24,88	3,46	7,20	0,00*	462,49	59,15	7,82	0,00*
x2 (Q)	-4,56	4,11	-1,11	0,31	-138,48	70,41	-1,97	0,10

*Valor significativo (p-valor < 0,05); x₁ – pH; x₂ - concentração de biomassa (%).

Tabela A. 2 - Coeficientes de regressão reparametrizados do DCCR 2² para as respostas de coesividade e trabalho de coesão

Fatores	Coesividade				Trabalho de coesão			
	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p-valor	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p-valor
Média	96,72	4,80	20,14	0,00*	161,92	8,64	18,73	0,00*
x2 (L)	32,05	4,04	7,93	0,00*	55,07	7,27	7,57	0,00*
x2 (Q)	-6,48	4,60	-1,41	0,20	-15,72	8,28	-1,90	0,09*

*Valor significativo (p-valor < 0,05); x₂ - concentração de biomassa (%).