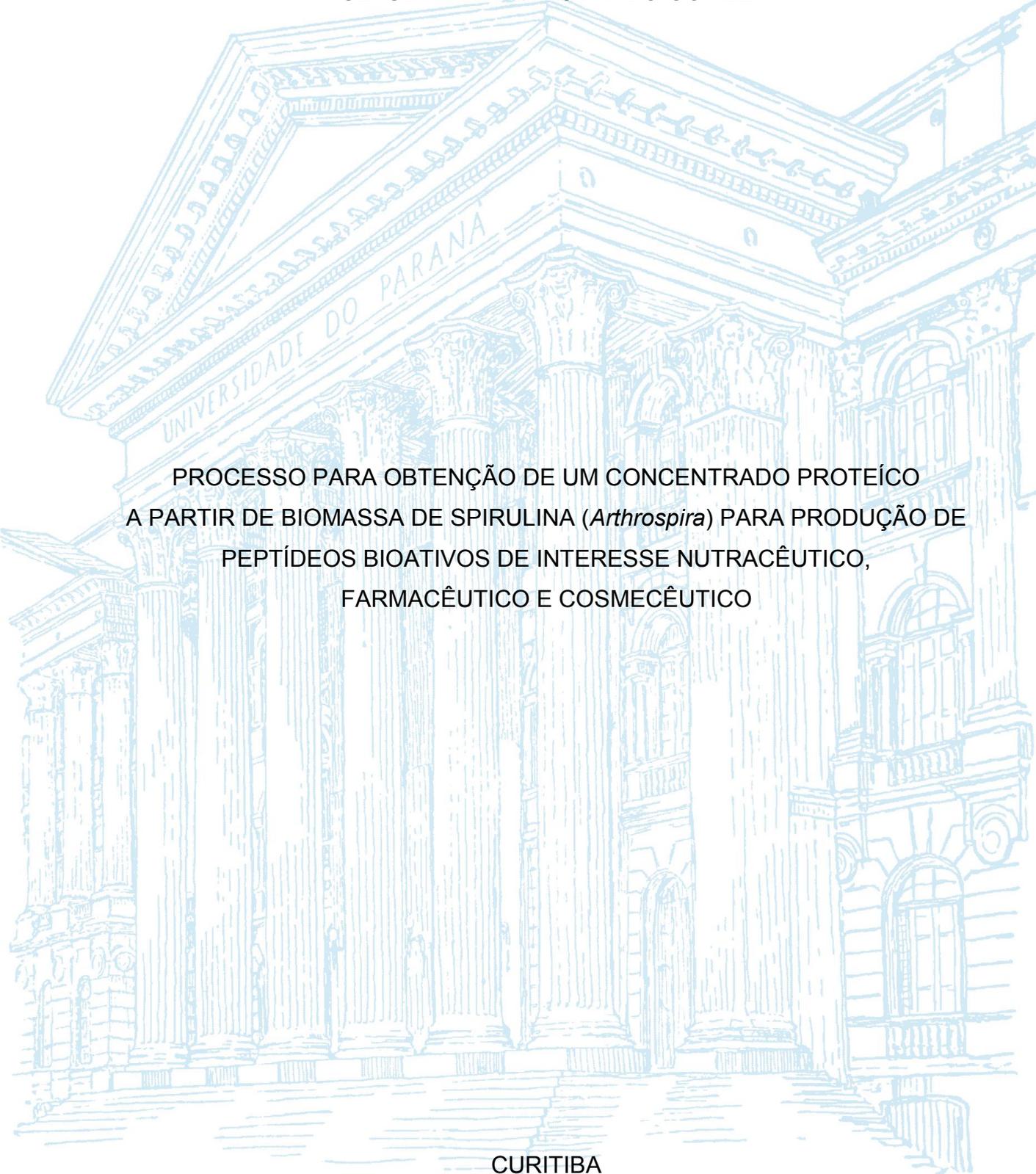


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA ANAHITE OVANDO GÓMEZ



PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM CONCENTRADO PROTEÍCO
A PARTIR DE BIOMASSA DE SPIRULINA (*Arthrospira*) PARA PRODUÇÃO DE
PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE INTERESSE NUTRACÊUTICO,
FARMACÊUTICO E COSMECÊUTICO

CURITIBA

2015

CLAUDIA ANAHITE OVANDO GÓMEZ

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM CONCENTRADO PROTEÍCO
A PARTIR DE BIOMASSA DE SPIRULINA (*Arthrospira*) PARA PRODUÇÃO DE
PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE INTERESSE NUTRACÊUTICO,
FARMACÊUTICO E COSMECÊUTICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no curso de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

OV96p

Ovando Gómez, Claudia Anahite

Processo para obtenção de um concentrado proteico a partir de biomassa de spirulina (arthrospira) para produção de peptídeos bioativos de interesse nutracêutico, farmacêutico e cosmeceútico / Claudia Anahite Ovando Gómez. – Curitiba, 2015.

113 p. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2015.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol.

1. Spirulina. 2. Concentrado protéico. 3. Peptídeos bioativos. I. Universidade Federal do Paraná.
II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Título.

CDD: 660.6

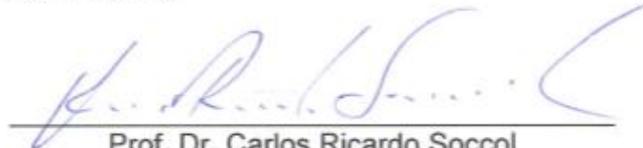
Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

TERMO DE APROVAÇÃO

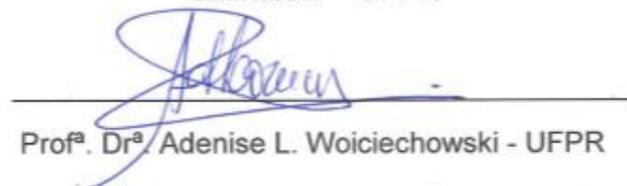
CLAUDIA ANAHITE OVANDO GOMEZ

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM CONCENTRADO PROTEÍCO
A PARTIR DE BIOMASSA DE SPIRULINA (*Arthrospira*) PARA PRODUÇÃO
DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE INTERESSE NUTRACÊUTICO,
FARMACÊUTICO E COSMECÊUTICO

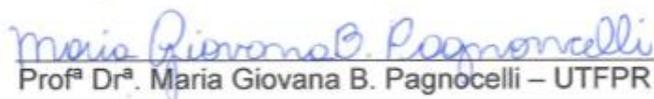
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



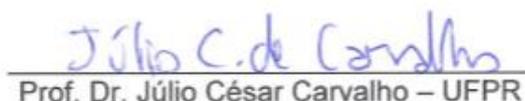
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Orientador – UFPR



Prof.ª Dr.ª Adenise L. Woiciechowski - UFPR



Prof.ª Dr.ª Maria Giovana B. Pagnocelli – UTFPR



Prof. Dr. Júlio César Carvalho – UFPR

Curitiba, 17 de Abril de 2015.

DEDICATORIA

A meus pais Ruben Ovando (*in memoriam*) e Gloria Gomez
A minha irmã Mariela Ovando, por ter me ensinado a ler e escrever

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e a oportunidade de recomeçar.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela orientação, estímulo, confiança, paciência e por aumentar meu interesse pela pesquisa.

Aos todos os professores e funcionários do departamento de pós-graduação de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, por ter-me acolhido no programa, pelos ensinamentos nas aulas, pelas sugestões teóricas e práticas para o trabalho e pelo apoio e amizade. Em especial ao Prof. Dr. Julio Cesar de Carvalho por sua dedicação incondicional e apoio.

A todos os colegas da universidade, por seu apoio e simpatia.

A Dona Judi e ao Senhor Romeo, por abrir as portas da sua casa e seu coração durante estes dois anos no Brasil.

A meus amigos, por ser os anjos que Deus coloca a meu redor para compartilhar momentos felizes.

A CAPES pela concessão da bolsa, possibilitando a realização do curso de mestrado e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Brasil, por sua hospitalidade e inspiração para celebrar a vida e lutar nas dificuldades, mas de jeito de estar sempre contente.

Lembre da minha ordem: “Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o SENHOR, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!”

Josué 1:9

RESUMO

Na procura de produtos de origem natural para o tratamento de doenças e a melhora do bem-estar integral ou a longevidade, têm emergido novos produtos com ingredientes bioativos que são introduzidos ao mercado promissor dos produtos nutracêuticos, farmacêuticos ou cosmecêuticos. As cianobactérias e microalgas são reconhecidas como uma fonte importante de elementos ou compostos bioativos (carboidratos, ácidos graxos, pigmentos, vitaminas, etc.). E sendo a Spirulina uma das mais representativas e de composição bem caracterizada, e que se destaca por proporcionar proteínas em alta concentração e qualidade, apresenta ótimas possibilidades para a produção de peptídeos bioativos. Pelo que são oportunas pesquisas orientadas a desenvolver processos factíveis e econômicos para promover a produção de proteínas e peptídeos bioativos derivados delas, em grande escala. Assim, neste trabalho propõe-se um processo de extração e concentração de proteínas a partir de biomassa de Spirulina, configurado a partir das oportunidades de melhora detectadas na avaliação e comparação de métodos clássicos para isolar proteínas. Com o processo proposto neste trabalho se obteve um concentrado protéico de 88,8 % de pureza e um rendimento de 79%, estes índices foram maiores quando comparado com os outros métodos avaliados. A fração de carboidratos e lipídeos remanescentes no concentrado protéico foi 3,75 % e 1,6% respectivamente. O tempo de processamento foi reduzido significativamente respeito aos outros processos comparados. Quanto ao potencial bioativo, o concentrado protéico obtido exibiu atividade antioxidante apresentando uma percentagem de inibição da oxidação de 20 - 62%, e manifestou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, este processo propõe o aproveitamento dos co-produtos: lipídeos, pigmentos, *debris* celulares e os sobrenadantes da separação de proteínas, conferindo ao processo potencialidade para ser projetado a escalas maiores de forma rentável.

Palavras-chave: Spirulina. Concentrado protéico. Peptídeos bioativos.
Processamento simples.

ABSTRACT

In the searching for natural products in order to treat diseases, improve the well-being or the longevity, new products have emerged with bioactive ingredients, that are being introduced to the promising market of nutraceuticals, pharmaceuticals or cosmeceuticals. Microalgae and cyanobacteria are recognized as an important source of bioactive compounds (peptides, fatty acids, pigments, vitamins, etc.). Spirulina is one of the most representative species of cyanobacteria, and for its high protein content it is specially suitable for producing bioactive peptides. So, it is important to develop feasible and cost-effective processes in order to enable production in a competitive scale. In this work we propose a process for extraction and concentration of proteins from Spirulina biomass; it was developed after the identification of improvement opportunities, during the evaluation and comparison of classical methods for isolating proteins. This proposed process produces a protein concentrate with 88.8% of purity and an overall yield of 79%, which is higher when compared with the other methods tested. This protein concentrate has only 3.75% of carbohydrates and 1.6% of lipids. The time for the processing was significantly reduced when compared to other processes. The protein concentrate exhibited an antioxidant activity and also antimicrobial properties against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Furthermore, it is possible to take advantage the co-products of the process (lipids, pigments, cell debris and centrifugation supernatant). So, this process potentially can be scaled up in a cost-effective manner.

Keywords: Spirulina. Protein concentrate. Bioactive peptides. Feasible process.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MORFOLOGIA SPIRULINAS	22
FIGURA 2 - ULTRAESTRUTURA SPIRULINA..	22
FIGURA 3 - CONVERGÊNCIA DA TERMINOLOGIA DE PRODUTOS TERAPÉUTICOS.	25
FIGURA 4 - ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DE ISOLADO PROTÉICO DE SPIRULINA PLATENSIS.....	30
FIGURA 5 - BIOATIVIDADES DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE ALIMENTOS.	32
FIGURA 6 - DIAGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO PEPTÍDEOS BIOATIVOS ...	35
FIGURA 7 - PERFIL ISOELÉTRICO DE PROTEÍNAS DE <i>S. PLATENSIS PACIFICA</i>	39
FIGURA 8 - HISTOGRAMA DE PONTOS ISOELÉTRICOS DE PROTEÍNAS DE <i>S.</i> <i>PLATENSIS</i>	39
FIGURA 9 - PESOS MOLECULARES DE PROTEÍNAS DE <i>S. PLATENSIS</i> PCC 8005 ...	40
FIGURA 10 - CURVA PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. MAXIMA</i>	44
FIGURA 11 - CURVA PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. PLATENSIS</i>	44
FIGURA 12 - CURVA PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATOS.....	45
FIGURA 13 - CURVA DE BSA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	47
FIGURA 14 - CURVA DE GLICOSE PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS.....	47
FIGURA 15 - PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS 1	50
FIGURA 16 - PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS 2	52
FIGURA 17 - PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS 3	54
FIGURA 18 - CURVA PADRAO VITAMINA C VRS ABTS	57
FIGURA 19 - PORCENTAGEM DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS A DIFERENTES PH	65
FIGURA 20 - COMPORTAMENTO DO % DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS A DIFERENTES pH.....	66
FIGURA 21 - CURVA DE SOLUBILIDADE PARA PROTEÍNAS DE <i>S. MAXIMA</i>	68
FIGURA 22 - CONFIGURAÇÃO DO PROCESO MELHORADO.....	76
FIGURA 23 - PROYEÇÃO DO PROCESSO MELHORADO A ESCALA INDUSTRIAL.....	77
FIGURA 24 - APARÊNCIA DOS MATERIAIS NA ETAPA DE DESENGORDURAMENTO .	80
FIGURA 25 - RUPTURA CELULAR DURANTE A EXTRAÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	81
FIGURA 26 - APARENCIA DOS MATERIAIS NA ETAPA DE PRECIPITAÇÃO	82
FIGURA 27 - PIGMENTOS DETECTADOS QUALITATIVAMENTE	86
FIGURA 28 - SDS PAGE DO CONCENTRADO PROTÉICO.....	88
FIGURA 29 - HALOS DE INIBICAO EM TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	90

FIGURA 30 - CULTIVO SOLIDO DE S. MAXIMA PARA ISOLAMENTO.....	110
FIGURA 31 - CULTURA DE S. MAXIMA ISOLADA.....	110
FIGURA 32 - CULTURA DE SPIRULINA EM FOTOREADORES DE LABORATORIO	111
FIGURA 33 - CINETICAS DE CRESCIMENTO SPIRULINA.....	111
FIGURA 34 - CINETICAS DE CRESCIMENTO SPIRULINA PLATENSIS COM PULSO CARBONO.....	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO GERAL <i>S. MAXIMA</i> E <i>S. PLATENSIS</i>	23
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DETALHADA <i>S. PLATENSIS</i>	24
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO GERAL DE DIFERENTES ALGAS E CIANOBÁCTERIAS	28
TABELA 4 - PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE MICROALGAS COMPARADO	29
TABELA 5 - CONCENTRAÇÕES E AMOSTRAS PARA TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	56
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS BIOMASSAS DE SPIRULINA	58
TABELA 7 - BALANÇO DE MASSAS PROCESSO 1	60
TABELA 8 - TEMPOS DAS ETAPAS DO PROCESSO 1	60
TABELA 9 - BALANÇO DE MASSAS PROCESSO 2	61
TABELA 10 - TEMPOS DAS ETAPAS DO PROCESSO 2	62
TABELA 11 - BALANÇO DE MASSAS PROCESSO 3.....	63
TABELA 12 - TEMPO DAS ETAPAS DO PROCESSO 3.....	63
TABELA 13 - EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SPIRULINA A DIFERENTES pH..	64
TABELA 14 - RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS POR PRECIPITAÇÃO ISOELÉTRICA TRATAMENTOS A DIFERENTES pH.....	66
TABELA 15 - ANOVA DOS TRATAMENTOS DA PRECIPITAÇÃO ISOELÉTRICA EM DIFERENTES pH.	67
TABELA 16 - VALORES DE SIGNIFICÂNCIA PARA O TESTE DE TUKEY DA PRECIPITAÇÃO	67
TABELA 17 - BALANÇO DE MASSAS PROCESSO 4	75
TABELA 18 - TEMPOS DAS ETAPAS DO PROCESSO 4	75
TABELA 19 - RENDIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA ETAPA DE DESENGORDURAMENTO.....	78
TABELA 20 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS NA BIOMASSA DESENGORDURADA	79
TABELA 21 - RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS	79
TABELA 22 - RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	81
TABELA 23 - RENDIMENTO DA RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS	82
TABELA 24 - RENDIMENTOS GLOBAIS E PUREZAS	83
TABELA 25 - INDICADORES DE PRODUÇÃO	85

TABELA 26 - COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO SPC E OS COPRODUTOS.....	86
TABELA 27 - HALOS DE INIBICAO PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	89
TABELA 28 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS DE SPIRULINA	91
TABELA 29 - SOLUCOES PARA PREPARACAO DE MEDIO ZARROUK.....	108
TABELA 30 - PARAMETROS CINETICOS CULTURAS DE SPIRULINA	112
TABELA 31 - PARAMETROS CINETICOS CULTURAS DE SPIRULINA COM PULSO	112

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVO GERAL.....	19
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	GENERALIDADES SOBRE A SPIRULINA.....	20
2.1.1	Classificação e ultraestrutura.....	21
2.1.2	Composição da Spirulina	23
2.2	POTENCIAL TERAPÊUTICO DA SPIRULINA	24
2.3	PROTEÍNAS DE SPIRULINA	28
2.3.1	Composição das proteínas de Spirulina	29
2.3.2	Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas de Spirulina.....	31
2.3.3	Bioatividade em proteínas, hidrolisados protéicos e peptídeos de Spirulina ..	32
2.4	OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS	34
2.5	PROTEÍNAS DE SPIRULINA PARA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS.....	36
2.6	SOLUBILIDADE PROTEÍNAS DE SPIRULINA: PONTOS ISOELÉTRICOS..	38
2.7	PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS DE SPIRULINA.....	40
2.8	DESAFIOS NA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE SPIRULINA	43
3.2	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	43
3.2.1	Determinação de biomassa	43
3.2.2	Determinação de proteínas.....	46
3.2.3	Determinação de carboidratos.....	47
3.2.4	Determinação de lipídeos	48
3.2.5	Deteção qualitativa de pigmentos	48

3.2.6	SDS-PAGE	48
3.3	PROCESSOS PARA EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS ...	49
3.3.1	Processo 1. Extração e concentração de proteínas de soja	49
3.3.2	Processo 2. Extração a partir de biomassa de Spirulina sem desengordurar.	51
3.3.3	Processo 3. Extração com biomassa desengordurada.....	53
3.3.4	Desengorduramento de Spirulina com etanol.....	55
3.4	HIDROLISE DE PROTEÍNAS	55
3.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	55
3.5.1	Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, técnica de poço..	56
3.5.2	Atividade antioxidante, método ABTS.....	56
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	BIOMASSA DE SPIRULINA	58
4.2	AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	59
4.2.1	Processo 1: Processo de extração de proteínas de soja modificado.....	59
4.2.2	Processo 2: Extração a partir de biomassa de Spirulina sem desengordurar.	61
4.2.3	Processo 3: Extração a partir de biomassa de Spirulina desengordurada.....	62
4.3	ESTUDOS DA SOLUBILIDADE E RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS	64
4.3.1	Solubilização de proteínas.....	64
4.3.2	Recuperação de proteínas a diferentes pH	65
4.3.3	Curva de solubilidade	67
4.4	PROCESSO MELHORADO PARA EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO	69
4.4.1	Extração de lipídeos (Desengorduramento)	69
4.4.2	Ruptura celular	71
4.4.3	Recuperação por precipitação	72
4.4.4	Secagem.....	73
4.4.5	Outras modificações	73

4.4.6	Descrição do processo melhorado (processo 4).....	74
4.5	COMPARATIVO DOS PROCESSOS AVALIADOS	78
4.5.1	Comparativo da etapa de desengorduramento.....	78
4.5.2	Comparativo da etapa de extração e solubilização	80
4.5.3	Comparativo da etapa recuperação por precipitação	82
4.5.4	Comparativo do rendimento global e pureza do concentrado protéico	83
4.5.5	Indicadores de produção do processo 4	84
4.6	CARACTERIZACAO DO CONCENTRADO PROTÉICO E COPRODUTOS..	85
4.6.1	Composição proximal	85
4.6.2	Pigmentos.....	86
4.6.3	Pesos moleculares no SPC	87
4.7	HIDROLISE DO CONCENTRADO PROTÉICO	88
4.8	PROPIEDADES BIOATIVAS	89
4.8.1	Propriedade antimicrobiana	89
4.8.2	Propriedade antioxidante	91
5	CONCLUSÕES	94
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	95
	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO	108

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a humanidade está enfrentando o aumento da incidência de várias doenças, tais como: o câncer, problemas cardiovasculares, a obesidade, a diabetes, entre outras. É sabido que isto pode estar relacionado com os estilos de vida sedentários e as dietas hipercalóricas (IBAÑEZ *et al.*, 2012). Diante desta situação no Japão e na Europa desde 1992 estabeleceram-se projetos e políticas para promover a saúde e o bem-estar. Com isto estabeleceram-se os alimentos funcionais, os quais foram formalmente definidos como aqueles alimentos que têm efeitos positivos em uma ou mais funções fisiológicas, e conseqüentemente melhoram o bem-estar ou reduzem o risco de adquirir doenças (DIPLOCK *et al.*, 1999).

Neste contexto também surgiram outras terminologias revolucionárias relacionadas a produtos de origem natural que promovem a saúde humana, tais como os termos: produtos nutracêuticos¹ e cosmeceuticos². Com o interesse que surgiu, indústrias inovadoras já têm colocado no mercado, produtos que incorporam elementos ou compostos bioativos; porém ainda é um campo pouco explorado que pode apresentar múltiplas possibilidades.

Extrair moléculas ou compostos bioativos como as proteínas, peptídeos, ácidos graxos, pigmentos ou antioxidantes, para serem utilizados como aditivos em alimentos, cosméticos ou em formulações farmacêuticas, já é uma realidade que está se tornando popular, além de ser uma alternativa aos aditivos químicos convencionais (CHACÓN *et al.*, 2010).

De acordo com a estimativa apresentada pela GIA (*Global Industry Analysts*), o mercado global de nutracêuticos pode crescer dos \$ 155,9 bilhões que representava no ano de 2007 para \$ 243,4 bilhões no ano 2015³. No caso dos cosmeceuticos, se prevê um aumento dos \$ 8,240 milhões que apresentava no ano 2012 para \$ 11,520 milhões no ano 2017 (BRANDT *et al.*, 2011). Estas informações são atrativas considerando que o mercado brasileiro desde o ano 2011, já possuía uma participação

¹ Alimento ou parte de alimento que proporciona benefícios médicos para a saúde, incluindo a prevenção ou tratamento de doenças (Defelice 1995). No entanto, os alimentos funcionais têm efeitos só preventivos.

² Produtos de aplicação tópica que além de cumprir sua função cosmética são capazes de alterar o estatuto de saúde da pele, porém não são considerados medicamentos (Klingman 2005).

³ Dados tomados da <http://www.biomed.com.tw/en/rd.php?page=1&cid=0>

de 10,1% no mercado mundial dos cosméticos (IZUMI *et al.*, 2013), e que o mercado dos nutracêuticos no Brasil incrementou-se 11% no ano 2010, segundo as informações do relato da *Euromonitor International*.⁴

Nesta procura de compostos biativos, as microalgas já têm sido referenciadas na literatura como uma fonte importante destes compostos (PLAZA *et al.*, 2008). As microalgas e cianobactérias não são um grupo completamente estudado, já que dos milhares de espécies existentes, só uma parte se encontra em coleções e somente centenas delas têm sido investigadas quanto a seu conteúdo químico e condições de cultivo em termos industriais, por isto elas continuam representando uma oportunidade de exploração e descobertas (OLAIZOLA, 2003).

Empregar a biomassa das microalgas como uma fonte de biomoléculas de interesse, em vez de usar a biomassa integral é uma abordagem interessante que já foi sugerida por GANTAR e SVIRČEV (2008). Os metabolitos de interesse que podem se obter a través de processos de extração e concentração ou fracionamento, podem se disponibilizar em quantidades ou concentrações necessárias para ser subministrados de forma controlada, ou podem ser utilizados como ingredientes ativos em diversos produtos. Assim também, durante estes processos de fracionamento podem se aproveitar os coprodutos de interesse. A purificação de biomoléculas está sendo adotada principalmente pelas indústrias cosmética e farmacêutica, onde o custo adicional de extração não é significativo quando comparado com os preços de venda, relativamente elevados, que estão tendo os novos produtos da linha de nutracêuticos e cosmeceuticos (CHACÓN *et al.*, 2010).

Neste sentido e do ponto de vista industrial e comercial, além da identificação de metabolitos de interesse, desenvolvimento de produtos e estudos de mercado, devem, em paralelo, ser estudados e estabelecidos processos que possam ser escalonáveis (AGYEI, 2011).

Sendo a *Spirulina* uma das mais representativas cianobactérias e com reconhecida composição e propriedades torna-se um foco atrativo de estudos de produção e extração de seus metabolitos e compostos bioativos. Entre estes compostos os peptídeos bioativos destacam-se, pois fazem parte de uma promissora

⁴ Dados tomados de http://www.nutraceuticalsworld.com/issues/2012-11/view_features/brazil-latin-americas-giant-at-a-crossroads/

linha de estudos, que estão sendo a plataforma para estabelecer a nova geração de agentes terapêuticos (PAULINE *et al.*, 2006).

A produção de peptídeos bioativos a partir de proteínas de microalgas é, portanto propícia, sendo necessário o desenvolvimento de métodos econômicos de produção, purificação e escalonamento industrial (AGYEI, 2011).

1.1 OBJETIVO GERAL

Definir e avaliar um processo para obtenção de um concentrado protéico a partir de biomassa de Spirulina para ser utilizado como matéria-prima para a produção de peptídeos bioativos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar ou configurar um processo de extração e concentração de proteínas de Spirulina com rendimento e pureza adequada, para a produção de peptídeos bioativos, com possibilidade de escalonamento e aproveitamento de co-produtos.
2. Comparar os indicadores produtivos dos processos avaliados.
3. Caracterizar o concentrado protéico obtido e os coprodutos.
4. Testar propriedades bioativas no concentrado protéico e em hidrolisados derivados deste, para avaliar o potencial para ser utilizado como matéria-prima para obtenção de peptídeos de aplicação nutracêutica, farmacêutica e cosmeceutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE A SPIRULINA

O gênero *Spirulina* (*Arthrospira*) é caracterizado por organismos procariotas, gram negativos e fotossintetizantes. Estas cianobactérias também são caracterizadas por crescerem em corpos de água com altos níveis de carbonatos e bicarbonatos e, portanto a elevados pH. Não têm relação filogenética ao grupo das microalgas, no entanto as *Spirulinas* ainda são chamadas de microalgas ou algas verde azuis, pelo fato de serem organismos unicelulares que contem clorofila. (OLIVEIRA *et al.*, 2013; ALI & SALEH, 2012).

A *Spirulina* como organismo fotoautotrófico metaboliza a matéria inorgânica e a energia luminosa em matéria orgânica e oxigênio. Contudo a *Spirulina*, assim como algumas microalgas, pode crescer de forma heterotrófica utilizando fontes de carbono orgânicas. Com esta capacidade a *Spirulina* pode desenvolver os metabolismos: a) fotoautotrófico, b) heterotrófico, c) fotoheterotrófico ou d) mixotrófico. No metabolismo fotoheterotrófico a fonte de energia é a luminosa, mas a fonte de carbono é matéria orgânica. O cultivo mixotrófico pode apresentar mais vantagens, porque a fonte de carbono pode ser orgânica e também inorgânica (principalmente CO₂). Neste ultimo tipo de metabolismo apresentam se menos problemas de fotoinibição e podem se atingir maiores taxas de crescimento (MARKOU & GEORGAKAKIS, 2011).

A versatilidade do metabolismo da *Spirulina* faz com que ela possa crescer em diferentes tipos de meios de cultivo, tais como: sintéticos, complexos ou resíduos agroindustriais. E como a *Spirulina* pode ser cultivada sob diferentes condições, a composição da sua biomassa pode variar e conseqüentemente ser modificada de acordo com o produto ou função de interesse. (MARKOU & GEORGAKAKIS 2011; MORAIS *et al.* 2009). Fatores como o sistema de cultivo, a temperatura, o tempo de cultivo e a concentração e fonte de nitrogênio, podem promover variações na concentração de proteínas, carboidratos e lipídeos, além da quantidade de biomassa produzida e sua produtividade (WOOD *et al.*, 1991).

Nas últimas décadas tem se desenvolvido diversas técnicas de cultivo para a produção da biomassa de *Spirulina*, desde unidades abertas de baixo custo (*raceway*) até fotobioreatores sofisticados (CHRONAKIS, 2011).

Como alternativa aos fotobioreatores o cultivo pode-se realizar em condições heterotróficas utilizando fermentadores convencionais (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000). Assim como também sistemas de operação sequencial, para produção autotrófica/heterotrófica ou mixotrófica (OGBONNA *et al.*, 1997).

2.1.1 Classificação e ultraestrutura

A classificação da *Spirulina* pode apresentar algumas diferenças, segundo as autoridades taxonômicas utilizadas de referência, porém na atualidade têm se estabelecido a designação correta como *Arthrospira*; a qual é filogeneticamente diferente do gênero *Spirulina*, elas somente compartilham a classificação em comum do reino, a divisão, a classe, e algumas semelhanças morfológicas (QUADRO 1).

QUADRO 1. TAXONOMIA DA *ARTHROSPIRA* E DA *SPIRULINA*

Classificação	Arthrospira	Spirulina
Reino maior	Procariota	Procariota
Reino	Eubacteria	Eubacteria
Divisão	Cyanobacteria	Cyanobacteria
Classe	Cyanophyceae	Cyanophyceae
Sub classe	Oscillatoriophyceae	Oscillatoriophyceae
Ordem	<i>Oscillatoriales</i>	<i>Chroococcales</i>
Gênero	<i>Arthrospira</i>	<i>Spirulina</i>

FONTE: <http://www.algaebase.org/>

As duas espécies mais representativas do gênero *Arthrospira* são a *Arthrospira maxima* e *Arthrospira platensis*, as quais desde a revisão de Geitler's, sobre o gênero *Cyanophyceae*, tem mantido a designação incorreta de *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis* (VONSHAK, 2002). Porém, na atualidade continua-se utilizando dita designação, por razões práticas, tradicionais e tecnológicas. No decorrer deste texto todas as denominações de *Spirulina* mencionadas farão referência ao gênero *Arthrospira*.

As Spirulinas são conhecidas morfológicamente por seu arranjo multicelular, cilíndrico e filamentoso (tricomas) na forma de hélice ou espiral (BELLINGER & SIGEE 2010), (FIGURA 1).

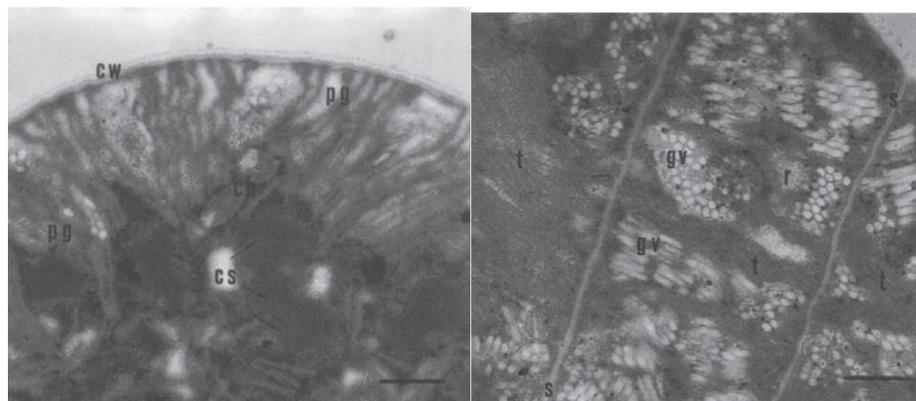
FIGURA 1. MORFOLOGIA SPIRULINAS



a) *arthrospira platensis* b) *arthrospira maxima*. 40x
FONTE: O AUTOR (2015)

Com respeito a sua ultraestrutura, a *Spirulina* tem a organização típica de um organismo procarioto, não contém núcleo nem plasmídeos e têm parede celular. Cada tricoma está coberto por uma delgada bainha formada por lipopolisacarídeos e proteínas. A parede celular é delgada, mas tem múltiplas capas, pode medir cerca de 40-60 nm, e nas secções transversais podem se detectar acumulações de peptidoglicanos (FIGURA 2). A divisão celular acontece por fissão binária ao longo dos tricomas (VONSHAK, 2002).

FIGURA 2. ULTRAESTRUTURA DE SPIRULINA. MICROFOTOGRAFIA ELETRÔNICA



a) *Arthrospira platensis* (secção transversal cw: parede celular, pg: grânulos de peptidoglicano, cs: carboxisomas) (b) *Arthrospira maxima* (secção longitudinal, s: Divisão dos tricomas por paredes celulares transversais; gv: vacúolos de gás, t: tilacóides da membrana e r: ribosomas).

FONTE: VONSHAK (2002).

2.1.2 Composição da Spirulina

As *Spirulinas* contêm: proteínas, aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas, betacaroteno, minerais, ácidos graxos essenciais (ácido gama linoleico e palmítico), polissacarídeos (p.ej. Ca-spirulan⁵), pigmentos (ficocianina, clorofila), glicolipídeos e sulfolipídeos (KHAN *et al.*, 2005). Na TABELA 1 pode se observar a composição geral da *Spirulina maxima* e *platensis*.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO GERAL S. MAXIMA E S. PLATENSIS

Composto (% em matéria seca)	S. maxima	S. platensis
Proteínas	60-71	46-63
Carboidratos	13-16	8-14
Lipídeos	6-7	4-9

FONTE: BEAKER (2007)

A organização mundial da saúde (WHO) reconhece o potencial nutricional da Spirulina, porém, na atualidade também estão sendo reconhecidas as suas propriedades terapêuticas. (KHAN *et al.*, 2005; RAPOSO *et al.*, 2013)

Todos os componentes da Spirulina são valiosos e podem ter várias aplicações. Os carboidratos podem ser considerados fonte de carbono para produtos de fermentação ou como biomoléculas terapêuticas. Os lipídeos não são uma fonte muito atrativa para produção de biocombustíveis, mas sim para extração de ácidos graxos principalmente o gama linoleico. As proteínas e os pigmentos também têm múltiplas aplicações nutracêuticas e/ou farmacêuticas. Por isso a Spirulina, assim como outras microalgas, têm sido considerada para ser processadas de forma integral em biorefinarias (YEN *et al.*, 2013).

Na TABELA 2 pode se observar, como exemplo, a composição detalhada da *S. platensis*.

⁵ Ca-spirulan: polisacarídeo sulfatado cálcio spirulan, isolado de *Spirulina platensis*, caracterizado por apresentar propriedades antivirais contra HIV-1 (Kyoko *et al.*, 2009).

TABELA 2. COMPOSIÇÃO DETALHADA *S.PLATENSIS*

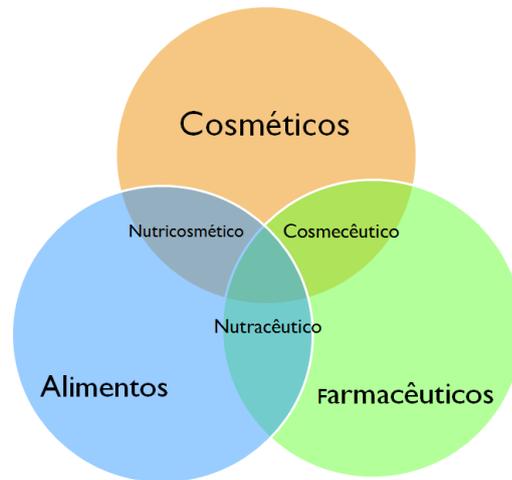
Vitaminas ^a	mg/100g	Minerais ^a	mg/100g
Provitamina A	2,330,000 IU/kg	Cálcio	700
(β-caroteno)	140	Cromo e cobre	1,28
Vitamina E	100 α-toferol eq.	Ferro	100
Tiamina B1	3,5	Magnésio	400
Riboflavina B2	4	Manganês	5
Niacina B3	14	Fósforo	800
Vitamina B6	0,8	Potássio	1400
Vitamina B12	0,32	Sódio e zinco	900
Acido fólico	0,01	Pigmentos	mg/100g
Biotina	0,01	Carotenoides	370
Ácido pantotênico	0,1	Clorofila a	1000
Vitamina K	25,2	Ficocianina	14.000
Ácidos graxos ^b		(%)	
(C ₁₄) Tetradecanoico		0,23	
(C ₁₆) Palmítico		46,07	
(C _{16:1}) D ⁹ Palmítico-olêico		1,26	
(C _{18:1}) D ⁹ Olêico		5,26	
(C _{18:2}) D ^{9,12} Linolêico		17,23	
(C _{18:3}) D ^{9,12,15} Gama linolêico		8,87	
Outros		20,88	

FONTE: a. BELAY (1997); b. MISBAHUDDIN *et al.* (2006)

2.2 POTENCIAL TERAPÊUTICO DA SPIRULINA

Os termos nutracêutico e cosmeceutico foram estabelecidos desde os anos 80 e 90's, surgiram da convergência das palavras: nutriente e cosmético com o termo farmacêutico, fazendo alusão aos produtos que se provem benéficos para a saúde humana, além de cumprir suas funções alimentícias ou cosméticas. (BERNAL *et al.*, 2011). A FIGURA 3 explica a relação entre estes termos. No QUADRO 2 pode se observar exemplos de compostos nutracêuticos.

FIGURA 3. CONVERGÊNCIA DA TERMINOLOGIA DOS PRODUTOS TERAPÊUTICOS.



FONTE: Adaptado de MELLAGE (2008)

QUADRO 2. ELEMENTOS OU COMPOSTOS NUTRACÊUTICOS E SUAS MATRIZES

Nutracêutico	Matriz	Possível efeito na saúde
Esteróis	Óleos vegetais (oliva, girassol, arroz...)	Diminuição do colesterol Anticancerígeno Anti-inflamatório
Betacaroteno	Sucos de laranja e tangerina	Antioxidante Anticancerígeno
Vitamina E (Tocoferóis)	Vegetais, óleos vegetais, microalgas	Antioxidante Prevenção de desordens degenerativas
Vitamina B ₁ e B ₂	Fungos comestíveis	Antioxidante
Proteínas e peptídeos da leite (Lactoferrina e imunoglobulina G)	Leite e seus derivados	Anti-hipertensivo Antimicrobiano Anti-inflamatório Atividade inmonoestimulante
Aminoácidos	Couve, algas, bebidas energéticas	Efeitos no sistema nervoso central Antioxidante Anticancerígeno Fonte de energia muscular
Peptídeos	Peixes	Anti-hipertensivo Antioxidante Atividade anticoagulante
Proteínas -35 kDA	Folhas de Cury	Propriedades antioxidantes
Proteínas totais	<i>Ganoderma lucidum</i>	Prevenção e tratamento de hipertensão, diabetes, hepatite, câncer e AIDS

FONTE: BERNAL (2011)

Em forma análoga às matrizes citadas no QUADRO 2, a Spirulina, por sua completa composição, também pode ser considerada uma matriz natural de produtos nutracêuticos. Sua alta concentração de proteína (com todos os aminoácidos essenciais) faz dela uma fonte importante de proteínas, peptídeos e aminoácidos que podem trazer efeitos benéficos para a saúde. (OLIVEIRA *et al.*, 2013; BELAY, 2002).

As proteínas da Spirulina têm altos níveis de lisina, metionina, cisteína e treonina; menores quando comparado com as proteínas do leite e da carne, mas seu valor nutricional é maior do que as proteínas das plantas (BURLANDO *et al.*, 2010). Além disso, a estrutura celular simples da Spirulina quando comparada com fontes vegetais pode apresentar vantagens nos processos de purificação.

O alto custo do atendimento a saúde, também têm impulsionado a procura do bem-estar, através do cuidado da dieta e através da medicina alternativa. Neste enfoque a Spirulina é reconhecida como recurso terapêutico importante, somente é preciso realizar mais pesquisas clínicas que possam consolidar o mérito de sua utilização (BELEY, 2002). Os efeitos regulatórios sobre o sistema imune são das principais propriedades terapêuticas que têm sido estudadas da Spirulina. Há estudos em animais e em seres humanos, que relatam melhorias na resistência imunológica em vários tipos de câncer, redução do colesterol, AIDS e outras doenças virais. (KHAN *et al.*, 2005; BELAY, 2002). No QUADRO 3 pode se observar alguns dos compostos da Spirulina e os efeitos terapêuticos estudados.

Os produtos produzidos por Spirulina também têm apresentado atributos interessantes para incluir em cosmeceuticos. Estes cosméticos possuem ingredientes que podem beneficiar a saúde da pele humana, melhorar sua proteção, aparência, assim como ter propriedade antienvhecimento (KIM *et al.*, 2008). Relatos na literatura indicam que aplicações tópicas com extratos brutos de Spirulina exibiram efeitos na tonificação da pele, revitalização da epiderme, melhora na drenagem do tecido dérmico, assim como a indução da redução do tecido subdérmico adiposo (BURLANDO *et al.*, 2010). De fato os extratos de Spirulina já são reconhecidos no mercado de cuidado da pele (STOLZ & OBERMAYER, 2005)

Outro exemplo é o estudo de Novak (2010), que demonstrou a capacidade antioxidante dos expolisacarídeos (EPS) produzidos por *S. platensis*. Estes EPS

quando colocados em uma formulação em creme exibiram boas propriedades de espalhabilidade, emulsificação e de retenção de umidade (NOVAK, 2010).

QUADRO 3. COMPOSTOS DA SPIRULINA COM EFEITOS TERAPÊUTICOS

Composto	Efeito / bioatividade
Ca-Spirulan	Imunomoduladoras Anticancerígeno Antiviral Indução de hematopoiese
Sulfolipídeos	Antiviral
β -Caroteno	Fonte de vitamina A Anticancerígeno Antioxidante
Acido γ -linoleico	Precursor de prostaglandinas Melhoras de sintomas de artrite e enfermidades do coração Tratamento de obesidade e transtornos maníaco depressivos
Vitamina E	Antioxidante
Ficocianina	Anticancerígeno Redução de toxicidade Antiviral

FONTE: KHAN *et al.* (2005)

A Spirulina também oferece outras vantagens na procura de aplicações terapêuticas, entre elas podem se citar: 1) A tecnologia de cultivo e colheita da Spirulina está bem estabelecida, 2) a Spirulina tem sido objeto de estudos de toxicidade em pelo menos duas décadas, além dos séculos de uso humano, 3) as normas microbiológicas e de segurança estão bem estabelecidas, 4) a Spirulina pode crescer livre de outras cianobactérias ou toxinas, pelo fato de sua adaptabilidade a condições fortemente alcalinas, 5) a Spirulina pode ser cultivada em terras que não tenham condições adequadas para a agricultura convencional, e 6) a popularidade da Spirulina após duas décadas de comercialização como alimento ou suplemento, que consequentemente pode trazer vantagens mercadológicas (BELAY, 2002).

Considerando este potencial e fazendo foco em sua completa constituição, a Spirulina pode se ainda redescobrir o reaproveitar como matéria-prima para obtenção de novos produtos. Especificamente a Spirulina destaca-se entre muitas cianobactérias ou microalgas, por sua alta concentração proteica. Isto a torna um alvo

para estudos de extração, concentração, purificação, hidrólises proteica ou recuperação peptídeos e aminoácidos. Abrindo muitas possibilidades para a obtenção de produtos nutracêuticos, terapêuticos ou cosmeceuticos.

2.3 PROTEÍNAS DE SPIRULINA

Devido à acumulação proteica nas Spirulinas (40 a 60% p/p), tem havido interesse no seu aproveitamento. Na TABELA 3, pode se observar que a Spirulina é muito eficiente em converter a energia luminosa em biomassa com alto conteúdo de proteína, usualmente maior que as outras espécies de microalgas, algas ou cianobactérias (BECKER, 2007).

TABELA 3. COMPOSIÇÃO GERAL DE DIFERENTES ALGAS E CIANOBACTÉRIAS

Alga ou cianobactéria	Proteína	Carboidratos	Lípidos
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	3
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirogyra sp</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	08-14	4-9
<i>Synechococcus sp</i>	63	15	11

% em peso de matéria seca. FONTE: BECKER (2007)

Ainda que a produção de proteína de algas dependa das condições de cultivo, a produtividade é considerada maior que das plantas terrestres. O rendimento de cultivo de microalgas pode atingir quantidades entre 20 e 50 vezes mais de proteína em termos de área, quando comparado com a soja (DARCY-VRILLON, 1993).

A Spirulina cultivada em tanques ao ar livre tem rendimento de 25 ton/ha *versus* as 0,16 t/ha no trigo (BOROWITZKA, 1995). A estrutura celular simples e o tamanho da Spirulina ajudam a diminuir os custos de energia nas operações de coleta, além disso, em condições apropriadas ela realiza uma fotossíntese rápida com quase acúmulo total de nutrientes. O grande número de ribossomos na Spirulina permite a

produção rápida de proteínas, ela pode exibir uma taxa de conversão de proteína entre 8 a 10% enquanto os grãos de soja e outras plantas terrestres atingem regularmente somente 3% (CHRONAKIS E MADSEN, 2011).

2.3.1 Composição das proteínas de Spirulina

a. Aminoácidos:

As proteínas de microalgas têm exibido alto conteúdo de aminoácidos essenciais como a threonine, valina, leucina, lisina, tirosina e fenilalanina (CHRONAKIS, 2011), devido a esta característica as microalgas destacam-se frente a outras fontes proteicas. Na TABELA 4, pode se observar o perfil de aminoácidos frente a outras fontes convencionais de proteína e o padrão da FAO (BEKER, 2007).

TABELA 4. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE MICROALGAS COMPARADO

Aminoácidos	WHO /FAO	Ovo	Soja	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Dunaliella bardawil</i>	<i>Arthrospira Maxima</i>	<i>Spirulina platensis</i>
Ile	4	6,6	5,3	3,8	4,1	6	6,7
Leu	7	8,8	7,7	8,8	11	8	9,8
Val	5	7,2	5,3	5,5	5,8	6,5	7,1
Lis	5,5	5,3	6,4	8,4	7	4,6	4,8
Fen	6	5,8	5	5	5,8	4,9	5,3
Tyr		4,2	3,7	3,4	3,7	3,9	5,3
Met	3,5	3,2	1,3	2,2	2,3	1,4	2,5
Cys		2,3	1,9	1,4	1,2	0,4	0,9
Try	1	1,7	1,4	2,1	0,7	1,4	0,3
Thr		5	4	4,8	5,4	4,6	6,2
Ala		-	5	7,9	7,3	6,8	9,5
Arg		6,2	7,4	6,4	7,3	6,5	7,3
Asp		11	1,3	9	10,4	8,6	11,8
Glu		12,6	19	11,6	12,7	12,6	10,3
Gly		4,2	4,5	5,8	5,5	4,8	5,7
His		2,4	2,6	2	1,8	1,8	2,2
Pro		4,2	5,3	4,8	3,3	3,9	4,2
Ser		6,9	5,8	4,1	4,6	4,2	5,1

(g/100g de proteína). FONTE: BEKER (2007).

b. Complexos pigmentos-proteína

As Spirulinas contêm ficobiliproteínas, que são compostos pigmentos-proteínas⁶. As ficobiliproteínas são grupos prostéticos (bilin-chromoforo), de alta fluorescência,

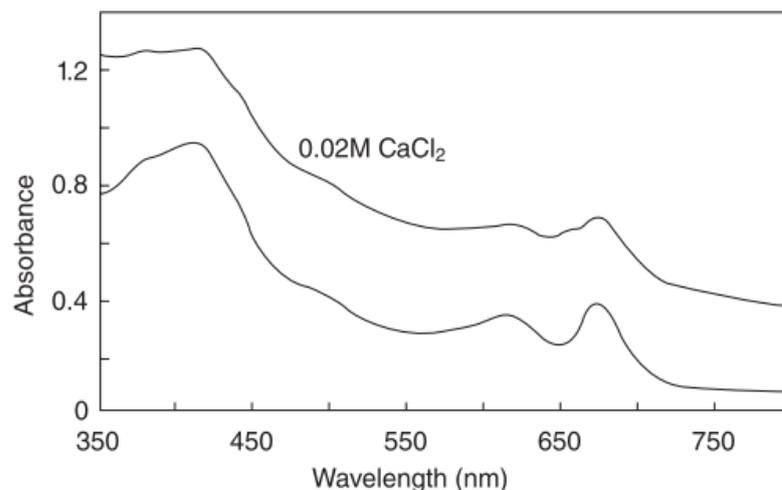
⁶ Complexos supramoleculares de onde o pigmento permanece ligado às proteínas (Patterson, 1996)

solúveis em água, coloridos e ligados covalentemente as proteínas. No caso da Spirulina, as ficobiliproteínas são os pigmentos azuis que têm função de antena fotossintética, absorvem a luz na região visível de 450 a 650 nm (ficoeritrina, ficocianina e alocianina) (PATTERSON, 1996). Muitos destes pigmentos fotossintéticos já têm sido caracterizados e utilizados para aplicações comerciais (BENRENS, 1999).

Os pigmentos comercialmente importantes para a Spirulina são de três tipos: a) Clorofila a, que representa 1,7% do peso na célula, ii) carotenóides e xantofilas, que corresponde a 0,5% do peso e iii) ficobiliproteínas (c-ficocinanina e aloficocianina) que normalmente corresponde ao 20% da proteína celular, sendo o principal pigmento presente na Spirulina (RICHMOND, 1987).

Na FIGURA 4 pode se observar o espectro da proteína de Spirulina na região visível, tendo os picos máximos nos valores 420 nm, devido à presença do pigmento clorofila-proteína; os picos em 620 e 675 correspondem aos pigmentos c-ficocinanina e alocianina. Na mesma figura pode se perceber que as proteínas exibem solubilidades diferentes, por exemplo: em compostos iônicos como o CaCl_2 a turbidez da solução incrementa-se, mas não é modificado o perfil dos complexos pigmento-proteína (CHRONAKIS, 2011).

FIGURA 4. ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DE ISOLADO PROTÉICO DE *SPIRULINA PLATENSIS* (*PACIFICA*)



Diluição 0,5 mg/ml, em tampão tris 0,1 hcl ph 7 e em 0,02 m cacl2 x 2 h20 em tris 0,1 hcl ph 7.
 FONTE: CHRONAKIS (2001)

c. Complexos glicose-proteína

A parede celular da Spirulina possui complexos de açúcar e proteína, chamados de glicoproteínas ou peptidoglicanos, os quais conferem rigidez à sua parede celular (BALLONI, 1980; VONSHAK, 2002).

2.3.2 Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas de Spirulina

As propriedades funcionais referem-se àquelas derivadas do comportamento das proteínas nos sistemas alimentícios, durante o processamento, armazenamento, preparação ou consumo (KINSELLA, 1976), e que podem afetar ou modificar as características e qualidade dos alimentos.

Com o interesse de utilizar as proteínas de Spirulina como ingrediente em sistemas alimentícios, ANUSUYA *et al.* (1981) e CHRONAKIS (2011, 2000) têm estudado as propriedades funcionais de isolados protéicos de *S. platensis*. Nesses estudos foram caracterizadas as propriedades de solubilidade, qualidades térmicas, fluorescência, hidrofobicidade, viscosidade, comportamento na interfase água/ar, emulsificação, absorção de água e gordura, e a espumação (CHRONAKIS, 2011; CHRONAKIS, 2001; CHRONAKIS, 2000). LETELIER (2009) também realizou estudos da estabilidade térmica, propriedades antinutricionais, absorção de água, viscosidade e emulsificação, mas em isolados protéicos de *S. maxima*; incluindo as modificações químicas para melhorar as propriedades funcionais (LETELIER, 2009).

Essas caracterizações indicaram que as proteínas da Spirulina exibem propriedades funcionais parecidas com as proteínas das plantas, o que a faz um ingrediente factível para ser utilizado em alimentos e formulações. (CHRONAKIS, 2001; CHRONAKIS *et al.*, 2000; ANUSUYA *et al.*, 1981; LETELIER, 2009).

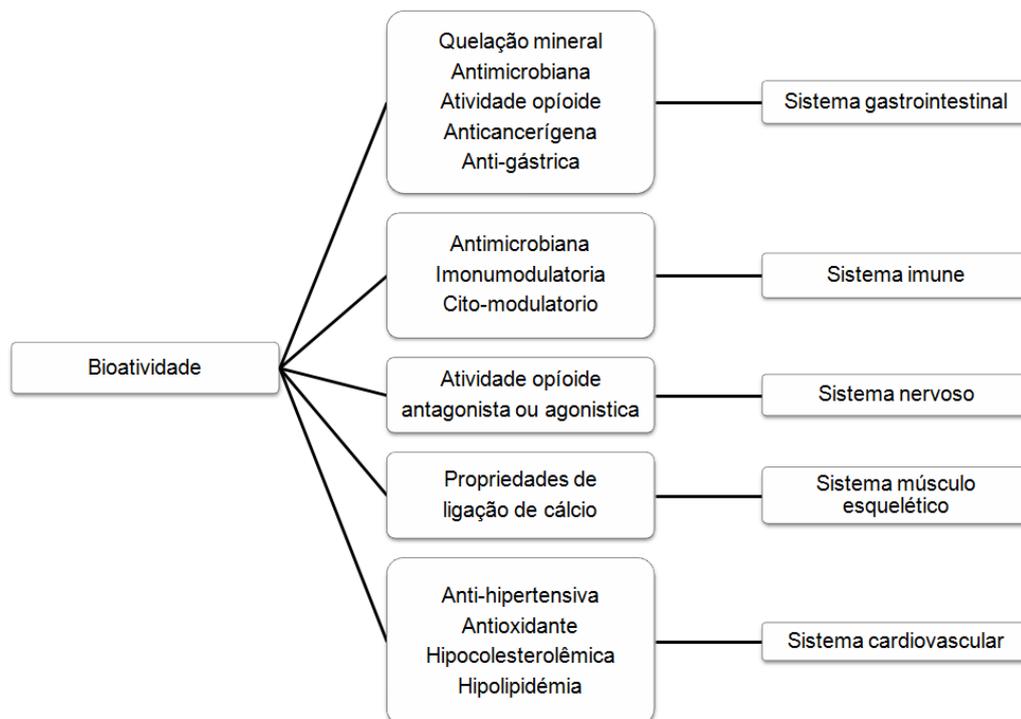
Entre os maiores fatores que determinam a qualidade de uma proteína estão o perfil de aminoácidos e a digestibilidade, a qual garante a sua biodisponibilidade. A Spirulina é única entre muitas outras microalgas, pois é altamente digestível, por isso, incluso têm sido recomendada pela FAO/WHO para ser consumida como biomassa integral por sua completa fonte proteica (BECKER, 2007). Além de ser geralmente considerada segura para o consumo humano.

2.3.3 Bioatividade em proteínas, hidrolisados protéicos e peptídeos de Spirulina

As proteínas possuem dentro de sua estrutura primária, regiões que codificam atividades de regulação e proteção das funções biológicas. Estas regiões são os polipeptídios ou peptídeos, que podem ser endógenos dos organismos ou liberados a eles por processos externos. Os peptídeos ativos têm sido descritos como aqueles componentes que podem exercer funções similares aos medicamentos ou hormônios. Podem alterar positivamente as funções fisiológicas através de mecanismos de ligação com receptores específicos e interatuar com células alvo, ou estimular inibições através de ações enzimáticas (FITZ GERALD & MURRAY, 2007; KITTS & WEILER, 2003).

Os peptídeos bioativos de baixo peso molecular têm a possibilidade de cruzar a barreira intestinal (ROBBERTS *et al.*, 1999). E quando comparados com fármacos de baixo peso molecular, os peptídeos têm a vantagem de poder ser bioespecíficos com os alvos, têm amplo espectro de ação terapêutica, baixos níveis de toxicidade, diversidade estrutural e ausência ou baixos níveis de acumulação nos tecidos (MARX, 2005). A FIGURA 5 mostra alguns efeitos fisiológicos dos peptídeos bioativos.

FIGURA 5. BIOATIVIDADES DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE ALIMENTOS



FONTE: AGYEI & DANQUAH (2012)

Embora as proteínas e peptídeos recombinantes sejam responsáveis pelo aumento das vendas dos medicamentos de origem natural, os compostos de baixo peso molecular utilizados em terapias humanas indiscutivelmente têm apresentado melhores efeitos por sua superior compatibilidade e biodisponibilidade (BAKRUDEEN *et al.*, 2013).

A literatura tem relatos sobre extratos protéicos, hidrolisados e peptídeos de microalgas que tem induzido atividades biológicas, tais como: antioxidantes (KARAVITA *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006), anti-hipertensivos (FITZGERALD & MURRAY, 2007), imunomoduladores (MORRIS *et al.*, 2007), anticancerígenos (Sheih *et al.*, 2010), hepatoprotetores (HWANG *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2012), anticoagulantes (ATHUKORALA & JEON, 2005), antimicrobianos, e assim por diante. Porém, estas bioatividades, ainda têm que ser confirmadas por vários estudos clínicos (AGYEI & DANQUAH, 2011). No QUADRO 4 podem se observar os peptídeos bioativos reportados até agora, para a *Spirulina*.

QUADRO 4. PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE SPIRULINA

Microalga	Possível bioatividade	Enzima ou médio de hidrólise	Sequência de aminoácidos	Referência/país
<i>Spirulina maxima</i>	Anti-inflamatória	Tripsina, -quimotripsina e pepsina	P1 (LDAVNR) P2 (MMLDF)	(VO <i>et al.</i> , 2013) Coreia do Sul
<i>Spirulina maxima</i>	Efeitos positivos em arteriosclerose (em células endoteliais)	Tripsina, alfa- quimotripsina e pepsina	P1 (LDAVNR) P2 (MMLDF)	(VO & KIM, 2013) Coreia do Sul
<i>Spirulina maxima</i>	Inibição de reações alérgicas	Tripsina, alfa- quimotripsina e pepsina	P1 (LDAVNR) P2 (MMLDF)	(VO <i>et al.</i> , 2014) Coreia do Sul
<i>Spirulina platensis</i>	Anti-hipertensivo /ACE-1 inibitória	Pepsina	Ile-Ala-Glu Fe-Ala-Leu Ala-Glu-Leu Ile-Ala-Pro-Gli Val-Ala-Fe	(SUETSUNA & CHEN, 2001) Japão /Taiwan
<i>Spirulina platensis</i>	Anti-hipertensivo /ACE-1 inibitória	Alcalase	Ile-Gln-Pro	(LU <i>et al.</i> , 2010) Japão /China
<i>Spirulina platensis</i>	Anti-tumoral	Tripsina	Nanopolypeptide	(ZHANG AND ZHANG, 2013)
<i>Spirulina platensis</i>	Quelação de ferro (suplemento)	Alcalase Flavourzina	Thr-Asp-Pro- Ile(Leu)-Ala-Ala- Cys-Ile(Leu)	(KIM <i>et al.</i> , 2014) Coreia

FONTE: O AUTOR (2015)

As frações peptídicas de Spirulina também têm apresentado propriedades cosméticas específicas, por exemplo, estudos de atividade dermatológica com hidrolisados protéicos indicaram estimulação na proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e glicosaminoglicanos e, portanto ação antienvhecimento (BODEAU, 2005).

Além disso, a literatura relata que as proteínas e seus derivados podem conferir propriedades de retenção de umidade no cabelo e na pele, por sua forte afinidade, aliás, os enriquece com nutrientes. Por isto, cosméticos que incluam estes ingredientes podem ser utilizados para curar e reparar a pele danificada por falta de hidratação e nutrição (HAGINO & MASANOBU, 2003). A proteína B-ficoeritrina, por exemplo, que também está presente na Spirulina, tem exibido várias bioatividades antioxidantes, anti-inflamatorias, neuroprotectoras, antivirais, antitumorais, hepatoprotectoras, entre outras (SEKAR & CHANDRAMOHAN, 2008). A ficoeritrina-b têm exibido estabilidade ao calor e ao pH, pelo que têm sido utilizada em colorantes naturais rosa e roxo para batons de lábios, delineador de olhos e outras formulações.

A possibilidade das proteínas para influenciar a fisiologia do corpo é observada não só quando as proteínas são hidrolisadas, mas também na sua forma intacta. Curiosamente, algumas proteínas parecem manter a sua bioatividade mesmo em um estado desnaturado. Isto têm sido demonstrado para a lisozima e α -lactalbumina, cujo espectro antibacteriano foi amplificado após a desnaturação (EXPÓSITO & RECIO 2006).

As bioatividades que possam ser encontradas nas proteínas ou peptídeos gera valor agregado aos produtos e abre o acesso á aplicações em alimentos funcionais ou nutracêuticos (CHACÓN & GONZALEZ, 2010; GUIL *et al.*, 2004; MOHAMED & RAHMAN, 2012), em produtos farmacêuticos (DOMINIC & DANQUAH, 2011), e também em cosmecêuticos (SEKAR & CHANDRAMOHAN, 2008; STOLZ & OBERMAYER, 2005).

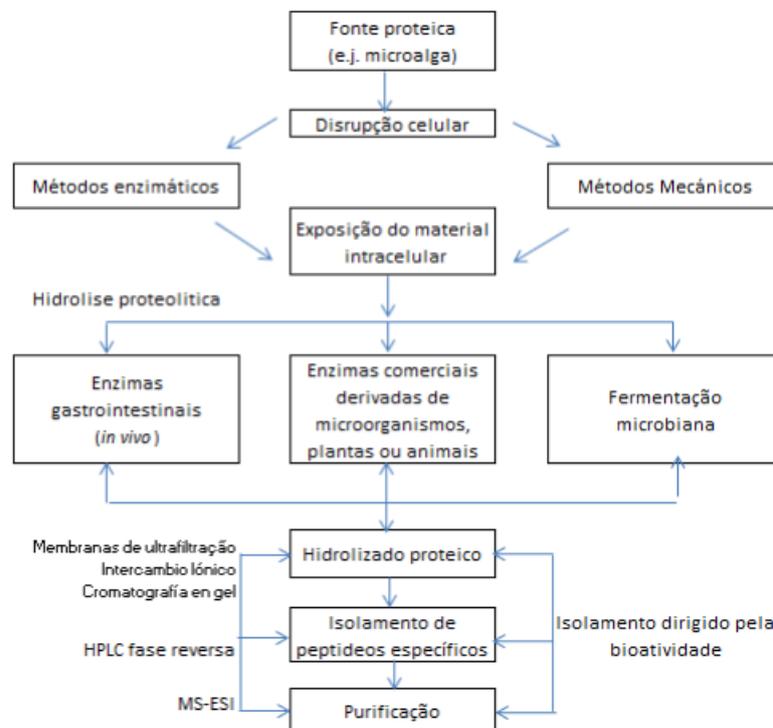
2.4 OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Os peptídeos terapêuticos tradicionais são manufaturados por métodos sintéticos, transgênicos ou recombinantes (MARX, 2005), porém são processos caros e conseqüentemente inadequados para aplicações em escalas maiores (HANCOCK

& SALH, 2006). Estudos sugerem que peptídeos bioativos são produzidos naturalmente a partir de proteínas dietéticas durante o trânsito gastrointestinal. No entanto, produzidos através de tais meios, não podem ser controlados em especificidade ou em quantidade suficiente para gerar uma resposta fisiológica em seres humanos adultos, existe então a necessidade de processos tecnológicos e industriais para produzir peptídeos bioativos de valor terapêutico (GAUTHIER *et al.*, 2006).

Os peptídeos bioativos usualmente são obtidos pela hidrólise enzimática (*in vitro*) ou por fermentação microbiana (*in situ*) de proteínas alimentícias. Porém a hidrólise enzimática (proteolítica) é preferida pela indústria alimentícia e farmacêutica, pois gera menor quantidade de resíduos. Finalmente a recuperação de peptídeos específicos é realizado através de tecnologias de purificação de ultima geração, tais como: a cromatografia em gel, a ultrafiltração por membranas, o intercambio iônico, a electroforese, entre outras (KIM & WIJESEKARA, 2010; SAMARAKOON & JEON, 2012; AGYEI & DANQUAH, 2011). Na FIGURA 6 pode se observar as principais etapas este tipo de processo:

FIGURA 6. DIAGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS



FONTE: Adaptado de AGYEI & DANQUAH (2011) e de SAMARAKOON & JEON (2012).

As enzimas utilizadas para realizar a proteólises são diversas, cada uma delas com capacidade de clivagem específica para certos tipos de polipeptídeos ou aminoácidos, e atuando em condições ótimas de pH e temperatura (SAMARAKOON *et al.*, 2012). No QUADRO 5 pode-se observar exemplos deste tipo de enzimas e suas condições de uso.

QUADRO 5. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PARA PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Enzima	Alvo de clivagem	pH	T (°C)	Microalga	Potencial atividade
Pepsina	Aminoácidos aromáticos hidrofóbicos, fenilalanina, leucina e tirosina	2	37	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Spirulina platensis</i>	Antioxidante Inibitória ACE-1
Tripsina	Terminal C de lisina e arginina	5	37	<i>Chlorella vulgaris</i>	Antioxidante
Papaína	Aminoácidos básicos: leucina e glicina	6	37	<i>Navicula incerta</i>	Inibitória de fibroses hepática
Alcalase		7	50	<i>Eclonia kava</i>	Inibitória de peroxidação de lipídeos

FONTE: SAMARAKOON *et al.* (2012)

2.5 PROTEÍNAS DE SPIRULINA PARA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS

Para a produção de peptídeos é preciso contar com uma fonte proteica, que poderia ser de origem animal, microbiológico ou vegetal, porém as microalgas, cianobactérias e organismos marinhos têm sido citados na literatura como uma fonte atrativa de peptídeos bioativos, além das suas outras substâncias terapêuticas (SAMARAKOON & JEON, 2012; KIM & WIJESEKARA, 2010; IBAÑEZ *et al.*, 2012; BAKRUDEEN *et al.*, 2013).

Neste contexto a Spirulina pode se tornar facilmente em uma fonte para produção de peptídeos bioativos. Mas como os processos com microalgas significam altos custos de produção, uma alternativa para viabiliza-los é a inclusão dos conceitos de biorefinaria, pois quanto mais produtos são obtidos da mesma cadeia produtiva, o valor agregado se incrementa significativamente e os processos podem ser economicamente mais factíveis (WIJFFELS *et al.*, 2010). Para isto acontecer é preciso que sejam desenvolvidas tecnologias aplicáveis a múltiplos produtos finais, de suficiente qualidade e quantidade, além disso, essas tecnologias devem ser simples, de baixo custo e baixo consumo energético (VANTHOOR-KOOPMANS *et al.*, 2013).

Para a produção de peptídeos, a proteólise pode se realizar sobre a biomassa algal e prosseguir com as purificações necessárias (FIGURA 6, secção 2.4), porém também pode ser aplicada diretamente aos isolados ou concentrados protéicos (KIM *et al.*, 2014). Nesta última opção pode se obter maior rendimento, facilitando as etapas finais de purificação e aproveitar os co-produtos derivados da extração.

Uma alternativa simples para extrair as proteínas de microalgas ou cianobactérias são os métodos clássicos baseados na solubilidade das proteínas e inspirados nos processos de produção de isolados de soja (BEKAR, 1992).

Os processos clássicos iniciam com a dispersão da biomassa em água, em taxas de 1:5 até 1:20; a biomassa pode ser previamente desengordurada ou não, de acordo com a quantidade de lipídeos presentes. Posteriormente é realizado um ajuste de pH, usualmente a condições alcalinas. As proteínas em solução são posteriormente separadas dos carboidratos e outros componentes através de precipitação, as proteínas são recuperadas por centrifugação, e finalmente lavadas para remoção de sais, neutralizadas e secadas. Os concentrados ou isolados protéicos obtidos mediante esta técnica podem atingir purezas entre 84 a 92% segundo as condições e etapas de purificação utilizadas (BOYE *et al.*, 2010).

Esta metodologia genérica tem sido utilizada para extração de proteínas de plantas e grãos, como a soja, feijão, cártamo, etc. (SATHE & VENKATACHALAM, 2007; ADEBOWALE *et al.*, 2007; BETSCHART, 1979; BOYE *et al.*, 2010; ROY *et al.*, 2010). Assim também em microalgas tais como a *Spirulina* e a *Nannochloropsis*, e em macroalgas como a *Ulva rígida* (LETELIER, 2009; CHRONAKIS, 2001; FLEURENCEL *et al.*, 1995).

Como a *Spirulina* tem parede celular, para acessar as proteínas e solubilizá-las é preciso a ruptura celular, que pode se realizar por métodos físicos, químicos, enzimáticos, ou combinação dos mesmos. Por exemplo: campos elétricos pulsados, ultrassom, moagem manual, prensa francesa, homogeneizador de alta pressão, enzimas, etc. (VANTHOOR-KOOPMANS *et al.*, 2013).

A recuperação das proteínas da fase solúvel, além da precipitação isoelétrica, pode-se realizar por extração com solventes iônicos (*Salting-in* e *Salting-out*),

sistemas de duas fases aquosas, formação de micelas reversas com surfactantes, ultrafiltração com membranas, entre outras técnicas (SAFI URSU *et al.*, 2014).

Uma vantagem atrativa dos processos clássicos de extração proteica, é a possibilidade de recuperar co-produtos de cada uma das etapas envolvidas, respeitando o conceito de biorefinarias (VANTHOOR-KOOPMANS *et al.*, 2013).

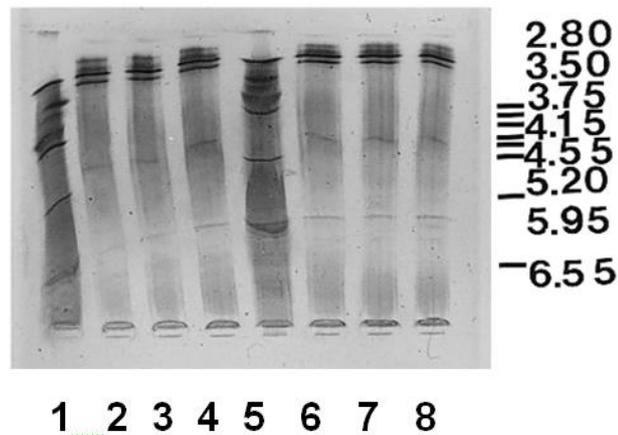
2.6 SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DE SPIRULINA: PONTOS ISOELÉTRICOS

A solubilidade das proteínas depende de diversos fatores (temperatura, presença de sais, constante dielétrica do solvente, carga elétrica da proteína, etc.). Dentre estes se destaca a presença de carga elétrica, a qual é devida a presença de grupos carboxilo e grupos amino, que permanecem livres ao longo da molécula.

Neste sentido a principal propriedade físico-química das proteínas, ligada à sua solubilidade é seu ponto isoelétrico, que é o valor de pH da solução onde o número de cargas negativas é igual ao número de cargas positivas na molécula. Neste ponto a interação molécula-solvente diminui, facilitando a precipitação (NELSON & COX, 2005). Esta propriedade é então utilizada nos processos de separação e purificação.

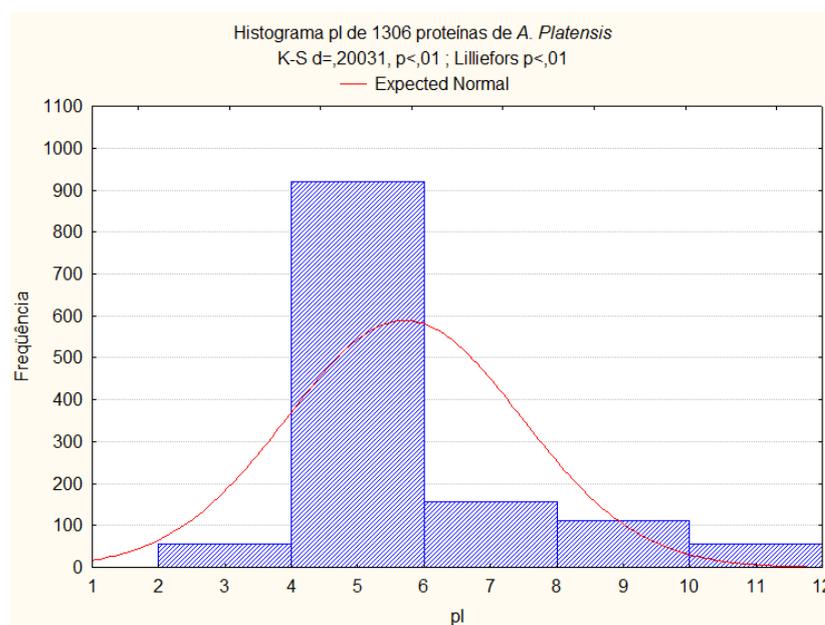
Numa célula existem diferentes proteínas, as quais têm diferentes cargas, solubilidades e propriedades, porém experimentalmente podem-se determinar os pontos isoelétricos onde converge a maior parte delas (BOYE *et al.*, 2010). ANUSUYA (1981) sugeriu o pH 3 como o ponto isoelétrico para as proteínas de *S. platensis*, isto através da avaliação da percentagem de nitrogênio extraído em diferentes valores de pH.

No trabalho de Chronakis os pontos isoelétricos sugeridos são valores de pH entre 2,8 - 3,5, para proteínas extraídas de *S. platensis - Pacifica* (CHRONAKIS *et al.*, 2000). Na FIGURA 7 se apresenta o gel do perfil isoelétrico gerado no trabalho de Chronakis. Pode se observar que têm proteínas na faixa pH 6 e 4, porém a maior concentração esta acumulada em valores entre 3,3 e 2,8.

FIGURA 7. PERFIL ISOELÉTRICO DE PROTEÍNAS DE *S. PLATENSIS PACIFICA*

Amostra 1 e 5 correspondem aos padrões e as amostras 2-4 e 6 - 8 as proteínas de spirulina.
 FONTE: CHRONAKIS *et al.* (2000).

Em estudos proteômicos da *S. Platensis* já foram identificadas 1306 proteínas, caracterizando seus pesos moleculares e pontos isoelétricos (MATALLANA-SURGET *et al.*, 2014). Essas proteínas representam só 21% do total do proteoma da Spirulina. Na FIGURA 8 podem-se observar os diferentes pontos isoelétricos das proteínas caracterizadas nesse trabalho. Estas informações indicam a variabilidade dos pontos isoelétricos que apresente esta parte estudada do proteoma da Spirulina.

FIGURA 8. HISTOGRAMA DE PI DE 1306 PROTEÍNAS DE *S. PLATENSIS*

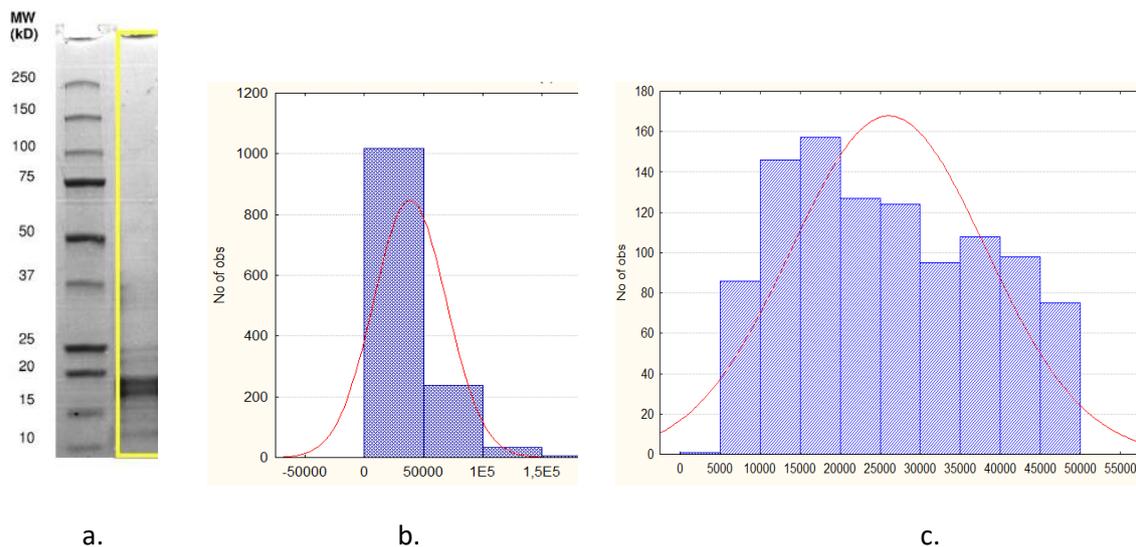
FONTE: O AUTOR, com dados de MANTALLAMA ET.AL. (2014).

2.7 PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS DE SPIRULINA

As cianobactérias e microalgas geralmente apresentam proteínas de baixos pesos moleculares também (ROUXEL *et al.*, 2001). Assim, no caso das Spirulinas, a literatura relata pesos moleculares na faixa de 10 a 25 kDa (MATALLANA *et al.*, 2014), 15,7 a 16,2 kDa (LETELIER, 2009) e 20,1 a 43 kDa (CHRONAKIS *et al.*, 2000).

Na FIGURA 9 pode se observar o perfil electroforetico obtido no trabalho de MATALLANA *et al.* (2014). Neste trabalho foram identificadas 1306 proteínas, através de cromatografia 3D acoplada a detector de espectrometria de massas (3D LC-MS/MS) para caracterizar parte do proteoma. Na mesma figura também pode se observar dois histogramas dos pesos moleculares das proteínas caracterizadas, no primeiro pode se observar que a maior quantidade de proteínas apresentaram pesos na faixa de 1 a 50 kDa (FIGURA 9, inciso b); no segundo histograma a maior frequência acontece entre 10 e 20 kDa (FIGURA 9, inciso c).

FIGURA 9. PESOS MOLECULARES DAS PROTEÍNAS DE *S. PLATENSIS* PCC 8005.



a. sds page do isolado protéico, fonte: matallana *et al.* (2014); b. histograma de frequência dos pesos moleculares das 1306 identificadas no proteóma da *s. platensis* pcc 8005. c. histograma de frequência das proteínas com pesos moleculares na faixa de 1 a 50 kda.

FONTE: Modificado de MATALLANA *et al.* (2014)

2.8 DESAFIOS NA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Tem se estimado que o desenvolvimento de fármacos possa requerer entre 10 a 12 anos, a partir da identificação da droga alvo até trazê-la ao mercado, pois o processo envolve pelo menos quatro fases: a) descobrimento e pesquisa, b) desenvolvimento, c) avaliação e aprovação regulamentar e d) comercialização (AGYEI *et al.*, 2011). Além disso têm se estimado um custo de US\$ 802 milhões para transformar uma nova entidade química a uma droga funcional comercializável (FRANK, 2003). Relatórios da FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos indica que o número de descobertas de drogas excede ao número de tratamentos médicos apresentados para aprovação, devido a problemas de segurança e efetividade dos compostos tradicionais (USFDA, 2009).

Os peptídeos bioativos, por sua efetividade e especificidade com células alvo oferecem uma alternativa promissora aos problemas citados, porém estes ainda têm que enfrentar desafios tecnológicos e econômicos (HANCOCK & SAHL, 2006). No QUADRO 6 se resumem estes desafios e algumas alternativas propostas na literatura.

QUADRO 6. DESAFIOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS TERAPEUTICOS

Desafio	Desvantagem	Alternativa
Baixa estabilidade	Vida média curta Diminuição da biodisponibilidade	Utilizar rotas alternas para liberação Modificações químicas Peptideomiméticos ⁷
Toxicidade	Efeitos sistêmicos desconhecidos	Estudos <i>in vitro</i> em modelos animais
Baixa solubilidade	Dificuldade na liberação nas células alvo Dificuldade no transporte através da membrana	Micro ou nano encapsulação Desenvolvimento de profármacos Utilização de dispersões líquidas Encapsulação em lipossomas
Alto custo	Alto custo para industrialização	Utilização de fontes proteicas baratas e acessíveis e co-produtos Utilização de enzimas microbianas Alianças com entidades R&D Aproveitamento de coprodutos Operação em bio-refinarias

FONTE: Adaptado de AGYEI (2011)

⁷ Moléculas pequenas não peptídicas que podem mimetizar ou bloquear funções peptídicas.

A produção de peptídeos bioativos derivados de fontes proteicas é uma alternativa promissora e explorável pela indústria farmacêutica e que pode ser ampliado para a indústria alimentícia e cosmética. No entanto, são necessárias pesquisas orientadas a enfrentar os desafios anteriormente citados. Precisam-se pesquisas da área científica e médica para enfrentar as etapas de aprovação e regulamentação. E o desenvolvimento de métodos eficazes para a produção, isolamento, purificação e escalado apresenta uma oportunidade para enfrentar os desafios na área tecnológica e econômica (AGYEI *et al.*, 2011).

Assim, este contexto tem sido a motivação para o presente trabalho, que propõe o desenvolvimento de um processo com características técnicas e economicamente factíveis, para produzir um concentrado protéico, a partir de Spirulin e servir de matéria prima para a produção de peptídeos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE SPIRULINA

Para obter biomassa de Spirulina foram cultivadas as cepas *S. platensis* (*Arthrospira*) SAG 257.80 e *S. maxima* (*Arthrospira*) SAG 84.79, em meio Zarrouk modificado (S. AIBA e T. OGAWA, 1977), segundo as instruções de manutenção da SAG (*Sammlung von Algenkulturen Göttingen*⁸). Detalhes da composição do meio se apresenta no anexo 1. As condições de cultivo se apresentam no QUADRO 7. Estas condições foram ajustadas a partir dos trabalhos de NOVAK (2010) e SYDNEY (2009).

QUADRO 7. CONDIÇÕES DE CULTIVO SPIRULINA

Condições de cultivo	Faixa
Volume de cultivo (L)	4
Temperatura (°C)	28 – 32
pH inicial	9,5
Aeração estéril (vvm)	0,28 – 0,3
Iluminação (Lux)	3800 – 4200
Fotoperíodo luz/ obscuridade (h:h)	16:08
Concentração inicial (g l ⁻¹)	0,2 – 0,6

FONTE: O AUTOR (2015)

Alem do cultivo de Spirulinas em escala do laboratório, obteve-se biomassa seca de *S. maxima*, que foi cultivada e cedida pela empresa *Ouro Fino Agronegócios*. Essa biomassa foi cultivada em tanques abertos (*Raceway*) com meio Zarrouk 50%, temperatura controlada de 30 °C, recuperação da biomassa por filtração e secagem ao sol.

3.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

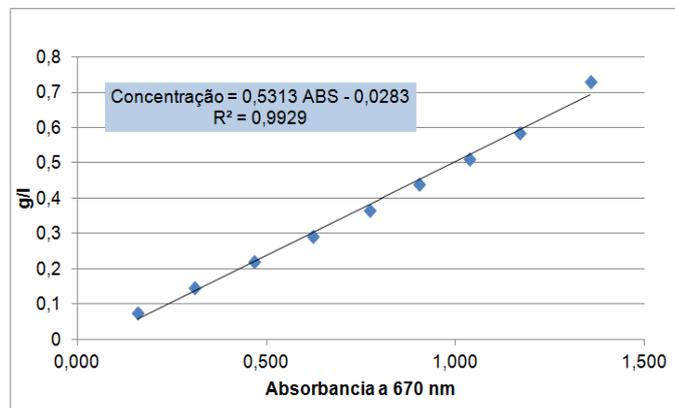
3.2.1 Determinação de biomassa

Para monitorar a biomassa foi construída uma curva da densidade ótica a 670 nm (FONTES *et al.* 2008) *versus* a concentração celular. A concentração celular foi determinada por peso seco através de filtração com membrana; para isto foram preparadas amostras de cultura de diferentes diluições, logo filtradas 10 ml de cada

⁸ SAG: acrônimo internacional para a coleção de culturas de algas na Universidade de Göttingen.

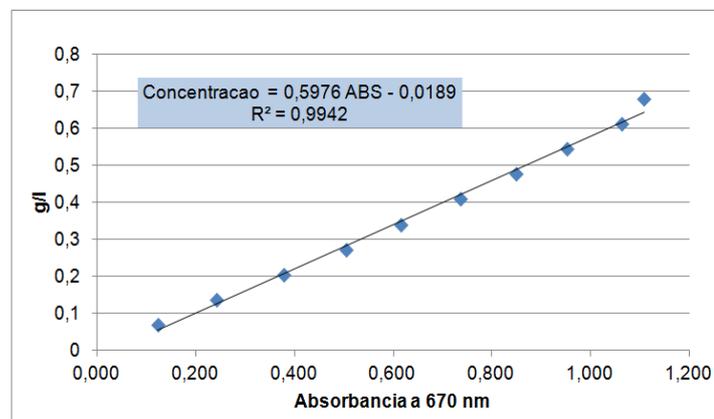
amostra em membranas de nitrato de celulose de 0,45 μm e equipamento para filtração a vácuo, as membranas foram previamente secas e taradas, após a filtração foram colocadas em estufa a 60 °C até atingir peso constante. Para a medição de absorbância foi utilizado um espectrofotômetro de comprimento de onda visível Spectrumlab 22PC. As amostras foram analisadas em triplicatas. Na FIGURA 10 e 11 pode-se observar as curvas obtidas.

FIGURA 10. CURVA PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA DE *S. MAXIMA*.



FONTE: O AUTOR (2015)

FIGURA 11. CURVA PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA DE *S. PLATENSIS*.



FONTE: O AUTOR (2015)

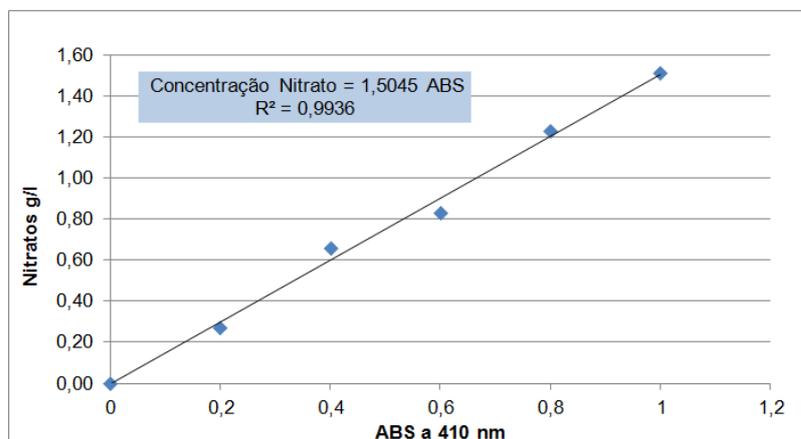
O crescimento da biomassa nas culturas foi monitorado periodicamente durante 15 a 17 dias de cultivo, também foi calculada a concentração máxima (X_{max} , g l^{-1}), a produtividade máxima (P_{max} , $\text{g l}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) a velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max} , dia^{-1}) e o tempo de duplicação (as equações utilizadas estão indicadas no anexo 2). Foram realizadas curvas cinéticas de crescimento e o monitoramento do consumo da fonte de carbono e de nitrogênio.

A fonte de carbono foi medida através da titulação de carbonatos e bicarbonatos (alcalinidade). Para a determinação de alcalinidade, amostras da cultura foram filtradas em papel quantitativo para recuperar aproximadamente 10 ml de meio livre de células para cada medição. Para a titulação foi utilizado HCl 0,1 N, fenolftaleína como indicador para carbonatos ($0,2 \text{ gl}^{-1}$ em etanol 95%) e laranja de metilo para os bicarbonatos ($0,5 \text{ g L}^{-1}$ em água). Aos 10 ml de meio foram adicionadas duas gotas de fenolftaleína e titulada com o HCL 0,1 N até o cor desaparecer (V1), depois da viragem foi colocado o laranja de metilo e titulada de novo com HCL 0,1 N, até obter uma cor laranja-rosa (V2), a quantidade total de bicarbonato foi calculado a partir da equação 1.

$$\text{HCO}_3^{-1}(\text{gl}^{-1}) = \frac{(V2-V1) \times 0,1 \times 61}{10} \quad \text{Eq. (1)}$$

A fonte de nitrogênio foi medida pelo método colorimétrico para determinação de nitratos, segundo CATALDO (1975). Para cada 0,2 ml de amostra de meio livre de células, foram adicionados 0,8 ml de solução de ácido salicílico (50 g/l em H_2SO_4 concentrado) e adicionados 19 ml de NaOH 2M após 20 minutos de reação, as leituras de absorvância foram feitas a 410 nm. Na FIGURA 12 se apresenta a curva de calibração para os nitratos.

FIGURA 12. CURVA PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATOS.



FONTE: O AUTOR (2015)

3.2.2 Determinação de proteínas

Para a determinação da concentração de proteínas na biomassa de *Spirulina* e as frações dos processos de extração, foi utilizado o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951; PETERSON, 1979). O método de Lowry é bem conhecido, simples e preciso, e têm sido muito utilizado nos estudos com microalgas (SLOCOMBE *et al.*, 2013; SAFI CHARTON *et al.*, 2014; VICTORIA *et al.*, 2010).

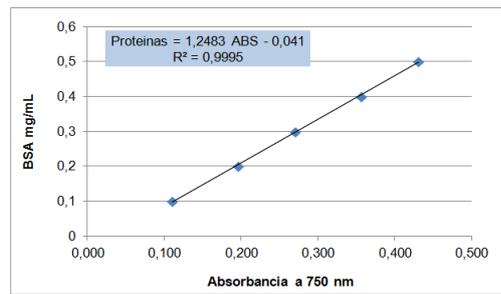
Para a determinação de proteínas, a biomassa de *Spirulina* foi previamente tratada para provocar a lise celular. A lise foi provocada colocando-se em suspensão 20 mg da biomassa em 10 ml de NaOH 0,1 N a 4 °C *overnight* (SYDNEY, 2009). Como alternativa para facilitar a extração de proteínas pode se utilizar um *buffer* de lise durante 20 minutos (5ml l⁻¹ de Triton X-100, 0,3722 g l⁻¹ de EDTA, 0,0348 g l⁻¹ Fenil metil sulfonil fluoreto) segundo o indicado por LOPEZ *et al.* (2010), neste caso a curva padrão deverá ser realizada utilizando o *buffer* de lise. Após a lise a suspensão é centrifugada a 9,000 x g por 5 minutos, para utilizar o sobrenadante nas determinações.

As soluções de Lowry tinham a seguinte composição: A) 2% p/p de Na₂CO₃ em NaOH 0,1 N; B) 0,5 % p/p de CuSO₄.5H₂O em 1% p/p Tartarato tetrahidrato de sódio e potássio, C) 50 ml da solução A e 1 ml da solução B, e D) Reagente de Folin–Ciocalteu 1:1 v/v em água destilada. As soluções C e D foram preparadas no dia de uso.

As amostras foram diluídas na mesma solução de lise. Da amostra diluída tomou-se 100 µl em tubos *ependorf* de 2,5 ml, adicionou-se 1 ml da solução C, e depois foi misturado em vortex. Após 10 minutos foi adicionado 100 µl da solução D nos tubos e deixados no escuro por mais 30 minutos. As leituras de absorbância foram tomadas a 750 nm em espectrofotômetro *PowerWave*®.

A curva padrão de proteínas foi realizada com BSA (Bovine Serum Albumin) A6003 Sigma ®, diluído na solução de lise (NaOH 0,1) e tratada da mesma forma que as amostras. Na FIGURA 13 pode se observar uma curva padrão de BSA.

FIGURA 13. CURVA DE BSA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.



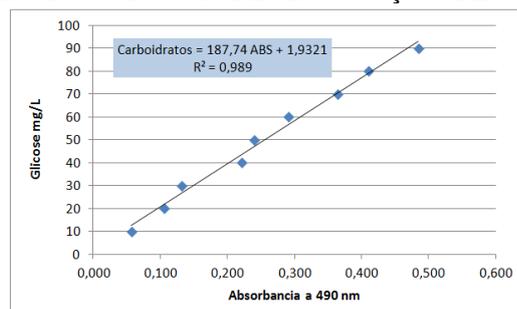
FORNTE: O AUTOR (2015)

É muito comum determinar o conteúdo de proteína a partir da quantificação de nitrogênio total pelo método do Kjeldahl, e multiplicar por o fator 6,25; no entanto parte do nitrogênio presente é gerado por fontes de nitrogênio não proteicas (ácidos nucleicos, amins, etc.), assim este cálculo estima a quantidade de proteína, acima do que realmente é (CHRONAKIS, 2011). Porém, pode se utilizar o Kjeldahl, mas utilizando fatores específicos determinados para microalgas, para a Spirulina têm se proposto fatores na faixa de 2,7 para 5,4 com valores médios de 3,68 e para varias microalgas incluindo a Spirulina o valor de 4,44 (SLOCOMBE *et al.*, 2013; LÓPEZ *et al.*, 2010).

3.2.3 Determinação de carboidratos

Os carboidratos totais foram determinados pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Para determinar os carboidratos da biomassa também foi utilizado o sobrenadante após a lise celular. Para 0,5 ml de amostra diluída (quando foi necessário) foi adicionado 0,5 ml de solução de fenol 5 % p/p seguido de 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado. Após esfriamento foram tomadas as leituras em espectrofotômetro a 490 nm. A curva padrão de carboidratos foi realizada com glicose diluída em água e tratada da mesma forma que as amostras. Na FIGURA 14 pode-se observar a curva padrão de glicose.

FIGURA 14. CURVA DE GLICOSE PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS.



FORNTE: O AUTOR (2015)

3.2.4 Determinação de lipídeos

Os lipídeos foram determinados gravimetricamente pelo método de BLIGH & DYER (1978). Foram pesados entre 1 a 3 g de amostra seca em tubos *falcon* de 50 ml, posteriormente foram adicionados 10 ml de clorofórmio, 20 de metanol e 8 de água destilada, os tubos foram homogeneizados em shaker rotativo durante 30 minutos, seguidamente foram adicionados 10 ml de clorofórmio e 10 ml de Na₂SO₄ 1,5 % p/p e homogeneizados de novo. Para separar as fases, as amostras foram centrifugadas a 2000xg durante 2 minutos. Com ajuda de seringa hipodérmica foram retirados cerca de 10 – 15 ml de clorofórmio, colocados em um tubo novo e 1 g de Na₂SO₄ anidro. Após agitação, a amostra foi filtrada com papel quantitativo. Do recuperado foram tomados 5 ml e colocados em um tubo previamente tarado. Os tubos foram colocados em estufa a 80 °C até evaporar o solvente e obter peso constante. A concentração de lipídeos foi calculada com a equação 2. Onde *p* é o peso de lipídeos obtidos nos 5 ml de amostra, e *g* é o peso original da amostra.

$$\text{Lipídeos \%} = \frac{p \times 4}{g} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

3.2.5 Detecção qualitativa de pigmentos

Para detectar os pigmentos presentes no concentrado protéico e as outras frações, foram realizados espectros de absorbância na faixa de 230 a 750 com um espectrofotômetro de varredura.

3.2.6 SDS-PAGE

Para a determinação de pesos moleculares das proteínas presentes no concentrado foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE de acordo com LAEMMLI, (1970). As amostras em concentração de 20 mg/ml foram preparadas em condições redutoras com β-mercaptoetanol (β-ME), utilizando concentração de 15% para o gel de separação. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Broad Range Protein Molecular Marker V849A*. A eletroforese foi realizada a 200 V por 5 h. O gel foi corado com a solução *Coomassie Brilliant Blue R-250* por 12 h e descorado com uma solução de ácido acético glacial e metanol.

3.3 PROCESSOS PARA EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

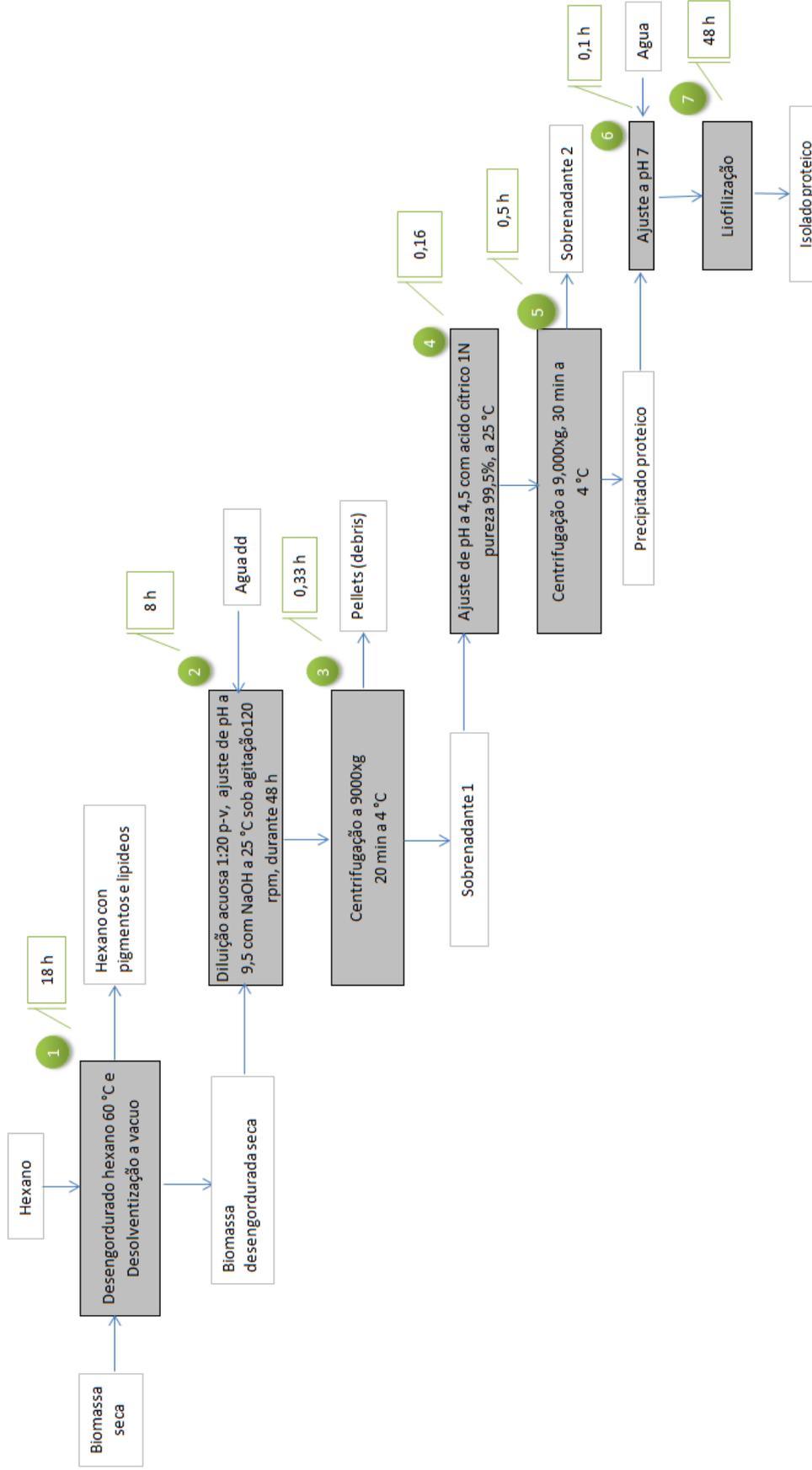
Foram selecionados três processos, baseados em métodos clássicos de extração. Foram selecionados de acordo a sua simplicidade, rendimento ou por terem sido utilizados com Spirulina. A restrição de serem métodos simples foi colocada para abrir a possibilidade de escalonamento e a factibilidade econômica.

3.3.1 Processo 1. Extração e concentração de proteínas de soja

Foi utilizado como referência a metodologia indicada no trabalho de VASCONCELLOS (2014), nesse trabalho foi otimizado um processo para obter um isolado protéico a partir de farinha desengordurada de soja, para ser fracionado e hidrolisado e posteriormente avaliado em formulações para fitocosméticos (VASCONCELLOS, 2014). Foram feitas algumas adaptações para ser utilizado com Spirulina.

A biomassa seca de Spirulina foi previamente pulverizada em almofariz e depois desengordurada. Para o desengorduramento (extração de lipídeos) utilizou-se hexano na proporção 1:20 v-v, durante 12 horas a 60 °C e posteriormente foi dessolventizada em estufa ao vácuo a 60 °C durante mais 6 horas. A biomassa desengordurada seca foi suspensa em água destilada em proporção 1:20 e o pH ajustado a 9,5 com NaOH 1N. Posteriormente mantida sob agitação a 120 rpm durante 8 horas. Na metodologia original a agitação tinha que ser mantida durante 48 horas, mas no caso da Spirulina foi ajustado para 8 horas. O extrato foi centrifugado 20 minutos a 9,000xg e 4°C. O sobrenadante foi separado e ajustado a pH 4,5 com ácido cítrico 1N sob agitação durante 10 minutos. Após a precipitação a suspensão foi centrifugada por 30 minutos a 9,000xg e 4°C, o sobrenadante da precipitação foi coletado (Sobrenadante 2) e o concentrado protéico foi ressuspenso em água destilada e ajustado a pH 7 com NaOH 0,01 N, congelado a -80°C e submetido a secagem por liofilização. A metodologia original incluía uma etapa de diálise, neste trabalho foi omitida. Na FIGURA 15 se apresenta um diagrama de fluxo do processo, donde se indicam as etapas e o tempo aproximado invertido em cada uma destas.

FIGURA 15. PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS 1



3.3.2 Processo 2. Extração a partir de biomassa de Spirulina sem desengordurar

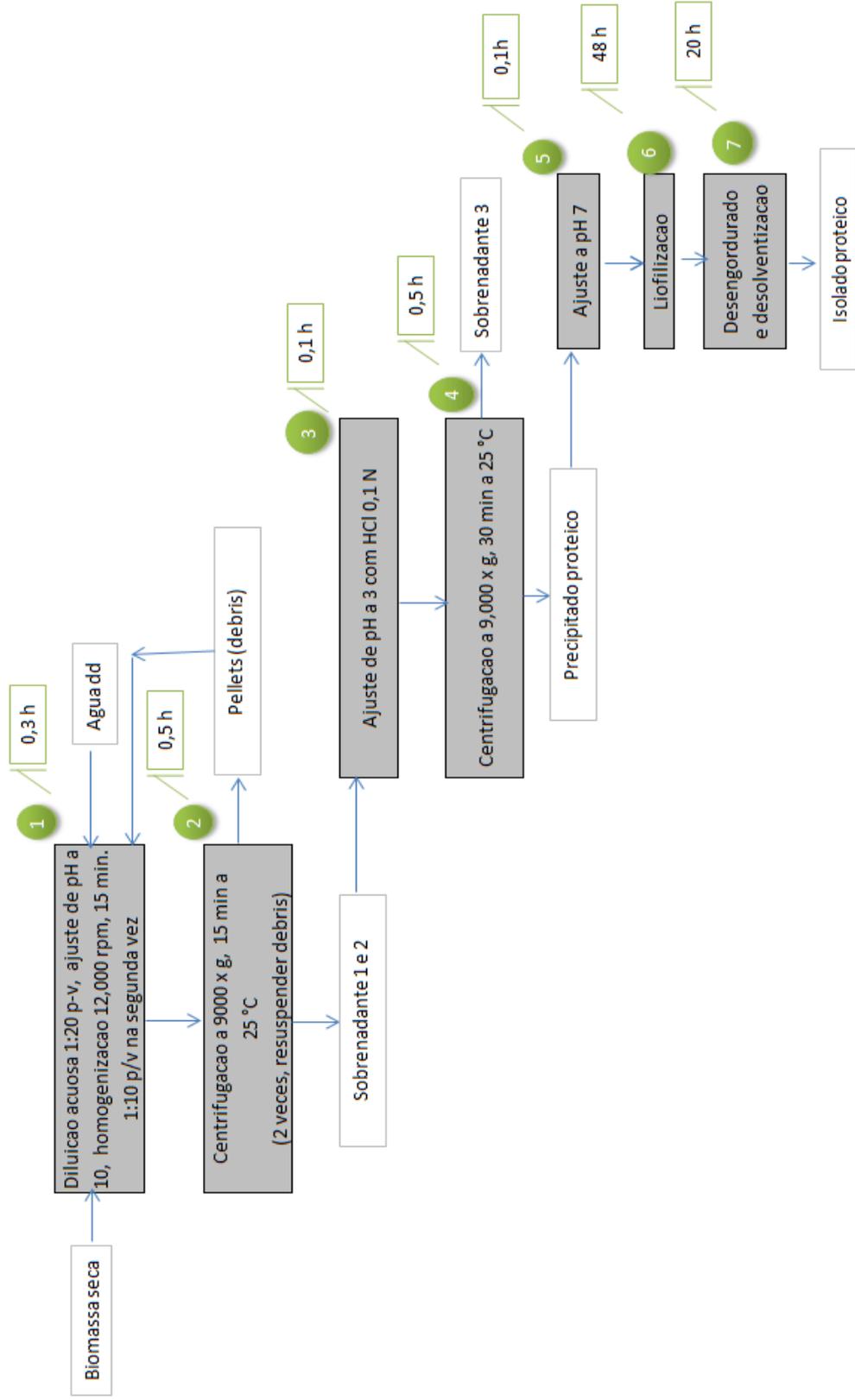
O segundo processo avaliado está baseado nos trabalhos de CHRONAKIS (2000, 2001), onde se propõe um processo de extração de proteínas com o objetivo de estudar as propriedades funcionais e nutricionais de proteínas de *S. platensis* (*Pacifica*), para serem utilizadas em sistemas alimentícios (CHRONAKIS 2001; CHRONAKIS *et al.*, 2000a).

A biomassa seca e pulverizada de Spirulina sem desengordurar foi suspensa em água destilada em proporção 1:20 e o pH ajustado a 10 com NaOH 1N. Seguidamente homogeneizada a 12,000 rpm durante 15 minutos. O extrato posteriormente foi centrifugado 30 minutos a 9,000xg e 25°C. O sobrenadante foi coletado e a biomassa residual (*pellets*) foi novamente resuspendida na proporção 1:10 a pH 10, homogeneizada e centrifugada nas condições do primeiro ciclo.

Os dois sobrenadantes obtidos foram misturados (sobrenadantes 1 e 2) e a solução resultante foi ajustada a pH 3 com HCl 1 N, sob agitação. Após a precipitação a suspensão foi centrifugada por 30 minutos a 9,000xg e 25°C, o concentrado protéico foi ressuspenso em água destilada e ajustado a pH 7 com NaOH 0,01 N e submetido a secagem por liofilização. A metodologia original incluía uma etapa de diálise, neste trabalho foi omitida. Foram coletados os sobrenadantes das últimas duas centrifugações (Sobrenadantes 4 e 5).

O concentrado protéico foi desengorduramento com hexano a 5°C em três ciclos de 5 horas e posteriormente dessolventizado por mais 5 horas a vácuo. Na FIGURA 16 se apresenta um diagrama de fluxo do processo, onde se indicam as etapas principais e o tempo aproximado investido em cada uma delas.

FIGURA 16. PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS 2



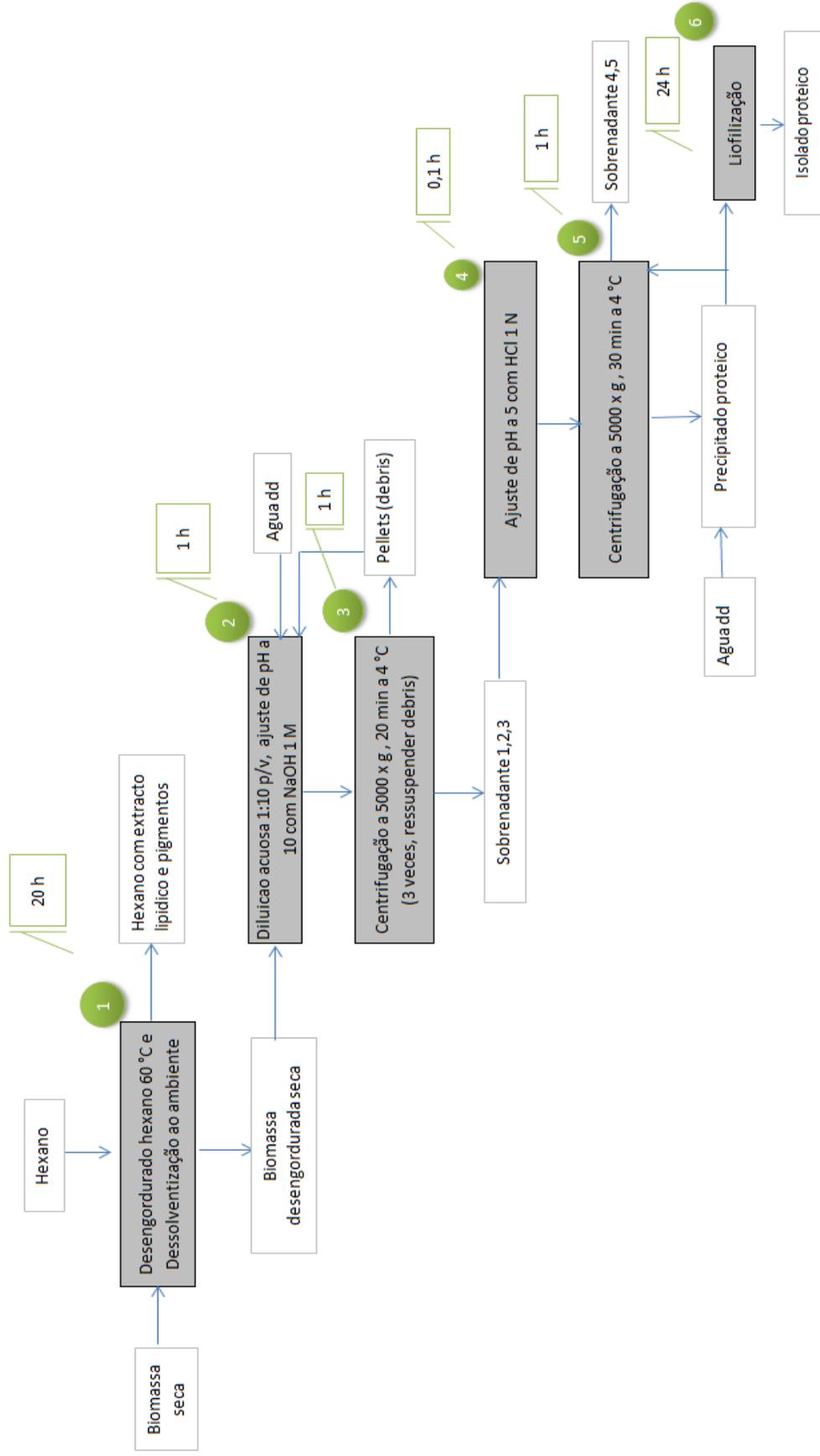
3.3.3 Processo 3. Extração com biomassa desengordurada

A terceira avaliação foi feita no processo baseado no trabalho de LETELIER (2009). Nesse trabalho foi realizado um processo de extração proteica baseado na metodologia de BETSCHART E SAUNDERS (1978) para extração de proteínas de *Carthamus* (LETELIER, 2009; BETSCHART & SAUNDERS, 1978), com o isolado obtido Letelier estudo as características funcionais e modificações químicas de proteínas extraídas de *S. maxima* para ser utilizada em sistemas alimentícios..

A primeira etapa deste processo, a igual à do processo 1, é o desengorduramento. A biomassa seca de *Spirulina* foi previamente pulverizada. Para desengorduramento utilizou-se hexano na proporção 1:20 v-v, durante 12 horas a 60 °C. Após o desengorduramento a biomassa foi dessolventizada ao ambiente por 8 horas. A biomassa desengordurada seca foi suspensa em água destilada 1:10 e o pH ajustado a 10 com NaOH 1N. A suspensão foi agitada durante uma hora a 240 rpm. Posteriormente foi centrifugado 20 minutos a 5,000xg e 4 °C em centrífuga refrigerada Himac CR21E. O sobrenadante foi separado e os *pellets* (biomassa residual) foram suspensos a pH 10 por mais duas vezes. Os três sobrenadantes foram misturados (Sobrenadantes 1,2 e 3), a solução resultante foi ajustada a pH 5 com HCl 1 N, sob agitação manual. Após a precipitação, a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 5,000 x g e 4 °C, o concentrado protéico foi lavado com água destilada, centrifugado novamente e secado por liofilização. Foram coletados os sobrenadantes das duas centrifugações (Sobrenadantes 4 e 5). Na FIGURA 17 se apresenta um diagrama de fluxo deste processo.

Para testar cada um dos processos foram utilizados 5 gramas de biomassa de *S. Maxima*. Foram realizadas duas corridas de cada processo e as amostras foram avaliadas em triplicata. Para estimar o balanço de massas, foi determinada a concentração de proteínas, carboidratos e lipídeos, na biomassa e nas frações recuperadas.

FIGURA 17. PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS 3



3.3.4 Desengorduramento de Spirulina com etanol

Para o processo de desengorduramento pode se utilizar alternativamente etanol como solvente extrator, segundo o processo proposto por CHAIKLAHAN (2008) para extração de lipídeos e ácidos graxos de Spirulina (CHAIKLAHAN *et al.*, 2008).

A biomassa de Spirulina foi suspensa em etanol 99,5% em proporção biomassa solvente de 1:5 a 60 °C durante 20 minutos sob agitação (120 rpm), seguidamente a biomassa foi recuperada com papel filtro quantitativo e suspensa de novo em etanol por mais dois ciclos.

3.4 HIDRÓLISE DE PROTEINAS

Foi preparada uma solução de 20 mg/ml de concentrado protéico e depois desnaturado por tratamento térmico a 90 °C durante 5 minutos, para facilitar a hidrólise (PENA RAMOS & XIONG, 2002). Depois de esfriar a solução foi dissolvida 1:1 em tampão fosfato (0,1 M, pH 8) e hidrolisada com tripsina em proporção enzima substrato 1:100, durante 4 horas a 37 °C, sob agitação. O pH foi subseqüentemente ajustado para 2 com HCl 0,1 M, o material foi digerido com pepsina em proporção 1:100 durante mais 4 horas a 37 °C, sob agitação. A reação foi interrompida por neutralização e ebulição em banho durante 10 minutos.

3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Para avaliar o potencial do concentrado protéico, dos coprodutos e do hidrolisado, para ser utilizado em aplicações nutracêuticas, farmacêuticas e cosmecêuticas, foram realizados testes preliminares para detectar atividade antimicrobiana e atividade antioxidante. Estas duas propriedades foram selecionadas como triagem inicial e também para determinar se o processo de extração não teve algum efeito negativo com as propriedades biológicas do material.

3.5.1 Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, técnica de poço

Foi utilizado como referência a metodologia descrita por Sigfrido *et al.* (2009) Foram utilizadas bactérias do banco de cepas do LEBB⁹, duas gram negativas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e uma gram positiva, *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028). As bactérias foram reativadas em caldo *BHI* (Infusão cérebro coração) durante 48 h a 37 °C e em condições de aerobiose. Prepararam-se placas petri com ágar Mueller Hilton e fizeram-se poços de aproximadamente 6 mm.

Os cultivos bacterianos foram diluídos com solução salina estéril (0,85% NaCl) até atingir turbidez equivalente a 0,5 da escala de *MacFarland*, e inoculados nas superfícies do ágar com ajuda de um *swab* estéril. As placas foram deixadas em temperatura ambiente durante 3 minutos. Dispensou-se em cada poço 50 µl dos controles e das amostras testadas, na TABELA 5 se apresentam as concentrações testadas. Como controle positivo foi utilizado ciprofloxacina 100 µl/ml e como controle negativo tampão fosfato pH 7, que também foi o solvente utilizado para diluir as amostras. Os testes foram realizados em triplicata.

TABELA 5. CONCENTRAÇÕES E AMOSTRAS PARA TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Amostra	Concentração (µg/µl)
Concentrados proteicos	5, 50,100
Sobrenadante da precipitacao isoeletrica	0,3
Extrato etanólico	2,5
Hidrolisado protéico	10, 50, 100,1000

FONTE: O AUTOR (2015)

3.5.2 Atividade antioxidante, método ABTS

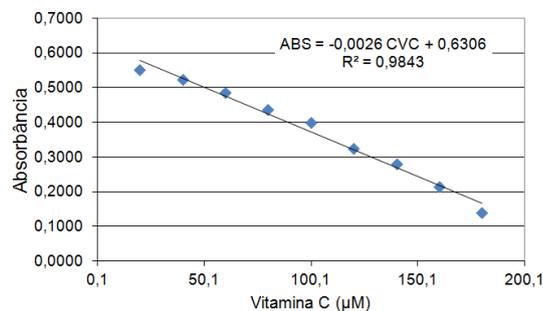
No método do radical ABTS a reação entre o radical e o persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) é monitorada com a perda da coloração azul esverdeada à medida que reage com os antioxidantes do meio. A metodologia foi baseada no trabalho de ZHU *et al.* (2011) e RUFINO *et al.* (2007b). O radical ABTS foi preparado através da reação de 5 ml de solução de ABTS (7 mM) com 88 µl do persulfato de potássio (140mM). A

⁹ Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR

solução foi mantida no escuro por 12-16 h a temperatura ambiente e posteriormente diluída em etanol até obter absorvância 0,6-0,7 em 734 nm.

A curva padrão foi construída utilizando soluções de Vitamina C entre 20-200 μM , para isto numa placa de 96 poços foram adicionados 200 μl da solução de ABTS e 50 μl de Vitamina C. A leitura foi realizada após 6 min de incubação a temperatura ambiente. As amostras foram tratadas da mesma forma que as soluções padrão (FIGURA 18).

FIGURA 18. CURVA PADRÃO DA VITAMINA C FRENTE AO RADICAL ABTS



FONTE: O AUTOR (2015)

As amostras testadas foram o concentrado protéico obtido no processo 4, utilizando biomassa desengordurada e sem desengordurar, nas concentrações na faixa de 2 a 5 mg/ml. Também foi testada a capacidade antioxidante dos hidrolisados derivados desses mesmos concentrados protéicos nas concentrações de 4 a 8 mg/ml. A percentagem de inibição foi calculada a partir das absorvâncias das amostras respeito a absorvância do controle antes e depois da reação. A concentração de amostra capaz de inibir até 50% a reação de oxidação foi calculada graficamente a partir dos valores de inibição *versus* as concentrações das amostras. Finalmente a capacidade antioxidante equivalente a Vitamina C foi determinada em μmol Vitamina C/g de amostra para o valor IC_{50} .

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão de triplicatas. As diferenças foram analisadas usando ANOVA seguido pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$ como significativos. A análises foram realizadas com o aplicativo Action para Excel versão 3.0.2. e com o software Statistica 7.1 Statsoft, Tulsa, USA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOMASSA DE SPIRULINA

A Spirulina proporcionada por *Ourofino Agronegócios* e as Spirulinas cultivadas exibiram a composição proximal indicada na TABELA 6.

TABELA 6. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS BIOMASSAS DE SPIRULINA (% p/p seco)

Amostra	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídeos (%)
<i>S. Platensis</i> (LB-52 /SAG 257.80)	47,24 ± 1,16 ^a	13,13 ± 1,17 ^a	9,32 ± 0,45 ^a
<i>S. maxima</i> (SAG 84.79)	50,10 ± 0,94 ^b	12,79 ± 0,77 ^a	7,57 ± 1,37 ^{ab}
<i>S. maxima</i> (OF) ¹⁰	56,43 ± 2,07 ^c	11,04 ± 1,49 ^a	6,16 ± 1,02 ^c

Valores correspondem a média e desvio padrão de triplicatas, valores na coluna com letras diferentes correspondem a diferença significativa segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). FONTE: O AUTOR (2015)

As concentrações de proteínas, carboidratos e lipídeos estão dentro do intervalo esperado para esta cianobactéria cultivada em condições semelhantes. A literatura reporta dados de composição para a Spirulina de entre 42 - 70% p/p para as proteínas, entre 14 -20% p/p para os carboidratos, e entre 4 -13% para os lipídeos (SYDNEY *et al.*, 2010; HABIB B., 2008; BECKER, 2007; FONTES *et al.*, 2008; MARCONI *et al.*, 2003).

As condições de cultivo da *S. platensis* e a *S. maxima* a escala do laboratório foram às mesmas, porém as cepas são diferentes e o fato de que a *S. maxima* apresentou maior quantidade de proteína com respeito a *S. platensis* concorda com o reportado na literatura (MARCONI *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 1999; BECKER, 2007).

A biomassa da *S. maxima* proporcionada por Ourofino Agronegócios foi selecionada para utilizar como matéria-prima para todos os testes de extração e concentração, pois exibiu uma quantidade maior de proteínas.

¹⁰ As siglas OF foram incluídas na identificação da amostra e indica sua origem (Ourofino Agronegócios), mas não faz parte da identificação da cepa.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para configurar ou selecionar um processo de extração e concentração de proteínas de *Spirulina* que proporcionasse elevado rendimento e pureza, foram avaliados os processos indicados na secção 3.3.

4.2.1 Processo 1: Processo de extração de proteínas de soja modificado

Este processo está configurado com sete etapas: 1) desengorduramento e dessolventização, 2) extração e solubilização de proteínas, 3) separação de *debris* (biomassa residual), 4) precipitação isoelétrica, 5) recuperação de proteínas, 6) neutralização e 7) secagem por liofilização; na FIGURA 15 da secção 3.3.1 pode se observar o fluxo que percorre este processo.

O propósito principal de ter incluso este processo, foi avaliar o desempenho do modelo baseado na obtenção de isolados protéicos de soja, que têm sido eficiente na indústria de suplementos alimentícios a base de soja (ALFA-LAVAL, 1990). Além disso, foi de interesse testar a utilização do ácido cítrico na etapa de precipitação que propõe este processo. A extração é realizada a pH 9,5 e a precipitação isoelétrica a pH 4,5.

Para avaliar este processo foram processadas 5 g de *S. maxima* (OF), obtendo-se 1,93 g de concentrado protéico com 85,42% de proteínas, 5,21% de carboidratos e 1,03% de lipídeos. Na TABELA 7 se apresenta o balanço de massas.

Este processo proporcionou um rendimento de obtenção de proteína de 57,8% com relação à quantidade de biomassa seca, e 59,7% com relação à biomassa desengordurada.

No trabalho de VASCONCELLOS (2014) este processo foi testado com farinha desengordurada de soja e obteve um rendimento de 83,9%, partindo de uma farinha com 46% de proteína. Cabe mencionar que a farinha desengodurada de soja é um material consideravelmente diferente da biomassa de *Spirulina*, pois têm uma estrutura celular diferente.

TABELA 7 BALANÇO DE MASSAS PROCESSO 1

Correntes	Quantidade		Composição					
	Volume (ml)	Peso (g)	Proteínas (g)	%	Carboidratos (g)	%	Lipídeos (g)	%
Biomassa S.Máxima		5,01 ± 0,01	2,83 ± 0,01	56,43	0,55 ± 0,01	11,04	0,31 ± 0,01	6,16
Biomassa desengordurada		4,28 ± 0,06	2,73 ± 0,02	62,72	0,22 ± 0,02	5,14	0,10 ± 0,04	2,34
Sobrenadante 1	92 ± 2,83		1,91 ± 0,04		0,17 ± 0,02			
Biomassa residual (debris)		2,08 ± 0,11	0,83 ± 0,03	39,90	0,04 ± 0,01	1,92	0,08 ± 0,01	3,85
Sobrenadante 2	89 ± 0,71		0,25 ± 0,08		0,07 ± 0,03			
Concentrado protéico		1,92 ± 0,01	1,63 ± 0,01	85,06	0,10 ± 0,01	5,21	0,02 ± 0,001	1,03

Rendimento de proteína 57,8%

FONTE: O AUTOR (2015)

A principal adaptação realizada para este processo, com respeito ao referido no trabalho de Vasconcellos, foi a redução do tempo de extração e solubilização proteica de 48 para 8 horas, esta variação foi implementada pelo fato de ter observado decomposição da biomassa de *Spirulina* durante o tempo de agitação, mediante percepção organoléptica. Esta diminuição de tempo de agitação pode ter influenciado no rendimento. Porém, no trabalho de ANASUYA (1,981) com proteínas de *S. platensis*, reporta se que na primeira etapa de extração proteica pode-se obter só até um 65% do nitrogênio extraível. Na TABELA 8 pode se observar o tempo que foi contabilizado para executar cada etapa do processo.

TABELA 8. TEMPOS DAS ETAPAS DO PROCESSO 1

Etapa	Processo	Tempo (h)
1	Desengorduramento e dessolventização	18
2	Extração e solubilização de proteínas	8
3	Separação de <i>debris</i>	0,33
4	Precipitação isoelétrica	0,16
5	Recuperação de proteínas	0,5
6	Neutralização	0,1
7	Liofilização	48
Total horas		75,1

FONTE: O AUTOR (2015)

4.2.2 Processo 2: Extração a partir de biomassa de *Spirulina* sem desengordurar

Este processo está configurado com sete etapas principais: 1) extração e solubilização de proteínas, 2) separação de *debris* (biomassa residual), 3) precipitação isoelétrica, 4) recuperação de proteínas, 5) neutralização, 6) secagem por liofilização, e 7) desengorduramento e dessolventização; na FIGURA 16 da seção 3.3.2 pode se observar o diagrama de fluxo deste processo.

Este processo tem o diferencial de iniciar a extração e solubilização de proteínas, sem desengordurar a biomassa, porém propõe extrair os lipídeos ao final. A extração é realizada a pH 10 e a precipitação isoelétrica a pH 3.

Para avaliar o rendimento deste processo também foram processadas 5 g de biomassa seca de *S. maxima* com obtendo-se 2,24 g de concentrado protéico, com uma composição de 87,2% de proteínas, 5,77% de carboidratos e 1,74% de lipídeos. Na TABELA 9 se apresenta o balanço de massas obtido para este processo.

TABELA 9. BALANÇO DE MASSAS PROCESSO 2

Correntes	Quantidade		Composição							
	Volume (ml)	Peso (g)	Proteínas (g)	%	Carboidratos (g)	%	Lipídeos (g)	%		
Biomassa		5,12 ± 0,01	2,89 ± 0,01	56,43	0,57 ± 0,01	11,04	0,32 ± 0,01	6,16		
Sobrenadantes 1 e 2	146 ± 0,71		2,54 ± 0,02		0,44 ± 0,03					
Biomassa residual (<i>debris</i>)		2,40 ± 0,06	0,33 ± 0,01	13,8	0,11 ± 0,01	4,42	0,20 ± 0,01	8,33		
Sobrenadante 3	138 ± 2,12		0,27 ± 0,03		0,27 ± 0,02					
Concentrado protéico		2,57 ± 0,03	2,24 ± 0,01	87,2	0,15 ± 0,01	5,77	0,04 ± 0,02	1,74		
Rendimento de proteína 77,5%										

FONTE: O AUTOR (2015)

Este processo proporcionou um rendimento de obtenção de proteína de 77,5%, com relação à quantidade de biomassa seca. O trabalho de CHRONAKIS (2000b) não reporta o rendimento do processo, porém indica que pode se obter um concentrado de não menos de 79% em proteínas. Esperava-se neste processo obter um rendimento maior em relação ao primeiro pelo fato de ter dois ciclos de extração e solubilização de proteínas.

Na TABELA 10 pode se observar o tempo que foi contabilizado para executar o processo. As etapas que apresentariam oportunidade de melhora em relação ao tempo e custos são: a secagem e o desengorduramento. A extração e solubilização de proteínas é realizada num tempo menor em relação ao processo 1 pois utiliza-se um homogeneizador a alta velocidade para promover a lise celular e agilizar a extração.

TABELA 10. TEMPOS DAS ETAPAS DO PROCESSO 2

Etapa	Processo	Tempo (h)
1	Extração e solubilização de proteínas	0,3
2	Separação <i>debris</i>	0,5
3	Precipitação isoelétrica	0,1
4	Recuperação proteínas	0,5
5	Neutralização	0,1
6	Secagem por liofilização	48
7	Desengorduramento e dessolventização	20
Total em horas		69,5
Total em dias		2,9

FONTE: O AUTOR (2015)

4.2.3 Processo 3: Extração a partir de biomassa de *Spirulina* desengordurada

Este processo está configurado com seis etapas: 1) desengorduramento e dessolventização, 2) extração e solubilização de proteínas, 3) separação de *debris*, 4) precipitação isoelétrica, 5) recuperação de proteínas e 6) secagem por liofilização; na FIGURA 17 da secção 3.3.3 pode se observar o diagrama de fluxo deste processo.

Neste processo, como no processo 1, a biomassa é previamente desengordurada. LETELIER (2009) testou este processo com *S. maxima*. A extração é realizada a pH 10 e a precipitação isoelétrica a pH 5. Este processo não inclui a neutralização das proteínas recuperadas, com o que se obtém um concentrado isoelétrico não solúvel. Isto pode representar uma vantagem quando o produto do processo final não requer a solubilização, por exemplo na forma de concentrado isoelétrico.

O rendimento deste processo partindo de 5 g de biomassa seca de *S. maxima* foi de 73,8% com relação à quantidade de biomassa seca. Obtiveram-se 2,12 g de concentrado protéico com uma composição de 85,5% de proteínas, 4,18% de

carboidratos e 2,02% de lipídeos. Na TABELA 11 se apresenta o balanço de massas obtido para este processo. E na TABELA 12 o tempo de execução.

TABELA 11. BALANÇO DE MASSAS PROCESSO 3

Correntes	Quantidade		Composição					
	Volume (ml)	Peso (g)	Proteínas (g)	%	Carboidratos (g)	%	Lipídeos (g)	%
Biomassa		5,09 ± 0,01	2,87 ± 0,01	56,43	0,56 ± 0,01	11,04	0,31 ± 0,01	6,16
Biomassa desengordurada		4,59 ± 0,04	2,82 ± 0,01	61,44	0,31 ± 0,06	6,75	0,12 ± 0,02	2,63
Sobrenadantes 1, 2 e 3	137 ± 5		2,55 ± 0,04		0,17 ± 0,05			
Biomassa residual (debris)		1,95 ± 0,03	0,27	13,85	0,08 ± 0,03	4,10	0,07 ± 0,01	3,58
Sobrenadante 4,5	128 ± 2,8		0,29 ± 0,01		0,09 ± 0,04			
Concentrado protéico		2,48 ± 0,01	2,12 ± 0,04	85,48	0,10 ± 0,02	4,18	0,05 ± 0,01	2,02
Rendimento de proteína 73,8%								

FONTE: O AUTOR (2015)

TABELA 12. TEMPO DAS ETAPAS DO PROCESSO 3

Etapa	Processo	Tempo (h)
1	Desengorduramento e dessorventização	20
2	Extração e solubilização de proteínas	3
3	Centrifugação <i>debris</i>	1
4	Precipitação isoelétrica	0,1
5	Separação proteínas	1
6	Liofilização	48
Total em horas		73
Total em dias		3,0

FONTE: O AUTOR (2015)

Neste processo a extração de proteína, assim como no processo 1 é realizado só com agitação a baixa velocidade e o agente redutor, requerendo tempos maiores do que o processo 2, porém é menor do que o processo 1 por utilizar três ciclos de extração.

4.3 ESTUDOS DA SOLUBILIDADE E RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.3.1 Solubilização de proteínas

Os processos de extração e concentração proteica que foram avaliados na secção 4.2, proporcionaram diferentes rendimentos, os três processos são baseados no mesmo princípio (extração, solubilização e precipitação), porém propõem diferentes condições de pH na etapa de extração e na de precipitação isoeétrica. Como é sabido que as proteínas exibem diferente solubilidade em determinadas condições físico-químicas (NELSON & COX, 2005), foram realizadas testes de solubilização e precipitação a diferentes pH, incluindo os valores propostos nos processos 1,2 e 3, para avaliar o comportamento do sistema de proteínas de *Spirulina*.

As extrações foram realizadas com 5 g de biomassa de *S. maxima* desengordurada (61,4% de proteínas - 30,71 mg/ml) nas condições do processo 2, mas a diferentes pH dentro do intervalo 7 – 11. Foram escolhidas as condições do processo 2, levando em conta que exibiu maior rendimento.

Após a separação dos *debris* por centrifugação a 9000xg a 4°C, foi determinada a concentração de proteína nos sobrenadantes. A variável de resposta foi expressa como a percentagem de extração proteica¹¹. Na TABELA 13 podem se observar os dados obtidos destes testes, e na FIGURA 19 o comportamento apresentado.

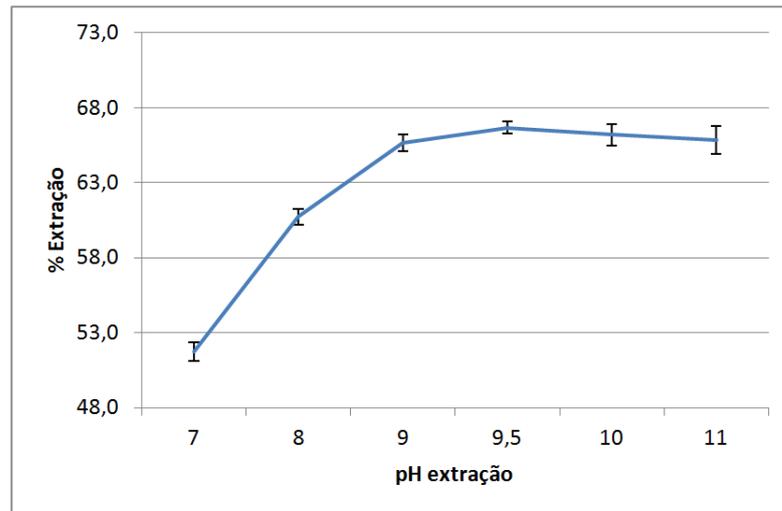
TABELA 13. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SPIRULINA A DIFERENTES pH

pH	Concentração de proteínas no sobrenadante (mg/mL)	% Extração
7	15,88 ±0,019	51,71 ^a ±0,62
8	18,65 ±0,016	60,71 ^b ±0,51
9	20,17 ±0,017	65,66 ^b ±0,53
9,5	20,48 ±0,012	66,68 ^b ±0,41
10	20,33 ±0,022	66,20 ^b ±0,72
11	20,24 ±0,029	65,86 ^b ±0,93

Valores correspondem a media e desvio padrão de triplicatas, valores na coluna com letras diferentes correspondem a diferença significativa pelo teste de Tukey (p< 0,05). FONTE: O AUTOR (2015)

¹¹ Relação entre a quantidade de proteína solubilizada/quantidade proteína na biomassa.

FIGURA 19. PERCENTAGEM DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS A DIFERENTES pH



FONTE: O AUTOR (2015)

Pode se observar que as proteínas de *Spirulina* foram extraídas e solubilizadas ao redor de 66% com os tratamentos de pH 9, 9,5, 10 e 11. Porém não há diferença significativa entre eles.

A literatura referente à tecnologia da soja relata que a proteína pode ser extraída em maior quantidade em condições altamente alcalinas (BERK, 1992). No entanto, pode se obter extratos indesejáveis além das modificações químicas que podem sofrer as proteínas nestas condições (desnaturação e alterações químicas nos aminoácidos). Os pH altos também favorecem a interação proteína carboidratos (reação de *Maillard*), que provoca formação de pigmentos escuros e perda do valor nutritivo (COGAN *et al.*, 1967). Por tanto é conveniente utilizar um pH intermediário que proporcione uma boa extração sem danificar os produtos, 9,5 por exemplo.

4.3.2 Recuperação de proteínas a diferentes pH

Para estudar a recuperação que poderia se obter na de precipitação foram realizados testes a diferentes pH. Para isto foi utilizado o sobrenadante da extração a pH 9,5 e ajustado o pH a valores entre 6 e 1. As precipitações foram realizadas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e sob agitação manual. As soluções precipitadas foram centrifugadas a 9000xg a 4°C e posteriormente foi determinada a quantidade de proteína residual no sobrenadante. A percentagem de recuperação de proteína foi calculada a partir da diferença entre a proteína na solução de extração inicial e a proteína residual no sobrenadante após a centrifugação. Foram incluídos tratamentos

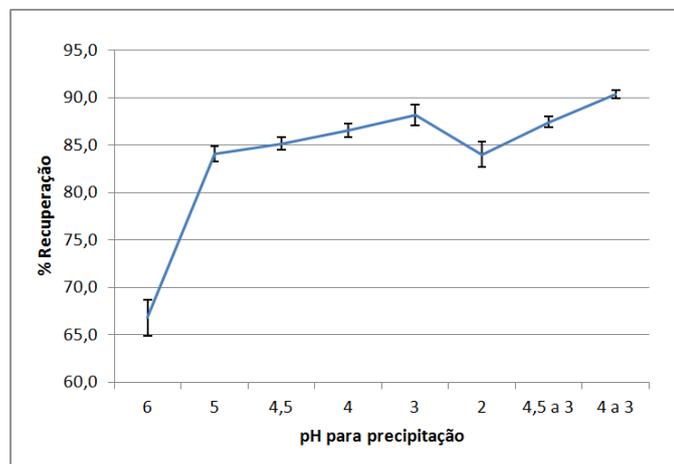
com dois ciclos de precipitação, aplicado para os sobrenadantes da recuperação a pH 4 e 4,5, em ambos casos o segundo ciclo o pH foi ajustado para 3, isto na tentativa de recuperar as proteínas que ainda permanecem solúveis. Na TABELA 14 pode se observar os dados obtidos, e na FIGURA 20 o comportamento.

TABELA 14. RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS POR PRECIPITAÇÃO ISOELÉTRICA TRATAMENTOS A DIFERENTES PH

pH	Concentração (mg/mL)	% Recuperação
6	6,83 ±0,41	66,79 ±1,75
5	3,28 ±0,19	84,06 ±0,71
4,5	3,06 ±0,16	85,13 ±0,60
4	2,76 ±0,17	86,59 ±0,65
3	2,44 ±0,24	88,17 ±0,98
2	3,30 ±0,29	83,99 ±1,21
4,5 a 3*	2,59 ±0,15	87,44 ±0,54
4 a 3*	1,99 ±0,11	90,35 ±0,42

*Dois valores de pH correspondem a precipitação em dois ciclos
 FONTE: O AUTOR (2015)

FIGURA 20. COMPORTAMENTO DO % DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS A DIFERENTES pH



FONTE: O AUTOR (2015)

Pode se observar que para valores de pH abaixo de 5 se obtém uma percentagem de recuperação acima de 85%. A análise de variância excluindo as amostras da precipitação a pH 6 e 2 indicou que há diferença significativa entre as amostras precipitadas a diferente pH (TABELA 15). O comparativo entre tratamentos indica que há diferença significativa entre amostras que foram submetidas a dois ciclos de precipitação *versus* as amostras precipitadas a pH 3 (TABELA 16).

TABELA 15. ANOVA DOS TRATAMENTOS DA PRECIPITAÇÃO ISOELÉTRICA EM DIFERENTES pH.

	G.L.	Soma de quadrados	Quadrado médio	Estat. F	P-valor
Fatores	5	75,1713	15,0342	33,33	1,2E-06
Resíduos	12	5,4124	0,4510		

FONTE: O AUTOR (2015)

TABELA 16. VALORES DE SIGNIFICANCIA PARA O TESTE DE TUKEY DA PRECIPITAÇÃO

Níveis (pH)	Centro	Limite.Inferior	Limite.Superior	P-valor
4 vrs 3	-1,58	-3,42	0,26	0,1097
4.5 vrs 3	-3,04	-4,88	-1,19	0,0014
4.5 e 3 vrs 3	-0,73	-2,57	1,11	0,7614
5 vrs 3	-4,11	-5,95	-2,27	0,0001
4 e 3 vrs 3	2,18	0,34	4,02	0,0177
4.5 vrs 4	-1,46	-3,30	0,39	0,1564
4.5 e 3 vrs 4	0,85	-0,99	2,69	0,6444
5 vrs 4	-2,53	-4,37	-0,69	0,0061
4 e 3 vrs 4	3,76	1,92	5,60	0,0002
4.5 e 3 vrs 4.5	2,30	0,46	4,15	0,0121
5 vrs 4.5	-1,07	-2,91	0,77	0,4175
4 e 3 vrs 4.5	5,22	3,37	7,06	0,0000
5 vrs 4.5 e 3	-3,38	-5,22	-1,54	0,0005
4 e 3 vrs 4.5 e 3	2,91	1,07	4,75	0,0020
4 e 3 vrs 5	6,29	4,45	8,13	0,0000

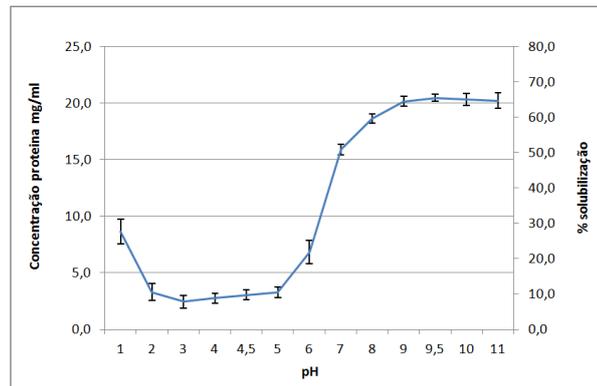
Valores de significância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). FONTE: O AUTOR (2015)

Considerando estes resultados, a precipitação isoelétrica em dois ciclos é uma opção que pode proporcionar maior recuperação. No entanto, se o custo energético ou de equipamentos não compensa duas centrifugações, sugere-se realizar um só ciclo de precipitação a pH 3.

4.3.3 Curva de solubilidade

Com os dados dos testes de solubilização e precipitação construiu-se a curva de solubilidade para as proteínas de *Spirulina máxima*. A curva esta expressada em termos da concentração de proteínas, no eixo auxiliar pode se ler % de extração – solubilização (FIGURA 21).

Esta curva de solubilidade é semelhante à obtida no trabalho de Anusuya (1981), que foi construída utilizando a percentagem de nitrogênio extraído em proteínas de *S. platensis*. Na curva de Anusuya o ponto de máxima solubilidade acontece no pH 8 e da mínima em pH 3.

FIGURA 21. CURVA DE SOLUBILIDADE PARA PROTEÍNAS DE *S. MAXIMA*

FONTE: O AUTOR (2015)

A semelhança da solubilidade para o sistema de proteínas de *S. platensis* e *S. maxima* pode ser atribuída a semelhanças filogenéticas entre as duas espécies. No trabalho de CHOI (2012), diferentes cepas de *S. maxima* e de *S. platensis* apresentaram relação filogenética de pelo menos 70% (CHOI *et al.*, 2012). Por outro lado, em estudos proteômicos de WANG (2013) foi encontrado menos de 50% de semelhança significativa entre as proteínas expressadas em *S. platensis* e em *S. maxima*, neste caso é preciso levar em conta que estes proteômas foram estudados sob condições específicas (WANG *et al.*, 2013).

Ao comparar os valores de solubilidade da *S. maxima* deste estudo com proteínas de origem vegetal (soja, feijão, ervilha, lentilha, etc.) e se percebe a semelhança no comportamento de máxima solubilidade a pH altamente alcalinos ou ácidos, e a mínima solubilidade perto dos ponto isoelétricos. Proteínas de leguminosas têm pontos isoelétricos entre pH 4 e 6. As proteínas de grão de bico apresentam solubilidade de 79% a pH 2 e de 94% a pH 9,5, as albuminas de lentilhas 95% de solubilidade a pH 7,8 e 77% a pH 1,8, e assim por diante (BOYE *et al.*, 2010). Isto indica que a tendência de solubilidade é parecida, mas os valores pontuais são particulares para cada espécie. Além disso a solubilidade das proteínas depende das condições físico-químicas do sistema: solvente, a temperatura, a concentração de sais, ou outros compostos presentes no meio, etc. (NELSON & COX, 2005).

Por isto é sempre oportuno determinar experimentalmente o comportamento das proteínas extraídas da matéria-prima de onde vai ser extraída a proteína, para confirmar os valores de pH em que se atinjam os níveis ótimos de recuperação.

4.4 PROCESSO MELHORADO PARA EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO

Ao avaliar os processos 1,2 e 3 foram detectadas oportunidades de melhora de acordo com os seguintes critérios: possibilidade de escalonamento e de diminuição de custos, rendimento e pureza. As principais oportunidades e alternativas estão apresentadas no QUADRO 8.

QUADRO 8. OPORTUNIDADES DE MELHORA

Etapa	Item com potencial de melhora	Alternativa
Desengorduramento	Uso de outro solvente no lugar de hexano	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizar um solvente extrator eficiente, barato e seguro • Diminuir o tempo de extração
Extração e solubilização de proteínas	Ruptura celular	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizar a estratégia de extração que promova maior lise celular • Diminuir o tempo de extração
Recuperação de proteínas	Rendimento na precipitação de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Precisar o pH da precipitação isoeletrica
Secagem	Liofilização	<ul style="list-style-type: none"> • Substituição o eliminação do método de secagem

FONTE: O AUTOR (2015)

Levando em conta estas oportunidades foi configurado um processo melhorado, nas seções seguintes se descrevem as modificações implantadas.

4.4.1 Extração de lipídeos (Desengorduramento)

Para o processo melhorado, denominado como processo 4, foi mantida a etapa de desengorduramento, visando a recuperação dos lipídeos. Levando em conta que a Spirulina é uma fonte potencial de ácido linolêico e γ -linolêico que representa cerca do 20% da composição de seus ácidos graxos (DESHNIUM *et al.*, 2000)

Nos seres humanos, o ácido γ -linolênico é sintetizado a partir do ácido linoleico proveniente da dieta, mas fontes extras desse ácido graxo são necessárias para compensar a deficiência da síntese induzida por doenças ou envelhecimento (DUBACQ & QUOC, 1993). Estes ácidos graxos desempenham um papel importante nas rotas metabólicas humanas, particularmente como precursores de prostaglandinas¹² (MENDES *et al.*, 2006), estes ácidos também são precursores do

¹² Sinais celulares lipídicas similares a hormônios. São produzidos por quase todas as células, geralmente em locais de dano tecidual ou infecção, pois estão envolvidos em interagir com lesões e

ácido araquidônico (MAHAJAN & KAMAT, 1995), por tanto a recuperação dos lipídeos para a produção de ácidos graxos é importante. Ao recuperar a fração lipídica podem se abrir outras linhas de produção paralelas à produção de proteínas e peptídeos de Spirulina.

Embora o hexano tenha sido utilizado com sucesso nos processos de extração de óleo de soja, há preocupações sobre a sua disponibilidade (ao ser um derivado do petróleo), sobre restrições de segurança e as emissões provocadas por o processo produtivo. Por isto desde 1990 a Lei de Ar Limpo dos Estados Unidos solicitou avaliações da possível poluição do ar provocada por hexano, também incentivou a procura de solventes alternativos (LUCAS *et al.*, 1991).

A literatura relata estudos da efetividade e equivalência na extração de óleo ou lipídeos de soja, utilizando solventes alternativos ao hexano, tais como: o n-heptano, n-propanol, iso-propanol e etanol (GANDHI *et al.*, 2003). E no trabalho de CHAIKLAHAN e colaboradores (2008) foi avaliada a extração de lipídeos e ácidos graxos da Spirulina utilizando etanol. A partir destas considerações foi selecionado o etanol como solvente alternativo na etapa de desengorduramento para o processo melhorado.

O trabalho do CHAIKLAHAN e colaboradores (2008) propõe a extração com etanol absoluto em etapas múltiplas em contra corrente, indica que pode se obter u rendimento de extração de ácidos graxos de 85%, num sistema de três etapas (20 minutos/etapa) com uma relação de biomassa solvente de 1:5 a 60 °C. Chaiklahan também indica que pode se obter um rendimento equivalente com extrações a 30 °C em uma sola etapa, mas com uma relação biomassa solvente de 1:10 por 120 minutos (CHAIKLAHAN *et al.*, 2008). Esta ultima condição seria uma alternativa para os casos em que seja desejável diminuir a desnaturação protéica causada por temperaturas elevadas. No entanto, considerando a possibilidade de escalonar o processo e levando em conta o tempo de processamento e quantidade de solvente a utilizar, foi selecionada a extração com etanol em três etapas a 60 °C.

Utilizar o etanol como solvente extrator apresenta um potencial atrativo do ponto de vista ambiental, pois é produzido por vias biotecnológicas, não gera resíduos tóxicos e é considerado seguro para a saúde humana. O etanol também têm

doenças. Elas controlam os processos, tais como a inflamação e o fluxo de sangue. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/> consultado 13 de dezembro 2014.

vantagens econômicas, pois é produzido em alta escala no Brasil e além disso pode ser facilmente reprocessado para seu reuso (SAWADA, 2012).

Ao utilizar etanol no processo de desengorduramento, além dos ácidos graxos, também podem obter-se os pigmentos que são dissolvidos por o solvente, e outros extratos brutos. A literatura tem relatos de atividades antimicrobianas e antivirais exibidas por extratos etanólicos de *Spirulina* (EL-BAZ *et al.*, 2013; GHEDA *et al.*, 2013; MALA *et al.*, 2009)

O desengorduramento com etanol é vantajoso, já que requer menor tempo de processamento. Além disso, não requer obrigatoriamente a dessolventização total, uma vez que a biomassa desengordurada pode ser separada por filtração ao vácuo. Neste caso os traços de etanol remanescente poderiam ser dissolvidos na seguinte etapa de extração e solubilização de proteínas, este é perfeitamente solúvel em água e seguro para o consumo humano.

Outra vantagem operacional de utilizar o etanol é a possibilidade de instalar o processo anexo a usinas sucroalcooleiras, de onde o álcool poderia ser obtido facilmente e a baixo custo, assim como se teria acesso ao vapor para o aquecimento que requer esta etapa.

4.4.2 Ruptura celular

Nos processos 1, 2 e 3, a extração e solubilização das proteínas é realizada em condições redutivas (presença de álcali a pH 9,5 -10). A lise celular nessas condições é promovida quimicamente já que o álcali entra em contacto com as células provocando a saponificação dos lipídeos das paredes celulares (lipopolisacarídeos) e facilitando a dissolução das lipoproteínas de parede (HARRISON *et al.*, 2003). A lise celular também é promovida mecanicamente pela agitação. Nos processos 1 e 3 a suspensão da biomassa é homogeneizada por várias horas a baixa velocidade (120 e 240 rpm), no processo 2 pelo contrário, a biomassa é homogeneizada a alta velocidade (12,000 rpm) durante só 15 minutos/ciclo. A homogeneização a alta velocidade promove cortes nas paredes celulares pelas altas forças de *cisalhamento* geradas durante a agitação, esta técnica tem um efeito relativamente semelhante à homogeneização de alta pressão (HARRISON *et al.* 2003).

Uma das dificuldades da extração proteica na *Spirulina* é o rompimento celular dificultado pela presença de polissacarídeos neutros ou iônicos na parede (FLEURENCEL *et al.*, 1995), e como a utilização de soluções alcalinas fortes pode afetar o conteúdo celular, desnaturação das proteínas e outros componentes celulares valiosos, o recomendável é realizar a ruptura celular mecânica combinada com a extração alcalina leve (CHRONAKIS, 2011).

Estudos de extração aquosa de proteínas com diferentes microalgas têm mostrado que os métodos mecânicos combinados com os químicos produzem melhores resultados para a lise celular e dissolução de proteínas quando comparado com outros métodos (SAFI, URSU, *et al.*, 2014).

Neste sentido, para configurar o processo 4 foram selecionadas as condições de extração e ruptura propostas no processo 2, que combina o método químico com o mecânico (homogeneização a alta velocidade), e que também requer menor tempo de processo.

Não foi testada a ruptura celular com homogeneizador de alta pressão, porém é recomendável confirmar o rendimento que poderia se obter com esta técnica.

4.4.3 Recuperação por precipitação

Segundo os resultados obtidos nos testes de precipitação da seção 4.3.2, para o processo melhorado foi selecionada a precipitação isoelétrica realizada em dois ciclos, o primeiro a pH 4 e para o sobrenadante resultante um segundo ciclo a pH 3. O ajuste de pH pode se realizar com HCl 1 M ou ácido cítrico, no trabalho de VASCONCELLOS (2014) foi avaliada a utilização do ácido cítrico proporcionando resultados equivalentes aos obtidos com HCl.

Para esta etapa não foram estudados os efeitos das variáveis de temperatura e velocidade de centrifugação, porém é sabido que maiores velocidades e baixa temperatura proporcionaram melhores taxas de recuperação. Neste caso foram mantidas os parâmetros de centrifugação para 9,000xg a 4 °C por serem as condições típicas para estes processos (SAFI, URSU, *et al.*, 2014; ANUSUYA *et al.*, 1981; CHRONAKIS *et al.*, 2000; LETELIER, 2009). No entanto, sempre existe a possibilidade de explorar alternativas que conduzam a processos de separação mais

econômicos e energeticamente menos demandantes do que a centrifugação a alta velocidade. Por exemplo, a ultrafiltração com membrana (BOYE *et al.*, 2010).

4.4.4 Secagem

A liofilização é um método de secagem utilizado para conservar alimentos e biomoléculas, pois têm a vantagem de conservar de melhor maneira as características físico-químicas e estruturais (HARRISON *et al.*, 2003). Se o produto final do processo de extração e concentração fosse somente às proteínas e fosse preciso conservar ao máximo suas características originais a liofilização seria uma alternativa razoável. Porém, no caso de utilizar o concentrado protéico como matéria-prima para a obtenção de peptídeos, pode se prescindir desta alternativa, já que nas etapas posteriores será preciso suspender novamente o material em meio aquoso, assim como também será submetido à desnaturação proteica na etapa de hidrólise. Nesse sentido a etapa de secagem não é indispensável, uma vez que pode se redirecionar as proteínas precipitadas diretamente às etapas de hidrólise.

Para o finalidade deste trabalho foi selecionada a opção de secagem ao vácuo a 40 °C, no caso de requerer o concentrado protéico em pó, para armazenamento o processamento posterior. A secagem ao vácuo é utilizada na indústria farmacêutica principalmente para produtos termolábiles (HARRISON *et al.*, 2003). A baixa temperatura foi selecionada com o critério de prevenir as reações de *Maillard* que são favorecidas em temperaturas acima de 40 °C (HELENA & BASTOS, 2011).

Alternativa que pode ser explorada, principalmente durante o escalonamento a secagem por *spray dryer*.

4.4.5 Outras modificações

Durante a avaliação dos processos 1, 2 e 3 já tinham sido excluídas as etapas de diálise, visando a diminuição de tempos e custos, e considerando que para a posterior obtenção de peptídeos vai ser requerer etapas refinadas de purificação, pelo qual a diálise pode se postergar para as etapas finais na obtenção de peptídeos.

Alem disso, foi incluída a secagem dos *debris* separados na etapa de extração, visando aproveitar este co-produto, já que contém resíduos de proteína, carboidratos e outros materiais celulares que podem ser de interesse.

4.4.6 Descrição do processo melhorado (processo 4)

Com as modificações citadas nas seções anteriores o processo resultante foi conformado de sete etapas: 1) desengorduramentorado 2) extração e solubilização de proteínas, 3) separação e secagem de *debris* 4) precipitação isoelétrica, 5) recuperação de proteínas, 6) neutralização e 7) secagem a vácuo.

O desengorduramentorado é realizado com etanol de acordo ao indicado na seção 3.3.4. A extração e solubilização é realizada a pH 9,5 numa relação biomassa solvente de 1:20 no primeiro ciclo e 1:10 no segundo, sob agitação a 12,000 rpm durante 15 minutos. A separação dos *debris* é realizada por centrifugação a 9,000xg a 4 °C. Estes *debris* são secados ao vácuo a 40 °C. A precipitação isoelétrica é realizada em dois ciclos (pH 4 e 3). A recuperação dos precipitados é realizada por centrifugação a 9,000xg a 4 °C. Desta ultima etapa se obtém um sobrenadante que contem carboidratos, proteínas residuais, pigmentos e outros compostos, pelo qual é outra fração de interesse (sobrenadante 4) e poderia ser utilizada como uma solução nutritiva para plantas ou animais, por exemplo.

Finalmente, o precipitado é suspenso em água, neutralizado e secado ao vácuo a 40 °C durante aproximadamente 12 horas.

Os produtos e coprodutos que podem obter se deste processo estão destacados em cor laranja, (FIGURA 22), i.e. concentrados protéicos, a fração lipídica e de pigmentos, *debris* celulares e o sobrenadante da precipitação.

Na FIGURA 22 foram adicionadas linhas ponteadas, indicando a possibilidade de derivar os concentrados protéicos para etapas de hidrolise e purificação, para a posterior fabricação de peptídeos ou hidrolisados protéicos. Porém, a análise dos processos de hidrólise e purificação para obtenção de peptídeos não está contemplada no escopo deste trabalho.

Para avaliar o desempenho deste processo foi executado o balanço de massas, os dados podem se observar na TABELA 17. E na TABELA 18 o tempo de execução do processo.

TABELA 17. BALANÇO DE MASSAS PROCESSO 4

Correntes	Quantidade		Composição					
	Volume (ml)	Peso (g)	Proteínas (g)	%	Carboidratos (g)	%	Lípidos (g)	%
Biomassa		5,03 ± 0,01	2,84 ± 0,01	56,43	0,56 ± 0,01	11,04	0,31 ± 0,01	6,16
B. deseng.		4,49 ± 0,04	2,80 ± 0,02	62,4	0,22 ± 0,02	4,91	0,11 ± 0,05	2,45
Sobrenadante 1 e 2	141		2,47 ± 0,05		0,17 ± 0,02			
Biomassa residual		1,86 ± 0,04	0,31 ± 0,01	16,66	0,03 ± 0,001	1,61	0,08 ± 0,004	4,30
Sobrenadante 3	134		1,02 ± 0,07		0,10 ± 0,005			
Sobrenadante 4	128		0,21 ± 0,03		0,05 ± 0,01			
Concentrado protéico		2,53 ± 0,03	2,25 ± 0,02	88,82	0,095 ± 0,01	3,75	0,04 ± 0,02	1,57
Rendimento de proteína			79,3%					

FORNTE: O AUTOR (2015)

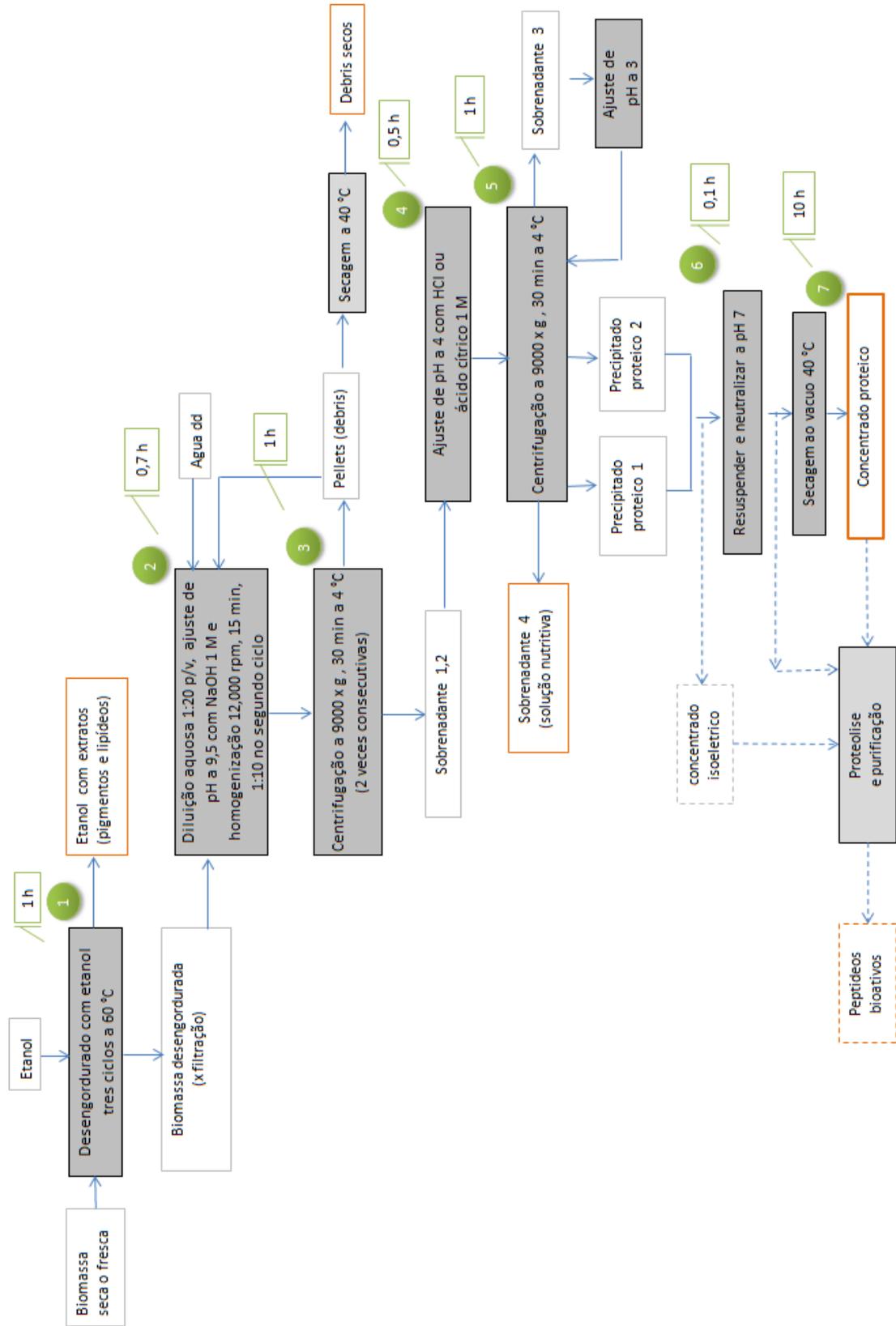
TABELA 18. TEMPO DAS ETAPAS DO PROCESSO 4

No.	Etapa	Tempo (h)
1	Desengorduramentorado	1
2	Extração de proteínas	0,7
3	Centrifugação <i>debris</i>	1
4	Precipitacao isoeletrica	0,5
5	Separacao proteinas	1
6	Resuspender e neutralizar	0,1
7	Secagem	12
Subtotal horas		16,3

FORNTE: O AUTOR (2015)

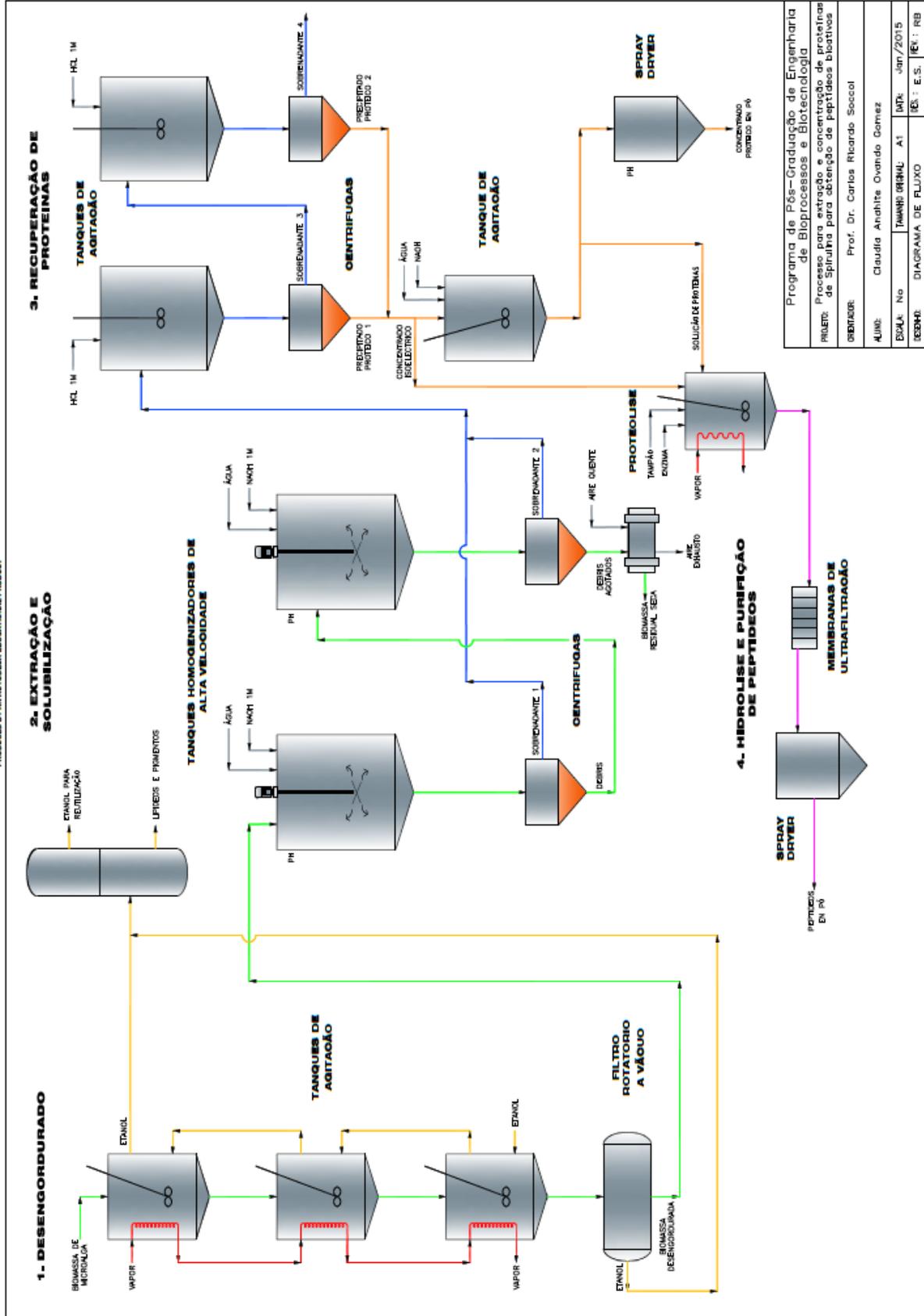
Na FIGURA 22 e 23 pode se observar um diagrama de fluxo com a simbologia básica de possíveis equipamentos para o processo a escala industrial.

FIGURA 22. CONFIGURAÇÃO DO PROCESSO MELHORADO



FONTE: O AUTOR (2015)

FIGURA 23. PROJEÇÃO DO PROCESSO MELHORADO A ESCALA INDUSTRIAL



4.5 COMPARATIVO DOS PROCESSOS AVALIADOS

Para confirmar a adequação do processo melhorado proposto neste trabalho, fizeram se comparativos dos rendimentos nas três etapas principais assim como do rendimento e pureza global obtida. Os dados e cálculos para estes comparativos obtiveram-se dos balanços de massa dos processos.

4.5.1 Comparativo da etapa de desengorduramento

O rendimento de recuperação de proteína foi calculado da relação entre a proteína na biomassa desengordurada e a proteína contida na biomassa entrando ao processo. Na TABELA 19 podem se observar os rendimentos para os processos avaliados. Pode se perceber também que durante o processo de desengorduramento acontece uma perda de proteína de entre 1,25% ate 4%, esta perda pode ser explicada no fato de existirem complexos pigmentos-proteína e lipoproteínas que podem ter migrado para a fase etanólica, além das perdas naturais durante a manipulação e transferência do produto.

TABELA 19. RENDIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA NA ETAPA DE DESENGORDURAMENTO

		Processos		
		1	3	4
Proteína na biomassa inicial (g)		2,83 ± 0,01	2,87± 0,01	2,84± 0,01
Proteína na biomassa desengordurada (g)		2,73± 0,02	2,82± 0,01	2,80± 0,02
Rendimento (%)		96,47^a ± 0,82	98,04^a ± 0,27	98,75^a ± 0,74
Parâmetros do processo	Solvente	Hexano	Hexano	Etanol
	Relação biomassa solvente	01:20	01:20	01:05
	Temperatura °C	60	60	60
	Ciclos	1	1	3
	Tempo horas	12	12	3

Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). FONTE: O AUTOR (2015)

Os rendimentos obtidos não apresentaram diferença significativa o qual confirma que a utilização do etanol é uma alternativa equivalente ao hexano. Estes resultados são coerentes com o reportado nos trabalhos de GANDHI *et al.* (2003) e SAWADA (2012), onde relatam que é igualmente efetiva a utilização de hexano e do etanol, no caso do desengorduramento e extração de óleo de soja (SAWADA, 2012;

GRANDHI *et al.*, 2008). Além disso, se obtém uma concentração de proteínas e lipídeos semelhante para os três processos (ver TABELA 20).

TABELA 20. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS NA BIOMASSA DESENGORDURADA

Processo	% proteína		% lipídeos	
1	63,73 ^a	±0,30	±2,34 ^a	±0,87
3	61,42 ^b	±0,30	±2,63 ^a	±0,52
4	62,43 ^c	±0,12	±2,46 ^a	±0,75

Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). FONTE: O AUTOR (2015)

Pode se observar que se produziu um aumento do teor de proteína de pelo menos 10%, levando em conta que a concentração de proteína na biomassa sem desengordurar era de 56,4%.

Por outro lado, visando à recuperação dos lipídeos como co-produto foi calculado o rendimento da extração de lipídeos. Na TABELA 21 podem se observar estes rendimentos e que não há diferença significativa entre eles, porém no processo 4 se pode obter uma concentração maior de lipídeos pelo fato de utilizar menor quantidade de solvente¹³.

TABELA 21. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

	Processo		
	1	3	4
Lipídeos na biomassa inicial (g)	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01
Lipídeos na b. desengordurada (g)	0,10 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,05
Rendimento (%)	67,6^a	61,5^a	64,5^a
Concentração de lipídeos no solvente extrator (mg/ml)	2	1,9	2,75

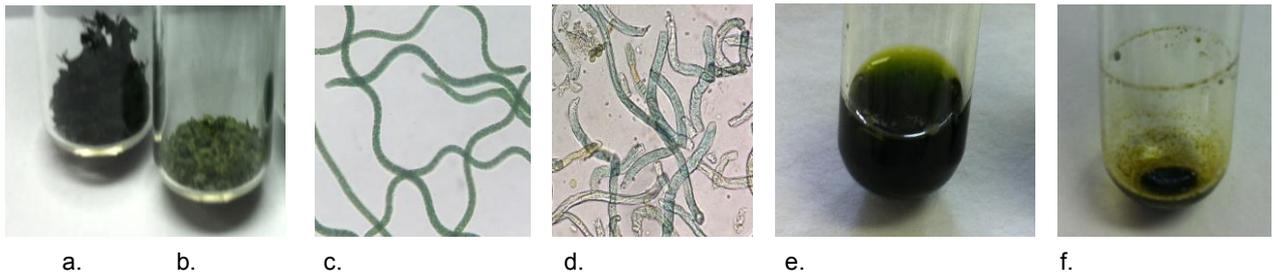
Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). FONTE: O AUTOR (2015)

O trabalho de CHAIKLAHAN (2008) relata que o rendimento pode atingir até 85% em extração de lipídeos e ácidos graxos. Os ácidos graxos reportados nesse trabalho estão compostos de 49 % de ácido palmítico, 40,2 % de ácido linoleico e 5% de esteárico e oleico (CHAIKLAHAN, 2008).

¹³ No processo 4 foram utilizados 75 ml (25 ml para cada ciclo, relação 1:5) no entanto, nos processos 1 e 2 foram 100 ml (relação 1:20)

Na FIGURA 24 pode se observar a aparência da biomassa desengordurada com etanol, o extrato etanólico obtido e a fase lipídica depois da evaporação do álcool. Embora haja diminuição da intensidade da cor na biomassa, pela transferência de pigmentos para a fase etanólica, ainda permanecem pigmentos na biomassa desengordurada.

FIGURA 24. APARÊNCIA DOS MATERIAIS NO PROCESSO DE DESENGORDURADO.



a) Biomassa de spirulina sem desengordurar 40x, b) Biomassa desengordurada 40x, c) Tricomas de spirulina sem desengordurar 40x, d) Tricomas após o desengordurado, e) extrato etanólico com lipídeos e pigmentos, e f) fração lipídica dessolventizada. FONTE: O AUTOR (2015)

4.5.2 Comparativo da etapa de extração e solubilização

Na etapa de extração e solubilização de proteínas, o rendimento de extração foi calculado a partir da quantidade de proteína obtida nos sobrenadantes das extrações¹⁴ versus a quantidade de proteína na biomassa de Spirulina entrando ao processo de extração. Na TABELA 22 pode se observar que o rendimento para o processo 1 é significativamente diferente e menor quando comparado com os outros, isto pode se explicar pelo fato de que este processo propõe só um ciclo de extração, embora o tempo de agitação em condições redutivas seja longo, a agitação a baixa velocidade não promove suficiente ruptura celular para que as proteínas sejam solubilizadas em sua totalidade, e, conseqüentemente os *debris* reterão maior quantidade de proteína.

Por outro lado não há diferença significativa no rendimento obtido pelos outros processos, os processos 2 e 4 praticamente têm as mesmas condições de operação, no entanto o processo 3 propõe 3 ciclos de extração, a menor velocidade de agitação mas durante maior quantidade de tempo. Ao proporcionar resultados equivalentes

¹⁴ Sobrenadante da extração material solúvel obtido após a remoção dos *debris* por centrifugação

foram selecionados os parâmetros com os quais se realiza a extração em menor quantidade de tempo.

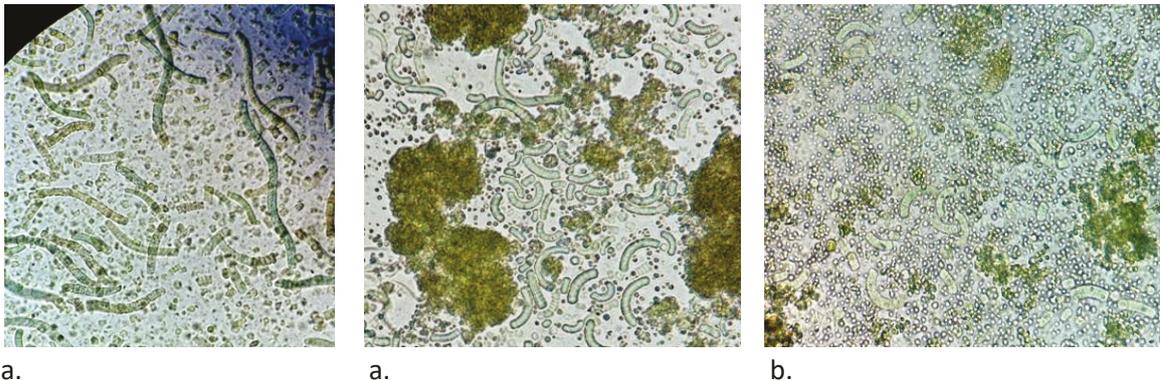
TABELA 22. RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

		Processos			
		1	2	3	4
Proteína na biomassa (g)		2,73 ±0,02	2,89 ±0,01	2,82 ±0,01	2,80 ±0,02
Proteína no sobrenadante (g)		1,91 ±0,04	2,54 ±0,02	2,55 ±0,04	2,47±0,05
Rendimento extração (%)		69,9^b ± 2,00	87,9^a ±0,76	90,7^a ±1,02	88,3^a ±2,45
Parâmetros do processo	Relação biomassa solvente	01:20	01:20 / 1:10	01:10	01:20 / 1:10
	Ciclos de extração	1	2	3	2
	Velocidade de homogeneização	120 rpm	12,000 rpm	240 rpm	12,000 rpm
	pH	9,5	10	10	9,5
	Tempo	8 horas	0,5 horas	3 horas	0,5 horas

Letras diferentes indicam diferença significativa, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). FONTE: O AUTOR (2015)

Na FIGURA 25 pode se observar a aparência da biomassa após de cada ciclo de extração realizado no processo 4. Os tricomas foram divididos em partículas menores e as condições redutivas devem ter debilitado a parede celular.

FIGURA 25. RUPTURA CELULAR DURANTE A EXTRAÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS



a. Depois o primeiro ciclo; b. depois o segundo ciclo de extração. 40x

FONTE: O AUTOR (2015)

4.5.3 Comparativo da etapa recuperação por precipitação

Para a etapa de precipitação, o rendimento de recuperação foi calculado a partir da relação entre a quantidade de proteína no concentrado protéico *versus* a quantidade de proteína nos sobrenadantes da extração. Na TABELA 23 pode-se observar que os processos que proporcionaram maior recuperação foram aqueles donde a precipitação foi realizada ao pH 3 e 4 justamente onde a solubilidade do sistema de proteínas de Spirulina foi mínima.

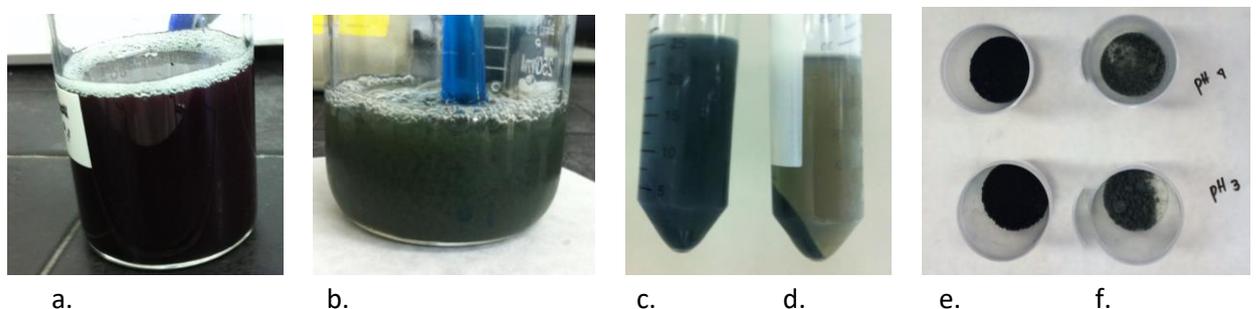
TABELA 23. RENDIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS

		Processos			
		1	2	3	4
Proteína no sobrenadante (g)		1,91 ± 0,04	2,54 ± 0,02	2,55 ± 0,04	2,47 ± 0,05
Proteína no concentrado (g)		1,63 ± 0,01	2,24 ± 0,01	2,12 ± 0,004	2,25 ± 0,02
Rendimento de recuperação (%)		85,6^{ac} ± 1,02	88,2^a ± 0,56	83,0^c ± 0,99	91,0^b ± 0,5
Parâmetros do processo	pH	4,5	3	5	4 e 3
	Ciclos	1	1	1	2

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). FONTE: O AUTOR (2015)

Na FIGURA 26 pode se observar a aparência das soluções durante a precipitação, depois da centrifugação e da secagem do concentrado protéico. Nos concentrados protéicos pode se observar a menor quantidade cor (pigmentos) naquele obtido a partir de biomassa desengordurada.

FIGURA 26. APARIENCIA DOS MATERIAIS NA ETAPA DE PRECIPITACION



a. Sobrenadante da centrifugação do material obtido da extração e solubilização da biomassa (sobrenadante 1 e 2 para o processo 4); b. Sobrenadante durante ajuste a pH 4 e 3, pode se observar a mudança da cor e a formação de conglomerados); c. Material após primeiro ciclo de centrifugação a pH 4 (pode se observar o material precipitado ao fundo e o sobrenadante 3); d. Material após segundo ciclo de centrifugação a pH 3 (pode se observar o sobrenadante 4 mais esgotado); e. Concentrado protéico em pó obtido de biomassa sem desengordurar; f. Concentrado protéico em pó obtido de biomassa desengordurada. FONTE: O AUTOR (2015).

4.5.4 Comparativo do rendimento global e pureza do concentrado protéico

Na TABELA 24 se apresentam os indicadores globais dos quatro processos avaliados. O processo 4 destaca-se por apresentar um rendimento maior em pelo menos 1,5% quando comparado com o processo 2, além disso têm menor tempo de execução. Estas duas características fazem com que este processo seja atrativo para ser escalonado, alias o aproveitamento de coprodutos que se propõem proporciona uma vantagem em termos econômicos e ambientais. Estas melhoras no desempenho foram atingidas através das modificações propostas na secção 4.4.

Na literatura não se têm muitos relatos dos rendimentos ou purezas, já que a maior parte dos trabalhos feitos à escala laboratorial tem como propósito principal a avaliação das propriedades das proteínas como componente de formulações alimentícias; pelo qual os resultados nem sempre incluem dados do rendimento do processo de extração. Porém, pode se mencionar que no trabalho de URSU (2014) se reporta $76 \pm 4\%$ no rendimento de recuperação de proteínas de *Chlorella Vulgaris* (URSU *et al.*, 2014). LETELIER (2009) reporta uma recuperação de 76,6% de proteína de *S. maxima*. BEKER (1992) relata que a escala laboratorial pode se obter até 84% de recuperação de proteínas de soja, indica que os concentrados de soja podem atingir mais de 70% de proteína e que os isolados atingem não menos de 90% de proteína. Neste contexto, pode se observar que o rendimento global do processo 4 atingiu valores razoáveis.

TABELA 24. RENDIMENTOS GLOBAIS E PUREZAS

	Processos			
	1	2	3	4
Biomassa inicial (g)	5,01	5,12	5,09	5,03
Concentrado final (g)	1,92	2,57	2,48	2,53
Proteína na biomassa inicial (g)	2,83	2,89	2,87	2,84
Proteína no concentrado (g)	1,63	2,24	2,11	2,25
Rendimento global (%)	57,8^a ± 0,5	77,4^{bc} ± 0,18	73,6^c ± 0,15	79,3^d ± 0,44
Pureza (%)	85,05^a ± 1,3	87,28^{ab} ± 0,4	85,3^a ± 0,3	88,9^b ± 0,5
Tempo global (horas)	75,1	69,5	73	16,3

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). FONTE: O AUTOR (2015)

4.5.5 Indicadores de produção do processo 4

Num processo produtivo será oportuno quantificar os rendimentos das etapas principais para monitorar o desempenho das mesmas e conseqüentemente tomar as ações preventivas ou corretivas que sejam necessárias.

O rendimento global é calculado a partir da relação entre a quantidade de proteína pura contida no concentrado e a proteína na biomassa inicial de *Spirulina*, porém este rendimento também pode ser calculado a partir da multiplicação dos três rendimentos das etapas principais (em termos decimais), tal como se indica na equação 3.

$$\% \text{ Rendimento global } (\eta_g) = \eta_D \times \eta_E \times \eta_R \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Donde:

η_D = Rendimento de recuperação de proteína no desengorduramento

η_E = Rendimento de extração de proteína (na ruptura e solubilização)

η_R = Rendimento de recuperação por precipitação

Como exemplo, na TABELA 25 lista os *items* que seriam utilizados para o análise do processo produtivo em termos de quantidades e indicadores de desempenho. Os dados estão projetados para o processamento de 1000 kg de biomassa. Estes indicadores poderão ser uteis para as projeções de custos e escalonamento.

Pode se observar que os rendimentos que ainda podem apresentar oportunidade de melhora, são os rendimentos de extração e de recuperação por precipitação. Na etapa de extração pode se maximizar a quantidade de proteína solubilizada testando outras metodologias para a ruptura celular, por exemplo, o homogeneizador de alta pressão; e no caso da precipitação, podem se testar outras técnicas de separação como a ultrafiltração, porém todas estas alternativas deveriam ser analisadas em termos de factibilidade técnica, econômica e possibilidades de escalonamento, etc.

Este processo melhorado ainda não inclui as etapas de hidrólise nem purificação de peptídeos, pelo qual foram evitadas etapas sofisticadas de purificação, pois serão mais necessárias nas de purificação de peptídeos específicos.

TABELA 25. INDICADORES DE PRODUÇÃO

Item		Quantidade	
Entradas	Matéria-prima: Spirulina	1000	kg
	Etanol	15	m ³
	Água	30	m ³
Produtos em processo	Extrato etanolico	13,6	m ³
	Biomassa desengordurada	898	Kg
	Sobrenadante da extração	28,2	m ³
Produtos	Concentrado protéico	506	Kg
	Lipídeos e pigmentos	38	Kg
	Biomassa residual: debris	372	Kg
	Sobrenadante da precipitação	25,6	m ³
Índices de produção	Recuperação no desengorduramento (η_D)	98,75	%
	Rendimento de extração (η_E)	88,3	%
	Recuperação de precipitação (η_R)	91	%
	Rendimento global (η)	79,3	%
	Concentrado protéico/Spirulina	0,51	kg/kg
	Proteína/Spirulina	0,44	kg/kg
	Lipídeos / etanol	2,75	g/l
Rendimento de extração de lipídeos	64,5	%	

FONTES: O AUTOR (2015)

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTÉICO E DOS COPRODUTOS

4.6.1 Composição proximal

Na TABELA 26 pode se observar a composição dos produtos obtidos a partir do processo melhorado. No concentrado protéico de Spirulina¹⁵ o 5,85% restante da

¹⁵ SPC = Spirulina protein concentrate

composição deve corresponder a pigmentos e cinzas. A caracterização dos produtos faz parte dos indicadores de qualidade para o monitoramento do processo.

TABELA 26. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO SPC E OS COPRODUTOS

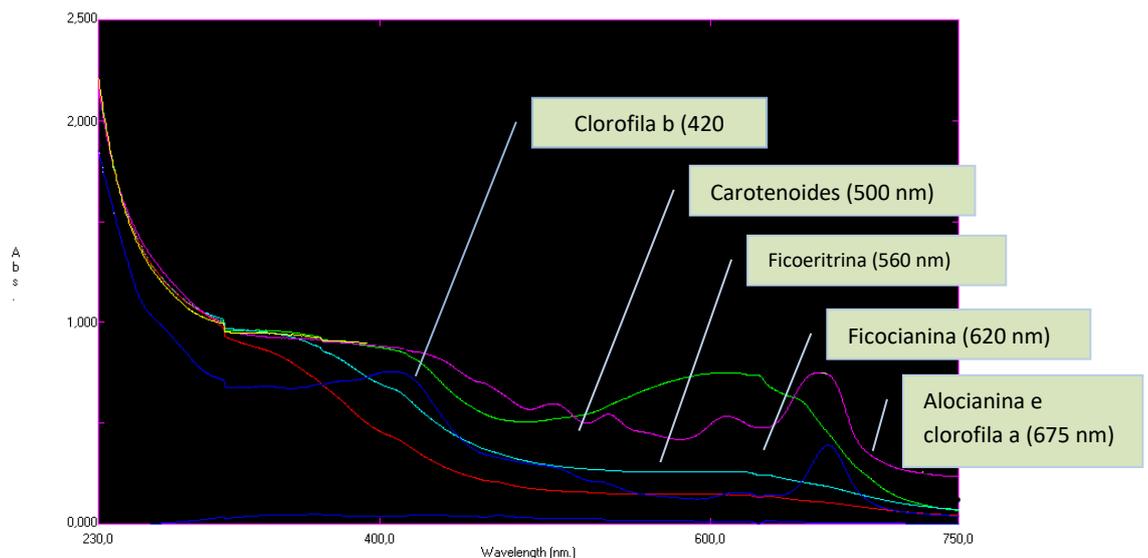
Produto	Proteína	Carboidratos	Lipídeos
Concentrado protéico (SPC)	88,8% ± 0,52	3,75% ± 0,31	1,6% ± 0,76
Biomassa residual: <i>debris</i>	16,7% ± 0,26	1,6% ± 0,03	4,3% ± 0,28
Sobrenadante da precipitação	1,64 g/l ± 0,17	0,35 g/l ± 0,06	
Extrato etanólico			2,75 g/l

FONTE: O AUTOR (2015)

4.6.2 Pigmentos

Na FIGURA 27 podem se observar os picos de absorbância que representam a presença dos principais pigmentos contidos nos produtos (concentrado protéico derivado de biomassa desengordurada e co-produtos). Os picos de maior absorbância acontecem nos comprimentos de onda ao redor dos valores 420, 620 e 675 que correspondem aos pigmentos clorofila, c-ficocianina e alocianina, respectivamente. No extrato etanólico e a biomassa residual apresentaram também picos ao redor de 500 e 560 que correspondem a pigmentos dos grupos dos carotenoides e ficoeritrinas.

FIGURA 27. PIGMENTOS DETECTADOS QUALITATIVAMENTE



Linha verde claro: concentrado protéico; linha celeste: concentrado protéico isoeletrico precipitado a pH 4; linha vermelha: concentrado protéico isoeletrico precipitado a pH 3; Linha roxa: biomassa residual; Linha azul: extrato etanólico diluído. FONTE: O AUTOR (2015)

Os pigmentos que foram detectados são coerentes com os reportados nos trabalhos de CHRONAKIS (2001) e SALEH (2011). A permanência dos pigmentos nos concentrados protéicos pode se explicar por a presença dos pigmentos - proteína que são formados por fortes enlaces covalentes (CHRONAKIS, 2000).

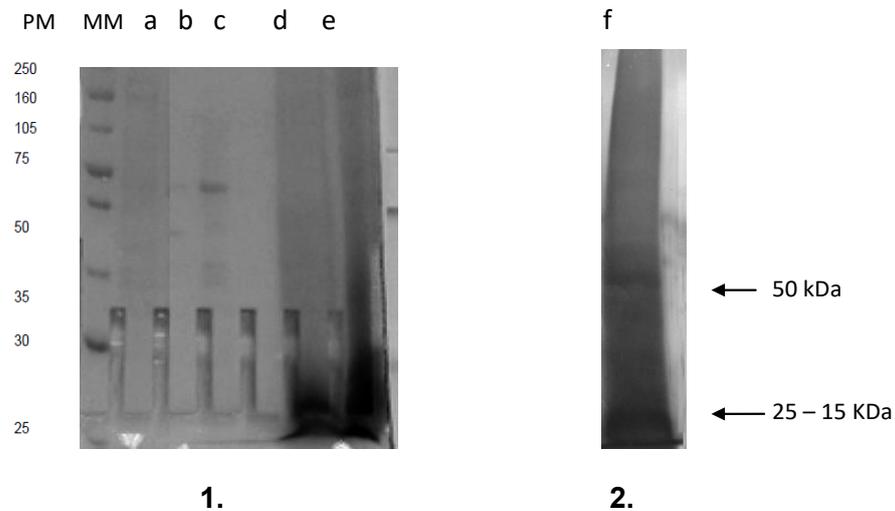
A presença dos pigmentos não é desejável em termos de aparência para o produto, porém é sabido que os pigmentos como as ficocianinas e ficoeritrinas são parcialmente responsáveis por propriedades biológicas associadas com as proteínas, principalmente as hepatoprotectoras, anti-inflamatórias e antioxidantes (BHAT *et al.*, 1998; ROMAY *et al.*, 2003), pelo que pode ser conveniente que permaneçam no produto. No caso do concentrado protéico de biomassa desengordurada apresentou principalmente ficocianina, no entanto pode se optar não desengordurar a biomassa para assegurar a retenção dos outros pigmentos como as alocianinas, segundo a aplicação desejada.

4.6.3 Pesos moleculares no SPC

As bandas do perfil electroforético para as amostras do concentrado protéico apresentaram dificuldades para sua clara visualização, porém pode se observar uma acumulação proteica na faixa entre 15 a 25 k Da (FIGURA 28, gel 1). Com fins comparativos foi incluída a figura de um gel de uma amostra de extrato bruto obtido da mesma biomassa onde é possível visualizar as bandas também em na faixa entre 15 a 25 kDa, este gel foi corado com nitrato de prata (FIGURA 28, gel 2). Estes resultados são coerentes com o perfil electroforetico de *S. platensis* apresentado no trabalho de MATELLANA *et al.* (2014) e da *S. maxima* no trabalho de LETELIER (2009), em donde as proteínas isoladas apresentaram bandas entre 10 à 25 kDa e 16,2 à 15,7 kDa, respectivamente. Assim também, têm relativa similaridade com os pesos moleculares obtidos para os isolados protéicos de *S. platensis pacifica*, onde bandas mais pronunciadas foram encontradas na faixa de 20,1 e 43 kDa (CHRONAKIS *et al.*, 2000).

Estes resultados denotam a tendência da Spirulina a exibir proteínas de baixo peso molecular, quando comparado com outras proteínas como as derivadas da soja ou do leite, que podem exibir proteínas no intervalo de 30 a 150 kDa (VASCONCELLOS, 2014; SPADOTI *et al.*, 2009).

FIGURA 28. SDS PAGE DO CONCENTRADO PROTÉICO.



1. Gel corado com solução de *Coomassie Brilliant Blue* (foto do autor) 2. Gel corado com solução de nitrato de prata (Fotografia de Carolina Saavedra). Nomenclatura das amostras (MM: marcador molecular; a, b, c: amostras de outras proteínas que foram corridos no mesmo gel, não correspondem a este trabalho; d,e e. Concentrado protéico; f.Extrato protéico bruto).

FONTE O AUTOR (2015)

Estas informações são importantes, pois conhecendo os pesos moleculares das proteínas, podem se procurar alternativas para as técnicas de purificação. Alias, pode se prever, que os hidrolisados proporcionaram peptídeos de mais baixo peso molecular do que estas proteínas; o qual os fará mais atrativos, no sentido de apresentar boa capacidade de atravessar facilmente as barreiras intestinais, assim como a possibilidade de possuir múltiplas bioatividades e consequentemente competir com fármacos de baixo peso molecular.

4.7 HIDROLISE DO CONCENTRADO PROTÉICO

Após a hidrolise dos concentrados protéicos com tripsina e pepsina foi determinada o grau de hidrolise, determinando a quantidade de proteína após centrifugar o material hidrolisado. A concentração de proteínas na solução antes da hidrolise foi de 17,5 mg/ml e após a hidrolise foi de 6,06 mg/ml, obtendo-se uma eficiência de 65,4 % na hidrolise. Estes hidrolisados não foram submetidos a processos de purificação.

4.8 PROPIEDADES BIOATIVAS

4.8.1 Propriedade antimicrobiana

Para avaliar o potencial bioativo do concentrado protéico e os coprodutos foi testada a propriedade antimicrobiana. Foi também utilizado o concentrado protéico obtido de biomassa de *Spirulina* sem desengordurar (do processo 2) para avaliar se o processo de desengordurado provoca alguma alteração da atividade biológica. As concentrações testadas para o concentrado protéico foram 5, 50 e 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. No caso do extrato etanólico foi testada a concentração de 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e para o sobrenadante da precipitação 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, por serem as concentrações aproximadas destes produtos saído do processo de extração e concentração de proteínas.

Para os concentrados protéicos as concentrações de 5 e 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ não apresentaram atividade antimicrobiana, mas na concentração de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o concentrado protéico de biomassa desengordurada (BD) e de biomassa sem desengordurar (BSD) apresentaram halos de inibição de tamanhos semelhantes nas cepas *S. aureus* e *E. coli*.

Os resultados obtidos podem se observar na TABELA 27. E na FIGURA 29 exemplos dos halos de inibição exibidos.

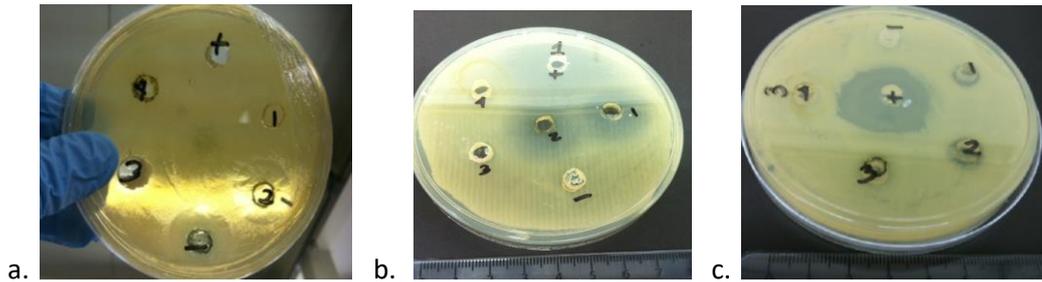
TABELA 27. HALOS DE INIBIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,

Amostra	<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Controle positivo (Ciprofloxacina)	25,7 \pm 2,5	27,3 \pm 3,1	24,3 \pm 4,1
Concentrado protéico BD	17,7 \pm 2,1	20,7 \pm 2,5	NA
Concentrado protéico BSD	19 \pm 2,6	18,0 \pm 1	NA
Solução de hidrolisados de BD	NA	NA	NA
Extrato etanólico	NA	NA	NA
Sobrenadante da precipitação	NA	NA	NA
Controle negativo (Tampão pH 7)	NA	NA	NA

Os dados correspondem media e desvio padrão de triplicatas. NA = não apresentou halo de inibição. Diâmetros em mm.

FONTE: O AUTOR (2015)

FIGURA 29. HALOS DE INIBIÇÃO



a) *E. Coli*, b) *S. Aureus*, c) *S. Typhimurium*. (+): controle positivo, (-): controle negativo, (1) Concentrado protéico de biomassa desengordurada, (2): Concentrado protéico de biomassa sem desengordurar, (3): Extrato etanólico, (4): Sobrenadante da precipitação.

FONTE: O AUTOR (2015)

Segundo o discutido na secção 4.6.3, os concentrados protéicos de Spirulina possuem um conjunto de proteínas de diferentes pesos moleculares já que provavelmente há presente proteínas de pesos moleculares na faixa de 10 KDa ou menores há possibilidade de que apresentem propriedades antimicrobianas. Análogo a o que acontece com peptídeos purificados de 5 a 10 kDa apresentam atividade biológica (KIM & WIJESEKARA, 2010). É sabido que as moléculas pequenas exibem atividades biológicas antimicrobianas, possivelmente através do mecanismo de ruptura seletiva na membrana celular, e pela interação de cargas dos fosfolípidos das membranas celulares com as cargas dos peptídeos (REDDY *et al.*, 2004).

Por outro lado vale a pena lembrar a capacidade das proteínas em influir na fisiologia dos organismos, não somente quando elas se descompõem em hidrolisados, mas também na sua forma original, pois algumas proteínas aparentemente podem conservar sua bioatividade inclusive no seu estado desnaturado. Isto tem sido demonstrado para a lisozima e α -lactalbúmina, que apresentam um espectro antibacteriano amplificado depois da desnaturação (EXPÓSITO & RECIO, 2006).

No entanto é preciso realizar estudos que confirmem a atividade antimicrobiana exibida com estas e outros micro-organismos; assim também determinar quais são as moléculas específicas que possam ser responsáveis desta atividade, provavelmente através de purificações baseadas no peso molecular e do sequenciamento das cadeias polipeptídicas. Porém esta atividade antimicrobiana que preliminarmente apresentaram os concentrados protéicos já é atrativa. No caso de ser confirmada esta propriedade poderá ser explorada sua aplicação em produtos nutracêuticos e

farmacêuticos. O extrato etanólico e o sobrenadante da precipitação não apresentaram nenhuma atividade, nas concentrações testadas.

O maior potencial, com certeza poderá ser encontrado nos hidrolisados ou peptídeos purificados derivados destes concentrados protéicos, pois ao serem clivados por enzimas proteolíticas, atingiram pesos moleculares menores e porque podem estar compostos por sequencias de aminoácidos que proporcionem funções específicas. Porém, neste trabalho as soluções de hidrolisados protéico não apresentaram atividades antimicrobianas, uma hipótese proposta para explicar este comportamento é à possível presença de outros compostos na solução (sais, traças de enzimas, impurezas, etc.) sendo que estes hidrolisados não foram submetido a purificações o isolamento.

4.8.2 Propriedade antioxidante

Na TABELA 28 se apresentam as percentagens de inibição que exibiram as amostras de concentrado protéico ao reagir com ABTS e inibir o processo oxidativo. Foram incluídas amostras de extrato aquoso de biomassa de *Spirulina maxima*, (extração por 24 h a 4 °C, separação de debris por centrifugação), para efeitos de comparação e assim poder determinar se existe aumento ou diminuição da capacidade antioxidante durante o processo de extração e concentração de proteínas.

TABELA 28. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS DE SPIRULINA

Concentração (mg/ml)	% Inibição com Extrato aquoso biomassa	% Inibição com Concentrado protéico de biomassa sem desengordurar	% Inibição com Concentrado protéico de biomassa desengordurada
5	64,4 ±1,4	62,9 ±1,1	21,5 ±0,8
4	63,9 ±0,7	60,4 ±0,4	19,7 ±1,4
3	56,9 ±1,0	57,0 ±0,9	12,4 ±0,5
2,5	43,6 ±1,3	52,5 ±1,1	7,4 ±0,7
2	40,1 ±1,0	43,9 ±0,7	0,5 ±0,3
IC ₅₀ mg/ml	2,78	1,84	7,13
VCAC µmol/g	35,92	54,48	14,02
VCAC mg/g	6,3	9,6	2,5

FONTE: O AUTOR (2015)

Pode se observar que ambos concentrados protéicos exibiram atividade antioxidante, isto é coerente com vários estudos que demonstram a habilidade das proteínas para atuar como agente antioxidante (ELIAS *et al.*, 2008). Porém as

amostras do concentrado protéico obtido a partir de biomassa desengordurada apresentaram menor percentagem de inibição e conseqüentemente a menor capacidade antioxidante, respeito às outras amostras. É importante mencionar que a atividade antioxidante da Spirulina tem sido atribuída aos compostos fenólicos, α -tocoferol, β -caroteno os quais podem ser extraídos com solventes orgânicos (JAIME *et al.*, 2005, MENDIOLA *et al.*, 2005, PIÑERO ESTRADA, 2001; MIRANDA *et al.*, 2001, BHAT & MADYASTHA, 2001). Durante o desengorduramento da biomassa de Spirulina com etanol, partes destes compostos migram até o extrato etanólico o qual pode explicar a menor capacidade antioxidante exibida pelo concentrado protéico de biomassa desengordurada respeito às outras amostras.

A capacidade antioxidante da Spirulina também é atribuída à ficocianina (PIÑERO ESTRADA, 2001). Já que parte da ficocianina permaneceu no concentrado protéico derivado de biomassa desengordurada (ver secção 4.6.2), esta pode ter conferido a capacidade antioxidante apresentada (21,5% de inibição). As amostras de concentrado protéico de biomassa sem desengordurar apresentaram até 62,9% de inibição nas mesmas concentrações, possivelmente devido a maior presença de ficocianina.

Se o concentrado protéico processado a partir de biomassa sem desengordurar apresentou maior capacidade antioxidante quanto comparada com o concentrado obtido de biomassa desengordurada, então esta informação pode ser utilizada para priorizar a realização ou não, do tratamento de extração de lipídeos (desengorduramento), antes da extração e concentração de proteínas, segundo o produto de interesse e as propriedades esperadas nele.

O extrato aquoso de biomassa integral (sem processar) apresentou uma coloração azul mais intensa do que as soluções de concentrado protéico de biomassa sem desengordurar, indicando a presença principalmente de ficocianina. A extração aquosa permite remover ficocianina, não de alocianina, que também é responsável da atividade antioxidante (PIÑERO, 2001). Durante a extração aquosa da biomassa outras ficobiliproteínas como a alocianina podem ter permanecido nos pellets da biomassa após a centrifugação, o que pode explicar os valores de inibição menores que apresentou o extrato aquoso quando comparado com o concentrado protéico derivado de biomassa sem desengordurar, o qual deve possuir ficocianina,

alocianina e outros grupos protéicos devido a não ter sido submetida ao desengorduramento com etanol.

As amostras do concentrado protéico derivado de biomassa sem desengordurar apresentaram inibição da oxidação de até 62,9% com IC₅₀ de 1,84 mg/ml que foi menor do que o IC₅₀ das amostras do extrato aquoso de biomassa 2,78 mg/ml, indicando que este concentrado exibiu maior capacidade antioxidante quando comparada com o extrato aquoso da biomassa, pois precisa-se menor concentração da amostra para conseguir o 50% de inibição e sendo maior também o valor equivalente de vitamina C. Neste caso o processo de extração e concentração de proteínas derivou num aumento de 51,7% da capacidade antioxidante tomando como referência dos valores equivalentes de vitamina C (VCAC $\mu\text{mol/g}$) 35,92 e 54,48, para o extrato aquoso e o concentrado protéico respectivamente.

Os resultados de capacidade antioxidante do extrato aquoso da biomassa integral também foram coerentes com os obtidos no trabalho de PIÑERO (2001) em donde as frações proteicas e de ficocianina extraídas de *S. platensis* exibiram 38,1 e 46,4 % de inibição.

Por outro lado, as soluções preparadas com hidrolisados derivados dos concentrados protéicos foram avaliadas, mas após a reação com o ABTS estas exibiram absorbâncias menores do que ponto zero da curva, pelo qual não foi possível determinar a sua atividade antioxidante. A perda de cor imediata obtida durante a reação poderia sugerir uma alta capacidade antioxidante, porém não foi possível a quantificação, uma possível explicação disto poderia ser as concentrações utilizadas ou a interferência das enzimas e demais impurezas residuais nos hidrolisados, que também poderiam ter reagido com o ABTS.

5 CONCLUSÕES

- Com o processo melhorado proposto neste trabalho, se obteve um rendimento de extração e concentração de proteína de 79%, sendo atrativo para produção de peptídeos. Além disso o processo requer menor quantidade de tempo de processo y possui princípios de operação simples que no requerem instalações complexas, assim este processo têm a possibilidade de ser projetado a escalas maiores.
- Durante a comparação dos indicadores de produção o processo proposto apresentou resultados relativamente maiores em rendimento e pureza, e destacou-se na redução do tempo de execução. Conferindo ao processo vantagens técnicas e econômicas.
- Os co-produtos de interesse que podem-se derivar do processo de extração e concentração de proteínas de Spirulina são: a biomassa residual (debris) o sobrenadante do ciclo final de precipitação e o extrato etanólico da etapa de desengorduramento, estes co-produtos possuem proteínas, carboidratos, pigmentos ou lipídeos que podem ser reaproveitados. Neste contexto todas as frações do processo têm potencial de uso e por tanto não se geram desperdícios ou efluentes, conferindo ao processo vantagens ambientais e também econômicas.
- O concentrado protéico obtido a partir do processo configurado atingiu 88,8% de pureza, permanecendo somente 3,75% de carboidratos e 1,6% de lipídeos. Com peso na faixa de 15 a 25 kDa. Estas características serão uma vantagem ao utilizar estes concentrados como matéria-prima para obtenção de peptídeos bioativos, pois após as hidrolises será possível obter fragmentos protéicos de ainda menor tamanho, e a quantidade de proteína facilitara os processos de purificação e isolamento de peptídeos.
- Os halos de inibição apresentados no teste de atividade antimicrobiana indicam que o concentrado protéico possui esta propriedade biológica, possivelmente devido a sua composição de proteínas de baixo peso molecular.

- Os concentrados protéicos exibiram atividade antioxidante, principalmente atribuível aos complexos pigmento- proteína que permanecem nos concentrados.
- As duas atividades biológicas foram testadas a maneira de *screening*, porem os resultados já sugerem as funcionalidades que poderiam ter os produtos ou aplicações em donde se incorporem estes concentrados protéicos de Spirulina.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar, aprofundar e confirmar outras atividades biológicas que pode exibir o concentrado protéico obtido de Spirulina, assim como seus hidrolisados.
- Hidrolisar o concentrado protéico com enzimas proteolíticas em diferentes condições, caracterizar e purificar o material hidrolisado, incluindo a determinação de pesos moleculares e sequencias de aminoácidos.
- Estudar a administração, proteção e liberação de proteínas ou peptídeos de baixa massa molecular por micro ou nanoencapsulação ou hidro-géis.
- Avaliar os parâmetros das etapas de hidrólise e purificação de peptídeos, e adicionar os estes parâmetros ao processo de extração e concentração de proteínas para complementar a cadeia produtiva de concentrados protéicos.
- Avaliar os processos de extração, concentração e hidrolise de proteínas e purificação de peptídeos com outras cianobactérias e microalgas de interesse.
- Caracterizar e extrair os ácidos graxos e pigmentos do extrato etanólico obtido na etapa de desengorduramento da biomassa de Spirulina.
- Avaliar os co-produtos do processo de concentração de proteínas para ser utilizados como biofertilizantes ou componentes de ração animal.
- Estudar a factibilidade técnica e econômica para suprir os requerimentos energéticos e de insumos para estes processos, ao serem instalados de forma anexa a outras indústrias, a sucroalcooleira, por exemplo, considerando conceitos de biorrefinaria.

REFERÊNCIAS

- AIBA, S., OGAWA, T. "Assessment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture". **J. Gen. Microbiol**, 102: 179-182. 1977.
- ADEBOWALE, YEMISI A., ISAAC A. ADEYEMI, ALADESANMI A. OSHODI, AND KESHAVAN NIRANJAN. "Isolation, fractionation and characterisation of proteins from *Mucuna* bean." **Food Chemistry**, 104(1):287–99. 2007.
- AGYEI, DOMINIC, AND MICHAEL K. DANQUAH. "Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides." **Biotechnology advances**, 29(3):272–77. 2011.
- AGYEI, D. & DANQUAH, M.K. "Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities." **Trends in Food Science & Technology**, 23(2): pp.62–69. 2012.
- ALI, SHABANA KOUSER, AND ARABI MOHAMMED SALEH. "Spirulina-An overview." **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 4(3):9–15. 2012.
- ANUPAMA AND RAVINDRA P. "Value-added food: Single cell protein" **Biotechnology Advances**, 18: 459–479. 2000.
- ANUSUYA, M.; SUBBULAKSHMI, G.; MADHAVI, K.; VENKATARAMAN, L. "Studies on the proteins of mass-cultivated, blue-green alga (*Spirulina platensis*)." **Journal of agricultural**, 29:522–25. 1981.
- ATHUKORALA, Y., LEE, K. W., KIM, S. K., & JEON, Y. J. "Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea". **Bioresource Technology**, 98: 1711–1716. 2007.
- BAKRUDEEN, ABDUL, ALI AHMED, M. VIJAYAKUMAR, N. ABDULLAH, AND R. M. TAHA. "Properties, Biological Advantages and Industrial Significance of Marine Peptides." Pp. 631–41 **Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications**. 2013.
- BALLONI, W., TOMASELLI, L., GIOVANNETTI, L., MARGHERI, M.C., Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. In: Cantarelli, C, Ciferri, O., Florenzano, G., Kapsiotis, G., Materassi, R., Treccani, U. (Eds.), Progetto finalizzato "Ricerca di nuove fonti proteiche e di nuove formulazioni alimentari". Atti del Convegno: **Prospettive della coltura di Spirulina in Italia. Consiglio Nazionale delle Ricerche**. Firenze-Academia dei Georgofili, CNR, Tipografia Coppini, pp. 49-82. 1980.
- BELLINGER, E.G. & SIGEE, D.C. "Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators". Wiley-Blackwell, West Sussex. 2010.
- BECKER, EW. "Micro-algae as a source of protein." **Biotechnology advances**, 25:207–10. 2007.

BELAY, AMHA. "Mass culture of Spirulina outdoors – The Earthrise Farms experience". In: **Vonshak, A., Ed. Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology**, Taylor and Francis. London. 131-158. 1997.

BELAY, AMHA. "The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management." **The Journal of the American Nutraceutical Association**, 5(2). 2002.

BERK Z. "FAO Agricultural services bulletin" Israel Institute of Technology Haifa, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. 1992.

BERNAL, J., J. A. MENDIOLA, E. IBÁÑEZ, AND A CIFUENTES. "Advanced analysis of nutraceuticals." **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 55(4):758–74. 2011.

BETSCHART, A. A. "Development of Safflower Protein." **J. Am. Chem. Soc.** 56(March):454–57. 1979.

BHAT, V.B. MADYASTHA. K.M. "Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from Spirulina platensis: Protection against oxidative damage to DNA". **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 285: 262–266. 2001

BHAT, B.V., N.W. GAIKWAD, AND K.M. MADYASTHA. "Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats." **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 249: 428–431. 1998.

BLIGH E.G. AND DYER W.J. "A rapid method for total lipid extraction and purification". **Can.J.Biochem.Physiol.**, 37:911-917. 1959.

BODEAU CHRISTINE. "Preparing a peptide extract of Spirulina, useful in nutraceutical and cosmetic compositions for e.g. controlling aging of the skin, comprises extraction of lipids then enzymatic hydrolysis." PAT:FR2857978 <http://europepmc.org/patents/PAT/FR2857978>. 2005.

BOROWITZKA, M. A. "Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds". **Journal Applied Phycology**, 7:3–15. 1995.

BOYE, JOYCE, FATEMEH ZARE, AND ALISON PLETCH. "Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed." **Food Research International**, 43(2):414–31. 2010.

BRANDT, F.S., CAZZANIGA, A., HANN, M. "Currents trends and market analysis". **Seminar Coetaneous Medical Surgery**, 30:141-143. 2011.

BURLANDO, L.VEROTTA, L.CORNARA, E.BOTTINI-MASSA. "Herbal Principles in Cosmetics: Properties and Mechanism of Action." Taylor & Francis Group CRC ISBN 978-1-4398-1213-6: 426. 2010.

CAÑIZARES R.O., DOMÍNGUEZ, A.R. "Growth of *Spirulina maxima* on Swine waste". **Bioresource Technology**, 45: 73-75. 1993.

CHACÓN-LEE, T. L., & GONZALEZ-MÁRIÑO, G. E. "Microalgae for "health" foods — Possibilities and challenges". **Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety**, 9: 655–675. 2010.

CHAIKLAHAN, RATANA, NATTAYAPORN CHIRASUWAN, VEARA LOHA, AND BOOSYA BUNNAG. "Lipid and fatty acids extraction from the cyanobacterium *Spirulina*." **Science Asia** 34:299–305. 2008.

CHOI, GANG-GUK, CHI-YONG AHN, AND HEE-MOCK OH. "Phylogenetic relationships of *Arthrospira* strains inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA* -IGS sequences." **Algae**, 27(2):75–82. 2012.

CHRONAKIS, I. S. MANDSEN. "Algal proteins." in **Handbook of food proteins**. Woodhead Publishing Limited. Pp. 353–394. 2011.

CHRONAKIS, I. S. "Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* Strain Pacifica): thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved." **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(2):888–98. 2001.

CHRONAKIS, IOANNIS S., ANCA NICOLETA GALATANU, AND TOMMY NYLANDER. "The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air / water interface." **Colloids and Surfaces** 173:181–92. 2000a.

CHRONAKIS, IOANNIS S. "Biosolar Proteins from Aquatic Algae." **Novel Macromolecules in Food Systems**, 39–75. 2000b.

COGAN U., YARON A., BERK Z. AND MIZRAHI S. "Isolation of soybean protein: effect of processing conditions on yield and purity." **J. Am. Oil Chem. Soc.** 44: 321. 1967.

DARCY-VRILLON B. "Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry", **International Journal Food Science Nutrition**, 44:S23–S35. 1993.

DAVIS, P.H. "Flora of Turkey and East Eagan Island, Edinburg." **Edinburg University Press**. 7: pp 947. 1982.

DESHNIUM, P., PAITHOONRANGSARID, K., SUPHATRAKUL, A., MEESAPUODSUK, D., TANTICHAROEN, M., CHEEVADHANARAK, S. "Temperature-independent and dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438)." **FeMs microbiology letters**. 184(2): 207-213. 2000.

DIPLOCK, A.T., P.J. AGGET, M. ASHWELL, F. BORNET, E.B. FERN, AND M.B. ROBERFROID. "Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document". **British Journal of Nutrition** 81: S1–S27.1999.

DOMINIC, A., & DANQUAH, M. K. "Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides" **Biotechnology Advances**, 29:272–7. 2011.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. 2006. "Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH" **Ciênc Tecnol Alim**, 26(2): 446–452.

DUBAC Q, J. P., QUOC, K. P. "Biotechnology of Spirulina lipids: a source of gamma-linolenic acid". **Spiruline, algue de vie. bulletin de l'institut océanographique**. 12: 59-64. 1993.

DUBOIS M.; GILLES K.A.; HAMILTON J.K.; REBERS P.A.; SMITH E. "Calorimetric method for determination of sugars and related substances". **Anal.Chem.** 28:350-356. 1956.

EL-BAZ, F. K., W. M. EL-SENOUSY, A. B. EL-SAYED, AND M. M. KAMEL. "In vitro antiviral and antimicrobial activities of Spirulina platensis extract." **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 3(12):52–56. 2013.

ELIAS, R.J.; KELLERBY, S.S.; DECKER, E.A. "Antioxidant Activity of Proteins and Peptides Antioxidant Activity of Proteins and Peptides". **Science**, 48:37–41. 2008.

EXPÓSITO I.L., RECIO I. "Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins". **International Dairy Journal**, 16(11):1294–305. 2006.

FITZ GERALD, J. R., & MURRAY, A. B. "Bioactive peptides and lactic fermentations." *International Journal Dairy Technology* 59, 118–125. 2007.

FLEURENCEL, JOEL, CATHERINE LE COEUR, SERGE MABEAU, MANUELLE MAURICE, AND ANNIE LANDREIN. "Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*." **Journal of Applied Phycology** (March 1993):577–82. 1995.

FONTES, E. M., ROSA ANDRADE, JORGE ALBERTO, AND VIEIRA COSTA. "Spirulina platensis." **Ciência e Agrotecnologia**, 32(5):1551–56. 2008.

FRANK, RG. "New estimates of drug development costs." **Journal of Health Economy** 22(2):325–30. 2003.

GANDHI, A. P. *et al.* "Short communication Studies on alternative solvents for the extraction of oil-I soybean." **International Journal of Food Science and Technology** 38:369–75. 2003

GANTAR M, SVIRČEV Z. "Microalgae and cyanobacteria: food for thought." **Journal of phycology**, 44:260–8. 2008.

GHEDA, SALY F., MAHA A. KHALIL, AND SHEREEN F. GHEIDA. "In vitro and in vivo preliminary results on Spirulina platensis for treatment of impetigo : Topical cream application." **African Journal of Biotechnology**, 12(18):2498–2509. 2013.

GUIL-GUERRERO, J. L., NAVARO-JUAREZ, R., LOPEZ-MARTINEZ, J. C., CAMPARA-MADRID, P., & REBOLLOSO-FUENTES, M. M. "Functional properties of the biomass of three microalgal species". **Journal of Food Engineering**, 65: 511–517. 2004.

HABIB B., AHSAN M. "A Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feed Domestic Animals and Fish." **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**, 1034(1034):6–41. 2008.

HAGINO, H., & MASANOBU, S. "Use of algal proteins in cosmetics." *European Patent* 1 433 463 B1, Dec. 18. 2003.

HANCOCK REW, SAHL H-G. "Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies." **Natural Biotechnology** 24(12):1551–7. 2006.

HARRISON, ROGER G.; PAUL W. TODD, SCOTT R. RUDGE AND DEMETRI PETRIDES. "Bioseparations science and engineering". Oxford University Press. ISBN 0-19-512340-9. 2003.

HELENA, DEBORAH, AND MARKOWICZ BASTOS. "Produtos da reação de Maillard em alimentos : implicações para a saúde Maillard reaction products in foods : implications for human health." **Revista de nutrição**. 24(6):895–904. 2011.

HEO, S. J., CHA, S. H., LEE, K. W., CHO, S. K., & JEON, Y. J. "Antioxidant activities of Chlorophyta and Phaeophyta from Jeju Island". **Algae**, 20: 251–260. 2005.

HWANG, H. J., KIM, I. H., & NAM, T. J. "Effect of a glycoprotein from *Hizikia fusiformis* on acetaminophen-induced liver injury". **Food and Chemical Toxicology** 46: 3475–3481. 2008.

IBAÑEZ, ELENA, MIGUEL HERRERO, JOSE A. MENDIOLA, AND MARÍA CASTRO-PUYANA. "Marine Bioactive Compounds." Pp. 55–99 in **Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications**, edited by Maria Hayes. Boston, MA: Springer US. 2012.

IZUMI M., S.M., VALIM D., L., TAKASHI, C. "Nutricosméticos-Legislação nacional" **Revista de saúde, médio ambiente e sustentabilidade**. 8 (3). 2013.

KANG, K. H., QIAN, Z. J., RYU, B., & KIM, S. K. "Characterization of growth and protein contents from microalgae *Navicula incerta* with the investigation of antioxidant activity of enzymatic hydrolysates". **Food Science and Biotechnology**, 20(1):183–191. 2011.

KARAVITA, R., SENEVIRATHNE, M., ATHUKORALA, Y., AFFAN, A., LEE, Y. J., KIM, S. K., *et al.* Protective effect of enzymatic extracts from microalgae against DNA damage induced by H₂O₂. **Marine Biotechnology**, 9: 479–490. 2007.

KHAN, ZAKIR, PRATIKSHA BHADOURIA, AND P. S. BISEN. "Nutritional and Therapeutic Potential of Spirulina." **Current Pharmaceutical Biotechnology** 6:373–79. 2005.

KIM, NAM-HO, *et al.* "Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates." **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry** 57(1):91–95. 2014.

KIM, S. K., RAVICHANDRAN, Y. D., KHAN, S. B., & KIM, Y. T. "Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms." **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 13: 511–523. 2008.

KIM, SE-KWON, AND ISURU WIJESEKARA. "Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review." **Journal of Functional Foods** 2(1):1–9. 2010.

KINSELLA, J. E. "Functional properties of food proteins: a review." **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 7:219-280. 1976.

KITTS, D. D., & WEILER, K. "Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery." **Current Pharmaceutical Design** 9:1309–1323. 2003.

KYOKO, H., TOSHIMUTSU H., AND ICHIRO, K. "A Natural Sulfated Polysaccharide, Calcium Spirulan, Isolated from *Spirulina platensis*: In Vitro and ex Vivo Evaluation of Anti-Herpes Simplex Virus and Anti-Human Immunodeficiency Virus Activities." **AIDS Research and Human Retroviruses**. 12(15): 1463-1471. 1996.

LAEMMLI, U.K. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage" T4. **Nature**, 227(5259):680–685. 1970.

LETELIER, JUAN CARLOS. "Caracterizaco e modificacoes qumicas da proteina da microalga *Spirulina* (*Spirulina maxima*)." Tesis Doctorado, Universidade Federal de Joo Pessoa. 2009.

LÓPEZ, CYNTHIA VICTORIA GONZLEZ *et al.* "Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass." **Bioresource technology**, 101(19):7587–91. 2010.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." **J. Biol. Chem.** 193: 265–275. 1951.

LU, JUN *et al.* "Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*." **Journal of agricultural and food chemistry** 58(12):7166–71. 2010.

LUCAS, E.W., WATKINS, L.R. & KOSEOGLU, S.S. "Isopropyl alcohol to be tested as solvent". **Inform**, 2: 970–973. 1991.

MAHAJAN, G., KAMAT, M. "γ-Linolenic acid production from *Spirulina platensis*" **Applied Microbiology and Biotechnology** 43(3): 466-469. 1995.

MALA, R., M. SAROJINI, S. SARAVANABABU, AND G. UMADEVI. "Screening for antimicrobial activity of crude extracts of *Spirulina platensis*." **Journal of Cell and Tissue Research** 9(3):1951–55. 2009.

MANDIGAN, MICHAEL T. *et al.* "Brock: Microbiología de los microorganismos." 10. ed. Pearson Educación, ISBN 84-205-3679-2. 2004.

MARCONI, GILVAIR, RICARDO VERTHEIN, TAVARES DE MACEDO, AND RANULFO MONTE ALEGRE. "Influencia do ter de nitrogenio no cultivo de Spirulina maxima em duas temperaturas- Parte I : Alteracao da composicao da biomassa." **Ciencia. Technol. Aliment.** Campinas 23:17–21. 2003.

MARKOU, GIORGOS, AND DIMITRIS GEORGAKAKIS. "Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters : A review." **Applied Energy**, 88(10):3389–3401. 2011.

MARX V. "Watching peptides grow up." **Chem Eng News**, 83(11):17–24. 2005.

MATALLANA-SURGET, SABINE *et al.* "Proteome-wide analysis and diel proteomic profiling of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* PCC 8005." **PloS one** 9(6):e99076. 2014.

MELLAGE, C. "Nutricosmetics, decoding the converse of beauty and health care" *In Cosmetics, Amsterdam 2008*. www.klinegroup.com/news/speeches/nutricosmetics-apr08.pdf, acesso em 05/05/2013.

MENDES R.L., REIS A.D., PALAVRA A.F. "Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira* (*Spirulina*) maxima: Comparison with organic solvent extraction". **Food Chem**, 99:57–63. 2006.

MENDIOLA, J.A., MARIN, F.R., HERNANDEZ, S.F., ARREDONDO, B.O., SENORANS, F.J., IBANEZ E. "Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga". **Journal of Separation Science**, 28:1031–1038. 2005.

MISBAHUDDIN, M. , MAIDUL ISLAM, A., KHANDKER, S., IFTHAKER-AL-MAHMUDC, ISLAM, N., ANJUMANARA. "Efficacy of Spirulina extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: A randomized placebo-controlled study". **Clinical Toxicology**. 44(1): 135-141. 2006.

MOORE, R. E. "Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review." **Journal of Industrial Microbiology**, 16(2):134-143. 1996.

MOHAMED, S., HASHIM, S. N., & RAHMAN, H. A. "Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy". **Trends in Food Science and Technology**, 23:83–96. 2012.

MORAIS, M. G. *et al.* "Pilot scale semicontinuous production of Spirulina biomass in southern Brazil." **Aquaculture**, 294(1-2):60–64. 2009.

MORRIS, H. J., CARRILLO, O., ALMARALES, A., BERMUDEZ, R. C., LEBEQUE, Y., FONTAINE, R., *et al.* "Immunostimulant activity of an enzymatic protein

hydrolysate from green microalgae *Chlorella vulgaris* on under nourished mice". **Enzyme and Microbial Technology**, 40: 456–460. 2007.

NELSON, D.L. AND COX, M.M. "Lehninger Principios de Bioquímica". 4ª edición. Ed. Omega. 2005.

NIRMALA, C.; PRAKASH, V.; VENKATARMAN, L. V. "Physico- chemical and functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*)". *Nahrung*. 36: 569-577. 1992.

NOVAK, ALESSANDRA CRISTINE. "**Evaluation of the Cosmetic Potential of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*.**" 87 f. Disertacao (Mestrado) - Sector Tecnologia, Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Universidade Federal do Paraná. 2010

OGBONNA J., MASUIH AND TANAKAH. "Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation – An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed", **Journal Applied Phycology**, 9: 359–366. 1997.

OLAIZOLA, MIGUEL. "Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace." **Biomolecular Engineering**, 20(4-6):459–66. 2003.

OLIVEIRA, M. A. C. , M. P. MONTEIRO, P. ROBBS, AND S. G. LEITE. "Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures." **Aquaculture International** 7(5221):261–75. 1999.

OLIVEIRA, WEMERSON DE CASTRO, CRISTIANE ALVES DE OLIVEIRA, MARIA EMILENE MARTINO CAMPOS-GALVÃO, VANESSA CRISTINA DE CASTRO, AND ANTONIO GALVÃO DO NASCIMENTO. "Cianobactérias: uma revisão sobre potencial nutricional e alguns aspectos biotecnológicos." **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2(1):49–67. 2013.

PAULINE, S., JOANNIS-CASSAN, C., ELIE, D., ARSENE, I. "Commercial application of microalgae." **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 2: 87–96. 2006.

PENA RAMOS, E. A., AND Y. L. XIONG. "Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System." **Food Chemistry and Toxicology**, 67(8):2952–56. 2002.

PETERSON, G.L., "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall." **Anal. Biochem.** 100: 201–220. 1979.

PINERO E., J.E., BERMEJO B., P., VILLAR DEL FRESNO, A.M. "Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract". **Farmaco**, 56:497–50. 2001.

PINERO E., J.E., BERMEJO B., P., VILLAR DEL FRESNO, A.M. "Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract". **Farmaco**, 56:497–50. 2001.

PLAZA, M., A. CIFUENTES, AND E. IBAÑEZ. "In the search of new functional food ingredients from algae." **Trends in Food Science & Technology**, 19: 31–39. 2008.

PLAZA, M., M. HERRERO, A. CIFUENTES, AND E. IBAÑEZ. "Innovative natural functional ingredients from Microalgae". **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57: 7159–7170. 2009.

PLAZA M., SANTOYOB, S., JAIMEB, L., GARCÍA-BLAIRSY REINAC G., HERRERO. M., SENORÁN F.J., IBAÑEZ, E. "Screening for bioactive compounds from algae." **J. Pharmaceut. Biomed.** 51:450-455. 2010.

RASMUSSEN R. S. AND MORRISSEY, M.T. "Marine biotechnology for production of food ingredients". **Advanced Food Nutrients Res**, 52: 237–292. 2007.

RAPOSO, MARIA FILOMENA, RUI MANUEL SANTOS COSTA DE MORAIS, AND ALCINA MARIA MIRANDA BERNARDO DE MORAIS. "Health applications of bioactive compounds from marine microalgae." **Life sciences**, 93(15):479–86. 2013.

REDDY, K. V. R., R. D. YEDERY, AND C. ARANHA. "Antimicrobial peptides: premises and promises." **International Journal of Antimicrobial Agents**, 24(6):536–47. 2004.

ROBERTS, P.R., BURNEY, J.D., BLACK, K.W., ZALOGA, G.P. "Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract." **Digestion**, 60: 332–337. 1999.

ROMAY, C.H., R. GONZALEZ, N. LEDÓN, D. REMIREZ, AND V. RIMBAU. "C-phycocyanin; abiliprotein with antioxidante, anti-inflammatory and neuroprotective effects." **Current Protein & Peptide Science**, 4: 207–216. 2003.

ROUXEL, C., DANIEL, A., JERONE, M., ETIENNE, M., FLEURENCE, J. "Species identification by SDS-PAGE of red algal used as seafood or a food ingredient." **Food Chemistry**. 74: 349-353. 2001.

ROY, F., J. I. BOYE, AND B. K. SIMPSON. "Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil." **Food Research International**, 43(2):432–42. 2010.

RUFINO, M. *et al.* "Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS." **Comunicado Técnico-EMBRAPA**. 128. 2007

RUFINO, M. *et al.* "Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil". **Food Chem.** 121(4):996–1002. 2010.

SAFI, CARL, ALINA VIOLETA URSU, *et al.* "Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods." **Algal Research** 3:61–65. 2014.

SAFI, CARL, MICHAEL CHARTON, *et al.* "Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments." **Algal Research**, 3:55–60. 2014.

SALEH, A. M., D. W. DHAR, P. K. SINGH, AND NEW DELHI. "Comparative pigment profiles of different Spirulina strains." **Research in Biotechnology**, 2(2):67–74. 2011.

SAMARAKOON, KALPA, AND YOU-JIN JEON. "Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review." **Food Research International**, 48(2):948–60. 2012.

SATHE, SHRIDHAR K., AND MAHESH VENKATACHALAM. "Fractionation and biochemical characterization of moth bean (*Vigna aconitifolia* L.) proteins." **LWT - Food Science and Technology**. 40(4):600–610. 2007.

SAWADA, MIRIAM MEGUMI. "Estudo da viabilidade técnica da substituição de hexano por etanol no processo de extração de óleo de soja: cinética de extração e índices de qualidade". Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo. 2012

SEKAR, S., & CHANDRAMOHAN, M. "Phycobiliprotein as commodity: Trends in applied research, patents and commercialization". **Journal of Applied Phycology**, 20: 113–136. 2008.

SHEIH, I. C., WU, T. K., & FANG, T. J. "Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein hydrolysate in different oxidation systems". **Bioresource Technology** 100(13): 3419–3425. 2009.

SHEIH, I. C., FANG, T. J., & WU, T. K. "Isolation and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste." **Food Chemistry**, 115: 279–284. 2009.

SHEIH, I. C., FANG, T. J., WU, T. K., & LIN, P. H. "Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein in waste." **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 58: 1202–1207. 2010.

SIGFRIDO, ROBERTO, GALLEGOS OLEA, AND JOSINETE SANTOS MESQUITA. "Metodologias aplicadas a extratos de plantas : comparação entre duas técnicas de ágar difusão." **Revista Brasileira de Farmacognocia**, 90(2):124–28. 2009

SLOCOMBE, STEPHEN P., MICHAEL ROSS, NAOMI THOMAS, SHARON MCNEILL, AND MICHELE S. STANLEY. "A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass." **Bioresource technology**, 129:51–57. 2013.

SPADOTI, L. M., MORENO, I., TORRES, A. "Peptídeos bioativos obtidos de proteínas do soro de queijo : potenciais ingredientes de alimentos promotores de saúde" **Fazer Melhor**. 80-83. 2009.

STAINER, R. Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M., COHEN-BAZIRE. "Purification and properties of unicellular blue-green algae (order chroococcales)." **Bacteriological Reviews**. 35(2): 171-205. 1971.

STOLZ, P., & OBERMAYER, B. "Manufacturing microalgae for skin care." **Cosmetics Toiletries**, 120:99–106. 2005.

SUETSUNA, K., AND J. R. CHEN. "Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*." **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, 3(4):305–9. 2001.

SYDNEY, EDUARDO BITTENCOURT *et al.* "Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae." **Bioresource technology**, 101(15):5892–96. 2010.

TYUG, T.S.; PRASAD, K.N.; ISMAIL, A. "Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products." **Food Chem**, 123(3): 583–589. 2010.

URSU, ALINA-VIOLETA *et al.* "Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*." **Bioresource technology** 157:134–39. 2014.

USFDA. US Federal Food, Drug, and Cosmetic 2009. Act (SEC. 201). [21 U.S.C 321], (g) (1) (B). FD&C Act chapters I and II: short titles and definitions. Retrieved 13th August 2013, from <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Legislation/FederalFoodDrugandCosmeticActFDCAct/FDCActChaptersIandIIShortTitleandDefinitions/ucm086297.htm>.

VASCONCELLOS, FERNANDA C.S. "Produção e caracterização de um isolado protéico de soja, avaliação das atividades biológicas: antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória das proteínas glicina e β -conglucina e produção de um fitocosmético". Tese doutorado. Setor de Tecnologia Universidade Federal do Paraná. 2014.

VICTORIA, CYNTHIA *et al.* "Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass." **Bioresource Technology** 101:7587–91. 2010.

VANTHOOR-KOOPMANS, MARIEKE, RENE H. WIJFFELS, MARIA J. BARBOSA, AND MICHEL H. M. EPPINK.. "Biorefinery of microalgae for food and fuel." **Bioresource Technology**, 135:142–49. 2013

VISKARI, P. J., & COLYER, C. L. "Rapid extraction of phycobiliproteins from cultures cyanobacteria samples." **Analytical Biochemistry**, 319: 263–271. 2003.

VO, THANH-SANG, AND SE-KWON KIM. "Down-regulation of histamine-induced endothelial cell activation as potential anti-atherosclerotic activity of peptides from *Spirulina maxima*." **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, 50(2):198–207. 2013.

VO, THANH-SANG, BOMI RYU, AND SE-KWON KIM. "Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*." **Journal of Functional Foods**, 5(3):1336–46. 2013.

VO, THANH-SANG, AND SE-KWON KIM. "Down-regulation of histamine-induced endothelial cell activation as potential anti-atherosclerotic activity of peptides from *Spirulina maxima*." **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, 50(2):198–207. 2013.

VO, THANH-SANG, DAI-HUNG NGO, KYONG-HWA KANG, SUN-JOO PARK, AND SE-KWON KIM. "The role of peptides derived from *Spirulina maxima* in downregulation of FcεRI-mediated allergic responses." **Molecular nutrition & food research**, 58(11): 2226–34. 2014.

VONSHAK, A. Use of *Spirulina* Biomass, In: Vonshak, A. (ed.), *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology Cell Biology and Biotechnology, Taylor & Francis, ISBN 0-203-48396-0, London, pp. 159-173. 2002.

WANG, HUILI *et al.* "Identification of differentially expressed proteins of *Arthrospira* (*Spirulina*) *plantensis*-YZ under salt-stress conditions by proteomics and qRT-PCR analysis." **Proteome science**, 11(1):6. 2013.

WIJFFELS, R.H., BARBOSA, M.J., EPPINK, M.H.M. "Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels". **Biofuels Bioprod. Biorefin.** 4 (3): 287–295. 2010.

YEN, HONG-WEI *et al.* "Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products." *Bioresource Technology* 135:166–74. 2013.

ZHU, K.X. "Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ". **Food Chem**, 126(3): 1122–1126. 2011

----- 1990. "Commercial Communication Alfa-Laval Sharpless Ltd., Camberley", U.K. PFT00114EN 0410.

ANEXO

MEDIO ZARROUK

As culturas de *S. maxima* (SAG 84.79) e *S. platensis* (LEB-52) foram cultivadas em meio Zarrouk modificado (S. AIBA & T. OGAWA, 1977) recomendado pela SAG (*Sammlung von Algenkulturen Göttingen*). A composição do meio pode se observar na TABELA 29. A solução A e B se preparam diluindo as sais em 500 ml, seguidamente são esterilizadas por separado e após esfriar são misturadas para obter 1 litro de meio.

TABELA 29. SOLUÇÕES PARA PREPARAÇÃO DE MEIO ZARROUK MODIFICADO

Solução A		Solução de micronutrientes		
NaHCO ₃	13,61 g		Solução de estoque (g/100 ml)	Solução de aplicação
Na ₂ CO ₃	4,03 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1	1 ml
K ₂ HPO ₄	0,5 g	MgSO ₄ .4H ₂ O	0,1	2 ml
Solução B		H ₃ BO ₃	0,2	5 ml
NaNO ₃	2,5	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,02	5 ml
K ₂ SO ₄	1	Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,02	5 ml
NaCl	1	CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,0005	1 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	Água desionizada		981 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	FeSO ₄ 7H ₂ O		0,7 g
EDTA (Tritriplex III)	0,08	EDTA (Tritriplex III)		0,8 g
Solução de micronutrientes	5 ml	Vitamina B₁₂ 5 x 10 ⁻⁶ g/l, na solução final se é preciso		

FONTE: S. AIBA & T. OGAWA (1977)

É recomendável esterilizar o FeSO₄.7H₂O seco e separado das outras sais, para evitar reações de oxidação com as outras sais.

Para o preparo de meio sólido ágar ao 1 – 1,5 % é dissolvido em banho quente ou forno de micro-ondas e posteriormente esterilizado separadamente dos sais, após esfriamento (~50 °C) e misturado em partes iguais com meio Zarrouk líquido

esterilizado e preparado com o dobro de concentração. No caso de precisar maior solidificação no meio pode se preparar o ágar a 2- 3%.

ISOLAMENTO DE SPIRULINA MAXIMA

Durante o cultivo da *S. maxima* no laboratório foi detectada contaminação com outra microalga desconhecida, pelo qual foi realizado um procedimento de isolamento com o objetivo de obter uma cultura monoespecífica.

O isolamento foi realizado de acordo a metodologia de CAÑIZARES (1993) e STANIER *et al.*, (1971), neste procedimento é aproveitada a propriedade de fototactismo positivo¹⁶ que apresentam as cianobactérias, a causa desta mobilidade é possível obter colônias separadas no meio sólido para posteriormente realizar repiques sucessivos ate atingir colônias puras. O procedimento foi realizado a partir das seguintes etapas:

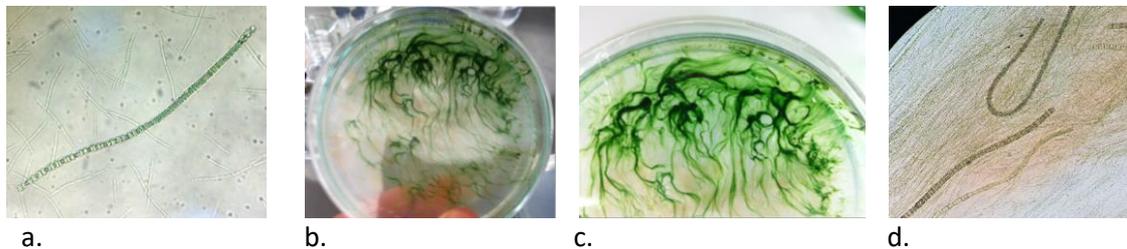
- a) Tomou-se uma amostra da cultura de *S. maxima* e foi realizada uma diluição com meio Zarrouk estéril em proporção 1:10.
- b) 0,1 ml da diluição foram inoculados em placas de petri com meio Zarrouk solido 2,5%.
- c) As caixas *petri* foram colocadas sob iluminação (1500 lux) e a 25 ± 3 °C. A iluminação foi colocada somente num extremo das caixas a fim de que uma parte recebesse significativamente maior quantidade de iluminação.
- d) Após 8 dias observou-se crescimento de filamentos de Spirulina na direção de maior intensidade da luz. No lado oposto da caixa apresentou crescimento de colônias vermelhas (FIGURA 30).
- e) Com uma alça microbiológica tomou-se uma amostra dos filamentos limpos e distanciados das colônias vermelhas, para sua observação no microscópio e avaliar a pureza da colônia. Tomaram-se outras amostras dos filamentos limpos para serem repicados em caixas de *petri* com meio Zarrouk solido. A repicagem foi

¹⁶Fototactismo positivo: Movimento em relação a luz, deslocando-se a fim de aproximar-se a ela.

realizada por mais duas vezes ate não observar presença da microalga desconhecida (FIGURA 31).

- f) Da caixa do ultimo repique foi transferida um alíquota com agar para um erlemeyer com 50 ml de medio Zarrouk líquido estéril, posteriormente foi colocado em shaker a 125 rpm, com iluminação a 3,000 Lux, fotoperíodo de 12:12 h e temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$
- g) Após 10 dias do cultivo, a cultura foi escalonada para 250 ml e posteriormente repetiu-se para 500 ml. E assim por diante.

FIGURA 30. CULTURA SOLIDO DE *S. MAXIMA* PARA ISOLAMENTO.



a. Amostra de cultura em meio liquido 40 X; b. Cultura contaminada em meio sólido, c. Colônias vermelhas aumento, d. Amostra de colônia contaminada tomada do meio solido 40X (note-se a cor vermelho e a presença de outros filamentos). FONTE: O AUTOR (2015)

FIGURA 31. CULTURA DE *S. MAXIMA* ISOLADA.



a. Cultura em meio sólido após duas repicagens; b. Amostra de colônia isolado do meio sólido 40 X, c. Amostra de cultura inoculada em meio liquido 40 X. FONTE O AUTOR (2015)

CULTIVOS DE SPIRULINA A ESCALA DE LABORATÓRIO

Culturas de *S. platensis* (LBE-52) e *S. maxima* (SAG 84.79) foram mantidas no laboratório segundo as condições de cultivo indicados na secção 3.1, em reatores de 14 litros, mas com um volume de operação de 4 litros (FIGURA 32). Na quinta

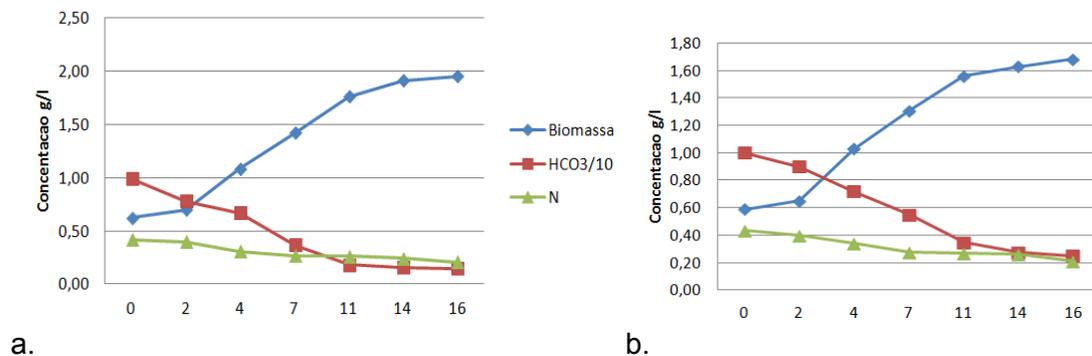
geração foram monitorados os parâmetros cinéticos e o consumo da fonte de carbono e nitrogênio. Na FIGURA 33 pode se observar que após 16 dias de cultivo, as culturas atingiram concentrações máximas (X_{max}) de $1,95 \text{ g l}^{-1}$ e $1,68 \text{ g l}^{-1}$, para *S. maxima* e *S. platensis* respectivamente assim como o comportamento do consumo da fonte de carbono e nitrogênio.

FIGURA 32. CULTURAS DE SPIRULINA EM FOTOREADORES DE LABORATÓRIO.



FONTE: O AUTOR (2015)

FIGURA 33. CINÉTICAS DE CRESCIMENTO SPIRULINAS.



a. *S. maxima*; b. *S. Platensis*. FONTE: O AUTOR (2015)

$$P_{max} = (X_t - X_0) / (t_x - t_0)$$

$$\mu = (\ln X - \ln X_i) \cdot 2.303 / (t_x - t_i)$$

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

Donde P_{max} é a produtividade máxima, X_t a concentração celular em um tempo t_x , X_0 é a concentração celular inicial do intervalo a um tempo t_0 , μ é a velocidade máxima de crescimento, X é a concentração celular ao final da fase logarítmica em

um tempo t_x , X_i a concentração celular ao início da fase logarítmica em um tempo t_i e t_d é o tempo de duplicação. Na TABELA 30 podem se observar os parâmetros cinéticos obtidos nessa geração.

TABELA 30. PARÂMETROS CINÉTICOS CULTURAS DE SPIRULINA

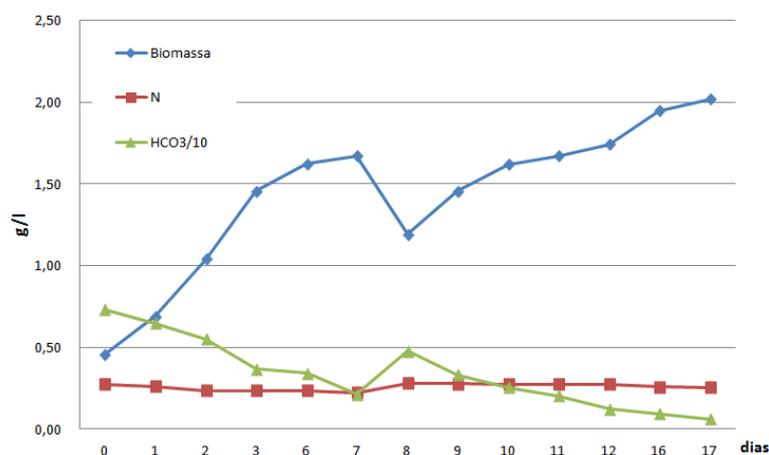
Cultura	X_{\max} ($g\ l^{-1}$)	μ_{\max} (d^{-1})	t_d (d)	P_{\max} ($g\ l^{-1}\ d^{-1}$)
<i>S. maxima</i>	1,95	0,24	2,94	0,113
<i>S. platensis</i>	1,68	0,21	3,38	0,110

d = dias.

FONTE: O AUTOR (2015)

Considerando que após 16 dias de cultivo ainda se apresentou fonte de carbono e nitrogênio, com fines exploratórios foi realizada uma cultura de *S. platensis* de 4 l, donde foi adicionando um pulso de 1,5 l de meio Zarrouk, no dia 7 de cultivo para observar o valor de biomassa que poderia se atingir. Esta cultura atingiu uma concentração máxima de $2,02\ g\ l^{-1}$. Na FIGURA 34 pode se observar o comportamento cinético desta cultura, e na TABELA 31 os parâmetros cinéticos para as duas etapas (antes do pulso e depois do pulso).

FIGURA 34. CINÉTICA DE CRESCIMENTO SPIRULINA PLATENSIS COM PULSO DE CARBONO



FONTE: O AUTOR (2015)

TABELA 31. PARÂMETROS CINÉTICOS CULTURAS DE SPIRULINA COM PULSO

Etapa	μ_{\max} (d^{-1})	t_d (d)	P_{\max} ($g\ l^{-1}\ d^{-1}$)
Dia 1 - 7	0,29	2,38	0,42
Dia 8 - 17	0,19	3,57	0,26

FONTE: O AUTOR (2015)