



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADO, ISOLADO E HIDROLISADO PROTÉICO A
PARTIR DE BIOMASSA DE *Spirulina***

ALINE MASSIA PEREIRA

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

Dra. CRISTIANE REINALDO LISBÔA
Co-orientadora

Rio Grande, RS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADO, ISOLADO E HIDROLISADO PROTÉICO A
PARTIR DE BIOMASSA DE *Spirulina***

ALINE MASSIA PEREIRA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

Dra. CRISTIANE REINALDO LISBÔA
Co-orientadora

Rio Grande, RS
2016

Ficha catalográfica

P436o Pereira, Aline Massia.

Obtenção de concentrado, isolado e hidrolisado protéico a partir da biomassa de *Spirulina* / Aline Massia Pereira. – 2016.
150 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

Coorientadora: Dr^a. Cristiane Reinaldo Lisbôa.

1. Hidrolisado protéico 2. Fonte de proteína 3. *Spirulina*
I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Lisbôa, Cristiane Reinaldo III. Título.

CDU 664.38:639.64

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Aline Massia Pereira e aprovada em 14 de abril de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG



Profa. Dra. Itaciara Larroza Nunes – UFBA



Profa. Dra. Eliana Badiale Burlong – FURG



Profa. Dra. Michele Greque de Moraes – FURG

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer à todas as pessoas que contribuíram, de forma técnica, pessoal ou afetiva, na realização desse trabalho. Todas foram extremamente importantes pra mim! À minha co-orientadora Cris pela sabedoria, disponibilidade, tranquilidade e paciência, mas principalmente pela amizade e cumplicidade em todos os momentos, inclusive quando nos colocamos na situação de concorrentes.

Ao meu orientador Jorge, agradeço pela confiança em mim para realização desse trabalho, pela experiência e sabedoria. Agradeço pela disponibilidade, pois apesar de seus compromissos da carreira de professor e pesquisador, sempre se mostrou prestativo por assuntos profissionais e compreensivo pelos assuntos pessoais.

Gostaria de agradecer à todos os professores do LEB e da FURG, que contribuem para o crescimento do grupo. À professora Eliana, que tenho uma imensa admiração e que sempre foi muito prestativa em todas as vezes que bati na sua porta com “mais uma perguntinha, professora”. À professora Michele Greque, também sempre muito prestativa e que vem contribuindo com a minha formação desde a co-orientação no TCC e participando de muitas das bancas de avaliação do meu trabalho.

Aos meus colegas do LEB tenho muito a agradecer pela contrinuição no trabalho e pela convivência agradável. Agradeço a Thaísa, Denise, Bárbara Catarina, Milene, que não está mais no laboratório, mas que também ajudou no trabalho, Luiza, Gabriel e a todos os outros colegas, sem exceção. Um agradecimento especial ao Roque, que além de técnico e colega, é um amigo, que tenho grande consideração. Ao pessoal de outros laboratórios que também se mostraram prestativos, especialmente a Daiane do laboratório de Microbiologia e

Biosseparações e aos técnicos, Sabrine, Maristela, Luisa, Adriano, Rafael e Bruno.

Agradeço aos meus colegas do mestrado pela parceria e amizade durante esses 2 anos. Dedico um agradecimento especial aos meus amigos Lenon, Douglas e Fatiele pelo companheirismo, pelas risadas, pelo apoio em todos os momentos. Agradeço aos meus amigos de fora da pós-graduação pela compreensão da minha ausência em alguns momentos devido às tarefas da dissertação e pelos momentos que consegui me fazer presente.

Aos meus pais Tania e Edi, dedico esse trabalho e agradeço pelo orgulho que sentem de mim. Obrigada por sempre me entenderem, por me incentivarem, por aceitarem e apoiarem minhas escolhas. Dedico também esse trabalho à minha gêmea Karine em que me espelho, literalmente, desde sempre.

Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1 – EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS OU SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Figura 1 - Fluxograma de extração de proteínas por precipitação isoeletrica	50
Figura 2 - Titulação potenciométrica da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	53
Figura 3 - Solubilidade protéica de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e de seus extratos protéicos.....	58
Figura 4 - Capacidade de formação de espuma de extratos protéicos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	60
Figura 5 - Estabilidade de espuma de extratos protéicos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	61
Figura 6 - Estabilidade térmica de extratos protéicos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	63

ARTIGO 2 – OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS A PARTIR DE ISOLADOS E CONCENTRADOS PROTÉICOS DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA USO EM ALIMENTOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Figura 1 - Fluxograma de extração de proteínas por precipitação isoeletrica	74
Figura 2 - Hidrólise enzimática em Erlenmeyer.....	75
Figura 3 - Hidrólise enzimática em biorreator <i>STR</i>	76
Figura 4 - Cinética enzimática da hidrólise de proteínas de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (a) em reator tipo Erlenmeyer e (b) em reator <i>STR</i>	82
Figura 5 - Perfil eletroforético dos extratos e dos hidrolisados protéicos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	86
Figura 6 - Digestibilidade protéica <i>in vitro</i> dos extratos protéicos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e de seus hidrolisados.....	87
Figura 7 - Solubilidade protéica de <i>Spirulina</i> , seus extratos e hidrolisados protéicos	89
Figura 8 - Curva de estabilidade térmica de hidrolisados protéicos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	91

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 – EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS OU SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Tabela 1 - Teor de proteínas e cinzas da biomassa desmineralizada e seus extratos protéicos	54
Tabela 2 - Rendimento do processo de extração de proteínas da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	55
Tabela 3 - Composição proximal dos extratos protéicos obtidos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	56

ARTIGO 2 – OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS A PARTIR DE ISOLADOS E CONCENTRADOS PROTÉICOS DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA USO EM ALIMENTOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Tabela 1 - Composição proximal da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e seus extratos protéicos (base seca).....	81
Tabela 2 - Grau de Hidrólise (GH) e produtividade em diferentes reatores	82
Tabela 3 - Grau de Hidrólise dos hidrolisados protéicos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	84
Tabela 4 - Parâmetros de avaliação da estabilidade térmica de extratos protéicos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	91
Tabela 5 - Atividade antioxidante de proteínas e peptídeos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Propriedades funcionais das proteínas e exemplos de suas aplicações tecnológicas em alimentos.....	33
Quadro 2 - Algumas definições de alimentos baseadas na legislação brasileira	34

ARTIGO 1 – EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS OU SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Quadro 1 - Testes de desmineralização da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	49
---	----

NOMENCLATURA

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CFE	Capacidade de formação de Espuma
CPP	Concentrado Protéico de Pescado
CRA	Capacidade de Retenção de Água
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EE	Estabilidade de Espuma
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPC	<i>Fish Protein Concentrate</i>
FPI	<i>Fish Protein Isolate</i>
GH	Grau de Hidrólise
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
η	Rendimento em massa
PS	Proteína Solúvel
PS _{final}	Proteína Solúvel Final
PS _{inicial}	Proteína Solúvel Inicial
PSS	Concentração de proteínas solúveis no sobrenadante
P _{total}	Proteína Total
REP	Rendimento de extração protéica
SDS	gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida
SPC	<i>Soy Protein Concentrate</i>
SPH	<i>Soy Protein Hydrolyzate</i>
SPI	<i>Soy Protein Isolate</i>
STR	<i>Stired Tank Reactor</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
Td	Temperatura de desnaturação
VE	Volume de Espuma
WPC	<i>Whey Protein Concentrate</i>
WPI	<i>Whey Protein Isolate</i>
ΔH	Variação Entálpica

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	19
RESUMO GERAL	21
ABSTRACT	22
1 INTRODUÇÃO GERAL	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
 CAPÍTULO II.....	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 Microalgas	29
3.2 <i>Spirulina</i>	29
3.3 Proteínas.....	31
3.3.1 Propriedades Funcionais de Proteínas	32
3.4 Fontes de Proteína e Suplementos Protéicos Convencionais	33
3.4.1 Concentrados Protéicos	35
3.4.2 Isolados Protéicos	36
3.5 Hidrolisados Protéicos	36
3.6 Alimentos Antioxidantes e Benefícios à Saúde.....	37
3.7 Microalgas como Fontes Alternativas para alimentação	38
 CAPÍTULO III	41
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	43
 ARTIGO 1 – EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA BIOMASSA DE <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS OU SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	44
RESUMO	45
ABSTRACT	46
1 INTRODUÇÃO.....	47
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Obtenção da biomassa microalgal	48
2.2 Composição proximal	48
2.3 Ponto Isoelétrico das Proteínas.....	48
2.4 Desmineralização da biomassa de <i>Spirulina</i>	49
2.5 Extração Química das Proteínas de <i>Spirulina</i>	49
2.6 Rendimento do processo de Extração	50
2.7 Propriedades Funcionais	51
2.7.1 Solubilidade Protéica	51
2.7.2 Capacidade de Formação de Espuma e Estabilidade de Espuma	51
2.7.3 Análise Térmica.....	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Ponto Isoelétrico das Proteínas de <i>Spirulina</i>	52
3.2 Desmineralização e Extração Química de Proteínas de <i>Spirulina</i>	54
3.3 Composição proximal	55
3.4 Caracterização do Concentrado e do Isolado Protéico de <i>Spirulina</i>	56
3.5 Solubilidade Protéica	58

3.6	Capacidade de Formação e Estabilização de Espuma -----	59
3.7	Estabilidade Térmica -----	62
4	CONCLUSÃO	64
5	REFERÊNCIAS	64

ARTIGO 2 – OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS A PARTIR DE ISOLADOS E CONCENTRADOS PROTÉICOS DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA USO EM ALIMENTOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES

	RESUMO	70
	ABSTRATC	71
1	INTRODUÇÃO	72
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1	Obtenção da biomassa microalgal -----	73
2.2	Composição proximal -----	73
2.3	Extração Química das Proteínas de <i>Spirulina</i> -----	73
2.4	Hidrólise Enzimática -----	75
2.4.1	Hidrólise Enzimática em Erlenmeyer	75
2.4.2	Hidrólise Enzimática em biorreator STR (<i>Stired tank reactor</i>)	76
2.4.3	Determinação do Grau de Hidrólise	76
2.5	Avaliação do valor nutritivo da proteína -----	77
2.5.1	Digestibilidade Protéica <i>in vitro</i> (DPIV)	77
2.6	SOLUBILIDADE PROTÉICA -----	78
2.7	Determinação da massa molecular das proteínas -----	78
2.8	Análise Térmica -----	78
2.9	Determinação da Atividade Antioxidante -----	79
2.9.1	Captura do Radical Livre DPPH	79
2.9.2	Poder Redutor	79
2.9.3	Capacidade Antioxidante Trolox Equivalente (TEAC)	80
2.10	Análise Estatística -----	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1	Composição proximal e Extração de Proteínas -----	80
3.2	Hidrólise Enzimática das Proteínas de <i>Spirulina</i> -----	81
3.3	Massa molecular das proteínas e peptídeos -----	85
3.4	Digestibilidade Protéica <i>in vitro</i> -----	86
3.5	Solubilidade Protéica -----	88
3.6	Estabilidade Térmica -----	91
3.7	Atividade Antioxidante -----	92
4	CONCLUSÃO	95
5	REFERÊNCIAS	96

	CAPÍTULO IV	103
	CONCLUSÃO GERAL	105
	CAPÍTULO V	107

	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
	ANEXO I – Composição do Meio Zarrouk	127

APÊNDICE 1 - SUPLEMENTOS ALIMENTARES: FONTES DE PROTEÍNA TRADICIONAIS E ALTERNATIVAS E SEUS BENEFÍCIOS À SAUDE HUMANA.....	129
RESUMO	130
ABSTRACT	131
1. INTRODUÇÃO.....	132
2. CONCENTRADOS PROTÉICOS	132
3. ISOLADOS PROTÉICOS.....	133
4. HIDROLISADOS PROTÉICOS.....	135
4.1. Hidrolisados Protéicos Lácteos -----	135
4.2. Hidrolisados Protéicos de Pescado -----	135
4.3. Hidrolisados Protéicos de Origem Vegetal -----	136
4.4. Benefícios dos Hidrolisados Protéicos-----	137
4.5. Aplicações dos Hidrolisados Protéicos -----	138
4.5.1. Hidrolisados Protéicos para Suplementação de Atletas.....	140
5. PROTEÍNAS MICROALGAIS COMO NOVOS INGREDIENTES PARA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR.....	140
6. CONCLUSÃO.....	143
7. REFERÊNCIAS	143

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL

Os suplementos alimentares são preparações destinadas a complementar a dieta e fornecer nutrientes como, vitaminas, minerais, fibras, ácidos graxos e proteínas ou aminoácidos, cuja necessidade nutricional não é suprida através da alimentação. A proteína é o principal componente dos alimentos encontrados em formulações para recém-nascidos, crianças em estado de desnutrição, idosos e praticantes de atividade física. Nas últimas décadas, as proteínas solúveis do soro do leite (*whey protein*), nas formas concentrada, isolada e hidrolisada, vêm sendo mais utilizadas devido à sua qualidade nutricional, porém elas estão altamente diluídas na porção aquosa do leite, gerada durante a fabricação do queijo, o que dificulta e encarece sua obtenção e utilização. A soja também é utilizada em suplementos alimentares, pois seus grãos possuem aproximadamente 40 % de proteína, porém é necessário tratamento térmico para eliminação de fatores antinutricionais, sem contar com questões éticas, ambientais e de segurança alimentar ligadas a utilização de soja transgênica. A microalga *Spirulina* apresenta elevado conteúdo protéico em sua biomassa e cerca de 50 % da massa total de proteínas é constituída de aminoácidos essenciais. Além disso, destaca-se por possuir o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*) o que garante o seu uso como alimento ou fármaco. A hidrólise de proteínas de microalgas proporciona rápida absorção e digestão de aminoácidos livres, di e tri-peptídeos resultantes do processo de hidrólise, o que pode favorecer a recuperação muscular de atletas pós-treinamento físico. O objetivo da presente dissertação consiste em utilizar a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 para obtenção de concentrado, isolado e hidrolisados protéicos que possam ser destinados à aplicação em alimentos e/ou suplementos alimentares. A biomassa da microalga foi obtida da planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) localizada em Santa Vitória do Palmar (RS), moída, e suas proteínas foram concentradas e isoladas por precipitação isoelétrica. O concentrado e isolado protéico da microalga foram hidrolisados com protease comercial de *Bacillus licheniformis*, em biorreator agitado com controle automático de temperatura, agitação e pH, conforme condições ótimas da enzima. As propriedades funcionais, valor biológico e a atividade antioxidante dos concentrados, isolados e hidrolisados protéicos de *Spirulina* foram avaliados. Com o método de precipitação isoelétrica, foi possível obter concentrado e isolado protéico de *Spirulina* com 83,9 % e 91,3 % de proteína, respectivamente. A hidrólise enzimática com Protamax 580L, em biorreator STR, proporcionou a obtenção de hidrolisados protéicos com 54,4 %, 66,8 % e 77,9 % de grau de hidrólise. O valor nutritivo, funcional e biológico, avaliados neste trabalho, sugerem a incorporação dos extratos protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18 e seus hidrolisados, como fontes alternativas de proteína, com alegação funcional e de saúde, podendo ser utilizados por praticantes de atividade física, idosos ou indivíduos que necessitem de proteínas.

Palavras-chave: Hidrolisado protéico. Fonte de proteína. *Spirulina*.

PROTEIN CONCENTRATE, PROTEIN ISOLATE AND PROTEIN HYDROLYZATE OBTAINED FROM *Spirulina* BIOMASS

ABSTRACT

Food supplements are preparations intended to supplement the diet and provide nutrients such as vitamins, minerals, fiber, fatty acids and amino acids or proteins, that nutritional need is not supplied through the diet. Protein is the main component of foods found in formulations for newborns, children in a state of malnutrition, elderly and physically active people. In recent decades, soluble whey proteins in concentrated, isolated and hydrolyzed forms, have been used due to their nutritional quality, but they are highly diluted in the aqueous portion of the milk produced during the manufacture of cheese, making it difficult and costly to use. Soybeans are also used in food supplements because their grain possess approximately 40 % of protein, but heat treatment is necessary to eliminate anti-nutritional factors, not including ethical, environmental and food security issues linked to use of transgenic soy. *Spirulina* has high content of protein in its composition and about 50 % of the total mass of proteins consists in essential amino acids. In addition, stands out for having the GRAS certificate (Generally Recognized as Safe) of FDA (Food and Drug Administration) which ensures its use as a food or drug. The hydrolysis of proteins microalgae provides rapid absorption and digestion of free amino acids, di and tri-peptides resulting from the hydrolysis process, which can promote athletes muscle recovery after physical training. The objective is to use the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18 to obtain concentrated, isolated and protein hydrolysates which may be intended for use in food and/or food supplements. The biomass of microalgae was obtained from the pilot plant of Laboratory of Biochemical Engineering (LEB) located in Santa Vitoria do Palmar (RS), milled, and their proteins were concentrated and isolated by isoelectric precipitation. The concentrated and isolated protein from the microalgae were hydrolyzed with commercial protease from *Bacillus licheniformis*, in bench bioreactor with automatic temperature, agitation and pH control, as optimal conditions of the enzyme. The functional properties, biological value and antioxidant activity of concentrates, isolates and hydrolysates protein of *Spirulina* were evaluated. With the isoelectric precipitation method, it was possible to isolate and concentrate protein from *Spirulina* with 83.9 % and 91.3 % protein, respectively. The enzymatic hydrolysis with Protamax 580 L, in bioreactor STR, afforded the obtainment of protein hydrolysates with 54.4 %, 66.8 % and 77.9 % of degree of hydrolysis. The nutritional, functional and biological value, evaluated in this work, suggest the incorporation of protein extracts of *Spirulina* sp. LEB 18 and their hydrolysates, as alternative sources of protein with functional claims and health, that can be used by practitioners of physical activity, elderly or individuals who require protein.

Keywords: Protein hydrolyzed. Source of protein. *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Concentrados protéicos são produtos que passam pela exclusão parcial de carboidratos, sais minerais e outros constituintes de uma matéria-prima, enquanto que isolados protéicos são produtos livres de interferentes, geralmente com mais de 90 % (p/p) de proteína (FONTANA et al., 2009; REGULY, 1983). Os hidrolisados protéicos consistem em uma mistura de aminoácidos livres e pequenos peptídeos que são obtidos pela quebra das ligações peptídicas de uma proteína (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

As proteínas vêm sendo extraídas de fontes vegetais e animais para obtenção desses produtos. Das fontes de origem vegetal, proteínas da soja são as mais utilizadas. Entre as fontes de origem animal, as proteínas do leite, especialmente as do soro, são as mais empregadas, devido às suas propriedades funcionais e valor nutritivo (DEVRIES; PHILLIPS, 2015; VANDENPLAS et al., 2014).

Existem muitos estudos quanto às mudanças causadas pelos processos de extração de proteínas nas propriedades funcionais (YANJUN et al., 2014), e também, estudos de modificação química ou enzimática destinadas à algum fim específico, como obtenção de peptídeos bioativos (ATTAALLAH et al., 2012; CARVAJAL, 2009). Entretanto, novas fontes de proteínas devem ser estudadas para atender a demanda mundial de alimentos (AIKING, 2011).

A utilização da biomassa proveniente do cultivo de microalgas em alimentos se torna cada vez mais atraente em comparação com a produção de proteínas convencionais (CHRONAKIS; MADSEN, 2011). Microalgas são micro-organismos autotróficos, que além de água, requerem apenas luz, dióxido de carbono e nutrientes inorgânicos para o crescimento (RADMER; PARKER, 1994; WOOD; TOERIEN, 1991). Esses requerimentos de baixo custo, aliados com altas taxas de crescimento celular e ampla faixa de condições de cultivo que as microalgas conseguem sobreviver, fazem com que essas sejam uma promissora fonte alternativa de proteínas com significativas vantagens tecnológicas e comerciais (CHRONAKIS; MADSEN, 2011).

A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria que possui elevado teor de proteínas em sua biomassa e é facilmente cultivada, devido à alta produtividade em biomassa (CHRONAKIS; MADSEN, 2011). O elevado número de ribossomos em sua estrutura celular permite maior síntese de proteínas do que a de células vegetais ou animais (BOROWITZKA, 1995). Sua biomassa pode ser utilizada em alimentos por possuir certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*) (FDA, 2003). As proteínas da

microalga *Spirulina* contêm todos os aminoácidos essenciais e seu valor nutritivo é comparável em relação à proteínas convencionais utilizadas na suplementação alimentar, o que as fazem uma potencial alternativa para nutrição humana (BECKER, 2007).

Além do elevado valor nutritivo e propriedades funcionais, que a biomassa de *Spirulina* possui, é possível obter peptídeos a partir da mesma. O processo de hidrólise das microalgas pode gerar peptídeos com atividade biológica, como ação anti-inflamatória (VO; RYU; KIM, 2013), antioxidante (LISBOA, 2013) e hipocolesterolêmica (PAN et al., 2015).

Portanto, o estudo da extração de proteínas da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 é importante para aplicação em alimentos e suplementos alimentares, destinados aos indivíduos que necessitem de uma dieta rica em proteínas. Além disso, a hidrólise enzimática dessas proteínas pode proporcionar melhorias na qualidade funcional, nutricional, além da liberação de peptídeos que podem ser benéficos à saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 para obtenção de concentrado, isolado e hidrolisados protéicos como fonte alternativa de proteína com potencial para aplicação em alimentos ou suplementos alimentares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter proteína concentrada e proteína isolada da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18;
- Obter hidrolisados protéicos das proteínas concentradas e das isoladas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18;
- Determinar as propriedades funcionais e o valor nutritivo do concentrado, do isolado e dos hidrolisados protéicos obtidos;
- Avaliar a atividade antioxidante da proteína concentrada, da isolada e da hidrolisada da biomassa;

CAPÍTULO II

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICROALGAS

Microalgas são micro-organismos fotossintéticos, eucarióticos ou procarióticos, geralmente unicelulares, que crescem em água salgada ou doce e variam quanto à morfologia, podendo alcançar de 3 a 10 µm de comprimento ou diâmetro (GAMAL, 2010; OLAIZOLA, 2003). Tanto microalgas eucarióticas, quanto procarióticas (cianobactérias), são organismos promissores para produção sustentável de insumos do setor alimentício, nutrição animal, indústria química e de combustível (WIJFFELS; KRUSE; HELLINGWERF, 2013).

As algas verde-azuladas ocupam uma posição intermediária entre as bactérias fotossintetizantes e as algas eucarióticas. Elas possuem clorofila e outros pigmentos como ficocianina. Com sua estrutura celular procariótica (parede celular, ribossomos e ácido nucléico), classificam-se, taxonomicamente, dentro do grupo das bactérias (Reino *Procaryotae*), com a denominação de cianobactérias (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005)

Assim sendo, as cianobactérias têm sido chamadas tradicionalmente de microalgas. Algumas dessas cianobactérias, como é o caso da *Spirulina*, fornecem uma grande contribuição na biotecnologia das microalgas (RODRIGUEZ; GUERRERO, 1992). O termo microalga não tem sentido taxonômico, porém incluem-se 2 tipos de micro-organismos: as cianobactérias, que têm estrutura celular procariótica, e as outras microalgas, com estrutura celular eucariótica (GAMAL, 2010).

Entre os grupos de microalgas, as cianobactérias são fontes de compostos bioativos (CHU, 2012). Compostos bioativos de origem microalgal podem ser obtidos de seu metabolismo primário, como proteínas, ácidos graxos, vitaminas e pigmentos ou podem ser sintetizados a partir de metabolismo secundário, originando compostos antimicrobianos, antienzimáticos ou com ação antibiótica (VOLK, 2008).

3.2 *Spirulina*

A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria pertencente ao grupo das *Cyanophytas*, também denominadas algas azuis. Sua organização celular é procariótica, filamentosa, que forma tricomas cilíndricos multicelulares, e se dispõe na forma espiralada (VONSHAK, 1997). Além de água, requer dióxido de carbono, energia luminosa e nutrientes inorgânicos para o crescimento (RADMER; PARKER, 1994; WOOD; TOERIEN, 1991). Reatores abertos do tipo

raceway podem ser utilizados para o cultivo de *Spirulina*, que são economicamente mais viáveis que fotobiorreatores fechados e sua biomassa pode ser separada do cultivo por filtração simples (CHRONAKIS; MADSEN, 2011).

Sua produtividade em biomassa é considerada elevada e a área de cultivo não compete com a de plantas terrestres. Em termos de área de cultivo, o rendimento em proteínas contidas na biomassa pode ser de 20 a 50 vezes maior do que o rendimento de proteínas produzidas por área de cultivo de soja. Estima-se que ao utilizar uma área de 0,4 hectares para o cultivo da microalga é possível obter 10 t de proteína, ao contrário do trigo e do gado, em que pode-se obter apenas 0,16 e 0,016 toneladas de proteína, respectivamente (DARCY-VRILLON, 1993).

Comparando-se com outros alimentos, a *Spirulina* apresenta teores de proteína mais elevados que de peixe (15-20 %), sementes de soja (35 %), ovos (12 %), cereais (8-14 %) e leite integral (3 %) (HENRIKSON, 1994). O elevado número de ribossomos em sua estrutura celular permite maior síntese de proteínas do que a de células vegetais ou animais. A *Spirulina* possui taxa de conversão fotossintética de 8 a 10 %, enquanto a soja possui apenas 3% (BOROWITZKA, 1995).

A biomassa de *Spirulina* vem sendo produzida comercialmente há aproximadamente 30 anos. Cerca de 60 a 70 % de seu peso seco constitui-se de proteína e é rica em vitaminas, especialmente vitamina B12 e pró-vitamina A (β -caroteno) e minerais, especialmente ferro (BELAY; HOUSTON, 2002; MORAIS et al., 2009).

As proteínas presentes em *Spirulina* são, principalmente, ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas aumentam o espectro de captação de luz pela fotossíntese, mas também possuem uma importante função de atuar como reserva de nitrogênio. Em situações de carência de nitrogênio, as proteínas que compõem as ficobiliproteínas são degradadas e os ficobilissomos são eliminados, liberando nitrogênio para os processos metabólicos essenciais (LOURENÇO, 2006). As ficobiliproteínas são classificadas em três grandes grupos: ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004). Entre essas, a ficocianina é a proteína majoritária (PATIL; RAGHAVARAO, 2007).

As proteínas dessa cianobactéria contêm todos os aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, fenilalanina e valina) que representam 47 % do seu peso total seco (DILLON; PHUN; DUBACQ, 1995). Becker (2007) afirmou que as proteínas de *Spirulina* são promissoras como nova fonte de proteína, ao comparar alguns parâmetros de avaliação de valor biológico como coeficiente de digestibilidade, utilização líquida de proteína (NPU) e coeficiente de eficácia protéica (PER) com proteínas convencionais.

Desde 1981 a microalga *Spirulina* foi legalmente aceita pelo FDA (*Food Drug Administration*), como sendo fonte de proteínas, vitaminas e minerais, podendo ser legalmente comercializada como alimento ou complemento alimentar (FOX, 1996).

No mercado, é possível encontrá-la na forma de *tablets*, cápsulas, em pó ou na forma líquida. No entanto, alimentos adicionados de *Spirulina* devem ser sensorialmente mais convenientes e variados, assim, combinando-se aspectos saudáveis e atrativos. Estudos foram realizados a fim de incluir a biomassa em formulações de pão (FIGUEIRA et al., 2011; MARCO et al., 2014), massas (FRADIQUE et al., 2010), pudins (GOUVEIA et al., 2008) e outros alimentos. Para esses produtos, estratégias tecnológicas são empregadas a fim de diminuir os aspectos sensoriais e aumentar sua aceitabilidade.

3.3 PROTEÍNAS

As proteínas são polímeros complexos, formados por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. São formadas de um grande número de unidades fundamentais chamadas de aminoácidos (compostas por 21 aminoácidos diferentes) que estão ligados entre si por ligações peptídicas. Elas possuem fundamental importância para o organismo humano, pois fazem parte de praticamente todos os processos biológicos, como sistema hormonal, enzimático, estrutural, imunológico e nutritivo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Elas representam uma classe variada e heterogênea de macromoléculas, formadas por polipeptídeos de elevada massa molecular. Quimicamente, dividem-se em proteínas simples, constituídas apenas de polipeptídeos, e complexas, ou conjugadas, que contém grupamentos adicionais, como carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. A organização espacial de uma proteína é resultante do tipo de aminoácidos que a compõem e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros (MARZZOCO; TORRES, 2007).

A estrutura de proteínas pode ser desestabilizada por mudanças de pH, temperatura, adição de sais, ação de pressão, forças de cisalhamento, ou até mesmo combinação destas condições. Consequentemente, é de se esperar que as operações durante o processamento de alimentos, como congelamento, desidratação, mistura, agitação, concentração, entre outros, causem alterações na estrutura protéica. No entanto, algumas alterações não são necessariamente indesejáveis, e os processos podem ser controlados de forma a modificar intencionalmente a estrutura e funcionalidade das proteínas. Mudanças químicas e enzimáticas também podem ser citadas como técnicas de modificação intencional das propriedades que as proteínas conferem em alimentos (YADA, 2004).

Todas as proteínas biologicamente produzidas podem ser utilizadas como proteínas alimentares. Entretanto, para efeitos práticos, as proteínas alimentares podem ser definidas como aquelas que apresentam fácil digestão, são atóxicas, adequadas, no aspecto nutricional, funcionalmente utilizáveis em produtos alimentícios e disponíveis em abundância. Devido ao aumento crescente da população mundial, fontes alternativas de proteínas para a alimentação humana precisam ser desenvolvidas para atendimento de demandas futuras. No entanto, a adequação dessas novas fontes de proteínas para uso em alimentos depende de seu custo e de sua capacidade de cumprir a função normal dos ingredientes protéicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.3.1 Propriedades Funcionais de Proteínas

As propriedades funcionais de proteínas são propriedades físico-químicas que lhes permitem contribuir para as características desejadas de um alimento, interferindo na qualidade e atributos sensoriais do mesmo (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). Elas podem ser classificadas em hidrofílicas, afinidade com a água; interfásicas, capacidade das moléculas de proteína se unirem formando uma película entre duas fases imiscíveis; intermoleculares, capacidade de formarem ligações entre si ou com outros componentes dos alimentos; reológicas, dependem de características físicas e químicas específicas das proteínas; e organolépticas, manifestam-se através dos órgãos dos sentidos, referindo-se a textura, cor, sabor e aroma (SGARBIERI, 1996).

Devido às propriedades funcionais que as proteínas desempenham em sistemas alimentícios, elas vêm sendo extraídas de fontes vegetais e animais para obtenção de concentrados e isolados protéicos destinados à aplicação em alimentos (SCHUTYSER; VANDER GOOT, 2011). O Quadro 1 apresenta as principais propriedades funcionais das proteínas relacionadas a sua aplicação em alimentos.

A solubilidade é uma propriedade físico-química fundamental das proteínas, classificada como uma propriedade funcional, pela importância que essa propriedade exerce sobre a funcionalidade das proteínas nos alimentos (SGARBIERI, 1996). De acordo com (DAMODARAN, 1996), a solubilidade de uma proteína é uma manifestação termodinâmica do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente. A funcionalidade das proteínas é frequentemente afetada pela solubilidade protéica, sendo que as propriedades espumantes, emulsificantes e gelificantes são as mais afetadas. Proteínas insolúveis possuem aplicação limitada em alimentos.

Quadro 1 - Propriedades funcionais das proteínas e exemplos de suas aplicações tecnológicas em alimentos

Propriedade	Aplicação	Fonte de Proteína
Solubilidade	Bebidas	Soro de leite
Formação e estabilidade de espuma	Coberturas, bolos, sorvetes, sobremesas	Ovo, leite
Emulsificação	Salsicha, sopa, molhos	Carne, leite, ovo
Absorção de água	Salsicha, massa	Carne, ovo
Absorção de gordura	Mortadela, salsicha, linguiças, patês	Carne
Viscosidade	Sopas, molhos, sobremesa	Gelatina
Coesão	Carne, salsicha, massa	Carne, ovo, soro de leite

Fonte: adaptado de (ARAÚJO, 2004; CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989)

As propriedades de formação de espuma referem-se a sua capacidade de formar uma película fina e resistente na interface gás-líquido, de modo que grandes quantidades de bolhas de gás possam ser incorporadas e estabilizadas. As espumas consistem de uma fase contínua aquosa e uma fase dispersa gasosa (ar). Em geral, a formação de bolhas ou o ato de bater ou agitar uma solução proteica criam espumas estabilizadas por proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.4 FONTES DE PROTEÍNA E SUPLEMENTOS PROTÉICOS CONVENCIONAIS

Os suplementos nutricionais ou alimentares podem ser definidos como fontes concentradas de nutrientes ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, comercializados com o objetivo de complementar a dieta tradicional (CE, 2002). A classificação de acordo com a legislação para suplementos varia entre os países. No Brasil, a categoria "suplemento alimentar" não existe, e estes produtos são colocados em outras categorias de alimentos, tais como alimentos para atletas (BRASIL, 2010), suplementos de vitaminas e/ou minerais (BRASIL, 1998a), alimentos com propriedades funcionais ou alegações de saúde (BRASIL, 1999a) e alimentos para fins especiais (BRASIL, 1998b), ou novos alimentos ou ingredientes (BRASIL, 1999b), cujas definições são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Algumas definições de alimentos baseadas na legislação brasileira

Categoria	Definição legal	Legislação
Alimentos para atletas	Alimentos especialmente formulados para auxiliar os atletas a atender suas necessidades nutricionais específicas e auxiliar no desempenho do exercício. Ex.: suplemento protéico; para substituição parcial de refeições; de creatina; de cafeína; de aminoácidos.	RDC 18/2010
Alimentos com propriedades funcionais ou alegações de saúde	Propriedade funcional: relativo ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano; Alegação de saúde: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.	RDC 18/1999
Novos alimentos e novos ingredientes	Alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas, e que, entretanto, venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular.	RDC nº16/1999
Substâncias Bioativas e Probióticos com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde	Substância Bioativa: além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica; Probiótico: micr-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.	RDC nº2/2002

As proteínas e aminoácidos estão entre os alimentos e suplementos alimentares mais utilizados, na forma de concentrados, isolados e hidrolisados protéicos (ALVES; LIMA, 2009). De modo a serem utilizadas como ingredientes na indústria de alimentos, as proteínas podem ser concentradas ou isoladas por diversos métodos. Os métodos de concentração de proteínas incluem: centrifugação, baseada na diferença de densidade; separação por membranas, baseada

na diferença de tamanho; troca iônica, baseada na diferença de carga; cromatografia por afinidade, baseada em ligação específica com uma matriz (BRANS et al., 2004).

3.4.1 Concentrados Protéicos

Os concentrados protéicos são produtos que passam pela exclusão parcial de carboidratos, sais minerais e outros constituintes não protéicos de uma matéria-prima (BRANS et al., 2004). Os mais conhecidos são os concentrados de soro de leite (*Whey Protein Concentrate* ou WPC), soja (*Soy Protein Concentrate* ou SPC) e pescado (*Fish Protein Concentrate* ou FPC) (FONTANA et al., 2009).

O WPC é um subproduto da indústria de laticínios obtido através da produção de queijos e existe no mercado em concentrações protéicas que variam de 35 a 80 %, sendo classificado de acordo com o seu percentual de proteína (BALDASSO, 2008). OS concentrados de proteínas de leite, assim como seus isolados protéicos são conhecidas por apresentarem qualidade elevada. Esses ingredientes protéicos são comumente vendidos em forma de pós, e oferecem versatilidade na indústria de bebidas, conferindo sabor, funcionalidade e propriedades nutricionais a esses alimentos (MULVIHILL; ENNIS, 2003).

A soja é o grão mais conhecido para obtenção de concentrado protéico de origem vegetal. Segundo o *Codex Alimentarius* (CODEX, 1989), o concentrado protéico de soja deve conter entre 65 e 90 % de proteína em sua composição. Concentrado protéico de pescado (CPP) ou *fish protein concentrate* (FCP), sigla adotada pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) para registro do produto comercial, é um produto estável, de alto teor protéico. Em geral, eles não são consumidos diretamente, sendo utilizados como matéria-prima para elaboração de produtos de elevado valor agregado (FONTANA et al., 2009).

Os principais inconvenientes na utilização de proteínas de soja são compostos de sabor e aroma fortes e de açúcares (estaquiose e rafinose) causadores de flatulência, assim, os métodos de extração de proteínas visam a eliminação desses compostos, no entanto, alguns minerais também são extraídos. Por consequência o teor de proteínas e fibras é aumentado (LUSAS; RIAZ, 1995). Existem estudos de concentrados protéicos que podem ser obtidos por outras fontes de vegetais, como de ervilha (PELGROM et al., 2013) e batata (MIEDZIANKA et al., 2014), geralmente em substituição aos concentrados protéicos utilizados para alimentação animal.

3.4.2 Isolados Protéicos

De acordo com Reguly (1983), o isolamento de proteína é basicamente um processo de extração o qual visa obter um produto livre de interferentes. Isolados protéicos são aqueles produtos que apresentam teores de proteínas superiores a 90 %. Da mesma forma que os concentrados protéicos, os isolados protéicos são obtidos de diversos alimentos, tais como leite, soja ou pescado. Estes isolados podem ser utilizados como ingrediente em produtos para consumo humano direto. Os mais conhecidos são os isolados protéicos do soro de leite (*Whey Protein Isolate* ou WPI), de soja (*Soy Protein Isolate* ou SPI) e de pescado (*Fish Protein Isolate* ou FPI) (FONTANA et al., 2009).

O WPI é a forma comercial mais pura das proteínas do soro, contém entre 80 e 95 % de proteína e quantidades muito pequenas de gorduras e lactose, podendo ser isento desses componentes (BRANS, 2006). Os SPI, geralmente produzidos por precipitação isoelétrica, são amplamente utilizados em alimentos devido ao elevado conteúdo de proteína (maior que 90 %) e versatilidade funcional (FANG; YU; BADGER, 2004). Os FPI contêm principalmente proteína miofibrilar extraída do músculo do pescado, além de lipídeos de membrana, dependendo do processamento em que são submetidos (HULTIN et al., 2005).

3.5 HIDROLISADOS PROTÉICOS

Os hidrolisados protéicos consistem em uma mistura de aminoácidos livres e pequenos peptídeos que são obtidos pela quebra das ligações peptídicas de uma proteína. Os hidrolisados protéicos são obtidos através de hidrólise química (hidrólise ácida ou alcalina) ou enzimática de proteínas. A hidrólise enzimática destaca-se por apresentar maiores benefícios e vantagens em relação à modificação química. Enzimas possuem maior especificidade com o substrato, diminuindo a probabilidade de ocorrerem reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos tóxicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A hidrólise enzimática da proteína resulta em diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos protegidos na estrutura original da proteína (ROMAN; SGARBIERI, 2005). Com isso, é possível aumentar o aproveitamento nutricional de proteínas. Os hidrolisados protéicos ricos em di e tri-peptídeos são mais facilmente digeridos e absorvidos pelo organismo do que proteínas intactas (NIELSEN; OLSEN, 2002).

Peptídeos introduzidos na dieta podem ser importantes, no sentido de propiciar melhor utilização das proteínas, principalmente em determinadas situações como para indivíduos com intolerância alimentar, nos casos de deficiência enzimática (JAKOBSSON et al., 2000). A suplementação com proteínas hidrolisadas pode contribuir no combate à desnutrição e aumentar a absorção de nitrogênio por indivíduos que possuam função intestinal prejudicada (FRENHANI; BURINI, 1999; LEE et al., 2015).

Na indústria de alimentos, os hidrolisados protéicos são utilizados para fins especiais como suplementação dietética de idosos (PENNING et al., 2011) crianças que apresentam alergia à proteína intacta, crianças com diarreia aguda ou crônica, intolerâncias alimentares (PENTERICH et al., 2010) ou erro inato de metabolismo, como a fenilcetonúria (BIZZOTO et al., 2006), bem como em dietas para controle de peso (AIHARA; OSAKA; YOSHIDA, 2014; LILLEFOSSE et al., 2013) e nutrição de esportistas (DÉCOMBAZ, 2004; MOBLEY et al., 2015).

Dependendo da estrutura, composição e sequência, os peptídeos gerados pela hidrólise das proteínas podem apresentar bioatividade como atividade antioxidante, anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, antibacteriana e imunomodulatória (HARTMANN; MEISEL, 2007).

A atividade antioxidante está associada aos peptídeos presentes em determinadas sequências da proteína, sendo que sua atividade baseia-se na respectiva composição e sequência dos resíduos de aminoácidos (COSTA; GONTIJO; NETTO, 2007). Estes peptídeos com atividade antioxidante além de serem úteis para a saúde dos indivíduos também podem ser utilizados como antioxidantes naturais para a conservação de alimentos (NEVES; CAMPOS; MAEQUEZ, 2006).

Alguns estudos, como o de Oseguera-Toledo et al. (2011) sugerem que com o isolamento das proteínas previamente à hidrólise é possível aumentar a atividade antioxidante e anti-inflamatória.

3.6 ALIMENTOS ANTIOXIDANTES E BENEFÍCIOS À SAÚDE

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres formados a partir do estresse oxidativo estão fortemente associados com o surgimento de doenças crônicas como câncer, doenças cardíacas e mal de Alzheimer (ZHOU et al., 2012). Os níveis de ROS, *in vivo*, são controlados por enzimas antioxidantes como a glutational peroxidase, catalase, superóxido dismutase, ou por antioxidantes não enzimáticos tais como vitamina C e E. A ação dos antioxidantes pode reduzir a formação de moléculas oxidadas, como proteínas e lipídeos, e

assim ajudar a prevenir o desenvolvimento de doenças (WOJCIK; BURZYNSKA-PEDZIWIATR; WOZNIAK, 2010).

O consumo de uma dieta rica em antioxidantes tem sido sugerido como benéfico para a saúde humana. Consequentemente, uma ampla variedade de produtos naturais estão sob investigação quanto ao seu potencial clínico, tanto para tratamento quanto prevenção de doenças (WOJCIK; BURZYNSKA-PEDZIWIATR; WOZNIAK, 2010). Consumir antioxidantes de fontes naturais se torna altamente efetivo para promover a saúde por aumentar o sistema antioxidante natural do organismo. Esses antioxidantes também são úteis em sistemas alimentícios por retardarem a peroxidação lipídica, o que ajuda na manutenção do valor nutritivo e dos aspectos de sabor, aroma e cor dos alimentos (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Produtos alimentícios com atividade antioxidante, assim como, compostos bioativos purificados estão sendo estudados na incorporação desses em formulações de alimentos e suplementos alimentares (ALMEIDA et al., 2011). Diversos peptídeos de proteínas alimentícias têm sido investigados por possuírem capacidade antioxidante. Peptídeos antioxidantes de alimentos são considerados como sendo compostos seguros e de saúde. Eles apresentam vantagens em relação aos antioxidantes enzimáticos, por serem mais estáveis em diferentes sistemas biológicos. Além disso, apresentam propriedades nutricionais e funcionais além da atividade antioxidante (XIE et al., 2008).

3.7 MICROALGAS COMO FONTES ALTERNATIVAS PARA ALIMENTAÇÃO

O interesse na pesquisa por novas fontes protéicas não convencionais para aplicação na indústria alimentícia é cada vez maior. Fontes alternativas de proteínas vêm sendo estudadas para garantir o desenvolvimento sustentável de alimentos. Novas fontes de proteína, para serem utilizadas como ingredientes protéicos, são mais aceitas pela indústria se possuírem excelentes propriedades tecnológicas/funcionais e se estiverem disponíveis a custo apropriado (SCHWENZFEIER et al., 2013).

Nos últimos anos, a biomassa de microalgas tem sido proposta como fonte alternativa devido a seu elevado conteúdo de proteínas (GARCÍA; FERNÁNDEZ; SEVILLA, 2012). Microalgas como *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis* possuem elevado teor de proteínas (em torno de 50 %).

Ursu et al. (2014) estudaram o método de extração de proteínas de *Chlorella vulgaris* por precipitação isoelétrica associada com ultrafiltração. Esses autores avaliaram o concentrado

protéico quanto à sua ação emulsificante e obtiveram melhores resultados em comparação com emulsificantes comerciais como o caseinato de sódio.

Schwenzfeier et al. (2013) estudaram a capacidade de formação de espuma de isolado de proteína solúvel de *Tetraselmis* sp. em função da concentração do isolado, pH e força iônica. Comparando os resultados com isolado protéico de soro de leite e albumina de clara de ovo, para avaliar as propriedades funcionais do isolado microalgal em referência aos agentes espumantes comumente utilizados em alimentos, encontraram melhores resultados para os isolados de microalga.

A hidrólise enzimática de polímeros celulares de algas verdes tem sido descrita como um método promissor para melhorar a digestibilidade protéica e para obter um produto equilibrado de proteína destinado à alimentação humana (WANG; ZHANG, 2012). Lisboa (2013) estudou a digestibilidade de hidrolisados protéicos de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina* sp. LEB 18 e obteve melhores resultados comparados às biomassas não hidrolisadas.

As proteínas de fontes microalgais vêm sendo hidrolisadas não só para melhorar os aspectos de absorção e digestibilidade, mas também para obtenção de compostos que apresentam benefícios à saúde. Sheih, Fang e Wu (2009) hidrolisaram a biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* com pepsina e obtiveram peptídeos capazes de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), importante para o tratamento de hipertensão arterial, e uma variedade de radicais livres, incluindo radical hidroxil, superóxido e radical peroxil (SHEIH; WU; FANG, 2009). Peptídeos com atividade inibidora de ECA também foram encontrados em proteínas hidrolisadas de *Nannochloropsis oculata* (SAMARAKOON et al., 2013). Mais recentemente, peptídeos de *Spirulina platensis* com atividade inibidora de ECA estão sendo reportados (PAN et al., 2015).

Vo, Ryu e Kim (2013) purificaram peptídeos com ação anti-inflamatória, verificada em células endoteliais, obtidos através de hidrólise da biomassa de *Spirulina maxima* com enzimas digestivas tripsina, quimotripsina e tirosina. Sheih et al. (2010) foram os primeiros pesquisadores a estudar a ação anticancerígena de peptídeos de microalgas e segundo esses autores, o efeito de inibição e parada do ciclo de células cancerígenas dos peptídeos da microalga *Chlorella vulgaris* é maior do que o de peptídeos de soja, peixe, leite e carne bovina.

A microalga *Spirulina*, por exemplo, pode alcançar até 70 % de proteínas na sua composição (MORAIS et al., 2009). Lisboa et al. (2014) estudaram as condições de hidrólise da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e obtiveram 52,9 % de grau de hidrólise. Os autores concluíram que os hidrolisados *Spirulina* podem ser utilizados como ingredientes para

formulação de alimentos para indivíduos com intolerância alimentar, devido ao elevado grau de hidrólise.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O trabalho proveniente do desenvolvimento desta dissertação foi dividido em 2 artigos científicos e 1 artigo de revisão em apêndice (Apêndice I). O primeiro artigo aborda o estudo de como foram obtidos o concentrado e isolado protéico de *Spirulina*. No segundo artigo, estão inseridos o estudo da obtenção de hidrolisados protéicos e caracterização nutricional e funcional para aplicação em alimentos. O artigo de revisão faz uma abordagem sobre fontes de proteínas convencionais existentes e inserindo as proteínas de *Spirulina* neste contexto.

Artigo 1 – “Extração de proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 para aplicação em alimentos ou suplementos alimentares”

Artigo 2 – “Obtenção de hidrolisados a partir de isolados e concentrados protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18 para uso em alimentos ou suplementos alimentares”

Apêndice I – “Suplementos Alimentares: fontes de proteína tradicionais e alternativas e seus benefícios à saúde humana”

**ARTIGO 1 – EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18
PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS OU SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

RESUMO

Novas fontes de proteína devem ser estudadas a fim de atender a demanda mundial de alimentos. A biomassa da microalga *Spirulina* é rica em proteínas e pode ser utilizada como alimento por possuir certificado GRAS. Portanto a extração de suas proteínas se faz interessante a fim de obter concentrado e isolado protéico, sendo necessário o estudo das alterações nas propriedades funcionais dos produtos obtidos e assim compará-los com ingredientes tradicionais, principalmente proteínas do leite e soja. Tendo isso em vista, o objetivo do trabalho foi obter concentrado e isolado protéico de *Spirulina* sp. LEB 18 e avaliar as mudanças causadas pelo processo de extração nas propriedades funcionais. A extração das proteínas foi realizada quimicamente através de solubilização em pH 11 com adição de NaOH 1 mol.L⁻¹ e precipitação em pH 4,2. Com esse processo, foi possível obter concentrado protéico com 83,9 % de proteína e isolado protéico com 91,3 % de proteína. A solubilidade, capacidade de formação e estabilização de espuma e estabilidade térmica da biomassa de *Spirulina*, concentrado e isolado protéico foram avaliados. A extração das proteínas da microalga possibilitou o aumento da solubilidade protéica e da estabilidade de espuma, chegando a alcançar aproximadamente 90 % de solubilidade. Além disso, a temperatura de desnaturação das proteínas dos extratos (107 e 97 °C) foi maior do que da biomassa de *Spirulina* (69 °C), o que possibilita que esses possam ser utilizados em alimentos que necessitem de tratamento térmico. Estes resultados demonstram a possibilidade de aplicação do concentrado e do isolado protéico de *Spirulina* sp. LEB 18 como ingredientes em alimentos àqueles indivíduos que necessitam de proteína, uma vez que, estes possuem mais que 80 e 90 % de proteína, respectivamente, e além disso proporcionam benefícios tecnológicos, devido às suas propriedades funcionais.

Palavras-chave: Microalga. Propriedades funcionais. Suplemento protéico.

PROTEIN EXTRACTION FROM THE BIOMASS OF *Spirulina* sp. LEB 18 FOR USE IN FOOD OR FOOD SUPPLEMENTS

ABSTRACT

New sources of protein should be studied in order to supply the global demand for food. The biomass of the *Spirulina* microalgae is rich in protein and can be used as food by having GRAS certified. Therefore, the extraction of proteins becomes interesting to obtain protein concentrate and isolated, being necessary the study of the changes in the functional properties of the thus obtained products and to compare them with traditional ingredients, mainly milk proteins and soy. With that in sight, the objective of this work was to extract protein from *Spirulina* sp. LEB 18 to get protein isolate and protein concentrate and verify changes caused by the extraction process in the functional properties. The extraction of the proteins was accomplished chemically by solubilizing proteins at pH 11 with addition of NaOH 1 mol.L⁻¹ and precipitation, with HCl 1 mol.L⁻¹, at pH 4,2. With this process, it was possible to obtain protein concentrate with 83.9% of protein and protein isolated with 91.3 % protein. The solubility and the ability to form and stabilize foam and thermal stability of the *Spirulina* biomass, its protein isolate and its concentrate were evaluated. The extraction of microalgae proteins enabled the increased protein solubility and foam stability, reaching approximately 90 % of solubility. Furthermore, the denaturation temperature of the protein extracts (107 e 97 °C) were higher than that of *Spirulina* biomass (69 °C), which enables these to be used in foods that require heat treatment. These results demonstrate the possibility of applying protein concentrate and isolated from *Spirulina* sp. LEB 18 as ingredients in foods for those individuals who need protein supplements, since these have more than 80 and 90 % of protein, respectively, and moreover provide technological benefits, due to their functional properties.

Keywords: Functional properties. Microalgae. Protein supplement.

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são essenciais à saúde por serem fonte de aminoácidos necessários ao organismo humano além de possuírem uma variedade de propriedades estruturais e funcionais, que desempenham elevada influência sobre a qualidade sensorial de alimentos (YADA, 2004). Paralelamente a isso, os aspectos nutricionais e funcionais de proteínas devem ser considerados nos processos de extração protéica, para o desenvolvimento de produtos alimentícios nutracêuticos/funcionais para alimentação humana (MATAK; TAHERGORABI; JACZYNSKI, 2015).

Devido às propriedades funcionais que as proteínas desempenham em sistemas alimentícios, elas vêm sendo extraídas de fontes vegetais e animais para obtenção de concentrados e isolados protéicos. A extração de proteínas de matrizes celulares pode ocasionar alteração de propriedades funcionais, como solubilidade, provocada pela desnaturação da proteína sob condições extremas (ácida ou alcalina e de aquecimento) que possam ser aplicadas durante o processamento (SCHUTYSER; VAN DER GOOT, 2011).

As proteínas de soro de leite e soja são mais tradicionalmente extraídas para obtenção de concentrados e isolados protéicos, que são utilizados em suplementação alimentar, porém apresentam algumas desvantagens econômicas, tecnológicas e ambientais (BRANS et al., 2004; FISCHER, 2006). Além disso, novas fontes de proteína devem ser estudadas para atender a demanda mundial de alimentos (AIKING, 2011).

Novas fontes de proteína, para serem usadas como ingredientes protéicos, são mais aceitas pela indústria de alimentos se possuírem boas propriedades tecnológicas/funcionais e estarem disponíveis a baixo custo (SCHWENZFEIER et al., 2013). As microalgas vem sendo reportadas como novas fontes de proteínas por apresentarem diversas vantagens tecnológicas e comerciais, pois possuem altas velocidades de crescimento celular, condições de cultivo de baixo custo, além de não competirem com áreas destinadas à produção de alimentos (CHRONAKIS; MADSEN, 2011; RADMER; PARKER, 1994).

A microalga *Spirulina* apresenta elevado teor de proteína em sua biomassa (60 a 70 %) e pode ser utilizada em alimentos por possuir certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*) (BELAY; HOUSTON, 2002; FOX, 1996). As proteínas microalgais apresentam valor nutritivo, muitas vezes, superior ao de proteínas convencionais utilizadas em suplementos alimentares, em termos de conteúdo protéico e teor de aminoácidos essenciais (INDERGAARD; MINSAAS, 1991; IZYDORCZYK; BILIADERIS, 2000).

Portanto, a elaboração de concentrados e isolados protéicos de *Spirulina*, então, se torna interessante. O objetivo deste trabalho foi obter concentrado e isolado protéico de *Spirulina* sp. LEB 18 e avaliar as mudanças causadas pelo processo de extração nas propriedades funcionais, para que esses possam ser utilizados em alimentos ou suplementos alimentares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada com meio Zarrouk em tanques abertos do tipo *raceway* em condições ambientais (ZARROUK, 1966), foi utilizada para realização desse estudo. Esta microalga, isolada por Moraes et al. (2008), foi produzida na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada as margens da Lagoa Mangureira (33° 30' 13"S e 53° 08' 59" W) na cidade de Santa Vitória do Palmar, Brasil. A biomassa foi seca e moída em moinho de bolas (Modelo Q298, QUIMIS) até atingir diâmetro de partícula igual a 0,125 mm (Tyler 115).

2.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

A determinação do teor de proteína total, cinzas e umidade foi realizada segundo métodos descritos pela AOAC (2000). O fator de conversão utilizado para a determinação da quantidade de proteína foi 5,95 de acordo com López et al. (2010). O teor de lipídeos foi determinado segundo método de Folch, Lees e Stanley (1957) adaptado por Colla (2002). Os carboidratos foram determinados pelo método de Dubois et al. (1956).

2.3 PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS

O ponto isoelétrico das proteínas foi determinado por titulação potenciométrica (HARRIS, 2012) utilizando HCl 0,1 mol.L⁻¹. O extrato microalgal foi preparado com 0,5 g de biomassa diluída em 10 mL de água destilada, submetido à rompimento celular em sonda ultrassônica de 60 hz (Cole Parmer, CV18, EUA) por 10 min em ciclos de 59 s (59 s ligada e 59 s desligada).

2.4 DESMINERALIZAÇÃO DA BIOMASSA DE *Spirulina*

Alguns testes foram realizados (Quadro 1), a fim de reduzir o teor de cinzas e aumentar o teor de proteínas nas etapas de obtenção dos extratos protéicos de *Spirulina*. As suspensões foram submetidas à homogeneização em agitador magnético por 5 min e centrifugação (Hitachi, CT6EL, Japão) a 15200 g por 30 min. A biomassa precipitada, proveniente de cada teste, foi congelada a -70 °C (New Brunswick Scientific, U535-86 Innova®, EUA) por 24 h e liofilizada durante 48 h (Labconco, 7753040, EUA). O conteúdo de proteínas e cinzas da biomassa após os testes foi determinado por método da AOAC (2000), sendo o fator de conversão de nitrogênio em proteínas igual a 5,95.

Quadro 1 - Testes de desmineralização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

Teste	Descrição
1	Biomassa de <i>Spirulina</i> não desmineralizada
2	Biomassa de <i>Spirulina</i> dispersa em água destilada 1:20 (p/v)
3	Biomassa de <i>Spirulina</i> dispersa em água destilada 1:10 (p/v)
4	Biomassa de <i>Spirulina</i> dispersa em água destilada 1:20 (p/v) com ajuste de pH no ponto isoelétrico (HCl 1 mol.L ⁻¹)
5	Biomassa de <i>Spirulina</i> dispersa em tampão citrato 1:20 (p/v) 0,1 mol.L ⁻¹ pH 4,2

2.5 EXTRAÇÃO QUÍMICA DAS PROTEÍNAS DE *Spirulina*

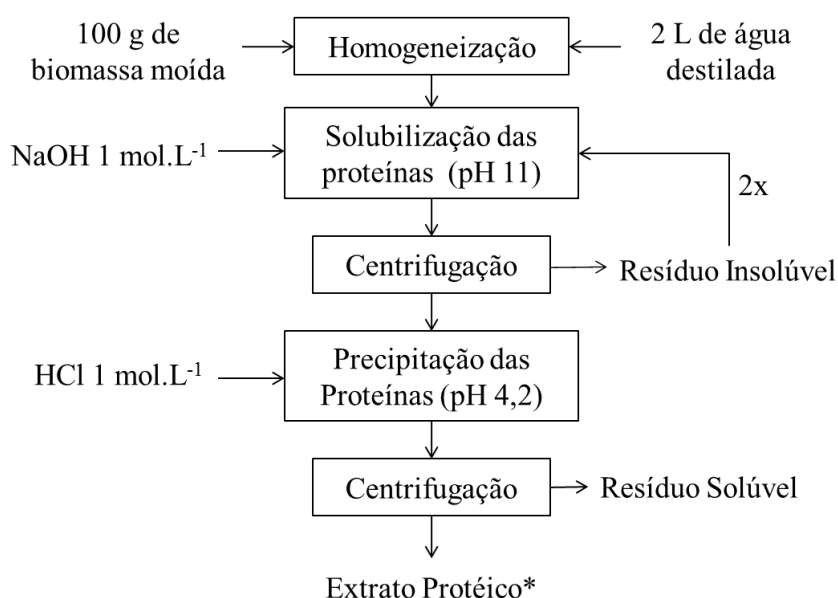
Com o conhecimento do ponto isoelétrico das proteínas da microalga, o processo de extração química por mudança de pH foi empregado, segundo método de Furtado (2013) com modificações, de acordo com a Figura 1. A biomassa da microalga e as biomassas provenientes dos testes de desmineralização foram homogeneizadas com água destilada em dispersor ultra turrax (Ika, T25, Alemanha), na proporção 1:20 (p/v) empregando-se NaOH 1 mol.L⁻¹ até pH 11 (LISBOA, 2013), separando-se as proteínas solúveis e fração insolúvel após centrifugação (15.200 g por 30 min) (Hitachi, CR22GIII, Japão).

As proteínas solúveis foram submetidas à precipitação isoelétrica (pH 4,2) com HCl 1 mol.L⁻¹ por 15 min em homogeneizador ultra turrax. Após centrifugação, as proteínas precipitadas foram congeladas a temperatura de -70 °C por 24 h em ultrafreezer, liofilizadas por

48 h e armazenadas à temperatura ambiente. De modo a aumentar o rendimento do processo, a fração insolúvel proveniente da primeira centrifugação foi ressuspensa e submetida a solubilização alcalina por mais duas vezes.

O teor de proteínas do extrato protéico obtido foi determinado por micro-Kjeldahl (AOAC, 2000). O extrato com teor de proteínas superior a 80 % foi denominado de Concentrado Protéico de *Spirulina*. A fim de obter um extrato com teor de proteína superior à 90 %, o processo de extração de proteínas foi realizado novamente, utilizando-se como matéria-prima o concentrado protéico obtido da primeira extração. Este extrato então foi denominado de Isolado Protéico de *Spirulina*.

Figura 1 - Fluxograma de extração de proteínas por precipitação isoeletrica



*Extrato protéico denominado de Concentrado Protéico de *Spirulina* (≥ 80 % de proteína), utilizado para obtenção do Isolado Protéico de *Spirulina* (≥ 90 % de proteína) através da repetição do processo de extração.

2.6 RENDIMENTO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

O rendimento em massa do processo (η) foi calculado considerando a massa seca de *Spirulina* sp. LEB 18 inicial e a massa do concentrado e/ou isolado protéico ao final do processo, como mostra a Equação (1). O rendimento de extração protéica (REP) foi calculado conhecendo-se o teor de proteínas inicial e final obtidos, como apresentado na Equação (2).

$$\eta (\%) = \frac{m_{\text{extrato protéico}}}{m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{REP (\%)} = \frac{m_{\text{extrato protéico}} \times P_{\text{extrato protéico}}}{m_{\text{biomassa}} \times P_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (2)$$

Em que: $m_{\text{extrato protéico}}$ = massa final de extrato protéico obtida (g); m_{biomassa} = massa inicial de biomassa (g); $P_{\text{extrato protéico}}$ = concentração de proteínas final obtido (%); P_{biomassa} = concentração inicial de proteínas da biomassa (%).

2.7 PROPRIEDADES FUNCIONAIS

2.7.1 Solubilidade Protéica

A solubilidade das proteínas da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e dos extratos protéicos foi determinada através da método de Morr et al. (1985) em pH 3, 4, 7, 10 e 11. Amostras de 500 mg foram ressuspensas em 2 mL de NaCl 0,1 mol.L⁻¹ sob agitação. Após total dispersão da amostra, 40 mL de solução tampão em pH correspondente foi adicionado e deixado sob agitação por 45 min. Em seguida, volume foi completado em balão volumétrico de 50 mL e a suspensão foi centrifugada a 660 g por 30 min. A concentração de proteína solúvel foi determinada (LOWRY et al., 1951) e a solubilidade protéica calculada utilizando-se a Equação (3).

$$\text{PS (\%)} = \frac{\text{PSS} \times 50}{m_{\text{amostra}} \times (P_{\text{total}} / 100)} \times 100 \quad (3)$$

Em que: PSS = concentração de proteínas solúveis no sobrenadante (mg.mL⁻¹); m_{amostra} = massa da amostra (mg); P_{total} = concentração de proteína na amostra (%).

As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de significância de 5 %.

2.7.2 Capacidade de Formação de Espuma e Estabilidade de Espuma

A capacidade de formação de espuma (CFE) e a estabilidade de espuma (EE) foram determinadas pelo método de Miller e Groninger (1976). Soluções com 2 % (p/v) de amostra em água destilada foram preparadas em proveta graduada e agitadas com homogeneizador de alta velocidade (Ika, T25, Alemanha) por 1 min a 9000 rpm. A estabilidade da espuma foi

avaliada à temperatura ambiente (25 °C) pelo acompanhamento do volume total após intervalos de 5, 10, 15, 30 e 60 min de repouso das amostras. As Equações (4) e (5) correspondem a capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma, respectivamente.

$$\text{CFE (\%)} = \frac{\text{VE}}{\text{V}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{VE}_{\text{tempo t}}}{\text{VE}} \times 100 \quad (5)$$

Em que: VE = volume de espuma (mL); $\text{V}_{\text{inicial}}$ = volume da solução antes da agitação (mL); $\text{VE}_{\text{tempo t}}$ = volume de espuma remanescente após intervalo de tempo t (mL).

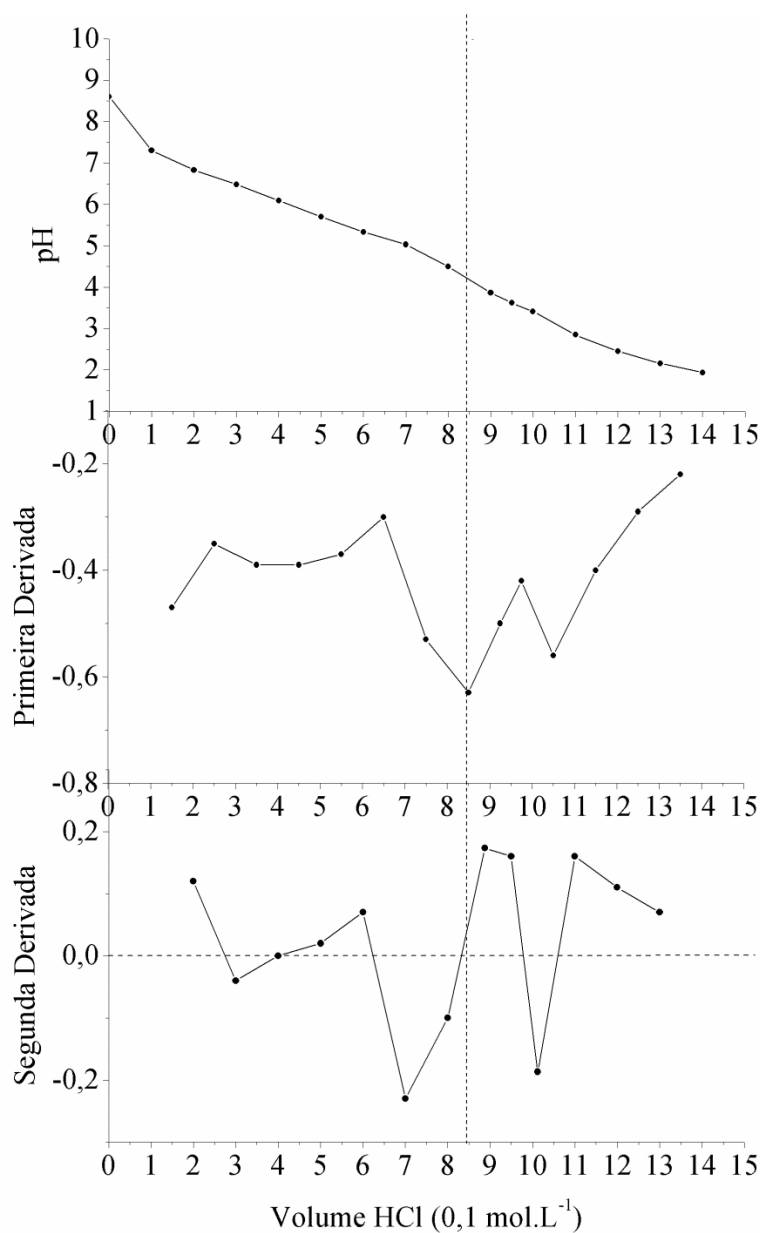
2.7.3 Análise Térmica

As temperaturas de desnaturação (T_d) e entalpia de desnaturação (ΔH) de *Spirulina* sp. LEB 18 e de seus extratos protéicos foram determinadas por calorimetria exploratória diferencial (Shimadzu, DSC-60, Japão) segundo a método proposto por Meng e Ma (2001). Amostras de 3 a 5 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio, selados hermeticamente, submetidos à taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, de 30 a 240 °C, sob atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 mL.min⁻¹. Os termogramas foram analisados através do *software* Ta60 2.20 (Shimadzu Corporation).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS DE *Spirulina*

O ponto isoelétrico é considerado como ponto em que a inclinação da curva de titulação é máximo e a derivada segunda é zero. O ponto de maior inclinação, determinado pelo cálculo da primeira derivada, e em que a segunda derivada é zero, foi observado quando utilizou-se 8,5 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹, que corresponde ao pH 4,2 (Figura 2). Logo o ponto isoelétrico foi estimado em pH igual a 4,2.

Figura 2 - Titulação potenciométrica da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

O ponto isoelétrico é influenciado pela presença de todos os aminoácidos constituintes das proteínas, ou seja, é função do pK dos seus grupos carboxílicos e amino terminais ionizáveis e das cadeias laterais desses aminoácidos constituintes. A biomassa de *Spirulina* apresenta elevada quantidade dos aminoácidos ácidos, ácido aspártico (11,8 %) e ácido glutâmico (10,3 %) em relação aos aminoácidos totais. Esses aminoácidos são classificados como ácidos pois ficam carregados negativamente em pH acima de 3 (ponto isoelétrico). Aminoácidos básicos histidina (2,2 %), lisina (4,8 %) e arginina (7,3 %) também estão presentes entre os aminoácidos da biomassa e contribuem para o ponto isoelétrico acima de pH 3 (BECKER, 2007).

Alguns autores precipitaram as proteínas de microalgas em pH 3 (CHRONAKIS, 2001) e em pH 3,2 (GERDE et al., 2013). Microalgas geralmente possuem ponto isoelétrico em pH ácido e dependendo do pH utilizado, pode-se favorecer a precipitação de alguns compostos em relação a outros. O conhecimento do ponto isoelétrico das proteínas é de fundamental importância para que se obtenha elevados rendimentos de extração.

3.2 DESMINERALIZAÇÃO E EXTRAÇÃO QUÍMICA DE PROTEÍNAS DE *Spirulina*

A Tabela 1 contém os resultados do teor de proteínas e cinzas após os testes para desmineralização da biomassa, e após a extração de proteínas. Pode-se observar que houve redução significativa do teor de cinzas e aumento do teor de proteínas nos testes 4 e 5, alcançando 67,1 % e 72,1 % de proteína e 8,2 e 5,0 % de cinzas, respectivamente. Nesses ensaios, a biomassa de *Spirulina* foi homogeneizada com água destilada com ajuste de pH em 4,2, para o teste 4, e com dissolução em tampão pH 4,2, para o teste 5. Entretanto, apesar da diminuição de cinzas do extrato protéico da biomassa submetida aos testes 4 e 5, não houve diferença significativa no teor de proteínas, em comparação à extração realizada diretamente com a biomassa de *Spirulina*.

Tabela 1 - Teor de proteínas e cinzas da biomassa desmineralizada e seus extratos protéicos

Teste	Biomassa de <i>Spirulina</i>		Extrato Protéico	
	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)
Teste 1	53,8 ^b ± 3,1	15,9 ^a ± <0,1	83,9 ^a ± 1,7	3,9 ^a ± <0,1
Teste 2	48,3 ^b ± 4,6	15,3 ^a ± 0,4	60,8 ^b ± 0,8	1,5 ^b ± <0,1
Teste 3	52,7 ^b ± 1,3	15,1 ^a ± 0,3	59,5 ^b ± 0,7	1,4 ^b ± <0,1
Teste 4	67,1 ^a ± 0,8	8,2 ^b ± 0,7	75,0 ^a ± 0,2	1,7 ^b ± 0,3
Teste 5	72,1 ^a ± 0,4	5,0 ^b ± 1,1	77,2 ^a ± 5,1	1,1 ^b ± 0,5

Teste 1 = biomassa não desmineralizada; Teste 2 = biomassa diluída em água destilada 1:20 p/v; Teste 3 = biomassa diluída em água destilada 1:10 p/v; Teste 4 = biomassa diluída em água destilada 1:20 p/v com ajuste de pH 4,2; Teste 5 = biomassa diluída com tampão citrato pH 4,2.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

Os processos de desmineralização da biomassa com ajuste de pH e com tampão pH 4,2 proporcionaram rendimento de extração protéica em torno de 40 e 50 %, respectivamente,

enquanto que as lavagens com água destilada proporcionaram REP entre 20 e 30 %, conforme apresentado na Tabela 2. O tamanho das partículas da biomassa, obtido após a moagem, faz com que essas se dispersem em água e a sua recuperação seja mais difícil. O ajuste de pH ou a utilização de tampão fez com que as perdas de biomassa fossem reduzidas.

A concentração de proteínas dos extratos protéicos, após os processos de desmineralização para os testes 4 e 5, não apresentaram diferença significativa quando comparados com o extrato protéico da biomassa de *Spirulina*. Além disso, o rendimento de extração de proteínas para a biomassa não desmineralizada (Teste 1) foi maior, e deste modo, não havendo perdas desnecessárias de biomassa. Logo, o processo de extração foi realizado diretamente com a biomassa de *Spirulina*.

Tabela 2 - Rendimento do processo de extração de proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

Teste	Perda de biomassa (%)	Rendimento em massa de extrato protéico (η %)	Rendimento da Extração Protéica (REP %)
Teste 1	-	40,6	63,3
Teste 2	50,0	17,7	20,0
Teste 3	50,2	29,1	32,2
Teste 4	46,8	32,0	44,6
Teste 5	42,4	35,6	51,1

Teste 1 = biomassa não desmineralizada; Teste 2 = biomassa diluída em água destilada 1:20 p/v; Teste 3 = biomassa diluída em água destilada 1:10 p/v; Teste 4 = biomassa diluída em água destilada 1:20 p/v com ajuste de pH 4,2; Teste 5 = biomassa diluída com tampão citrato pH 4,2.

3.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

A determinação da composição proximal da biomassa microalgal é importante para conhecer principalmente o conteúdo de proteínas presente. Utilizando este fator de conversão de nitrogênio estudado por López et al. (2010) para *Spirulina platensis*, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 avaliada neste estudo apresentou 53,8 % (p/p) de proteína (Tabela 3). Neste estudo, as condições de cultivo em que a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi produzida não visavam a estimulação de síntese de proteínas. Esta cianobactéria pode apresentar de 50 a 70 % de proteína (MORAIS et al., 2009), uma vez que o teor de proteínas pode ser manipulado ou

influenciado pelas condições de cultivo, ou do ambiente, como intensidade luminosa, concentração de nitrogênio, concentração de minerais e condições climáticas.

O conteúdo de carboidratos e cinzas apresentou-se próximo a 16 % (p/p). Esses compostos devem ser removidos nos processos de extração de proteínas para que o rendimento de proteínas nos concentrados e isolados protéicos seja maior. Os lipídeos também podem ser removidos durante o processo e utilizados para outros fins como utilização em emulsões ou produção de biodiesel, reforçando o conceito de biorefinaria de microalgas.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO E DO ISOLADO PROTÉICO DE *Spirulina*

O concentrado protéico de *Spirulina* apresentou $83,9 \pm 1,7$ % de proteínas. Com o segundo processo de extração realizado a partir do concentrado protéico foi possível obter isolado protéico de *Spirulina* com $91,3 \pm 1,2$ % de proteína (Tabela 3). O rendimento em massa e o rendimento de extração protéica, para obtenção do isolado protéico de *Spirulina* foram 33 % e 57,1 %, respectivamente.

Tabela 3 – Composição proximal dos extratos protéicos obtidos de *Spirulina* sp. LEB 18

Determinação	Biomassa de <i>Spirulina</i> (%)	Concentrado Protéico (%)	Isolado Protéico (%)
Proteínas	$53,8^b \pm 3,1$	$83,9^c \pm 1,7$	$91,3^a \pm 1,2$
Carboidratos	$15,9^a \pm 1,2$	$4,6^b \pm <0,1$	$1,2^c \pm 0,3$
Lipídeos	$7,5^{ab} \pm 1,5$	$8,7^a \pm 1,8$	$4,6^b \pm 0,5$
Cinzas	$15,9^a \pm <0,1$	$4,0^b \pm <0,1$	$1,92^c \pm <0,1$

Média $\pm$ Desvio padrão ($p < 0,05$). Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa.

Chronakis (2001) extraíram as proteínas de *Spirulina platensis* (56 % de proteína p/p) e obtiveram 78,6 % de proteínas no extrato protéico final. Esses autores também extraíram as proteínas por processo químico de mudança de pH, porém não estudaram o ponto isoeletrico das proteínas da biomassa. O pH utilizado para precipitar proteínas por esses autores foi pH 3, o que pode justificar os maiores teores de proteína obtido nos extratos do atual estudo.

As composições centesimais do concentrado e do isolado protéico de *Spirulina* estão apresentados na Tabela 3. Com os fatores de conversão de Atwater, o valor energético total

(VET) de um alimento pode ser caculado baseado na sua composição, sendo: 4 kcal.g⁻¹ de proteína, 9 kcal.g⁻¹ de lipídeos e 4 kcal.g⁻¹ de proteína. Considerando 1 g dos produtos obtidos nesse trabalho, a biomassa de *Spirulina*, o concentrado e isolado protéico de *Spirulina* apresentaram valores energéticos iguais a 3,5, 4,32 e 4,11 kcal.g⁻¹, respectivamente.

Segundo a RDC nº18 de 2010, que regulamenta sobre alimentos para atletas, o alimento, para ser considerado um suplemento protéico, deve conter no mínimo 50 % do VET proveniente do conteúdo protéico. A parcela de proteínas corresponde a 62,1 % do valor energético da biomassa de *Spirulina*, em 77,6 % para o concentrado protéico e em 88,7 % para o isolado protéico de *Spirulina*. Logo, a biomassa de *Spirulina* e seus extratos protéicos apresentam-se como ingredientes promissores em formulações que venham a ser consideradas como suplementos protéicos para atletas, devido a elevada contribuição que a parcela de proteínas pode conferir no valor energético do alimento final.

Os resultados obtidos mostram que o processo de extração química de proteínas de microalgas é um processo eficiente, uma vez que, aumentou-se o teor de proteínas em 1,5 e 1,6 vezes, para o concentrado e isolado protéico, respectivamente. O processo de extração por precipitação isoeletrica vem sendo realizado para extrair proteínas de *Nannochloropsis oculata* (CAVONIUS; ALBERS; UNDELAND, 2015) e *Chlorella vulgaris* (URSU et al., 2014), principalmente após extração de lipídeos para produção de biodiesel, com apelo de biorrefinaria.

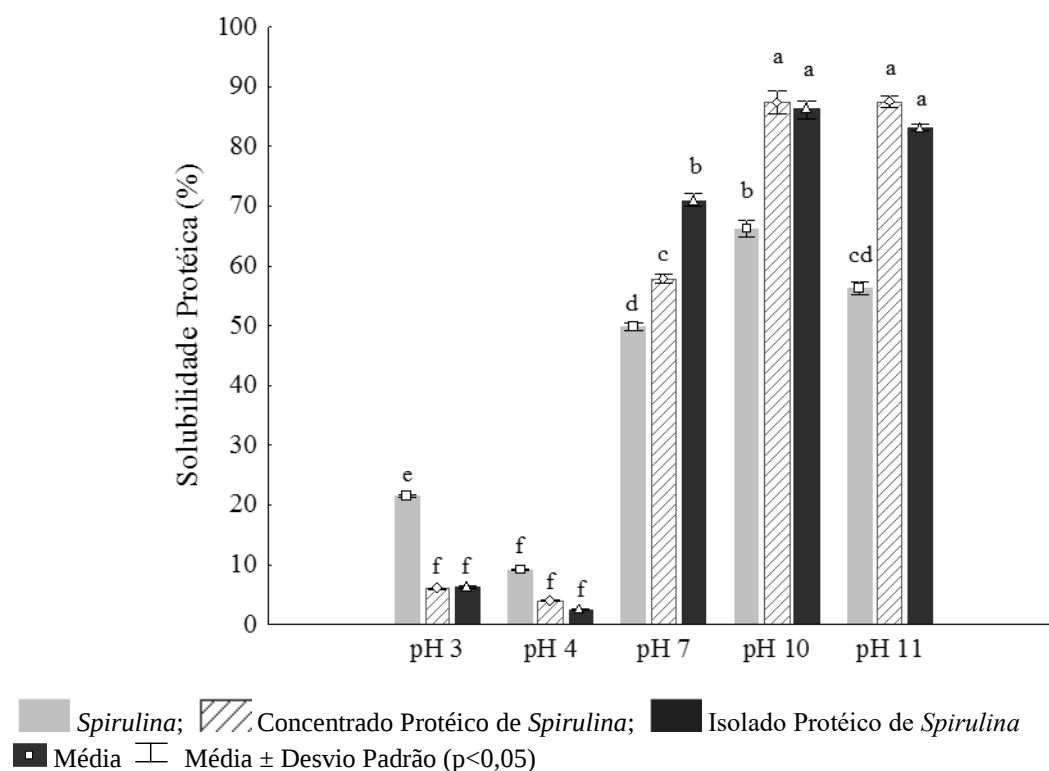
Com a extração das proteínas de *Spirulina* sp. LEB 18, foi possível obter concentrado protéico e isolado protéico com teor reduzido de carboidratos. Segundo Vonshak (1997), a maioria dos carboidratos de *Spirulina* podem ser extraídos com água, em pH superiores à 8,0. No entanto, a diminuição do teor de carboidratos com o processo de precipitação isoeletrica de proteínas, eliminou significativamente o teor de carboidratos, mesmo em pH inferior a 8,0.

Produtos lácteos com concentração de proteínas superior a 80 % são utilizados como substitutos de refeição, bebidas que conferem saciedade, bebidas e suplementos em pó para esportistas e como ingredientes em produtos nutricionais em geral. Paralelamente ao elevado teor de proteínas, o baixo teor de carboidratos e alta solubilidade são requisitos que conferem um excelente perfil nutricional para fornecer um ingrediente funcional eficaz para muitas aplicações nutricionais (LAGRANGE; WHITSETT; BURRIS, 2015).

3.5 SOLUBILIDADE PROTÉICA

A Figura 3 mostra que em pH acima do ponto isoelétrico das proteínas, a solubilidade do concentrado e do isolado protéico aumentaram em comparação à biomassa de *Spirulina*. Abaixo do ponto isoelétrico, houve diferença significativa apenas para a biomassa de *Spirulina*. A solubilidade de proteínas depende do pH em que elas estão inseridas, aumentando em pH acima do ponto isoelétrico e, em menor proporção, em pH abaixo do PI, devido à acidez. O aumento da solubilidade se deve ao aumento da repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína e hidratação dos resíduos carregados (YADA, 2004). Resultados semelhantes foram reportados por Cavonius, Albers e Undeland (2015) ao estudar a solubilidade de proteínas extraídas da microalga *Nannochloropsis oculata*, por precipitação isoelétrica, e esses extratos apresentaram menor solubilidade em pH 4 e maior entre pH 7 e 10.

Figura 3 – Solubilidade protéica de *Spirulina* sp. LEB 18 e de seus extratos protéicos



Em pH 7 a solubilidade aumentou de 49,7 % (p/v), para a amostra de *Spirulina*, chegando a 57,7 % (p/v) para o concentrado protéico e 70,9 % (p/v) para o isolado protéico. O processo de extração de proteínas pode ter causado aumento da solubilidade entre as amostras,

devido ao rompimento da membrana celular pela ação do ultraturrax e por separação das proteínas solúveis em pH alcalino.

Sanmartín et al. (2013) atribuíram o aumento da solubilidade de amostras de soro de leite ao baixo teor de lipídeos. Logo, a redução do teor de lipídeos em aproximadamente 2 vezes, para o isolado protéico pode ter sido responsável pelo aumento da solubilidade, em pH acima da neutralidade. Patel e Kilara (1990) afirmaram que as interações hidrofóbicas entre lipídeos e proteínas podem causar a redução da solubilidade em amostras com maior conteúdo lipídico.

Em pH alcalino, a solubilidade do concentrado e do isolado protéico de *Spirulina* sp. LEB 18 (entre 80 e 90 % p/v) não apresentaram diferença significativa, porém foram superiores à solubilidade das proteínas da biomassa (aproximadamente 60 % p/v). Isso pode ter sido causado pois as proteínas foram extraídas solubilizando-as no mesmo pH (pH 11), logo o concentrado e isolado protéico não diferiram quanto à solubilidade. A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou maior solubilidade em pH 10.

As proteínas de soro de leite e soja, nas suas formas concentrada e isolada, são amplamente utilizadas na indústria de alimentos devido às suas propriedades funcionais e valor nutritivo (AGARWAL et al., 2015; SUPPAVORASATIT; MEJIA; CADWALLADER, 2011). A solubilidade das proteínas é a propriedade funcional mais importante, uma vez que deve ser solúvel para ser aplicada em sistemas alimentares. Outras propriedades funcionais como capacidade emulsificação, formação de espuma e gelificação são dependentes da solubilidade (VACLAVIK; CHRISTIAN, 2003).

A solubilidade de concentrados protéicos comerciais de soro de leite e soja, em pH 7 ficaram em torno de $73,9 \pm 3,5$ % (SANMARTÍN et al., 2013) e de 50 % (VISHWANATHAN et al., 2011), respectivamente. Amostras de isolado protéico de soro de leite e soja apresentaram 97 % (SEGAT et al., 2014) e 55 % (VISHWANATHAN et al., 2011) de solubilidade em pH neutro. Portanto, pode-se dizer que a solubilidade proteica da biomassa de *Spirulina*, do concentrado e isolado protéico é comparável com concentrado protéico de soro de leite, de soja e com isolado protéico de soro de leite.

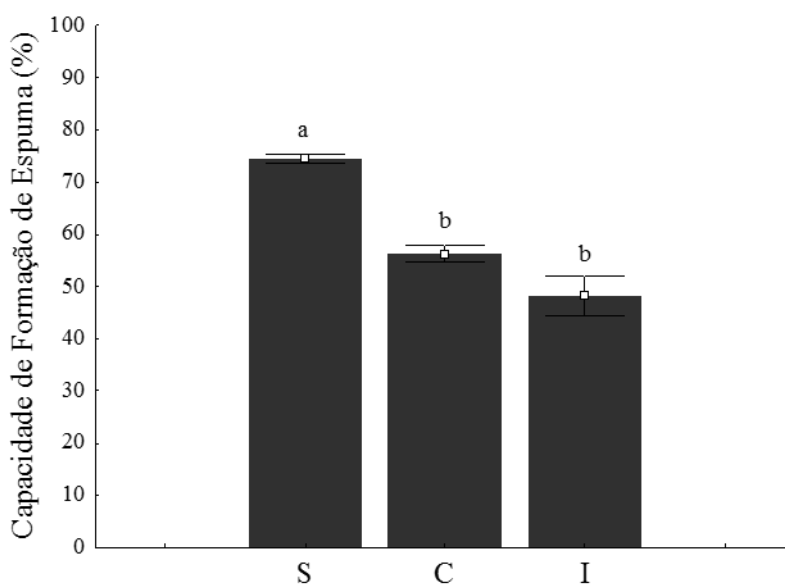
3.6 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE ESPUMA

A Figura 4 mostra que o concentrado e o isolado protéico apresentaram menor capacidade de formação de espuma do que a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. Porém, na

Figura 5, o contrário é observado para a estabilidade de espuma. Houve aumento da estabilidade de espuma, a partir de 10 min de repouso, para as amostras de concentrado e isolado protéico.

A capacidade de formação de espuma e a estabilidade dependem geralmente da película interfacial formada por proteínas que mantêm as bolhas de ar na suspensão e diminui a taxa de coalescência (MA et al., 2011). A capacidade de formar e estabilizar espumas é uma propriedade funcional importante, principalmente para produtos de confeitaria e panificação como, bolos, massas e pães. As propriedades sensoriais e de textura são provenientes de minúsculas bolhas de ar dispersas (KUMAR et al., 2014).

Figura 4 – Capacidade de formação de espuma de extratos protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18



S = *Spirulina*; C = Concentrado Protéico de *Spirulina*; I = Isolado Protéico de *Spirulina*
 ■ Média — Média ± Desvio Padrão (p<0,05)

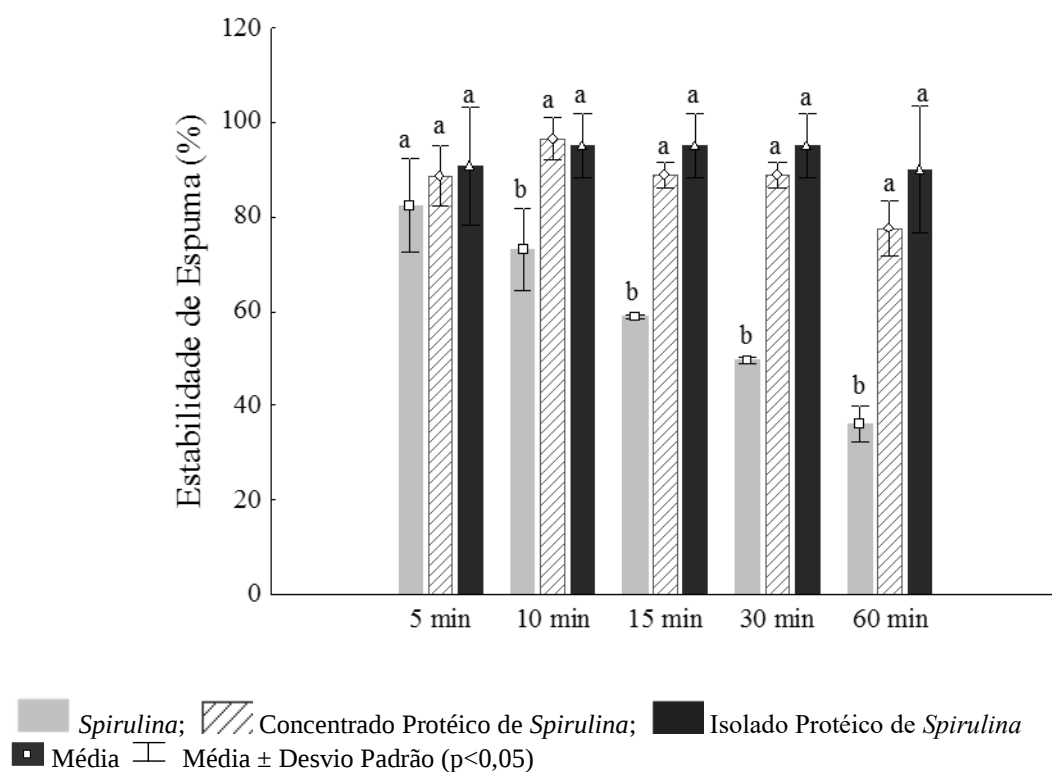
A capacidade de formação de espuma possui uma estreita relação com a hidrofobicidade das proteínas, aumentando conforme incremento na hidrofobicidade, devido a redução da tensão superficial (KATO et al., 1983). Como visto anteriormente, a solubilidade do concentrado e do isolado protéico foi maior em relação à biomassa, portanto esses são menos hidrofóbicos, o que pode explicar sua menor capacidade de formação de espuma em relação à biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

A biomassa de *Spirulina* apresenta aproximadamente 15 % de cinzas, o que também pode influenciar na maior capacidade de formar espuma, comparado ao concentrado e ao isolado protéico. Raikos, Campbell e Euston (2007) e Mune, Minka e Mbome (2014) também notaram relação entre o teor de sais e o aumento da capacidade de formação de espuma. Esses autores especularam que a presença dos sais pode reduzir a repulsão eletrostática entre as

moléculas de proteína adsorvidas e não adsorvidas e assim facilitar a adsorção na interface ar/água. Davis e Foegeding (2004) reportaram resultados similares a respeito do efeito de NaCl na adsorção de isolado protéico de soro de leite na interface ar/água.

Em bebidas protéicas a solubilidade é mais importante do que a capacidade de formação de espuma. Portanto, para esses alimentos, apesar de o concentrado e o isolado protéico terem apresentado menor CFE do que a biomassa de *Spirulina*, isso não demonstra ser um problema. Ao avaliar a qualidade sensorial de bebidas de chocolate, Batista et al. (2015) perceberam que formulações de bebidas com menor quantidade de espuma, não apresentaram diferença significativa quanto à aceitação e intenção de compra de bebidas com mais espuma.

Figura 5 – Estabilidade de espuma de extratos protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18



Quanto à estabilidade de espuma, depois de permanecer 60 min em temperatura ambiente, mais de 50 % do volume de espuma formada pela biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 havia desaparecido. As espumas formadas pelo concentrado e isolado protéico permaneceram estáveis em intervalo maior de tempo, sendo que aproximadamente 80 % da espuma formada pelo concentrado e isolado protéico permaneceram em 60 min de repouso.

As propriedades espumantes são diretamente influenciadas pela concentração de proteínas. Quanto maior o teor de proteínas, maior é a rigidez das bolhas de ar formadas, devido

ao menor tamanho das bolhas e maior viscosidade da solução. Consequentemente, ocorre o aumento da estabilidade da espuma com o aumento da concentração de proteína (DAMODARAN, 2005), como foi observado no presente trabalho.

A maior estabilidade de espuma, devido a maior concentração de proteínas, influencia diretamente na textura de alimentos. Uma das aplicações-chave de concentrados e isolados protéicos, especialmente de leite e soro de leite é em barras nutritivas de proteínas (mais de 15 g por porção). Um dos problemas relatados na formulação desses produtos é a alteração da textura durante o armazenamento, geralmente devido ao aumento da dureza (LOVEDAY et al., 2009). A elevada estabilidade de espuma dos extratos protéicos de *Spirulina* pode contribuir sensorialmente nesses produtos, fazendo com que a textura permaneça constante por intervalo maior de tempo.

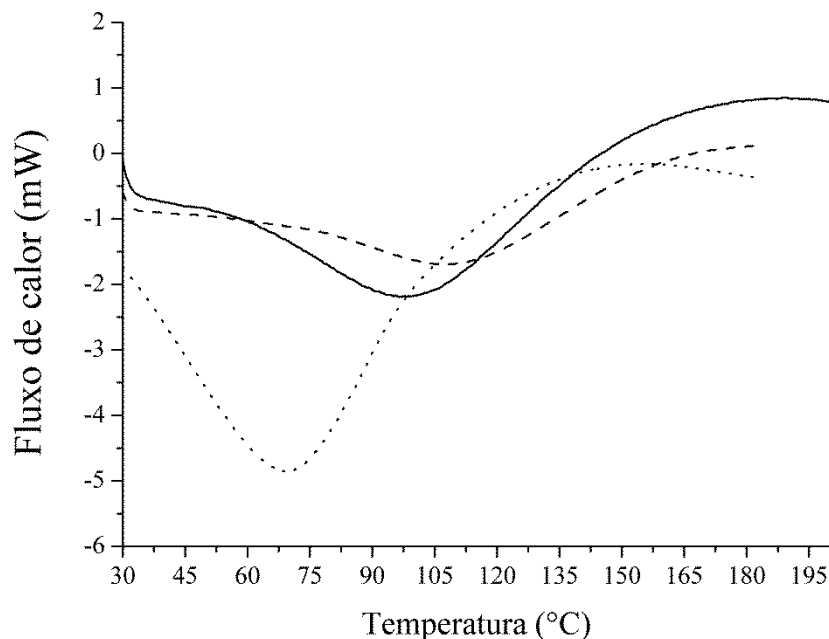
Diversos fatores podem influenciar as propriedades espumantes das proteínas, como fonte protéica, método de preparação, extração, processamento, composição, solubilidade, concentração, pH, temperatura, presença de sais, açúcar, lipídios, entre outros. O sinergismo entre esses fatores tem sido estudado com diversas proteínas. No entanto, os resultados variam com as circunstâncias, o que dificulta a generalização sobre a especialidade de cada fator, bem como influência dessas propriedades na aplicação em alimentos (MUNE; MINKA; MBOME, 2014). No presente estudo os fatores que mais propiciam as diferenças na capacidade e estabilidade de espuma podem estar relacionados à solubilidade, presença de sais e concentração de proteínas.

3.7 ESTABILIDADE TÉRMICA

O efeito do processo de extração no comportamento térmico das proteínas de *Spirulina* sp. LEB 18 foi avaliado por calorimetria exploratória diferencial (DSC), apresentado na Figura 6. Pode-se observar que as proteínas do concentrado e do isolado protéico apresentaram maior faixa de temperatura de desnaturação (Td) que as proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, sendo essas em torno de, 107, 96,7 e 69,2 °C, respectivamente.

Temperaturas de desnaturação entre 67 °C e 109 °C também foram observadas por Chronakis (2001) ao estudar as propriedades de gelificação de proteínas de *Spirulina platensis*. Segundo Tang, Sun e Yin (2009), Td é uma medida da estabilidade térmica e que o aumento dessa temperatura significa incremento da estabilidade das proteínas, principalmente de proteínas globulares.

Figura 6 – Estabilidade térmica de extratos protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18



(.....) *Spirulina*; (----) Concentrado Protéico de *Spirulina*; (—) Isolado Protéico de *Spirulina*

Embora, as temperaturas de desnaturação do concentrado e isolado protéico terem sido maiores que a da biomassa de *Spirulina*, indicados pela faixa de temperatura do pico endotérmico, a energia (ΔH) envolvida para desnaturação das proteínas da microalga, avaliada pela área do pico endotérmico, foi maior do que de seus extratos protéicos. Chronakis (2001) afirmaram que a diminuição de entalpia pode estar associada a agregação de moléculas de proteína.

A desnaturação está associada com o rompimento de ligações intramoleculares, causado pela absorção de energia (processo endotérmico). Mudanças nas entalpias de desnaturação podem estar associadas com mudanças nas forças de ligação entre as moléculas. O estado conformacional em que as proteínas possuem forças de ligação mais fracas, requerem menos energia para se desdobrar, e como consequência uma redução na entalpia pode ser observado (FRYDENBERG et al., 2016).

O valor da T_d permite que se estabeleça a temperatura final do processo térmico (cozimento), todavia, as mudanças entálpicas (ΔH) são conhecidas e utilizadas nos cálculos de transferência de calor do produto durante o processo térmico (ARNTFIELD; MURRAY, 1981; JOHNSON, 2013) Logo, pode-se dizer que os extratos de *Spirulina* sp. LEB 18 são mais resistentes à desnaturação protéica por ação de calor do que da biomassa de *Spirulina*, podendo ser utilizados em alimentos que necessitem de tratamento térmico.

4 CONCLUSÃO

O processo de extração das proteínas de *Spirulina* sp. LEB 18 possibilitou a obtenção de concentrado protéico com 83,9 % de proteína e isolado protéico com 91,3 %, que apresentaram maior solubilidade do que a biomassa de *Spirulina*, chegando a alcançar aproximadamente 90 %. Além disso, a biomassa de *Spirulina*, o concentrado e isolado protéico de *Spirulina* apresentaram a propriedade funcional de formar espuma, sendo que o concentrado e o isolado protéico apresentaram maior estabilidade de espuma (aproximadamente 80 %). Com os resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que proteínas extraídas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 podem ser utilizadas como ingredientes na elaboração de alimentos, uma vez que podem ser comparadas aos concentrados e isolados protéicos de soro de leite e soja que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia.

5 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; BEAUSIRE, R. L. W.; PATEL, S.; PATEL, H. Innovative Uses of Milk Protein Concentrates in Product Development. **Journal of Food Science**, v. 80, n. S1, p. A23–A29, 2015.
- AIKING, H. Future protein supply. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 112–120, 2011.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists international**. 17. ed. Washington: D. C., 2000.
- ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The influence of processing parameters on food protein functionality I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 14, n. 4, p. 289–294, jan. 1981.
- BATISTA, M. A.; GAMA, L. L. A.; ALMEIDA, L. P.; ORNELLAS, C. B. D.; SANTOS, L. C.; CRUZ, L. L.; SILVESTRE, M. P. C. Desenvolvimento, caracterização e análise sensorial de formulações alimentares com proteínas do soro de leite ou albumina para crianças. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 31–41, 2015.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.
- BELAY, A.; HOUSTON, M. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27–48, 2002.
- BRANS, G.; SCHROËN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane

fractionation of milk: State of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, n. 1-2, p. 263–272, 2004.

BRASIL. Resolução RDC nº 18 de abril de 2010 - Regulamento técnico sobre alimentos para atletas. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010.

CAVONIUS, L. R.; ALBERS, E.; UNDELAND, I. pH-shift processing of *Nannochloropsis oculata* microalgal biomass to obtain a protein-enriched food or feed ingredient. **Algal Research**, v. 11, p. 95–102, 2015.

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**, v. 49, n. 2, p. 888–898, 2001.

CHRONAKIS, I. S.; MADSEN, M. **Algal proteins**. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). Handbook of Food Protein. [s.l.] Woodhead Publishing Series in Food Sciences, Technology and Nutrition, 2011. p. 353–394.

COLLA, L. M. **Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia**. 202 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

DAMODARAN, S. Protein stabilization of emulsions and foams. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. 54–66, 2005.

DAVIS, J. P.; FOEGEDING, E. A. Foaming and interfacial properties of polymerized whey protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. 404–410, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FISCHER, M. **Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein**. Droeendaalsesteeg: Wageningen University, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 5, p. 497–509, 1957.

FOX, R. D. ***Spirulina* Production e Potencial**. France: Edsud, 1996. 232 p.

FRYDENBERG, R. P.; HAMMERSHØJ, M.; ANDERSEN, U.; GREVE, M. T.; WIKING, L. Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. **Food Chemistry**, v. 192, p. 415–423, 2016.

FURTADO, A. S. **Produção, avaliação e aplicação de filmes nanocompósitos obtidos a partir de extrato proteico da microalga *Spirulina platensis***. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande 2013.

GERDE, J. A.; WANG, T.; YAO, L.; JUNG, S.; JOHNSON, L. A.; LAMSAL, B. Optimizing

protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 145–153, 2013.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

INDERGAARD, M.; MINSAAS, J. **Animal and human nutrition**. In: Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential. California: Wiley, 1991. p. 432 p.

IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERIS, C. G. Novel **Macromolecules in Food Systems**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers, 2000. v. 41

JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 531, n. 1-2, p. 100–109, 2013.

KATO, A.; OSAKO, Y.; MATSUDOMI, N.; KOBAYASHI, K. Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 33–37, 1983.

KUMAR, K. S.; GANESAN, K.; SELVARAJ, K.; SUBBA RAO, P. V. Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An edible seaweed. **Food Chemistry**, v. 153, p. 353–360, 2014.

LAGRANGE, V.; WHITSETT, D.; BURRIS, C. Global Market for Dairy Proteins. **Journal of Food Science**, v. 80, n. S1, p. A16–A22, 2015.

LISBOA, C. L. **Produção de nanopartículas contendo peptídeos bioativos de microalgas**. 2013. 155 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

LÓPEZ, C. V. G.; DEL CARMEN CERÓN GARCÍA, M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7587–7591, 2010.

LOVEDAY, S. M.; HINDMARSH, J. P.; CREAMER, L. K.; SINGH, H. Physicochemical changes in a model protein bar during storage. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 798–806, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MA, Z.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K.; PRASHER, S. O.; MONPETIT, D.; MALCOLMSON, L. Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2534–2544, 2011.

MATAK, K. E.; TAHERGORABI, R.; JACZYNSKI, J. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. **Food Research International**, v. 77, p. 697–703, 2015.

MENG, G. T.; MA, C. Y. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. **Food Research International**, v. 73, n. 4, p. 453–460, 2001.

MILLER, R.; GRONINGER, H. S. Functional properties of enzyme-modified acylated fish protein derivatives. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 2, p. 268–272, mar. 1976.

MORAIS, M. G. DE; REICHERT, C. D. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1-2, p. 144–150, 2008.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715–1718, 1985.

MUNE, M. M. A.; MINKA, S. R.; MBOME, I. L. Optimising functional properties during preparation of cowpea protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 154, p. 32–37, 2014.

PATEL, M. T.; KILARA, A. Studies on Whey Protein Concentrates. Foaming and Emulsifying Properties and their Relationships with Physicochemical Properties. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 10, p. 2731–2740, out. 1990.

RADMER, R. J.; PARKER, B. C. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 93–98, 1994.

RAIKOS, V.; CAMPBELL, L.; EUSTON, S. R. Effects of sucrose and sodium chloride on foaming properties of egg white proteins. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 347–355, 2007.

SANMARTÍN, B.; DÍAZ, O.; RODRÍGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A. Functional properties of caprine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 110, n. 1, p. 52–56, 2013.

SCHUTYSER, M. A. I.; VAN DER GOOT, A. J. The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 4, p. 154–164, 2011.

SCHWENZFEIER, A.; LECH, F.; WIERENGA, P. A.; EPPINK, M. H. M.; GRUPPEN, H. Foam properties of algae soluble protein isolate: Effect of pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 111–117, 2013.

SEGAT, A.; MISRA, N. N.; FABBRO, A.; BUCHINI, F.; LIPPE, G.; CULLEN, P. J.; INNOCENTE, N. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. **Food Research International**, v. 66, p. 365–372, 2014.

SUPPAVORASATIT, I.; MEJIA, E. G.; CADWALLADER, K. R. Optimization of the Enzymatic Deamidation of Soy Protein by Protein-Glutaminase and Its Effects on the Functional Properties of the Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 11621–11628, 2011.

TANG, C.-H.; SUN, X.; YIN, S.-W. Physicochemical, functional and structural properties of

vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: Effect of heat treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1771–1778, 2009.

URSU, A. V.; MARCATI, A.; SAYD, T.; SANTE-LHOUTELLIER, V.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014.

VACLAVIK, V. A.; CHRISTIAN, E. W. **Essentials of Food Science**. 2. ed. [s.l.] LLC, 2003.

VISHWANATHAN, K. H.; GOVINDARAJU, K.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Production of okara and soy protein concentrates using membrane technology. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 158–164, 2011.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

YADA, R. Y. **Proteins in Food processing**. Washington: Cambridge England, 2004.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. Paris: Université Des Paris, 1966.

**ARTIGO 2 – OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS A PARTIR DE ISOLADOS E
CONCENTRADOS PROTÉICOS DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA USO EM
ALIMENTOS E SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

RESUMO

Suplementos alimentares são requeridos por pessoas que buscam benefícios à saúde através da ingestão de algum alimento com propriedade nutracêutica ou funcional. Os hidrolisados protéicos se destacam entre os alimentos destinados a pessoas idosas, com intolerância alimentar ou para praticantes de atividade física. A microalga *Spirulina* é certificada pelo FDA para uso como alimento e fármaco, possui elevado valor nutritivo, por possuir todos os aminoácidos essenciais e alta concentração de proteínas. Este trabalho teve como objetivo hidrolisar as proteínas da biomassa, do concentrado e do isolado protéico de *Spirulina* sp. LEB 18, verificando o valor nutritivo dos produtos obtidos. Para realização deste trabalho, extraiu-se quimicamente as proteínas da microalga por precipitação isoelétrica, para obtenção de concentrado e isolado protéico. Estudos cinéticos de hidrólise, com a enzima Protamax 580L (5 U.mL^{-1}), da biomassa do concentrado e do isolado protéico foram realizados em erlenmeyer e em *stired tank reator* (STR). As hidrólises foram realizadas com 4 % de substrato e mantidas à 60 °C e 180 rpm. Solução tamponante pH 9,5 foi utilizada para reações em erlenmeyer e o pH das reações em STR foi controlado automaticamente. Digestibilidade, propriedades funcionais, atividade antioxidante e estabilidade térmica dos extratos protéicos e dos hidrolisados com maior grau de hidrólise foram avaliadas. O reator do tipo STR proporcionou os maiores graus de hidrólise (54,4, 66,8 e 77,9 % para a biomassa de *Spirulina*, concentrado e isolado protéico, respectivamente) e produtividade de hidrólise. Além disso, foi possível aumentar a solubilidade (90 %), digestibilidade (83 %), e ainda obter aumento da atividade antioxidante. Com os resultados obtidos, é possível sugerir que os hidrolisados protéicos da biomassa, do concentrado e do isolado protéico possuem possível aplicação em formulações de alimentos e suplementos alimentares destinados a indivíduos que necessitam de elevado teor protéico, altamente disponível para síntese e recuperação muscular.

Palavras-chave: Alimento funcional. Extrato protéico microalgal. Hidrólise enzimática.

HYDROLYZED OBTAINED FROM ISOLATED AND PROTEIN CONCENTRATES OF *Spirulina* sp. LEB 18 FOR USE IN FOOD AND FOOD SUPPLEMENTS

ABSTRACT

Food supplements are purchased by people looking for health benefits by eating some food with nutraceutical or functional property. The protein hydrolysates stand out among food for the elderly, with food intolerance or physically active. The *Spirulina* is certified by the FDA for use in food and drug, it has a high nutritional value, because it has all the essential amino acids and high concentration of proteins. This study aimed to hydrolyze the proteins of biomass, concentrated and isolated protein of *Spirulina* sp. LEB 18, checking the nutritional value of the products obtained. For this, chemical extraction of proteins from microalgae was made by isoelectric precipitation to obtain concentrate and isolate protein. Kinetic studies of hydrolysis, with the enzyme Protamax 580L (5 U.mL⁻¹), of biomass, of concentrate and of isolate protein were performed in Erlenmeyer and stirred tank reactor (STR). The hydrolyses were performed with 4 % of substrate and maintained at 60 °C and 180 rpm. Buffer solution pH 9.5 was used for reactions in erlenmeyer and the pH of the reactions in the STR was automatically controlled. Digestibility, functional properties, antioxidant activity and thermal stability of the protein extracts and hydrolysates with a higher degree of hydrolysis were evaluated. The STR type reactor provided the highest degree of hydrolysis (54.4, 66.8 and 77.9 % for the biomass of *Spirulina*, concentrated and protein isolate, respectively) and hydrolysis productivity. Moreover, it was possible to increase the solubility (90 %), digestibility (83 %), and still obtain increased antioxidant activity. With the results, it could be suggested that the protein hydrolysates of biomass, concentrated and protein isolate have possible application in formulations intended to individuals who need high protein content, highly available for synthesis and muscle recovery.

Keywords: Enzymatic hydrolysis. Functional food. Microalgae protein extract.

1 INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos, os hidrolisados protéicos são utilizados para fins especiais como suplementação dietética de idosos (PENNINGGS et al., 2011), crianças que apresentam alergia à proteína intacta, crianças com diarreia aguda ou crônica, intolerâncias alimentares (PENTERICH et al., 2010) ou erro inato de metabolismo, como a fenilcetonúria (BIZZOTTO et al., 2006), bem como em dietas para controle de peso (AIHARA; OSAKA; YOSHIDA, 2014; LILLEFOSSE et al., 2013) e nutrição de esportistas (DÉCOMBAZ, 2004; MOBLEY et al., 2015).

Os hidrolisados protéicos possuem peptídeos e aminoácidos livres que são mais rapidamente absorvidos pelo trato intestinal e digeridos pelo organismo humano. Proteínas de fonte animal, incluindo soro de leite (ZAMBÃO; ROCCO; HEYDE, 2015), albumina de ovo (MOBLEY et al., 2015), caseína (PENNINGGS et al., 2011) e de origem vegetal como de soja (CASTRO; SATO, 2014b), vem sendo hidrolisadas a fim de serem utilizadas em formulações de alimentos e suplementos alimentares. Entretanto, novas fontes de proteínas devem ser estudadas para atender a demanda mundial de alimentos (AIKING, 2011).

A ingestão de quantidades adequadas de proteína na dieta evita o balanço negativo de nitrogênio (que resulta em perda muscular) e estimula o efeito anabólico, devido ao fornecimento de aminoácidos para síntese protéica. A quantidade e o tipo de proteína ou de aminoácido, fornecidos na dieta, influenciam nesse processo de síntese protéica (CHURCHWARD-VENNE; BURD; PHILLIPS, 2012).

A microalga *Spirulina* é certificada pelo FDA e pode ser utilizada como alimento ou fármaco (FOX, 1996). Esta microalga possui elevado teor de proteínas (60 a 70 % p/p em base seca) e valor nutritivo, devido à sua composição de aminoácidos, possuindo todos aminoácidos essenciais, principalmente de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, essenciais para síntese e recuperação muscular (BELAY; HOUSTON, 2002; DICKINSON et al., 2011).

Portanto, o estudo da hidrólise de proteínas extraídas da biomassa de *Spirulina* se torna interessante a fim de sugerir sua aplicação como fonte alternativa de proteínas que podem ser utilizadas em alimentos ou suplementos alimentares. O objetivo deste trabalho foi hidrolisar as proteínas da biomassa, do concentrado e do isolado protéico de *Spirulina* sp. LEB 18, verificando o valor funcional e nutricional dos produtos obtidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em tanques abertos do tipo *raceway* em condições ambientais com meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) foi utilizada. Esta microalga, isolada por Moraes et al. (2008), foi produzida na planta piloto do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada as margens da Lagoa Mangueira (33° 30' 13''S e 53° 08' 59'' W) na cidade de Santa Vitória do Palmar, Brasil. A biomassa foi moída em moinho de bolas (Modelo Q298, QUIMIS) até atingir diâmetro de partícula igual a 0,125 mm (Tyler 115).

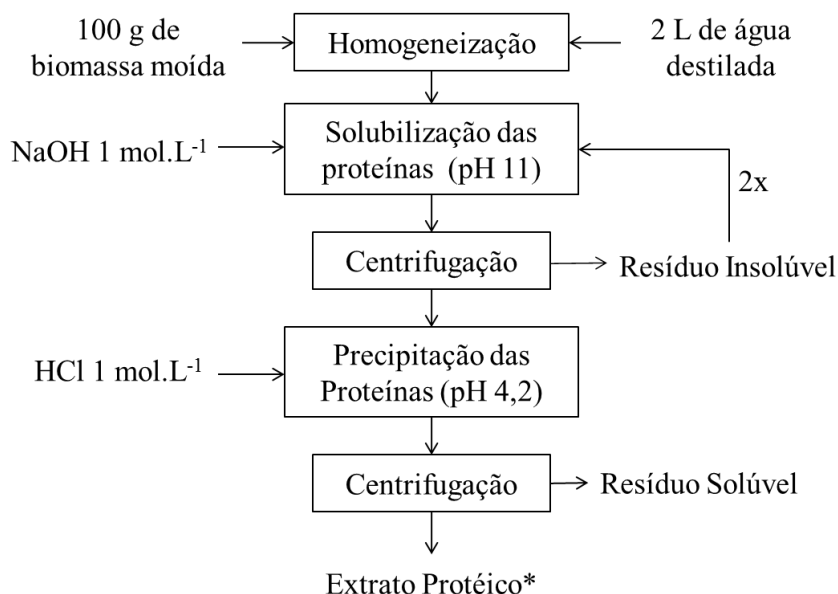
2.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

A determinação do teor de proteína total, cinzas e umidade foi realizada segundo métodos descritos pela AOAC (2000). O fator de conversão utilizado para a determinação da quantidade de proteína foi 5,95 de acordo com López et al. (2010). O teor de lipídeos foi determinado segundo método de Folch, Lees e Stanley (1957) adaptado por Colla (2002). Os carboidratos foram determinados pelo método descrito por Dubois et al. (1956).

2.3 EXTRAÇÃO QUÍMICA DAS PROTEÍNAS DE *Spirulina*

O processo de extração química por mudança de pH foi empregado, segundo método de Furtado (2013) com modificações, de acordo com a Figura 1. A biomassa da microalga foi homogeneizada com água destilada em dispersor ultra turrax (Ika, T25, Alemanha), na proporção 1:20 (p/v) empregando-se NaOH 1 mol.L⁻¹ até pH 11, separando-se as proteínas solúveis e fração insolúvel após centrifugação (15.200 g por 30 min) (Hitachi, CR22GIII, Japão).

As proteínas solúveis foram submetidas à precipitação isoelétrica (pH 4,2) com HCl 1 mol.L⁻¹ por 15 min em homogeneizador ultra turrax. Após centrifugação, as proteínas precipitadas foram congeladas a temperatura de -70 °C por 24 h em ultrafreezer (New Brunswick Scientific, U535-86 Innova®, Estados Unidos), liofilizadas (Labconco, 7753040, Estados Unidos) por 48 h e armazenadas à temperatura ambiente. A fração insolúvel proveniente da primeira centrifugação foi ressuspensa e submetida a solubilização alcalina por mais duas vezes.

Figura 1 - Fluxograma de Extração de Proteínas por precipitação isoeletrica

*Extrato protéico denominado de Concentrado Protéico de *Spirulina* (≥ 80 % de proteína), utilizado para obtenção do Isolado Protéico de *Spirulina* (≥ 90 % de proteína) através da repetição do processo de extração.

O teor de proteínas do extrato protéico obtido foi determinado por micro-Kjeldahl (AOAC, 2000). O extrato protéico com teor de proteínas superior a 80 % foi denominado de Concentrado Protéico de *Spirulina*. A fim de obter um extrato protéico com teor de proteína superior à 90 %, o processo de extração de proteínas foi submetido novamente. Este extrato então foi denominado de Isolado Protéico de *Spirulina*. Os rendimentos do processo foram calculados considerando a massa seca inicial de *Spirulina* sp. LEB 18, a massa do concentrado e isolado protéico ao final do processo e seus teores de proteína, de acordo com as equações (1) e (2).

$$\eta (\%) = \frac{m_{\text{extrato protéico}}}{m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{REP} (\%) = \frac{m_{\text{extrato protéico}} \times P_{\text{extrato protéico}}}{m_{\text{biomassa}} \times P_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (2)$$

Em que: η = rendimento em massa; REP = rendimento de extração protéica; $m_{\text{extrato protéico}}$ = massa final de extrato protéico obtida (g); m_{biomassa} = massa inicial de biomassa (g); $P_{\text{extrato protéico}}$ = concentração de proteínas final obtido (%); P_{biomassa} = concentração inicial de proteínas da biomassa (%).

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, seus concentrados e isolados protéicos foram hidrolisados com a enzima Protemax 580L, uma serino endopeptidase de *Bacillus licheniformis*, cedida pela Prozyn (São Paulo – SP). Sua atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina por min, segundo o método descrito por Ma et al. (2007).

A concentração de enzima e de substrato utilizadas foram 5 U.mL⁻¹ e 4 % (p/v), respectivamente, de acordo com as melhores condições encontradas por Lisboa (2013). Estudos cinéticos em diferentes biorreatores foram realizados a fim de determinar o tempo da reação de hidrólise, sendo as mesmas realizadas à 60 °C (condição ótima de atividade da enzima).

2.4.1 Hidrólise Enzimática em Erlenmeyer

As reações em biorreatores do tipo erlenmeyer com volume útil de 250 mL, acoplados em mesa agitadora “*shaker*” (Certomat, BS-1, EUA), conforme Figura 2, foram realizadas em triplicata com a biomassa *Spirulina* sp. LEB 18, concentrado e isolado protéico. Tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 9,5 (100 mL de volume reacional) foi utilizado para manter o pH em 9,5 em que a atividade enzimática é máxima. Ao final da hidrólise, a enzima foi inativada termicamente à 85 °C por 10 min.

Figura 2 - Hidrólise Enzimática em Erlenmeyer

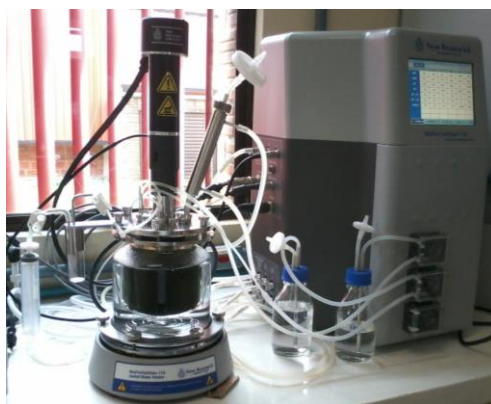


2.4.2 Hidrólise Enzimática em biorreator STR (*Stired tank reactor*)

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, seus concentrados e isolados protéicos foram hidrolisados em biorreator agitado “*Stired tank reactor*” (STR) (BioFlo, Celligen 115, EUA) com volume útil de 1,5 L (Figura 3). Este biorreator foi equipado com 4 chicanas (16,2 cm de altura e 1,2 cm de largura) para favorecer a turbulência e prevenir a formação de vórtices. A agitação do meio reacional (180 rpm) foi promovida por 2 impelidores do tipo *Rushton* uniformemente espaçados em um eixo, sendo que cada um dos impelidores possui 6 pás (1,8 cm de altura, 1,5 de largura, 1 mm de espessura) uniformemente espaçadas.

A temperatura e o pH foram controlados automaticamente por controladores PID (Proporcional e Integral) para manter o valor da variável controlada dentro de limites pré-ajustados. Desta forma, a temperatura foi mantida à 60 °C pelo encamisamento do reator e o pH à 9,5 pelo acionamento das bombas peristálticas de ácido (H_2PO_4 1 mol.L⁻¹) e base (NaOH 1 mol.L⁻¹).

Figura 3 - Hidrólise Enzimática em biorreator STR



2.4.3 Determinação do Grau de Hidrólise

O grau de hidrólise foi estimado, em triplicata, segundo o método descrito por Hoyle e Merritt (1994) com modificações, sendo expresso como concentração de proteínas solúveis em TCA 6,25 % (ácido tricloroacético) em relação à quantidade de proteína inicial total. O cálculo do grau de hidrólise foi estimado conforme a Equação (3). A quantidade de proteína total na amostra determinada por micro-Kjeldahl ($\text{N} \times 5,95$) e as proteínas solúveis foram determinadas por método de Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina. A produtividade das reações foi calculada de acordo com a Equação (4).

$$GH(\%) = \frac{PS_t - PS_{t0}}{P_{total}} \times 100 \quad (3)$$

$$P = \frac{PS_t - PS_{t0}}{t} \quad (4)$$

Em que: PS_t = Proteína solúvel no tempo t (mg.mL^{-1}); PS_{t0} = Proteína solúvel no tempo zero (mg.mL^{-1}); P_{total} = quantidade de proteína total presente na amostra (mg.mL^{-1}); P = produtividade ($\text{mg.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$); t = tempo (min).

2.5 AVALIAÇÃO DO VALOR NUTRITIVO DA PROTEÍNA

2.5.1 Digestibilidade Protéica *in vitro* (DPIV)

A digestibilidade *in vitro* das proteínas da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, de seus concentrados, isolados e hidrolisados protéicos foi avaliada pelo método descrito por Akesson e Stahmann (1964) com modificações. Alíquotas de 500 mg de amostra foram suspensas em 10 mL de solução 0,1 mol.L⁻¹ contendo 1 mg.mL⁻¹ de pepsina e incubadas a 37 °C por 3 h. A hidrólise com pepsina foi inibida pela adição de 10 mL de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. As amostras foram, então, centrifugadas à 660 g por 15 min e filtradas. O sobrenadante foi armazenado à 4 °C e ao precipitado foi adicionado 10 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 8,0 contendo 2 mg.mL⁻¹ de pancreatina, mantendo-se a reação à 37 °C por 24 h. Após a hidrólise com pancreatina, ácido tricloroacético 30 % foi adicionado para parar a reação. TCA 5 % foi utilizado para completar o volume reacional para 50 mL e centrifugou-se novamente a 660 g por 15 min. Os sobrenadantes provenientes da hidrólise com pepsina e pancreatina foram quantificados quanto à proteína solúvel pelo método Folin-Lowry (LOWRY et al., 1951) utilizando tirosina como padrão de referência. A digestibilidade protéica foi calculada pela Equação (5):

$$DPIV(\%) = \frac{PS}{P_{total}} \times 100 \quad (5)$$

Em que: PS = Proteína solúvel após digestão enzimática determinada por Folin-Lowry com curva-padrão de tirosina (mg.mL^{-1}); P_{total} = Proteína total determinada por micro-Kjeldahl (mg.mL^{-1})

2.6 SOLUBILIDADE PROTÉICA

A solubilidade das proteínas da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, de seus concentrados, isolados e hidrolisados protéicos foi determinada conforme método de Morr et al. (1985) em pH 3, 4, 7, 10 e 11. Aproximadamente 500 mg de amostra foram ressuspensas em 2 mL de NaCl 0,1 mol.L⁻¹ sob agitação. Após total dispersão da amostra, 40 mL de solução tampão em pH correspondente foi adicionado e deixado sob agitação por 45 min. Em seguida, o volume foi completado em balão volumétrico de 50 mL e a suspensão foi centrifugada a 660 g por 30 min. A concentração de proteína solúvel foi determinada (LOWRY et al., 1951) e a solubilidade protéica calculada utilizando-se a Equação (6):

$$PS(\%) = \frac{PSS \times 50}{m_{amostra} \times (P_{total} / 100)} \times 100 \quad (6)$$

Em que: PSS = concentração de proteínas solúveis no sobrenadante (mg.mL⁻¹); m_{amostra} = massa da amostra (mg); P_{total} = concentração de proteína na amostra (%).

2.7 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DAS PROTEÍNAS

A eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada para determinar a massa molecular aproximada tanto das proteínas da microalga como dos concentrados, isolados e hidrolisados, em um sistema tampão contínuo: tampão tris 1,5 mol.L⁻¹ e SDS 10 % (p/v), baseada no método de Laemmli (1970). O gel foi preparado com 12,5 % de gel de separação e 5% em gel de concentração utilizando conjunto de placas espaçadoras de 1 mm (Bio-Rad, Mini-Protean Tetra Cell).

2.8 ANÁLISE TÉRMICA

As temperaturas de desnaturação (Td) e entalpia de desnaturação (ΔH) de *Spirulina* sp. LEB 18, seus concentrados, isolados e hidrolisados protéicos, foram determinadas por calorimetria exploratória diferencial (Shimadzu, DSC-60, Japão), segundo a método proposto por Meng e Ma (2001).

Aproximadamente 5 mg de amostra foram colocados em cadinhos de alumínio, selados hermeticamente, submetidos à uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, de 30 a 240 °C, sob

atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 mL.min⁻¹. Os termogramas foram analisados com o auxílio do *software* Ta60 2.20 (Shimadzu Corporation).

2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os métodos DPPH (MAADANE et al., 2015), ABTS (RUFINO et al., 2007) e poder redutor (OYAIZU, 1986), baseados em diferentes princípios, foram utilizados para avaliar a atividade antioxidante da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, de seus concentrados, isolados e de hidrolisados protéicos.

2.9.1 Captura do Radical Livre DPPH

A atividade antioxidante da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, concentrado, isolado protéico e seus respectivos hidrolisados protéicos, pelo mecanismo de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), foi avaliada conforme Maadane et al. (2015). As amostras foram preparadas à concentração de 2,5 mg.mL⁻¹ em água e colocadas durante 15 min em banho ultrassônico. Os extratos foram então centrifugados por 5 min a 660 g. Ao sobrenadante (0,1 mL) foi adicionado 3,9 mL de DPPH 0,06 mmol.L⁻¹ em álcool metílico. Após homogeneizados em vórtex, deixou-se a mistura em repouso à temperatura ambiente por 60 min. A atividade antioxidante foi avaliada pela leitura da absorvância (Abs) do radical remanescente da reação do DPPH com os extratos das amostras, em espectrofotômetro (Shimadzu, A109348, Japão) a 515 nm, descontada da abs do branco (0,1 mL de amostra e 3,9 mL de álcool metílico), em relação a abs do controle (0,1 mL de água destilada e 3,9 mL da solução DPPH), conforme Equação (5):

$$\text{Inibição (\%)} = \left[1 - \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (5)$$

2.9.2 Poder Redutor

A análise da atividade antioxidante através da técnica de poder redutor foi realizada de acordo com Oyaizu (1986). As amostras foram preparadas a uma concentração de 10 mg.mL⁻¹ diluídas em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 9,5 e colocadas durante 15 min em banho ultrassônico. As amostras de *Spirulina*, concentrado e isolado protéico não

hidrolisados foram submetidos em banho-maria à 60 °C por 2,5 h após extração ultrassônica. Os extratos foram então centrifugados por 5 min a 660 g. Aliquotas de 2,5 mL de sobrenadante foram adicionadas de 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,8 e 2,5 mL de ferricianto de potássio 1 % (p/v), acondicionados em banho-maria a 50 °C durante 20 min. TCA 10 % (p/v) (2,5 mL) foi adicionado e a suspensão centrifugada a 1193 g por 10 min (XIE, 2008). O sobrenadante (2,5 mL) foi diluído com água destilada (2,5 mL) e 0,5 mL de cloreto férrico foi adicionado. A mudança de coloração de amarelo para verde indica se as amostras possuem capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} e o aumento da abs após 10 min de reação a 700 nm indica aumento do poder redutor.

2.9.3 Capacidade Antioxidante Trolox Equivalente (TEAC)

Os mesmos extratos utilizados para avaliação do poder redutor foram utilizados, porém diluídos até 2,5 mg.mL⁻¹. Aliquotas de 30 µL dos extratos foram misturadas com 3 mL do radical ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) em agitador de tubos (vórtex). Após repouso de 6 min, a leitura da abs em espectrofotômetro a 734 nm foi realizada. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mmol.mg⁻¹ de trolox equivalente de acordo com a equação da reta de curva-padrão de trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (RUFINO et al., 2007).

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de significância de 5 % para verificar a existência de diferença entre as amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas neste estudo é importante para o estabelecimento da concentração de substrato utilizada nas hidrólises. A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 contém 53,8 % p/p (base seca), como mostrado na Tabela 1. Com o processo de extração protéica,

obteve-se 83,9 % de proteína, sendo que os rendimentos em massa e de extração protéica foram, respectivamente, 40,6 % e 63,3 %.

A repetição do processo de extração protéica proporcionou a obtenção de isolado protéico com 91,3 % p/p de proteína (isolado protéico). O rendimento em massa e de extração protéica, para o isolado protéico, foram 33 % e 57,1 %, respectivamente.

Tabela 1 - Composição proximal da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e seus extratos protéicos (base seca)

Determinação	<i>Spirulina</i> (%)	Concentrado Protéico (%)	Isolado Protéico (%)
Proteínas	53,8 ^a ± 3,1	83,9 ^b ± 1,7	91,3 ^c ± 1,2
Carboidratos	15,9 ^a ± 1,2	4,6 ^b ± <0,1	1,2 ^c ± 0,3
Lipídeos	7,5 ^{ab} ± 1,5	8,7 ^a ± 1,8	4,6 ^b ± 0,5
Cinzas	15,9 ^a ± <0,1	4,0 ^b ± <0,1	1,9 ^c ± <0,1

Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05)

O elevado teor protéico obtido nos extratos de *Spirulina* sugerem muitas aplicações nutricionais possíveis. Suplementos alimentares com elevado teor de proteínas possuem elevada demanda de mercado e são consumidos para melhorar a performance em esportes, hipertrofia e recuperação muscular e para saúde em geral (AGARWAL et al., 2015). Também considera-se importante, para idosos, consumirem suplementos ricos em proteínas, de elevada qualidade, para compensar a perda de massa muscular, proporcionando benefícios à saúde (BAUER et al., 2013; DEUTZ et al., 2014).

3.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DE *Spirulina*

A hidrólise enzimática das proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, do concentrado protéico e do isolado protéico apresentaram comportamento distinto quando realizadas em erlenmeyer em relação ao biorreator *STR*, como pode-se observar na Figura 4. Na Figura 4(a) foi obtido GH entre aproximadamente 60 e 70 %. Em reator *STR* (Figura 4.b), os hidrolisados protéicos obtidos apresentam entre aproximadamente 50 e 80 % de GH. Em erlenmeyer, maior período de tempo foi necessário para que se alcançasse a fase estacionária da reação enzimática com a biomassa de *Spirulina*, acima de 240 min. Pode-se observar

também que as curvas de GH entre o concentrado e o isolado protéico estão mais próximas, para os reatores tipo erlenmeyer.

Figura 4 - Cinética Enzimática da Hidrólise de Proteínas de *Spirulina* sp. LEB 18 (a) em reator tipo erlenmeyer e (b) em reator *STR*

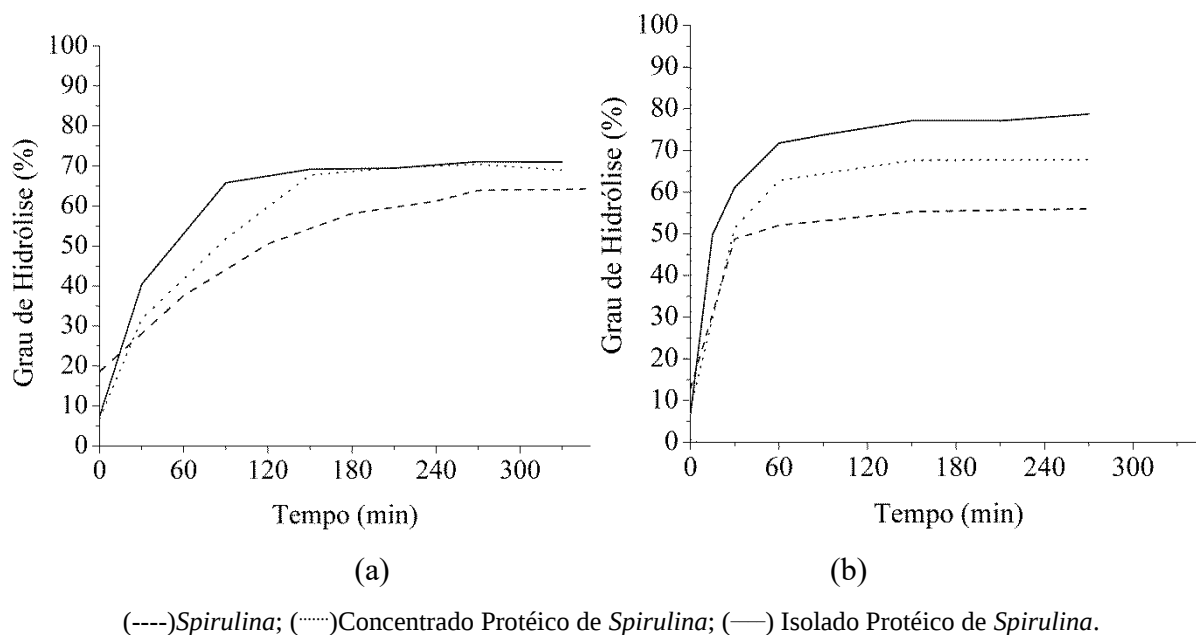


Tabela 2 - Grau de Hidrólise (GH) e produtividade em diferentes reatores

Reator	Ensaio	Grau de Hidrólise (%)	Produtividade (mg.mL ⁻¹ .min ⁻¹)
Erlenmeyer	<i>Spirulina</i>	58,1 ^c ± 1,8	0,087 ^e ± 0,003
	Concentrado Protéico de <i>Spirulina</i>	67,7 ^b ± 0,8	0,107 ^d ± 0,003
	Isolado Protéico de <i>Spirulina</i>	69,2 ^b ± 1,1	0,105 ^d ± 0,005
Biorreator <i>STR</i>	<i>Spirulina</i>	55,3 ^c ± 3,2	0,147 ^c ± 0,009
	Concentrado Protéico de <i>Spirulina</i>	67,6 ^b ± 1,8	0,180 ^b ± 0,005
	Isolado Protéico de <i>Spirulina</i>	77,5 ^a ± 1,2	0,207 ^a ± 0,003

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p<0,05).

O GH da biomassa de *Spirulina* e do concentrado em ambos os reatores não apresentaram diferença significativa, com nível de confiança de 95 %, ao contrário do GH o isolado protéico de *Spirulina*, em que foi possível obter 77,5 % de GH em reator *STR* (Tabela 2). Além disso, pode-se observar que a produtividade, para as amostras hidrolisadas em biorreator *STR* foi significativamente maior do que a produtividade das hidrólises em erlenmeyer.

Rendimentos elevados são requeridos quando se trata da obtenção de produtos de alto valor agregado, ao contrário de produtos de baixo valor agregado, em que elevada produtividade é mais importante. No presente estudo, foi possível obter maior rendimento de hidrólise (maiores GH) e também maior produtividade, quando utilizado o biorreator *STR*. Isso pode representar vantagem econômica em termos de produção, pois os hidrolisados protéicos são produtos de alto valor agregado, e com o biorreator *STR* estudado, eles podem ser obtidos em menor intervalo de tempo.

No biorreator *STR*, o GH aumentou linearmente com a concentração de proteínas, da biomassa de *Spirulina* (53,8 % de proteína), em relação ao concentrado protéico (83,9 % de proteína) e ao isolado protéico (93,1 % de proteína). Utilizando os reatores do tipo erlenmeyer não foi verificada diferença significativa entre o GH do concentrado protéico e o isolado protéico, apenas do GH da biomassa de *Spirulina* em relação a eles.

O aumento do GH, resultado do aumento da concentração de proteínas pode ser explicado pela acessibilidade das proteases às proteínas, visto que a enzima necessita ligar-se à superfície da molécula para ter acesso às ligações peptídicas e iniciar a hidrólise. Com isso o pré-tratamento do substrato promove um aumento da exposição das ligações peptídicas e da adsorção das enzimas à proteína, resultando em um aumento do grau de hidrólise.

Carvalho et al. (2013) afirmaram que a alta concentração de sólidos diminui os rendimentos de hidrólise devido à resistência de transferência de massa através do filme líquido ao redor do substrato. Os mesmos autores afirmaram que diversos fatores devem ser observados, a fim de obter rendimentos máximos de hidrólise, como o tipo de pré-tratamento realizado no substrato, concentração de enzima e substrato presente, termoestabilidade das enzimas, pH do meio, velocidade de agitação entre outros.

A termoestabilidade das enzimas requer um controle rigoroso da temperatura do processo, pois o aumento excessivo da temperatura pode causar desnaturação da enzima e se o aquecimento não for eficiente, ocorrerá diminuição da atividade da enzima. No presente estudo, a temperatura das reações de hidrólise permaneceu constante, através do controle automático de temperatura, por sistema de encamisamento de água, para o reator *STR* e por resistência

elétrica para os erlenmeyers acoplados em mesa agitadora, porém como nos estudos de Zabotti (2014), o modo de agitação pode ter influenciado na transferência de calor para o meio reacional.

O mesmo controle rigoroso deve ser realizado com o pH, visto que um meio muito ácido provoca a desnaturação das enzimas (CARVALHO et al., 2013). Observou-se que o pH da solução baixou com mistura das amostras e o tampão, para em torno de 9,0 e 7,5 após a adição da enzima, levando cerca de 30 min para aumentar novamente, estabilizando-se ao redor de pH 8,0. Isso pode explicar o fato do GH ter sido maior quando o controle do pH foi realizado automaticamente no reator STR, em relação às hidrólises em erlenmeyer, uma vez que o pH não se manteve na condição ótima da atividade da enzima.

As técnicas de controle de pH devem ser consideradas para aumentar os rendimentos cinéticos de hidrólise enzimática, principalmente em produções de hidrolisados protéicos em grande escala (FERNÁNDEZ; KELLY, 2016). Tendo isso em vista, e com os resultados de GH obtidos do estudo cinético, para continuidade deste trabalho, os hidrolisados protéicos da biomassa de *Spirulina*, do concentrado e isolado protéico, foram conduzidas no biorretaror STR.

As hidrólises foram então, realizadas durante 2,5 h, pois a partir deste período o GH permaneceu constante. Da mesma maneira do estudo cinético, houve diferença significativa entre o GH das amostras de biomassa de *Spirulina*, concentrado protéico e isolado protéico de *Spirulina* (Tabela 3).

Tabela 3 - Grau de Hidrólise dos Hidrolisados Protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18

Amostra	Grau de Hidrólise (%)
<i>Spirulina</i>	54,4 ^c ± 2,9
Concentrado Protéico de <i>Spirulina</i>	66,8 ^b ± 1,7
Isolado Protéico de <i>Spirulina</i>	77,9 ^a ± 1,0

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p<0,05).

Os GH das amostras do presente estudo foram superiores aos da hidrólise de proteínas de soro de leite, consideradas ideais para suplementação alimentar. (CASTRO; SATO, 2014c) otimizaram a hidrólise de *whey protein* com diferentes proteases e alcançaram GH máximo próximos à 50 %. Esses autores, em outro estudo com hidrólise de proteínas isoladas de soja

(CASTRO; SATO, 2014b), atingiram no máximo 20 % de GH em 120 min de reação. Hidrolisados de soro de leite e de caseína são utilizados por atletas para induzir o aumento rápido de aminoácidos no plasma sanguíneo (antes, durante e pós exercício físico) para maximizar o anabolismo de proteínas musculares e facilitar sua recuperação (MANNINEN, 2009).

Proteínas hidrolisadas elaboradas para aplicações em nutrição esportiva, nutrição enteral, formulações hipoalergênicas devem apresentar elevado grau de hidrólise e por consequência peptídeos de pequeno tamanho, em maior quantidade. Cadeias curtas de peptídeos são menos alergênicos devido a eliminação de epítodos sequenciais (SIEMENSMA; WEIJER; BAK, 1985).

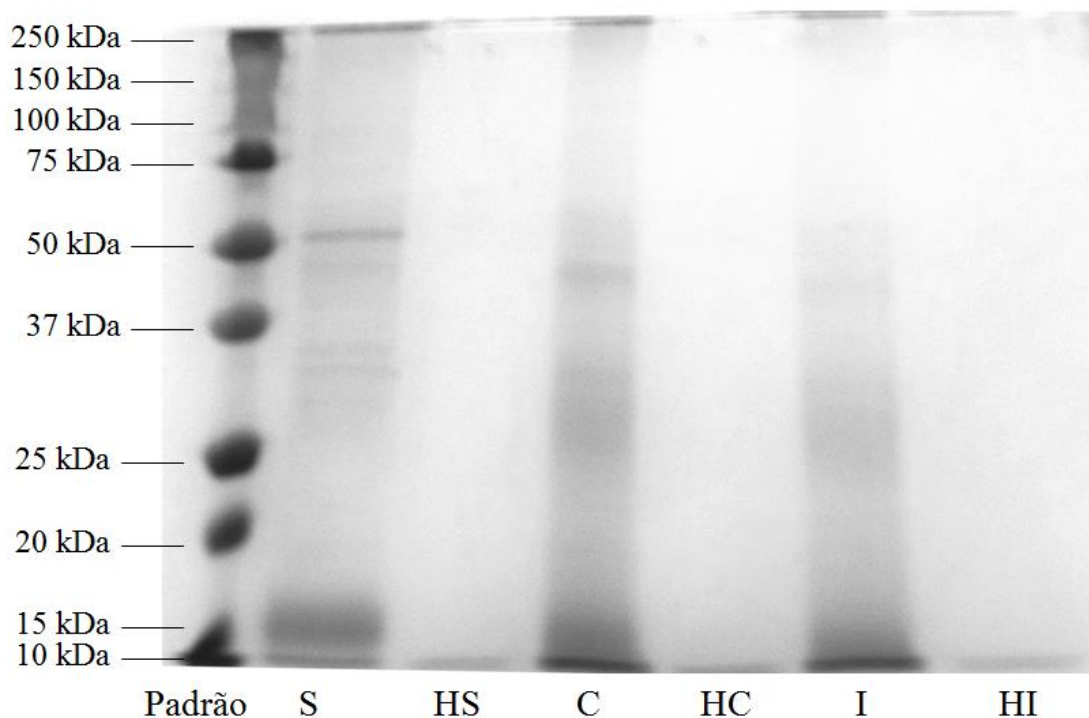
Em suplementos protéicos para atletas, peptídeos e aminoácidos livres devem estar presentes para aumentar a velocidade de absorção de aminoácidos e assim maximizar o desempenho físico (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014). A maioria dos estudos sugerem que a ingestão de proteínas e aminoácidos, principalmente os de cadeia ramificada, por praticantes de atividade física, pode aumentar a síntese muscular protéica, aliados a treinamento físico de resistência (HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010).

3.3 MASSA MOLECULAR DAS PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS

Com a análise do perfil eletroforético das proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, do concentrado, isolado e seus hidrolisados protéicos é possível observar que houve diminuição da massa molecular das proteínas devido à ação da enzima (Figura 5). Vários fragmentos corados são possíveis de serem observados para as amostras não hidrolisadas. Proteínas com 250 kDa, ou maiores, estão presentes na biomassa e em seus extratos protéicos, assim como proteínas de aproximadamente 50 kDa.

As bandas eletroforéticas detectadas para o concentrado e o isolado protéico, entre 25 e 37 kDa, aparentam estar mais evidentes do que para a biomassa de *Spirulina*. Isso pode indicar a maior concentração de proteínas que essas amostras possuem. O mesmo pode ser observado para proteínas com massa molecular ao redor de 15 kDa.

Figura 5 - Perfil Eletroforético dos extratos e dos hidrolisados protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18



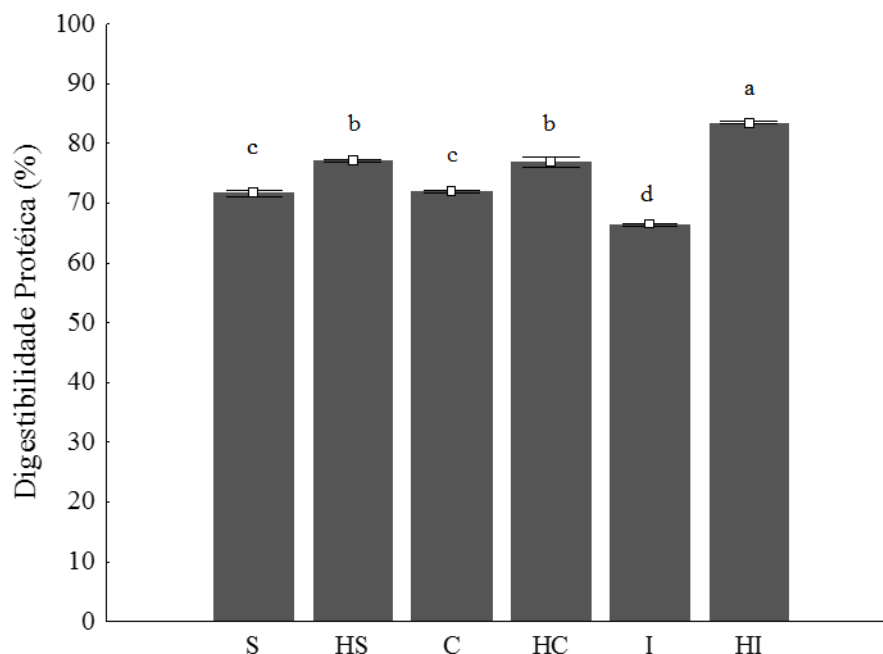
S = *Spirulina*; HS = hidrolisado de *Spirulina*; C = concentrado protéico de *Spirulina*; HC = Concentrado protéico hidrolisado; I = isolado protéico de *Spirulina*; HI = Isolado protéico hidrolisado.

O método empregado para determinação da massa molecular de proteínas pelo método de Laemmli (1970) com gel de separação de 12,5 % não foi adequada para detectar a massa molecular dos peptídeos presentes nos hidrolisados protéicos. Porém, apesar disso, é possível afirmar que os hidrolisados protéicos da *Spirulina*, do concentrado e do isolado protéico possuem peptídeos menores de 10 kDa, pois esta foi a menor banda de detecção do padrão de proteínas utilizado.

3.4 DIGESTIBILIDADE PROTÉICA *in vitro*

A digestibilidade *in vitro* dos extratos protéicos de *Spirulina* e de seus hidrolisados protéicos variou de 66,5 % (isolado protéico) à 83,4 % (isolado protéico hidrolisado). Pode-se observar que houve diferença significativa no valor de digestibilidade protéica, para todas as amostras, quando comparadas aos seus hidrolisados protéicos (Figura 6). Isso se deve, principalmente, à diminuição do tamanho das moléculas de proteína, como mostraram os resultados de eletroforese.

Figura 6 - Digestibilidade Protéica *in vitro* dos extratos protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18 e de seus hidrolisados



S = *Spirulina*; C = Concentrado protéico; I = Isolado protéico; HS = *Spirulina* Hidrolisada; HC = Concentrado protéico hidrolisado; HI = Isolado protéico hidrolisado

■ Média ▬ Média ± Desvio Padrão ($p < 0,05$)

Letras iguais significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras.

Diversos estudos relatam que as proteínas de fontes algais são altamente susceptíveis à ação de enzimas proteolíticas. Por outro lado, existem outros compostos presentes, como compostos fenólicos e polissacarídeos que podem limitar a digestibilidade de suas proteínas (IBAÑEZ; CIFUENTES, 2013).

Pires et al. (2006) afirmam que a digestibilidade é influenciada pela fonte de proteína. Comparando-se com suplementos alimentares convencionais, a digestibilidade das proteínas de *Spirulina*, do seu concentrado protéico e isolado protéico foi maior do que de proteínas isoladas de soja. Almeida et al. (2015) encontraram 55,2 % de digestibilidade para esse suplemento. Os mesmos autores determinaram a digestibilidade de hidrolisados de soro de leite comercializado no Brasil, que foi o que apresentou maior digestibilidade, igual a 88,4 %, e caseína, em torno de 83 %. Concentrado protéico de soro de leite, com 75 % de proteína, apresentou 25 % de digestibilidade *in vitro* antes de hidrolisado e depois de hidrolisado aumentou para 70 % nos estudos de Sinha et al. (2007).

A partir disso, pode-se dizer que a digestibilidade das proteínas extraídas de *Spirulina* e seus hidrolisados é comparável com as proteínas do leite e maior que às proteínas vegetais. A

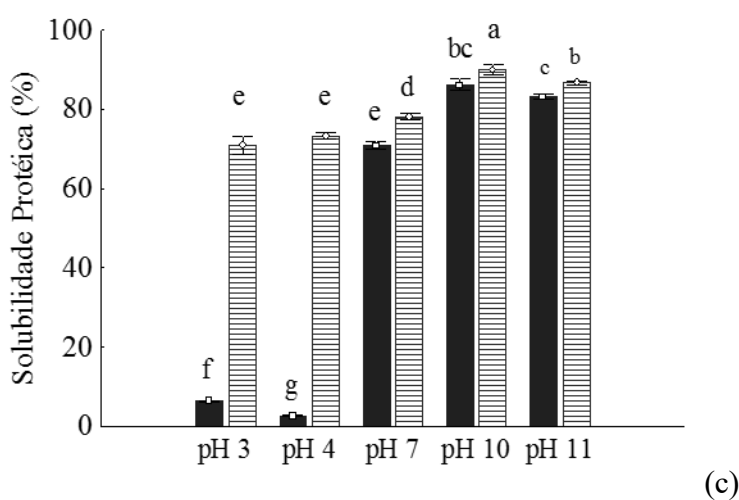
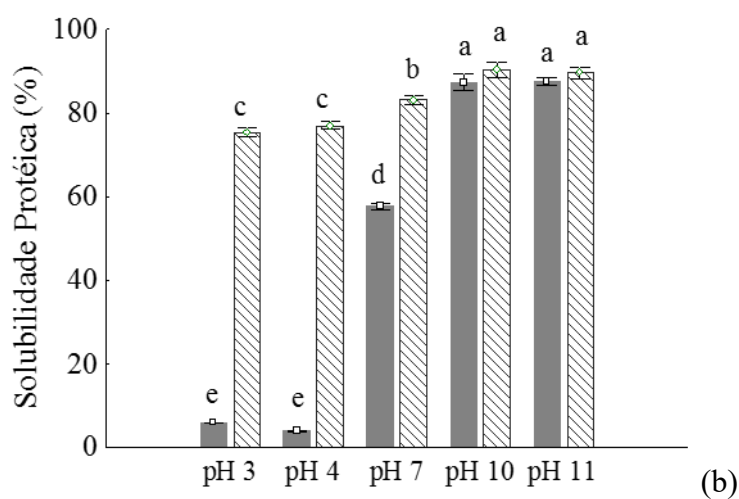
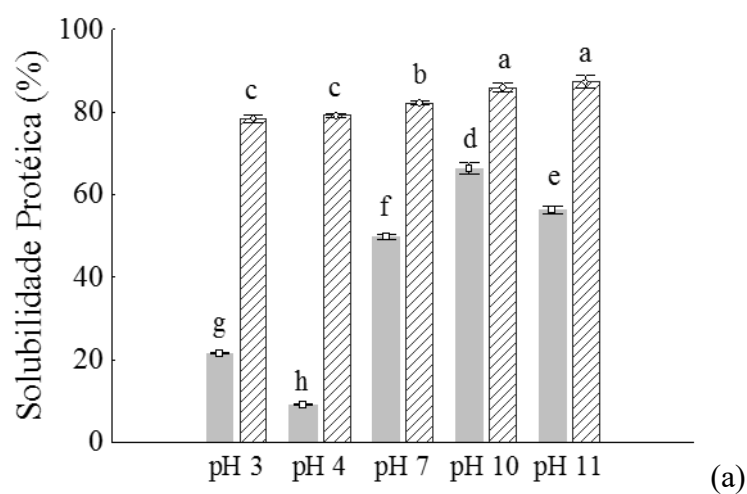
digestibilidade desses ingredientes é extremamente importante quando deseja-se aplicá-los como suplementos protéicos.

3.5 SOLUBILIDADE PROTÉICA

A Figura 7 apresenta a solubilidade das proteínas de *Spirulina*, do concentrado, isolado protéico e seus hidrolisados em diferentes pH. O pH em que as proteínas apresentaram menor solubilidade, para as amostras não hidrolisadas de *Spirulina* (Figura 7.a) e isolado protéico (Figura 7.c) foi o pH 4, pois este é o pH mais próximo ao ponto isoelétrico, e em que foi realizada a extração química das proteínas. Para o concentrado protéico, não houve diferença significativa entre a solubilidade em pH 3 e 4.

Observou-se também, que para todas as amostras, exceto para o concentrado protéico e seu hidrolisado nos pH 10 e 11 (Figura 7.b), que a solubilidade dos hidrolisados protéicos foi maior do que os não hidrolisados, alcançando 90 %, para os hidrolisados do concentrado e do isolado protéico em pH alcalino. A diminuição da massa molecular das proteínas dos hidrolisados protéicos de *Spirulina* pode justificar o aumento da solubilidade, indicando que houve quebra das moléculas de proteína em peptídeos menores. Gbogouri et al. (2004) e Dong et al. (2008) afirmam que os peptídeos liberados durante a hidrólise são constituídos de resíduos polares, que são capazes de estabelecer pontes de hidrogênio com água. Uma vez que a enzima utilizada para obtenção dos hidrolisados das amostras de *Spirulina* foi uma serinoendopeptidase, o aumento da solubilidade pode ter sido causado também pela exposição do resíduo serina, um aminoácido polar.

A hidrólise enzimática é frequentemente usada para melhorar as propriedades funcionais e nutricionais de proteínas. Geralmente acarreta 3 efeitos distintos: (1) diminuição do peso molecular; (2) aumento do número de grupos ionizáveis e (3) exposição de grupos hidrofóbicos protegidos na estrutura original (PANYAM; KILARA, 1996). Esses efeitos podem modificar efetivamente a conformação e estrutura da proteína e assim melhorar a solubilidade, propriedades de superfície e de gelificação. Além disso, hidrolisados protéicos são fisiologicamente melhores do que proteínas intactas pois são mais facilmente absorvidos pelo organismo devido à maior solubilidade (KONG et al., 2008).

Figura 7 - Solubilidade Protéica de *Spirulina*, seus extratos e hidrolisados protéicos -

(a) *Spirulina*; Hidrolisado de *Spirulina*; (b) Concentrado Protéico de *Spirulina*; Concentrado Protéico Hidrolisado; (c) Isolado Protéico de *Spirulina*; Isolado Protéico Hidrolisado
 Média Média $\pm$ Desvio Padrão ($p < 0,05$)
 Letras iguais em cada figura significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras.

Apesar de não ter ocorrido aumento significativo da solubilidade do concentrado protéico hidrolisado, em relação ao não hidrolisado, em pH alcalino, a hidrólise enzimática aumentou a solubilidade em aproximadamente 13 e 19 vezes nos pH 3 e 4, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para todas as amostras em pH ácido. Isso quer dizer que, mesmo próximo ao ponto isoelétrico das proteínas, os hidrolisados protéicos apresentaram elevada solubilidade. Geralmente nesta faixa de pH, proteínas exibem maiores aplicações em produtos alimentícios como bebidas à base de frutas e iogurtes, em que o pH varia de 3,4 a 4,0 e de 4,0 a 5,0 (VISHWANATHAN et al., 2011).

Neste sentido, o aumento da solubilidade causado pela hidrólise enzimática das proteínas de *Spirulina*, do concentrado protéico em pH ácido e neutro e do isolado protéico agrega vantagens na incorporação de bebidas, por exemplo. Suplementos alimentares, com proteínas de leite com mais de 70 % de proteínas, possuem aplicação limitada em bebidas devido à baixa solubilidade em pH neutro (HAVEA, 2006).

Além da hidrólise enzimática ter causado aumento da solubilidade, a extração das proteínas da microalga também influenciou na solubilidade. Pode-se observar na Figura 7(c) que a solubilidade do isolado protéico em pH 7 foi aproximadamente 75 %, enquanto que no mesmo pH as proteínas de *Spirulina* (Figura 7.a) apresentaram 50 % de solubilidade e além disso, não apresentou diferença significativa em relação aos hidrolisados em pH 3 e 4. O mesmo foi observado para a solubilidade do isolado protéico em pH 10 e o hidrolisado protéico em pH 11, que alcançaram aproximadamente 86 % de solubilidade (Figura 7.c), enquanto que as proteínas de *Spirulina* apresentaram 65 % e 56 % de solubilidade nos respectivos pH (Figura 7.a). Banach, Lin e Lamsal (2013a) também não encontraram diferença significativa entre a solubilidade de proteínas concentradas de leite e seus hidrolisados em pH alcalino e sugeriram que as etapas de ressuspensão das proteínas e liofilização durante o processo de extração podem ter causado aumento da solubilidade.

Isolados protéicos de soja comerciais foram hidrolisados com proteases por Castro e Sato (2014b) resultando em 75 e 85 % de solubilidade, aproximadamente. Concentrados protéicos de soro de leite hidrolisados obtiveram em torno 99 % de solubilidade, determinada por Ma et al. (2014) e 86,5 %, determinada por Castro e Sato (2014a). Logo, pode-se dizer que os produtos obtidos de *Spirulina* neste estudo podem ser comparados com ingredientes protéicos comerciais, uma vez que foram obtidos hidrolisados protéicos com 90 % de solubilidade.

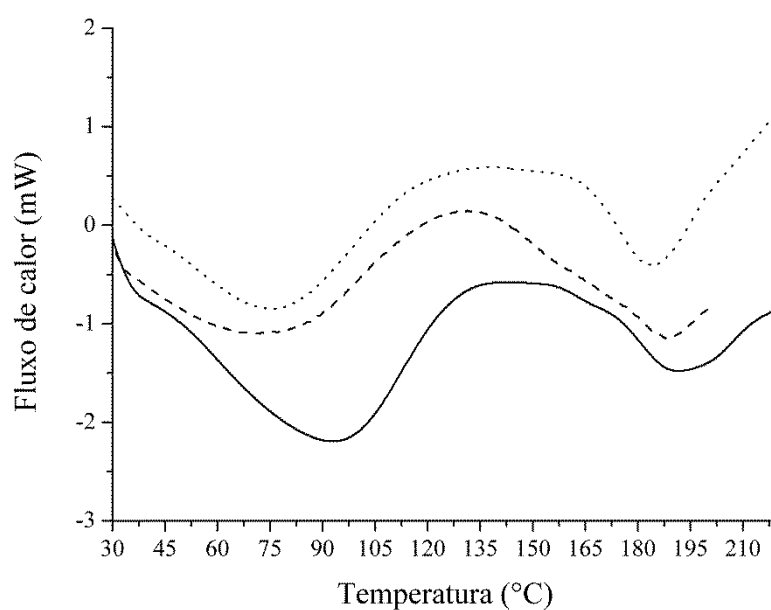
3.6 ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica de uma proteína pode ser avaliada através da temperatura de desnaturação (T_d), ou pico de temperatura de transição, no entanto, a proporção de proteínas desnaturadas pode ser observada pela área abaixo do pico endotérmico, representando mudanças entálpicas (ARNTFIELD; MURRAY, 1981). A temperatura de desnaturação T_d e a variação de entalpia foram examinadas para avaliar a estabilidade térmica das proteínas e dos hidrolisados protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18, como mostram a Tabela 4 e a Figura 8.

Tabela 4 - Parâmetros de avaliação da estabilidade térmica de extratos protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18

Ensaio	Temperatura de desnaturação (°C)	Variação de entalpia (Kcal.g ⁻¹)
<i>Spirulina</i>	69,2	0,710
Concentrado Protéico de <i>Spirulina</i>	107,5	0,366
Isolado Protéico de <i>Spirulina</i>	96,7	0,654

Figura 8 - Curva de Estabilidade Térmica de hidrolisados protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18



(.....) *Spirulina* Hidrolisada; (----) Concentrado Protéico Hidrolisado; (—) Isolado Protéico Hidrolisado

A Tabela 4 mostra que as proteínas do concentrado e do isolado protéico apresentaram maior T_d que as proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, sendo essas, 107, 96,7 e

69,2°C, respectivamente. Isso indica que os extratos de *Spirulina* sp. LEB 18 são mais resistentes à desnaturação protéica por ação do calor, podendo ser utilizados em alimentos que necessitem de tratamento térmico em temperaturas mais elevadas.

Os hidrolisados protéicos de *Spirulina* sp LEB 18, apresentaram 2 picos endotérmicos de desnaturação, como pode ser observado na Figura 8. As proteínas de *Spirulina* hidrolisada apresentaram Td em 76,5 e 187 °C, o concentrado protéico hidrolisado em 72,1 e 187,9 °C, e o isolado protéico hidrolisado em 75,1 e 186 °C. Da mesma forma que o comportamento térmico dos extratos, os hidrolisados protéicos apresentaram maior Td que as proteínas da biomassa de *Spirulina*.

Pesquisadores indicam que a estrutura nativa das proteínas é estabilizada por forças moleculares internas. Mudanças endotérmicas estão associadas ao rompimento de pontes de hidrogênio e de interações polares (ARNTFIELD; MURRAY, 1981; PARK; LANIER, 1990). Portanto, a hidrólise enzimática das proteínas de *Spirulina* pode ter levado à mudança estrutural que acarretou no aumento de sua estabilidade. O fato de existirem 2 picos endotérmicos também pode estar associado a isto.

Ismond e Welsh (1992) afirmam que quanto maior o fluxo de calor na proteína, no processo de desnaturação térmica, indica maior estado de natividade da proteína. O ΔH dos hidrolisados protéicos de *Spirulina*, do concentrado e do isolado foram 0,412, 0,259 e 0,259 kcal.g⁻¹, respectivamente. Esses valores foram menores quando comparados às amostras não hidrolisadas, o que indica às mudanças causadas pela hidrólise enzimática, que não deixa de ser um método de desnaturação de proteínas, porém desejável.

O estudo do comportamento térmico de proteínas é interessante, pois algumas propriedades funcionais são relacionadas à elevada estabilidade térmica de sua estrutura molecular, como capacidade de formar gel (DESHPANDE; DAMODARAN, 1990; MENG; MA, 2001). O calor aplicado às proteínas também pode aumentar a absorção de água e de óleo e dependendo do tipo de proteína, pode aumentar ou reduzir as propriedades de superfície das proteínas (BARROS, 2010).

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A Tabela 5 apresenta os resultados de atividade antioxidante avaliado pelas técnicas de poder redutor, captura do radical DPPH e ABTS (trolox equivalente TEAC). Para todas as técnicas avaliadas, houve aumento significativo da atividade antioxidante entre as amostras de proteína extraídas de *Spirulina* e de seus hidrolisados protéicos.

Tabela 5 - Atividade antioxidante de proteínas e peptídeos de *Spirulina* sp. LEB 18

Ensaio	Método de avaliação		
	Poder Redutor (Abs)	DPPH* (% inibição.mg ⁻¹)	ABTS** (mmol trolox.mg ⁻¹)
<i>Spirulina</i>	0,549 ^d ± 0,016	6,2 ^c ± 0,6	1,53 ^c ± 0,06
Concentrado Protéico de <i>Spirulina</i>	0,555 ^d ± 0,010	5,9 ^c ± 0,3	1,67 ^{bc} ± 0,05
Isolado Protéico de <i>Spirulina</i>	0,413 ^c ± 0,021	4,5 ^c ± 0,3	1,70 ^b ± 0,08
<i>Spirulina</i> Hidrolisada	0,751 ^b ± 0,027	12,4 ^b ± 0,9	1,94 ^a ± 0,05
Concentrado Protéico de <i>Spirulina</i> Hidrolisado	0,881 ^a ± 0,001	15,5 ^a ± 0,6	1,98 ^a ± 0,01
Isolado Protéico de <i>Spirulina</i> Hidrolisado	0,645 ^c ± 0,010	16,6 ^a ± 0,9	2,04 ^a ± 0,05

Média ± desvio padrão

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

*DPPH = 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

**ABTS = 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

As substâncias antioxidantes podem agir por diferentes mecanismos e assim agir em diversas etapas no estresse oxidativo, evitando o desencadeamento de diversas doenças. Os compostos de ação antioxidante podem inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis (WOJCIK; BURZYNSKA-PEDZIWIATR; WOZNIAK, 2010).

No ensaio de poder redutor, a habilidade antioxidante dos peptídeos foi avaliada pela capacidade em doar elétrons para mudar o potencial redox do ferro de Fe³⁺ para Fe²⁺. Entre as amostras não hidrolisadas, apenas o isolado protéico apresentou diferença significativa, apresentando menor poder redutor. O processo de extração das proteínas para obtenção do isolado protéico pode ter provocado agregação das proteínas, deixando os aminoácidos das proteínas menos expostos à doação de elétrons. Triptofano e tirosina, por exemplo, são

aminoácidos que apresentam elevada densidade de elétrons nas suas cadeias laterais (UDENIGWE; ALUKO, 2011).

Quanto aos hidrolisados protéicos, todas as amostras apresentaram diferença significativa, sendo que o concentrado protéico hidrolisado apresentou maior capacidade antioxidante pela técnica do poder redutor, seguidos da biomassa hidrolisada e do isolado protéico hidrolisado. Apesar da diferença estatística, houve um aumento proporcional do poder redutor, comparando-se as amostras não hidrolisadas separadamente, em relação aos seus respectivos hidrolisados.

A capacidade de sequestro do radical DPPH é amplamente utilizada para determinar a habilidade que compostos antioxidantes possuem em doar hidrogênio. Amostras de caseína apresentam aproximadamente 10 % de inibição desse radical (SLIZYTÉ et al., 2009). Todos os hidrolisados protéicos obtidos no presente estudo apresentaram mais que 10 % de inibição do radical DPPH, o que indica que, por este mecanismo de ação antioxidante, os peptídeos de *Spirulina* sp. LEB 18 podem apresentar maior inibição de radicais livres, em comparação com proteínas convencionais.

O ensaio de atividade antioxidante trolox equivalente, baseado na descoloração do cátion radical ABTS, é amplamente utilizado para avaliar o potencial antioxidante tanto de amostras lipofílicas ou hidrofílicas quanto a inibição de radicais livres (KONG; XIONG, 2006). A Tabela 5 mostra que houve aumento da capacidade antioxidante entre as amostras não hidrolisadas e hidrolisadas, porém os hidrolisados protéicos obtidos neste estudo não apresentaram diferença significativa quanto à inibição do radical ABTS.

Sequências peptídicas liberadas durante a hidrólise enzimática de proteínas podem desempenhar funções biológicas, como atividade antioxidante (UDENIGWE; ALUKO, 2012). Com os resultados obtidos, é possível afirmar que a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e seus extratos protéicos apresentam capacidade antioxidante, e que a hidrólise enzimática das proteínas gerou peptídeos com atividade antioxidante.

As propriedades antioxidantes de peptídeos são altamente influenciadas pela massa molecular dessas moléculas (RAJAPAKSE et al., 2005). Em geral, peptídeos derivados de proteínas do leite, que possuem atividade antioxidante, possuem cadeia curta de aminoácidos, entre 5 a 11, e contêm aminoácidos hidrofóbicos como prolina, histidina, tirosina e triptofano (PIHLANTO, 2006).

Sheih, Wu e Fang (2009), estudaram a atividade antioxidante de peptídeos purificados da microalga *Chlorella vulgaris*, com massa molecular de 1,3 kDa e atribuíram a bioatividade à sequência de aminoácidos. A susceptibilidade oxidativa dos aminoácidos na cadeia peptídica

aos ataque dos radicais livres é determinada pelas cadeias laterais dos aminoácidos (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008).

Lisboa et al. (2016) avaliou a atividade antioxidante de peptídeos de *Spirulina* sp. LEB 18 e os hidrolisados obtidos por esse autor apresentaram valores próximos para o poder redutor das amostras não hidrolisadas encontrados no atual estudo, porém os ensaios de DPPH e ABTS apresentaram melhores resultados. Os micro-organismos exibem atividade antioxidante em resposta aos estresses causados durante o seu crescimento, estimulando seu sistema intrínseco de defesa antioxidante (SRIVASTAVA; BHARGAVA; RAI, 2005). Portanto, mesmo tratando-se da mesma espécie, a atividade antioxidante pode variar dependendo de cada cultivo.

Compostos antioxidantes são importantes para a saúde pois protegem o organismo de espécies reativas de oxigênio (ROS) evitando o desencadeamento de doenças, como aterosclerose, doenças cardíacas, hipertensão, diabetes, mal de Alzheimer e câncer (ZHOU et al., 2012) e também são importantes na conservação de alimentos pois evitam peroxidação lipídica (SARMADI; ISMAIL, 2010). Tendo isso em vista, os hidrolisados protéicos de *Spirulina* e de seus extratos protéicos podem apresentar benefícios à saúde e ao processamento de alimentos, com a vantagem de serem de fonte natural.

4 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática de extratos protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18 em reator do tipo *STR* permitiu a obtenção de hidrolisados protéicos com elevados GH (54,4 a 77,9 %). A diminuição da massa molecular, resultante do processo de hidrólise, proporcionou aumento do valor nutritivo e biológico das proteínas da biomassa de *Spirulina* e seus extratos protéicos, devido ao aumento da digestibilidade (66,5 a 83,4 %) e atividade antioxidante (1 a 2 vezes, dependendo dos métodos de avaliação). A modificação enzimática também aumentou da solubilidade protéica, alcançando aproximadamente 90 % (p/v), em pH a cima da neutralidade e 80 % (p/v) abaixo, para as amostras de biomassa de *Spirulina*, concentrado e isolado protéico.

Os indicativos de valor nutricional e funcional sugerem a possibilidade de aplicação dos hidrolisados protéicos de *Spirulina* em vários sistemas alimentares, com apelo funcional, principalmente em formulações destinadas à suplementação protéica, altamente disponível para síntese e recuperação muscular.

5 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; BEAUSIRE, R. L. W.; PATEL, S.; PATEL, H. Innovative Uses of Milk Protein Concentrates in Product Development. **Journal of Food Science**, v. 80, n. S1, p. A23–A29, 2015.
- AIHARA, K.; OSAKA, M.; YOSHIDA, M. Oral administration of the milk casein-derived tripeptide Val-Pro-Pro attenuates high-fat diet-induced adipose tissue inflammation in mice. **The British journal of Nutrition**, v. 112, n. 4, p. 513–9, 2014.
- AIKING, H. Future protein supply. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 112–120, 2011.
- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A Pepsin Pancreatin Digest Index of Protein Quality Evaluation. **The Journal of nutrition**, v. 83, n. 64, p. 257–261, 1964.
- ALMEIDA, C. C.; MONTEIRO, M. L. G.; COSTA-LIMA, B. R. C. DA; ALVARES, T. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 7–11, 2015.
- ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Dietary supplement use by adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 4, p. 287–294, 2009.
- A. O. A. C. **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists international**. 17. ed. Washington: D. C., 2000.
- ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 14, n. 4, p. 289–294, jan. 1981.
- BANACH, J. C.; LIN, Z.; LAMSAL, B. P. Enzymatic modification of milk protein concentrate and characterization of resulting functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 397–403, 2013.
- BARROS, K. K. D. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. 2010. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- BAUER, J.; BIOLO, G.; CEDERHOLM, T.; CESARI, M.; CRUZ-JENTOFT, A. J.; MORLEY, J. E.; PHILLIPS, S.; SIEBER, C.; STEHLE, P.; TETA, D.; VISVANATHAN, R.; VOLPI, E.; BOIRIE, Y. Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: A position paper from the prot-age study group. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 14, n. 8, p. 542–559, 2013.
- BELAY, A.; HOUSTON, M. The Potential Application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health menagement. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27–48, 2002.
- BIZZOTO, C. S.; CAPOBIONGO, M.; BIASUTTI, A. R.; SILVA, V. D. M.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina,

obtidos pela ação da corolase e uso do carvão ativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 308–316, 2006.

CARVALHO, M. L.; JR., R. S.; RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; SUAREZ, C. A. G.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 03, p. 437–447, 2013.

CASTRO, R. J. S. DE; SATO, H. H. Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 80–88, 2014a.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 58–65, 2014b.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 2, p. 317–328, 2014c.

CHURCHWARD-VENNE, T. A.; BURD, N. A.; PHILLIPS, S. M. Nutritional regulation of muscle protein synthesis with resistance exercise: strategies to enhance anabolism. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 40, 2012.

COLLA, L. M. **Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia. 2002 p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

CRUZAT, V.; KRAUSE, M.; NEWSHOLME, P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 61, 2014.

DÉCOMBAZ, J. Protéines et acides aminés dans la récupération post-effort. **Science and Sports**, v. 19, n. 5, p. 228–233, 2004.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Food legumes: Chemistry and Technology. **Agris**, v. 10, p. 147–241, 1990.

DEUTZ, N. E. P.; BAUER, J. M.; BARAZZONI, R.; BIOLO, G.; BOIRIE, Y.; BOSY-WESTPHAL, A.; CEDERHOLM, T.; CRUZ-JENTOFT, A.; KRZNARIĆ, Z.; NAIR, K. S.; SINGER, P.; TETA, D.; TIPTON, K.; CALDER, P. C. Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 929–936, 2014.

DICKINSON, J. M.; FRY, C. S.; DRUMMOND, M. J.; GUNDERMANN, D. M.; WALKER, D. K.; GLYNN, E. L.; TIMMERMAN, K. L.; DHANANI, S.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B. B. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation is required for the stimulation of human skeletal muscle protein synthesis by essential amino acids. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 856–862, 2011.

- DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1485–1493, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430–441, 8 maio 2008.
- FERNÁNDEZ, A.; KELLY, P. pH-stat vs. free-fall pH techniques in the enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Food Chemistry**, v. 199, p. 409–415, maio 2016.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 5, p. 497–509, 1957.
- FOX, R. D. **Spirulina Production e Potencial**. France: Edsud, 1996. 232 p.
- FURTADO, A. S. **Produção, avaliação e aplicação de filmes nanocompósitos obtidos a partir de extrato proteico da microalga *Spirulina platensis***. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande 2013.
- GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Influence of Hydrolysis Degree on the functional properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 8, p. 615–622, 2004.
- HAVEA, P. Protein interactions in milk protein concentrate powders. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 415–422, 2006.
- HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 76–79, 1994.
- HULMI, J. J.; LOCKWOOD, C. M.; STOUT, J. R. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, p. 51, 2010.
- IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 703–709, 2013.
- ISMOND, M. A. H.; WELSH, W. D. Application of new methodology to canola protein isolation. **Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 125–127, 1992.
- KONG, B.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 6059–6068, 2006.
- KONG, X.; GUO, M.; HUA, Y.; CAO, D.; ZHANG, C. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p.

8873–8879, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LILLEFOSSE, H. H.; TASTESSEN, H. S.; DU, Z.-Y.; DITLEV, D. B.; THORSEN, F. A.; MADSEN, L.; KRISTIANSEN, K.; LIASET, B. Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 9, p. 1367–75, 2013.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; ALBERTO, J.; COSTA, V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 3, p. 79–86, 2016.

LÓPEZ, C. V. G.; DEL CARMEN CERÓN GARCÍA, M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7587–7591, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 343–351, 2007.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae : Pufa profiles , carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.

MANNINEN, A. H. Protein hydrolysates in sports nutrition. **Nutrition & Metabolism**, v. 6, p. 38, 2009.

MENG, G. T.; MA, C. Y. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. **Food Research International**, v. 73, n. 4, p. 453–460, 2001.

MOBLEY, C.; FOX, C. D.; FERGUSON, B. S.; PASCOE, C. A.; HEALY, J. C.; MCADAM, J. S.; LOCKWOOD, C. M.; ROBERTS, M. D. Effects of protein type and composition on postprandial markers of skeletal muscle anabolism, adipose tissue lipolysis, and hypothalamic gene expression. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 14, 2015.

MORAIS, M. G. DE; REICHERT, C. D. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1-2, p. 144–150, 2008.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715–1718, 1985.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products

of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 120–125, 1996.

PARK, J. W.; LANIER, T. C. EFFECTS OF SALT AND SUCROSE ADDITION ON THERMAL DENATURATION AND AGGREGATION OF WATER-LEACHED FISH MUSCLE. **Journal of Food Biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 395–404, out. 1990.

PENNINGS, B.; KOOPMAN, R.; BEELEN, M.; SENDEN, J. M. G.; SARIS, W. H. M.; LOON, L. J. C. VAN. Exercising before protein intake allows for greater use of dietary protein – derived amino acids for de novo muscle protein synthesis in both young and elderly men 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, p. 322–331, 2011.

PENTERICH, V. R. A.; MATTE, M. H.; YANG, A. C.; CASTRO, F. F. M.; KALIL, J.; PINTO, M. E. M. S. Development of an infant formula with chicken hydrolysate for children from 0 to 12 months with adverse reaction to milk. **Supplement**, 2010.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1306–1314, 2006.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. D. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 179–187, 2006.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 9, p. 562–569, 2005.

RUFINO, M. S. M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, S. M. DE; SAMPAIO, C. G. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-COLIXTO, F. D.; SAURA-CALIXTO, F. D.; SAURA-COLIXTO, F. D. Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico on line**, v. 127, p. 0–3, 2007.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

SHEIH, I. C.; WU, T. K.; FANG, T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3419–3425, 2009.

SIEMENSMA, A. D.; WEIJER, W. J.; BAK, H. J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 89, p. 601–603, 1985.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1484–1491, 2007.

SLIZYTÉ, R.; MOZURAITYTÉ, R.; MARTÍNÉS-ALVAREZ, O.; FALCH, E.;

FOUCHEREAU-PERON, M.; RUSTAD, T. Functional , bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 668–677, 2009.

SRIVASTAVA, A. K.; BHARGAVA, P.; RAI, L. C. Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 1291–1298, 2005.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein Hydrolysates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3148–3161, 2011.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

VISHWANATHAN, K. H.; GOVINDARAJU, K.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Production of Okara and Soy Protein Concentrates Using Membrane Technology. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 158–164, 2011.

WOJCIK, M.; BURZYNSKA-PEDZIWIATR, I.; WOZNIAK, L. A. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 28, p. 3262–3288, 2010.

ZABOTTI, C. **Parâmetros de hidrólise enzimática de farelo de arroz para produção de etanol de segunda geração**. 2014. 69 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2014.

ZAMBÃO, J. E.; ROCCO, C. S.; HEYDE, M. E. D. VON DER. Relação entre a suplementação de proteína do soro do leite e hipertrofia muscular: uma revisão. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 9, n. 50, p. 212–223, 2015.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina máxima***. Paris: Université Des Paris, 1966.

ZHOU, D. Y.; ZHU, B. W.; QIAO, L.; WU, H. T.; LI, D. M.; YANG, J. F.; MURATA, Y. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 148–154, 2012.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, o concentrado, o isolado e os hidrolisados protéicos obtidos neste estudo podem ser utilizados na elaboração de alimentos e suplementos alimentares, uma vez que possuem propriedades nutricionais e funcionais comparáveis aos concentrados e isolados protéicos de soro de leite e soja. Com isso, a biomassa de *Spirulina* e seus extratos protéicos se tornam fonte alternativa às proteínas que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia.

O processo de extração das proteínas de *Spirulina* sp. LEB 18 possibilitou a obtenção de concentrado protéico com 83,9 % de proteína e isolado protéico com 91,3 %. Esses produtos apresentaram solubilidade de aproximadamente 90 % p/v e maior estabilidade de espuma em relação à biomassa de *Spirulina*. O elevado valor protéico e solubilidade, obtidos para o concentrado e isolado protéico, apresenta potencial aplicação desses em alimentos, como substitutos de refeição, bebidas e suplementos protéicos para atletas.

Hidrolisados protéicos com elevado grau de hidrólise e maior produtividade foram obtidos com o reator *stired tank reactor* “STR” alcançando até 77,9 % de GH para o hidrolisado de isolado protéico. Os hidrolisados protéicos apresentaram elevado valor nutritivo devido ao aumento da digestibilidade, mas destaca-se que com a reação de hidrólise, houve aumento da atividade antioxidante, relacionado a possibilidade de peptídeos biotivos terem sido gerados.

Com os resultados obtidos nesta dissertação e de acordo com a legislação brasileira, pode-se dizer que os extratos e os hidrolisados protéicos de *Spirulina* sp. LEB 18 são novos alimentos ou novos ingredientes que podem ser incluídos na classificação de: alimentos para atletas; alimentos com propriedades funcionais ou alegações de saúde. Logo, os produtos obtidos neste trabalho são promissores para serem utilizados como alimentos ou suplementos alimentares, como fontes alternativas de proteína, e que ainda possuem alegação funcional devido à ação antioxidante.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P.; AGBOOLA, S. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1435–1443, 2013.
- AGARWAL, S.; BEAUSIRE, R. L. W.; PATEL, S.; PATEL, H. Innovative Uses of Milk Protein Concentrates in Product Development. **Journal of Food Science**, v. 80, n. S1, p. A23–A29, 2015.
- AHN, C.-B.; JE, J. Y.; CHO, Y. S. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 92–98, nov. 2012.
- AIHARA, K.; OSAKA, M.; YOSHIDA, M. Oral administration of the milk casein-derived tripeptide Val-Pro-Pro attenuates high-fat diet-induced adipose tissue inflammation in mice. **The British journal of nutrition**, v. 112, n. 4, p. 513–9, 2014.
- AIKING, H. Future protein supply. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 112–120, 2011.
- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A Pepsin Pancreatin Digest Index of Protein Quality Evaluation. **The Journal of nutrition**, v. 83, n. 64, p. 257–261, 1964.
- ALASHI, A. M.; BLANCHARD, C. L.; MAILER, R. J.; AGBOOLA, S. O.; MAWSON, A. J.; HE, R.; GIRGIH, A.; ALUKO, R. E. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 146, p. 500–506, 2014.
- ALMEIDA, C. C.; MONTEIRO, M. L. G.; COSTA-LIMA, B. R. C. DA; ALVARES, T. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 7–11, 2015.
- ALMEIDA, I. M. C.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Dietary antioxidant supplements: Benefits of their combined use. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3232–3237, 2011.
- ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Dietary supplement use by adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 4, p. 287–294, 2009.
- A. O. A. C. **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists international**. 17. ed. Washington: D. C., 2000.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 14, n. 4, p. 289–294, jan. 1981.
- ATTAALLAH, W.; YILMAZ, A. M.; ERDOĞAN, N.; YALÇIN, A. S.; AKTAN, A. Ö.

Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. **Pathology and Oncology Research**, v. 18, n. 4, p. 817–822, 2012.

BALDASSO, C. **Concentração , Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

BANACH, J. C.; LIN, Z.; LAMSAL, B. P. Enzymatic modification of milk protein concentrate and characterization of resulting functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 397–403, 2013.

BARROS, K. K. D. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (Spirulina platensis) para alimentação humana**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

BATISTA, M. A.; GAMA, L. L. A.; ALMEIDA, L. P.; ORNELLAS, C. B. D.; SANTOS, L. C.; CRUZ, L. L.; SILVESTRE, M. P. C. Desenvolvimento , caracterização e análise sensorial de formulações alimentares com proteínas do soro de leite ou albumina para crianças. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 18, n. 1, p. 31–41, 2015.

BAUER, J.; BIOLO, G.; CEDERHOLM, T.; CESARI, M.; CRUZ-JENTOFT, A. J.; MORLEY, J. E.; PHILLIPS, S.; SIEBER, C.; STEHLE, P.; TETA, D.; VISVANATHAN, R.; VOLPI, E.; BOIRIE, Y. Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: A position paper from the prot-age study group. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 14, n. 8, p. 542–559, 2013.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.

BELAY, A.; HOUSTON, M. The Potential Application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27–48, 2002.

BIZZOTO, C. S.; CAPOBIONGO, M.; BIASUTTI, A. R.; SILVA, V. D. M.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase e uso do carvão ativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 308–316, 2006.

BLANC, F.; BERNARD, H.; ALESSANDRI, S.; BUBLIN, M.; PATY, E.; LEUNG, S. A.; PATIENT, K. A.; WAL, J. M. Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 166–175, 2008.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 1, p. 3–15, 1995.

BRANS, G. **Design of membrane systems for fractionation of particle suspensions**. Netherlands: Wageningen Universiteit, 2006.

BRANS, G.; SCHROËN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, n. 1-2, p. 263–272, 2004.

BRASIL. Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998 - Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. **Secretaria de Vigilância Sanitária, Ministério Público**, 1998a.

BRASIL. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998 - Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 1998b.

BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 - Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 1999a.

BRASIL. Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999 - Regulamento técnico de procedimentos para registro de Alimentos e ou novos ingredientes. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 6–8, 1999b.

BRASIL. Resolução RDC nº18 de abril de 2010 - Regulamento técnico sobre alimentos para atletas. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. [s.l: s.n.]. v. 2

CARVAJAL, J. C. L. **Caracterização e Modificações Químicas da Proteína da Microalga Spirulina**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2009.

CARVALHO, M. L.; JR., R. S.; RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; SUAREZ, C. A. G.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 03, p. 437–447, 2013.

CASTRO, R. J. S. DE; SATO, H. H. Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 80–88, 2014a.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 2, p. 317–328, 2014b.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 58–65, 2014c.

CAVONIUS, L. R.; ALBERS, E.; UNDELAND, I. pH-shift processing of *Nannochloropsis oculata* microalgal biomass to obtain a protein-enriched food or feed ingredient. **Algal Research**, v. 11, p. 95–102, 2015.

CE. Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the member states relating to food supplements. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2002.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish

protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

CHANPUT, W.; THEERAKULKAIT, C.; NAKAI, S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 3, p. 422–428, 2009.

CHAO, D.; HE, R.; JUNG, S.; ALUKO, R. E. Effect of pressure or temperature pretreatment of isolated pea protein on properties of the enzymatic hydrolysates. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1528–1534, 2013.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteins alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas**. Zaragoza: Acribia, 1989.

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**, v. 49, n. 2, p. 888–898, 2001.

CHRONAKIS, I. S.; MADSEN, M. Algal proteins. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Handbook of Food Protein**. [s.l.] Woodhead Publishing Series in Food Sciences, Technology and Nutrition, 2011. p. 353–394.

CHU, W. Biotechnological applications of microalgae. **International e-Journal of Science, Medicine & Education**, v. 6, n. 126, p. 24–37, 2012.

CHURCHWARD-VENNE, T. A.; BURD, N. A.; PHILLIPS, S. M. Nutritional regulation of muscle protein synthesis with resistance exercise: strategies to enhance anabolism. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 40, 2012.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 254–262, 2000.

CODEX. **Codex General Standard 175 for Soy Protein Products Codex General Standard for Soy Protein Products**, 1989.

COLLA, L. M. **Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande 2002.

COSTA, E. L. DA; GONTIJO, J. A. DA R.; NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 632–640, 2007.

CRUZAT, V.; KRAUSE, M.; NEWSHOLME, P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 61, 2014.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides and proteins. In: **Food Chemistry**. Porto Alegre: Artmed, p. 321–429, 2010.

DAMODARAN, S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. 54–66, 2005.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: editora Artmed, 2010.

DARCY-VRILLON, B. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 23–35, 1993.

DAVIS, J. P.; FOEGEDING, E. A. Foaming and interfacial properties of polymerized whey protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. C404–410, 2004.

DÉCOMBAZ, J. Protéines et acides aminés dans la récupération post-effort. **Science and Sports**, v. 19, n. 5, p. 228–233, 2004.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Food legumes: Chemistry and Technology. **Agris**, v. 10, p. 147–241, 1990.

DEUTZ, N. E. P.; BAUER, J. M.; BARAZZONI, R.; BIOLO, G.; BOIRIE, Y.; BOSY-WESTPHAL, A.; CEDERHOLM, T.; CRUZ-JENTOFT, A.; KRZNARIĆ, Z.; NAIR, K. S.; SINGER, P.; TETA, D.; TIPTON, K.; CALDER, P. C. Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 929–936, 2014.

DEVRIES, M. C.; PHILLIPS, S. M. Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. **Journal of food science**, v. 80, n. 1, p. 8–15, 2015.

DICKINSON, J. M.; FRY, C. S.; DRUMMOND, M. J.; GUNDERMANN, D. M.; WALKER, D. K.; GLYNN, E. L.; TIMMERMAN, K. L.; DHANANI, S.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B. B. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation is required for the stimulation of human skeletal muscle protein synthesis by essential amino acids. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 856–862, 2011.

DILLON, J. C.; PHUN, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional Value of the Alga *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Diets**, v. 77, p. 32–46, 1995.

DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1485–1493, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430–441, 8 maio 2008.

FANG, N.; YU, S.; BADGER, T. M. Comprehensive phytochemical profile of soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4012–4020, 2004.

FERNÁNDEZ, A.; KELLY, P. pH-stat vs. free-fall pH techniques in the enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Food Chemistry**, v. 199, p. 409–415, maio 2016.

FERREIRA, A. DE C. D. **Suplementos Alimentares : Adequabilidade à legislação e efeitos metabólicos em ratos**. 2010. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

FDA. **GRAS Notice Inventory - Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127** Center for Food Safety and Applied Nutrition - Food and Drug Administration, , 2003.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153944.htm>>. Acesso em: 9 mar. 2016

FIGUEIRA, F. D. S.; CRIZEL, T. DE M.; SILVA, C. R.; SALAS-MELLADO, M. DE LAS M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 4, p. 308–316, 2011.

FISCHER, M. **Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein**. Droeendaalsesteeg: Wageningen University, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 5, p. 497–509, 1957.

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Obtenção e Avaliação de Concentrados Proteicos de Corvina (*Micropogonias furnieri*) Processados por Extração Química. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2299–2303, 2009.

FOX, R. D. **Spirulina Production e Potencial**. France: Edsud, 1996.

FRADIQUE, MÓNICA; BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; RAYMUNDO, A. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1656–1664, 2010.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. C. Mecanismos de absorção de Aminoácidos e Oligopeptídeos. Controle e implicações na dietoterapia humana. **Arquivos de Gastroenterologia**, n. 4, p. 227–237, 1999.

FRYDENBERG, R. P.; HAMMERSHØJ, M.; ANDERSEN, U.; GREVE, M. T.; WIKING, L. Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. **Food Chemistry**, v. 192, p. 415–423, 2016.

FURTADO, A. S. **Produção, avaliação e aplicação de filmes nanocompósitos obtidos a partir de extrato proteico da microalga *Spirulina platensis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande: 2013.

GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–25, 2010.

GARCÍA, J. M. R.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F. Development of a process

for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 164–170, 2012.

GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Influence of Hydrolysis Degree on the functional properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 8, p. 615–622, 2004.

GERDE, J. A.; WANG, T.; YAO, L.; JUNG, S.; JOHNSON, L. A.; LAMSAL, B. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 145–153, 2013.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB, K. E. Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 9, p. 2135–2155, 2008.

GONZÁLES-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M P; GUADIZ, E. M. Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 523–528, 1994.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; RAYMUNDO, A.; BANDARRA, N. *Spirulina maxima* and *Diacronema vlkianum* microalgae in vegetable gelled desserts. **Nutrition & Food Science**, v. 38, n. 5, p. 492–501, 2008.

HARAGUCHI, F. K.; DE ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: Composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.

HAVEA, P. Protein interactions in milk protein concentrate powders. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 415–422, 2006.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina, superalimento del futuro**. [s.l: s.n.].

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M. J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, n. 2, p. 82–100, 2014.

HILL, D. J.; MURCH, S. H.; RAFFERTY, K.; WALLIS, P.; GREEN, C. J. The efficacy of amino acid-based formulas in relieving the symptoms of cow's milk allergy: A systematic review. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, n. 6, p. 808–822, 2007.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 76–79, 1994.

HULMI, J. J.; LOCKWOOD, C. M.; STOUT, J. R. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, p. 51, 2010.

- HULTIN, H. O.; KRISTINSSON, H. G.; LANIER, T. C.; PARK, J. W. Process for Recovery of Functional Proteins by pH Shifts. In: **Surimi and Surimi Seafood**. [s.l: s.n.]. p. 169–192.
- IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 703–709, 2013.
- INDERGAARD, M.; MINSAAS, J. Animal and human nutrition. In: **Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential. California**. California: Wiley, 1991. p. 432 p.
- ISMOND, M. A. H.; WELSH, W. D. Application of new methodology to canola protein isolation. **Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 125–127, 1992.
- IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERIS, C. G. **Novel Macromolecules in Food Systems**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers, 2000. v. 41
- JAKOBSSON, I.; LOTHE, L.; LEY, D.; BORSCHHEL, M. W. Effectiveness of casein hydrolysate feedings in infants with colic. **Acta paediatrica**, v. 89, n. 1, p. 18–21, 2000.
- JEMIL, I.; JRIDI, M.; NASRI, R.; KTARI, N.; BEN SLAMA-BEN SALEM, R.; MEHIRI, M.; HAJJI, M.; NASRI, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 963–972, 2014.
- JI, N.; SUN, C.; ZHAO, Y.; XIONG, L.; SUN, Q. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 161, n. 10, p. 148–154, 2014.
- JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 531, n. 1-2, p. 100–109, 2013.
- KATO, A.; OSAKO, Y.; MATSUDOMI, N.; KOBAYASHI, K. Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 33–37, 1983.
- KONG, B.; PENG, X.; XIONG, Y. L.; ZHAO, X. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 540–547, 2012.
- KONG, B.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 6059–6068, 2006.
- KONG, X.; GUO, M.; HUA, Y.; CAO, D.; ZHANG, C. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8873–8879, 2008.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 131–139, 2000.
- KUHN, K. R.; SILVA, F. G. D. E.; NETTO, F. M.; CUNHA, R. L. DA. Assessing the potential of flaxseed protein as an emulsifier combined with whey protein isolate. **Food**

Research International, v. 58, p. 89–97, 2014.

KUMAR, K. S.; GANESAN, K.; SELVARAJ, K.; SUBBA RAO, P. V. Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An edible seaweed. **Food Chemistry**, v. 153, p. 353–360, 2014.

KWON, D. Y.; DAILY, J. W.; KIM, H. J.; PARK, S. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 1–13, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAGRANGE, V.; WHITSETT, D.; BURRIS, C. Global Market for Dairy Proteins. **Journal of Food Science**, v. 80, n. S1, p. A16–A22, 2015.

LEE, D.; ALBENBERG, L.; COMPHER, C.; BALDASSANO, R.; PICCOLI, D.; LEWIS, J. D.; WU, G. D. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, p. 1087–1106, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LI, H.; ZHU, K.; ZHOU, H.; PENG, W. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. **Food Chemistry**, v. 59, p. 1228–1036, 2011.

LIANG, H. N.; TANG, C. H. Pea protein exhibits a novel Pickering stabilization for oil-in-water emulsions at pH 3.0. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 463–469, 2014.

LILLEFOSSE, H. H.; TASTESEN, H. S.; DU, Z.-Y.; DITLEV, D. B.; THORSEN, F. A.; MADSEN, L.; KRISTIANSEN, K.; LIASET, B. Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 9, p. 1367–75, 2013.

LISBOA, C. L. **Produção de nanopartículas contendo peptídeos bioativos de microalgas**. 2013. 155 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande 2013.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; ALBERTO, J.; COSTA, V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 3, p. 79–86, 2016.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P.; COSTA, J. A. V. Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 5, p. 29–38, 2014.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, v. 151, p. 459–465, 2014.

LÓPEZ, C. V. G.; DEL CARMEN CERÓN GARCÍA, M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.;

BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7587–7591, 2010.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

LOVEDAY, S. M.; HINDMARSH, J. P.; CREAMER, L. K.; SINGH, H. Physicochemical changes in a model protein bar during storage. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 798–806, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUSAS, E. W.; RIAZ, M. N. Overview of Soybean Processing and Products Soy Protein Products : Processing and use1. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 573S–580S, 1995.

MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 343–351, 2007.

MA, J. J.; MAO, X. Y.; WANG, Q.; YANG, S.; ZHANG, D.; CHEN, S. W.; LI, Y. H. Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 296–302, 2014.

MA, Z.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K.; PRASHER, S. O.; MONPETIT, D.; MALCOLMSON, L. Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2534–2544, 2011.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae : Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015.

MANNINEN, A. H. Protein hydrolysates in sports nutrition. **Nutrition & Metabolism**, v. 6, p. 38, 2009.

MAO, X. Y.; CHENG, X.; WANG, X.; WU, S. J. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 484–490, 2011.

MARCO, E. R.; STEFFOLANI, M. E.; MARTÍNEZ, C. S.; LEÓN, A. E. Effects of spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 102–108, 2014.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2007.

MATAK, K. E.; TAHERGORABI, R.; JACZYNSKI, J. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. **Food Research International**, v. 77, p. 697–703, 2015.

- MCCARTHY, N. A.; KELLY, P. M.; MAHER, P. G.; FENELON, M. A. Dissolution of milk protein concentrate (MPC) powders by ultrasonication. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 142–148, 2014.
- MEJIA, E. DE; LUMEN, B. O. DE. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. **Sexuality, Reproduction & Menopause**, v. 4, n. 2, p. 91–95, 2006.
- MENG, G. T.; MA, C. Y. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. **Food Research International**, v. 73, n. 4, p. 453–460, 2001.
- MIEDZIANKA, J.; PEKSA, A.; POKORA, M.; RYTEL, E.; TAJNER-CZOPEK, A.; KITA, A. Improving the properties of fodder potato protein concentrate by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 159, p. 512–518, 2014.
- MILLER, R.; GRONINGER, H. S. Functional properties of enzyme-modified acylated fish protein derivatives. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 2, p. 268–272, mar. 1976.
- MOBLEY, C.; FOX, C. D.; FERGUSON, B. S.; PASCOE, C. A.; HEALY, J. C.; MCADAM, J. S.; LOCKWOOD, C. M.; ROBERTS, M. D. Effects of protein type and composition on postprandial markers of skeletal muscle anabolism, adipose tissue lipolysis, and hypothalamic gene expression. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 14, 2015.
- MORAIS, M. G. DE; REICHERT, C. D. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1-2, p. 144–150, 2008.
- MORAIS, M. G. DE; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A V; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872–2876, 2010.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 60–64, 2009.
- MORR, C. V; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715–1718, 1985.
- MORRIS, H. J.; BORGES, L.; MARTINEZ, C.; ALMARALES, A; ABDALA, R. T. Composición bioquímica y propiedades bioestimulantes de un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*). **Revista cubana de química**, v. XIII, n. 3, p. 28–54, 2001.
- MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Functionality of oilseed protein products: A review. **Food Research International**, v. 39, n. 9, p. 945–963, 2006.
- MULVIHILL, D. M.; ENNIS, M. P. Functional Milk Proteins: Production and Utilization. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.) **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. Boston, MA: Springer US, 2003. p. 1175–1228.

MUNE, M. M. A.; MINKA, S. R.; MBOME, I. L. Optimising functional properties during preparation of cowpea protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 154, p. 32–37, 2014.

NESSE, K. O.; NAGALAKSHMI, A. P.; MARIMUTHU, P.; SINGH, M.; BHETARIYA, P. J.; HO, M.; SIMON, R. R. Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 69, n. 1, p. 1–6, 2014.

NEVES, R. A. M.; CAMPOS, T.; MAEQUEZ, U. M. L. Modulação da pressão arterial por hidrolisados protéicos modulation of arterial pressure by protein hydrolysates. **Blood Pressure**, p. 81–86, 2006.

NIELSEN, P. M.; OLSEN, H. S. Enzymatic modification of food protein. In: **Enzymes in food technology**. [s.l.: s.n.]. p. 109–143.

NIGGEMANN, B.; VON BERG, A.; BOLLRATH, C.; BERDEL, D.; SCHAUER, U.; RIEGER, C.; HASCHKE-BECHER, E.; WAHN, U. Safety and efficacy of a new extensively hydrolyzed formula for infants with cow's milk protein allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 19, n. 4, p. 348–354, 2008.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 459–466, 2003.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E.; DE MEJIA, E. G.; DIA, V. P.; AMAYA-LLANO, S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1175–1185, 2011.

OVISSIPOUR, M.; ABEDIAN KENARI, A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; NAZARI, R. M. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 696–705, 2012.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

PAN, H.; SHE, X.; WU, H.; MA, J.; REN, D.; LU, J. Long-Term Regulation of the Local Renin-Angiotensin System in the Myocardium of Spontaneously Hypertensive Rats by Feeding Bioactive Peptides Derived from *Spirulina platensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7765–7774, 2015.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 120–125, 1996.

PARK, J. W.; LANIER, T. C. Effects of salt and sucrose addition on thermal denaturation and aggregation of water-leached fish muscle. **Journal of Food Biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 395–404, out. 1990.

PATEL, M. T.; KILARA, A. Studies on Whey Protein Concentrates. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 10, p. 2731–2740, out. 1990.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 156–164, 2007.

PELGROM, P. J. M.; VISSERS, A. M.; BOOM, R. M.; SCHUTYSER, M. A I. Dry fractionation for production of functional pea protein concentrates. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 232–239, 2013.

PENNINGS, B.; KOOPMAN, R.; BEELEN, M.; SENDEN, J. M. G.; SARIS, W. H. M.; LOON, L. J. C. VAN. Exercising before protein intake allows for greater use of dietary protein – derived amino acids for de novo muscle protein synthesis in both young and elderly men 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, p. 322–331, 2011.

PENTERICH, V. R. A.; MATTÉ, M. H.; YANG, A. C.; CASTRO, F. F. M.; KALIL, J.; PINTO, M. E. M. S. Development of an infant formula with chicken hydrolysate for children from 0 to 12 months with adverse reaction to milk. **Supplement**, 2010.

PICCOLOMINI, A. F.; ISKANDAR, M. M.; LANDS, L. C.; KUBOW, S. High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. **Food and Nutrition Research**, v. 56, p. 1–10, 2012.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1306–1314, 2006.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. D. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 179–187, 2006.

RADMER, R. J.; PARKER, B. C. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 93–98, 1994.

RAIKOS, V.; CAMPBELL, L.; EUSTON, S. R. Effects of sucrose and sodium chloride on foaming properties of egg white proteins. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 347–355, 2007.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 9, p. 562–569, 2005.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas: Ed. Universitária, 1983.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. [s.l.] Instituto Mauá de Tecnologia, 2007.

RODRIGUEZ, H. M.; GUERRERO, M. G. Products and uses of cyanobacteria (blue-green algae). **Profiles on Biotechnology**, p. 247–260, 1992.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 468–474, 2005.

- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. **Comunicado Técnico on line**, p. 1–4, 2007.
- SAIDI, S.; DERATANI, A.; BELLEVILLE, M. P.; AMAR, R. BEN. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. **Food Research International**, v. 65, p. 453–461, 2014.
- SAMARAKOON, K. W.; O-NAM, K.; KO, J. Y.; LEE, Y. H.; KANG, M. C.; KIM, D.; LEE, J. S. J. H. J. B.; JEON, Y. J.; Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 5, p. 1595–1606, 2013.
- SANMARTÍN, B.; DÍAZ, O.; RODRÍGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A. Functional properties of caprine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 110, n. 1, p. 52–56, 2013.
- SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2047–2052, 2004.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.
- SCHUTYSER, M. A. I.; VAN DER GOOT, A. J. The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 4, p. 154–164, 2011.
- SCHWENZFEIER, A.; LECH, F.; WIERENGA, P. A.; EPPINK, M. H. M.; GRUPPEN, H. Foam properties of algae soluble protein isolate: Effect of pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 111–117, 2013.
- SEGAT, A.; MISRA, N. N.; FABBRO, A.; BUCHINI, F.; LIPPE, G.; CULLEN, P. J.; INNOCENTE, N. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. **Food Research International**, v. 66, p. 365–372, 2014.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.
- SHCHEKOLDINA, T.; AIDER, M. Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2331–2343, 2014.
- SHEIH, I. C.; FANG, T. J.; WU, T. K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 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 waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1202–1207, 2010.

SHEIH, I. C.; WU, T. K.; FANG, T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3419–3425, 2009.

SIEMENSMA, A. D.; WEIJER, W. J.; BAK, H. J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 89, p. 601–603, 1985.

SILVA, J. F. X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J. F.; CAHÚ, T. B.; BEZERRA, R. S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, 2014.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1484–1491, 2007.

SLIZYTÉ, R.; MOZURAITYTÉ, R.; MARTÍNÉS-ALVAREZ, O.; FALCH, E.; FOUCHEREAU-PERON, M.; RUSTAD, T. Functional , bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 668–677, 2009.

SRIVASTAVA, A. K.; BHARGAVA, P.; RAI, L. C. Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 1291–1298, 2005.

SUPPAVORASATIT, I.; MEJIA, E. G.; CADWALLADER, K. R. Optimization of the Enzymatic Deamidation of Soy Protein by Protein-Glutaminase and Its Effects on the Functional Properties of the Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 11621–11628, 2011.

TAGHVAEI, M.; JAFARI, S. M.; MAHOONAK, A. S.; NIKOO, A. M.; RAHMANIAN, N.; HAJITABAR, J.; MESHGINFAR, N. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 124–130, 2014.

TANG, C.-H.; SUN, X.; YIN, S.-W. Physicochemical, functional and structural properties of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: Effect of heat treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1771–1778, 2009.

TANG, J. E.; MOORE, D. R.; KUJBIDA, G. W.; TARNOPOLSKY, M. A.; PHILLIPS, S. M. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. **Journal of applied physiology**, v. 107, n. 3, p. 987–992, 2009.

TAVARES, T. G.; CONTRERAS, M. M.; AMORIM, M.; MARTÍN-ALVAREZ, P. J.; PINTADO, M. E.; RECIO, I.; MALCATA, F. X. Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 12, p. 926–933, 2011.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein Hydrolysates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3148–3161, 2011.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

URSU, A. V.; MARCATI, A.; SAYD, T.; SANTE-LHOUELIER, V.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014.

VACLAVIK, V. A.; CHRISTIAN, E. W. **Essentials of Food Science**. 2. ed. [s.l.] LLC, 2003.

VANDENPLAS, Y.; CASTRELLON, P. G.; RIVAS, R.; GUTIÉRREZ, C. J.; GARCIA, L. D.; JIMENEZ, J. E.; ANZO, A.; HEGAR, B.; ALARCON, P. Safety of soya-based infant formulas in children. **The British journal of nutrition**, v. 111, n. 8, p. 1340–60, 2014.

VISHWANATHAN, K. H.; GOVINDARAJU, K.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Production of okara and soy protein concentrates using membrane technology. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 158–164, 2011.

VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1336–1346, 2013.

VOLK, R. B. A newly developed assay for the quantitative determination of antimicrobial (anticyanobacterial) activity of both hydrophilic and lipophilic test compounds without any restriction. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 161–167, 2008.

VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

WANG, X. J.; ZHENG, X. Q.; KOPPARAPU, N. K.; CONG, W. S.; DENG, Y. P.; SUN, X. J.; LIU, X. L. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate. **Process Biochemistry**, 2014.

WANG, X.; ZHANG, X. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 307–313, 2012.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 405–413, 2013.

WOJCIK, M.; BURZYNSKA-PEDZIWIATR, I.; WOZNIAK, L. A. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 28, p. 3262–3288, 2010.

WOOD, A.; TOERIEN, D. F. The algae-recent developments in cultivation and utilization. **Development in Food Protein**, p. 79–123, 1991.

WU, J.; DING, X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. **Journal of**

agricultural and food chemistry, v. 49, n. 1, p. 501–506, 2001.

XIE, Z.; HUANG, J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 370–376, 2008.

YADA, R Y. **Proteins in Food processing**. Washington: Cambridge England, 2004.

YANJUN, S.; JIANHANG, C.; SHUWEN, Z.; HONGJUAN, L.; JING, L.; LU, L.; ULUKO, H.; YANLING, S.; WENMING, C.; WUPENG, G.; JIAPING, L. Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 11–18, 2014.

ZABOTTI, C. **Parâmetros de hidrólise enzimática de farelo de arroz para produção de etanol de segunda geração**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira 2014.

ZAMBÃO, J. E.; ROCCO, C. S.; HEYDE, M. E. D. VON DER. Relação entre a suplementação de proteína do soro do leite e hipertrofia muscular: uma revisão. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 9, n. 50, p. 212–223, 2015.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina máxima**. Paris: Université Des Paris, 1966.

ZAVAREZE, E. DA R.; TELLES, A. C.; MELLO EL HALAL, S. L.; DA ROCHA, M.; COLUSSI, R.; MARQUES DE ASSIS, L.; SUITA DE CASTRO, L. A.; GUERRA DIAS, A. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, p. 1–8, 2014.

ZHANG, M.; MU, T.-H.; SUN, M.-J. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 191–200, 2014.

ZHOU, D. Y.; ZHU, B. W.; QIAO, L.; WU, H. T.; LI, D. M.; YANG, J. F.; MURATA, Y. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 148–154, 2012.

ANEXO I – COMPOSIÇÃO DO MEIO ZARROUK

Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,80
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A ₅	1,00 mL
Solução B ₆	1,00 mL

Solução A₅: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,22; CuSO₄.5.H₂O: 0,08; Na₂MoO₄: 0,02.

Solução B₆: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O: 96,00; NiSO₄.7H₂O: 47,85; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O: 61,10; Co(NO₃)₂.6H₂O: 43,98.

**APÊNDICE 1 - SUPLEMENTOS ALIMENTARES: FONTES DE PROTEÍNA
TRADICIONAIS E ALTERNATIVAS E SEUS BENEFÍCIOS À SAÚDE HUMANA**

RESUMO

O aumento populacional tem estimulado a busca por novas fontes de alimentos, principalmente ricos em proteínas, devido ao seu importante papel nutricional. Este artigo tem como objetivo abordar alimentos protéicos tradicionalmente utilizados para suplementação alimentar bem como novas fontes de proteína. As fontes mais tradicionais de proteína utilizadas para elaboração de suplementos alimentares, como concentrados, isolados e hidrolisados protéicos, são soja, leite e pescado. Algumas microalgas, como a *Spirulina*, possuem elevado teor de proteínas, de alto valor biológico, em sua composição. A utilização desta fonte de proteína para suplementação alimentar, através dos processos de concentração, isolamento e hidrólise das proteínas é possível obter produtos de alto valor agregado com alta funcionalidade e proporcionando diversos benefícios à saúde. Assim, a elaboração de suplementos alimentares com biomassa microalgal é importante para alimentação de indivíduos que apresentam necessidades nutritivas especiais.

Palavras-chave: Fonte alternativa de proteína. Hidrolisados protéicos. *Spirulina*.

ABSTRACT

The population growth has stimulated the search for new sources of food, especially rich in protein, due to its important nutritional role. This article aims to address protein foods traditionally used for food supplements as well as new sources of protein. The more traditional sources of protein used in the preparation of dietary supplements, as concentrates, isolates and protein hydrolysates are soy, milk and fish. Some microalgae such as *Spirulina*, have high protein content of high biological value, on its composition. The use of this source of protein for food supplementation, through the processes of concentration, isolation and hydrolysis of proteins, is possible to obtain high value added products with high functionality and provide many health benefits. Thus, the preparation of dietary supplements with microalgal biomass is important for feeding people who have special dietary needs.

Keywords: Alternative source of protein. Protein hydrolysates. *Spirulina*.

1. INTRODUÇÃO

Suplementação alimentar é o consumo pontual de um nutriente, objetivando determinado efeito, geralmente, quando um indivíduo não consegue, através da alimentação, atender suas necessidades nutricionais. A suplementação proteica pode ser adotada para suprir as necessidades especiais de indivíduos como recém-nascidos, crianças em estado de desnutrição, idosos e praticantes de atividades físicas (BACURAU, 2007).

Alimentos como soja, leite, ovo, carne e pescado são fontes de proteína de elevado valor biológico usualmente presentes na dieta. A partir desses alimentos são preparados os concentrados e isolados protéicos para formulação de suplementos alimentares e para utilização como ingredientes que conferem propriedades funcionais aos produtos alimentícios (FERREIRA, 2010). Novas fontes de proteína vem sendo estudadas a fim de atender a demanda mundial de alimentos. Microalgas com elevada concentração de proteínas em sua biomassa estão entre esses estudos e podem servir como fonte alternativa de proteínas em suplementos alimentares.

Os hidrolisados protéicos vêm se destacando na utilização em formulações de suplementos alimentares específicos justamente devido aos seus diversos benefícios nutricionais e funcionais. Eles são empregados para fins especiais como suplementação dietética de idosos (PENNING et al., 2011), crianças com intolerâncias alimentares (PENTERICH et al., 2010), em dietas para controle de peso (AIHARA; OSAKA; YOSHIDA, 2014) e nutrição de esportistas (MOBLEY et al., 2015).

Este artigo de revisão trata de uma abordagem sobre proteínas usualmente utilizadas para elaboração de suplementos alimentares e de novas fontes de proteína, especialmente proteínas de origem microalgal, uma vez que, essas proteínas possuem excelentes propriedades tecnológicas/funcionais entre outros benefícios.

2. CONCENTRADOS PROTÉICOS

Concentrados protéicos são produtos que passam pela exclusão parcial de carboidratos, sais minerais e outros constituintes não protéicos de uma matéria-prima. Os mais conhecidos são os concentrados de soro de leite (*Whey Protein Concentrate* ou WPC), soja (*Soy Protein Concentrate* ou SPC) e pescado (*Fish Protein Concentrate* ou FPC) (FONTANA et al., 2009).

Para serem utilizadas como ingredientes na indústria de alimentos, as proteínas podem ser concentradas por diversos métodos. Os métodos de concentração de proteínas incluem: centrifugação, em que as proteínas são separadas por diferença de densidade; separação por membranas, de acordo com a diferença de tamanho; troca iônica, baseada na diferença de carga; cromatografia por afinidade, em que as proteínas ligam-se por ligação específica com uma matriz (BRANS et al., 2004).

O WPC é um subproduto da indústria de laticínios obtido através da produção de queijos e existe no mercado em concentrações proteicas que variam de 35 a 80 % (p/p), sendo classificado de acordo com o seu percentual de proteína. O WPC é um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos devido às excelentes propriedades funcionais de suas proteínas, sendo empregado em muitos produtos cárneos, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis (BRANS et al., 2004).

Dentre as propriedades funcionais que justificam o uso do WPC, destacam-se: a solubilidade em água, a capacidade de transportar pequenas moléculas lipofílicas, a ação tensoativa e propriedade geleificantes além do elevado valor nutricional de suas proteínas em razão do seu alto conteúdo de aminoácidos essenciais (SINHA et al., 2007).

A soja é o grão mais conhecido para obtenção de concentrado proteico de origem vegetal. O concentrado proteico de soja é obtido a partir do refinamento da farinha desengordurada dos grãos de soja e tratamento térmico para remoção de fatores antinutricionais. Segundo o *Codex Alimentarius*, o concentrado proteico de soja deve conter entre 65 e 90 % (p/p) de proteína em sua composição.

Concentrado proteico de pescado (CPP) ou *fish protein concentrate* (FCP), sigla adotada pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) para registro do produto comercial, é um produto estável, de alto teor proteico. Em geral, eles não são consumidos diretamente, sendo utilizados como matéria-prima para elaboração de produtos de elevado valor agregado. Os concentrados protéicos de pescado são ingredientes preparados a partir de matérias-primas de diferentes espécies, sem interferir na estrutura original do músculo. A vantagem do uso de pescado para elaboração de concentrados protéicos é que espécies de menor valor comercial podem ser empregadas (FONTANA et al., 2009).

3. ISOLADOS PROTÉICOS

Os mais conhecidos são os isolados protéicos do soro de leite (*Whey Protein Isolate* – WPI), de soja (*Soy Protein Isolate* - SPI) e de pescado (*Fish Protein Isolate* – FPI). Os

concentrados e isolados protéicos têm grande aplicação nas indústrias alimentícias pela funcionalidade que podem conferir aos alimentos (FONTANA et al., 2009).

De acordo com Reguly (1983), o isolamento de proteína é um processo de extração o qual visa obter um produto livre de interferentes. Isolados protéicos são aqueles produtos que apresentam teores de proteínas superiores a 90 % (p/p). Os isolados protéicos, da mesma forma que os concentrados protéicos, são obtidos de diversos alimentos, tais como: leite, soja ou pescado. Estes isolados podem ser utilizados como ingredientes em produtos para consumo humano direto.

O isolado proteico de soro de leite (*whey protein isolate* – *WPI*) que é a forma comercial mais pura das proteínas do soro contém entre 80 e 95 % (p/p) de proteína e quantidades muito pequenas de gorduras e lactose, podendo ser isenta desses componentes (BRANS, 2006). Além de possuir elevado valor nutricional, é utilizado na indústria de alimentos devido as suas propriedades funcionais. O WPI possui excelentes propriedades de geleificação, aeração, emulsificação, retenção de água e gordura. As principais aplicações do WPI incluem produtos lácteos de panificação e de confeitaria, *snacks*, salgadinhos, aperitivos e carnes processadas (BALDASSO, 2008).

Isolados protéicos de soja (SPI) produzidos por precipitação isoeletrica são amplamente utilizados em alimentos devido ao elevado conteúdo de proteína (maior que 90 % p/p) e versatilidade funcional. Outros vegetais de grande potencial, como ervilha (LIANG; TANG, 2014), girassol (SHCHEKOLDINA; AIDER, 2014) e linhaça (KUHN et al., 2014) têm sido propostas para a produção de isolados protéicos. Entretanto, a soja é o principal material usado para produção industrial de concentrados e isolados de proteínas vegetais, devido, principalmente, ao seu alto teor de proteínas e bom desempenho tecnológico dos produtos (LI et al., 2011).

Isolado proteico de pescado (FPI) pode ser produzido a partir de diferentes tipos de pescado cru, por precipitação isoeletrica. Contém principalmente proteína miofibrilar extraída do músculo do pescado, além de lipídeos de membrana, dependendo do processamento em que são submetidos (HULTIN et al., 2005). Além do músculo de pescado, subprodutos do seu processamento ou espécies de baixo valor comercial são novas fontes de proteína que também podem servir de ingredientes para elaboração de alimentos com valor agregado, através do isolamento de suas proteínas (FONTANA et al., 2009).

4. HIDROLISADOS PROTÉICOS

Hidrolisados protéicos consistem em uma mistura de aminoácidos livres e pequenos peptídeos que são obtidos pela quebra das ligações peptídicas de uma proteína. Os hidrolisados protéicos são obtidos através de hidrólise química (hidrólise ácida ou alcalina) ou enzimática de proteínas, sendo que a hidrólise enzimática é mais empregada pois enzimas possuem maior especificidade em relação ao substrato, diminuindo a probabilidade de ocorrer reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos tóxicos (OVISSIPOUR et al., 2012).

4.1. HIDROLISADOS PROTÉICOS LÁCTEOS

Os hidrolisados de proteínas de soro de leite e caseínas são preferidos para formulações infantis em virtude de seu elevado valor nutritivo. As proteínas são normalmente reduzidas a aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular. Teoricamente a hidrólise extensiva deve destruir os epítonos alergênicos (regiões de ligação da IgE), resultando em produtos hipoalergênicos seguros (BLANC et al., 2008; HILL et al., 2007; NIGGEMANN et al., 2008).

Ainda, a hidrólise enzimática do soro de leite é capaz de gerar peptídeos com atividade antioxidante (TAVARES et al., 2011). As características antioxidantes desses peptídeos podem ser explicadas pela sua habilidade de inativar espécies reativas de oxigênio (ROS), sequestrar radicais livres, quelar metais de transição pró-oxidativos e reduzir hidroperóxidos. Esses mecanismos estão baseados na sua composição e sequência de aminoácidos e peptídeos. Eles consistem usualmente de 5 a 11 aminoácidos, incluindo aminoácidos hidrofóbicos prolina, histidina, tirosina e triptofano (ZHOU et al., 2012).

Attaallah et al. (2012) detectaram que o soro de leite hidrolisado é mais eficiente na prevenção da incidência de tumores em ratos do que o soro de leite in natura. Kong et al. (2012) identificaram pentapeptídeo (Val-His-Leu-Lys-Pro), obtido através da hidrólise de soro de leite com alcalase, através de espectroscopia de massa, com atividade antioxidante.

4.2. HIDROLISADOS PROTÉICOS DE PESCADO

Conhecidos pela sigla HPP – hidrolisado proteico de pescado ou FPH - "fish protein hidrolized", conforme designado pela FAO, são concentrados protéicos obtidos com o auxílio de enzimas, que hidrolisam as proteínas do pescado isolando a fração proteica em aproximadamente 90 % (p/p) no produto final. Esses produtos podem ser utilizados como

aditivo na indústria alimentícia (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). Hidrolisados protéicos de pescado tem atraído a atenção dos pesquisadores devido à possibilidade de utilização dos subprodutos do processamento do pescado, agregando valor a esses produtos, e pelo elevado conteúdo proteico de alto valor nutricional (CHALAMAI AH et al., 2012; SAIDI et al., 2014).

Diversos estudos tem reportado a elaboração de hidrolisados enzimáticos de subprodutos de pescado, como Ahn, Je e Cho (2012) que obtiveram peptídeos com atividade antioxidante de subprodutos de salmão. Liu et al. (2014) caracterizaram os hidrolisados de surimi. Silva et al. (2014) hidrolisaram os resíduos do processamento de tilápia, podendo aplicá-los na alimentação de animais da aquicultura. Zavareze et al. (2014) compararam os hidrolisados do músculo e o resíduo de corvina quanto à atividade antioxidante, apresentando semelhança estatística.

Liu et al. (2014) determinaram as propriedades estruturais e funcionais de pescado hidrolisado com serino-endopeptidase e alcalase. De acordo com os resultados, concluíram que as propriedades funcionais são diretamente influenciadas pelo grau de hidrólise e pelo tipo de enzima empregado, sugerindo que é possível manipular a forma como a reação de hidrólise é conduzida para conferir diferentes aplicações aos hidrolisados de pescado. Hidrolisados de pescado com enzima de *Bacillus subtilis*, estudados por (JEMIL et al., 2014), apresentaram melhores propriedades de solubilidade, capacidade de formação de espuma e de formar emulsões do que as proteínas não hidrolisadas, além de apresentarem atividade antioxidante e antibacteriana.

4.3. HIDROLISADOS PROTÉICOS DE ORIGEM VEGETAL

As proteínas da soja são as únicas proteínas de origem vegetal que podem ser comparadas à proteína animal, pois apresentam todos os aminoácidos essenciais aos seres humanos. Essas proteínas vêm sendo modificadas por proteases a fim de obter produtos de melhor qualidade sensorial (CAPOBIANGO, 2006). Hidrolisados de proteína de soja são fisiologicamente melhores do que proteínas intactas, pois sua absorção intestinal parece ser mais eficaz, devido ao aumento da solubilidade e do teor de peptídeo, tornando-os atraentes como fonte de aminoácidos ou peptídeos em nutrição humana (KONG et al., 2008).

Pepsina, pancreatina e alcalase são as enzimas que vem sendo mais estudadas para obtenção de hidrolisados de soja com atividade biológica (SINGH; VIJ; HATI, 2014). Proteínas

de soja isoladas antes de serem hidrolisadas tem apresentado melhor atividade antioxidante e anti-inflamatória (OSEGUERA-TOLEDO et al., 2011).

Fontes vegetais de proteína como de cevada (MCCARTHY et al., 2014), canola (ALASHI et al., 2014), batata doce (ZHANG; MU; SUN, 2014), ervilha (CHAO et al., 2013), amendoim (JI et al., 2014), milho (WANG et al., 2014), farelo de arroz (CHANPUT; THEERAKULKAIT; NAKAI, 2009) vêm sendo hidrolisadas e estudadas quanto às suas propriedades antioxidantes, como fonte alternativa às proteínas da soja.

4.4. BENEFÍCIOS DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

Os hidrolisados protéicos vêm sendo estudados há bastante tempo devido aos seus aspectos nutricionais bem como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas. A hidrólise tem mostrado aumento de solubilidade, de propriedades emulsificantes e liberação de peptídeos biologicamente ativos de certas proteínas (MORRIS et al., 2001).

Através dos processos de hidrólise enzimática é possível aumentar o aproveitamento nutricional de proteínas. Os hidrolisados protéicos ricos em di e tri-peptídeos são mais facilmente digeridos e absorvidos pelo organismo do que proteínas intactas (GILBERT; WONG; WEBB, 2008). A introdução na dieta de hidrolisados ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar melhor utilização das proteínas, principalmente em determinadas situações como a que ocorre em indivíduos com intolerância alimentar, nos casos de deficiência enzimática (GONZÁLES-TELLO et al., 1994).

Dependendo da estrutura, composição e sequência, os peptídeos gerados pela hidrólise das proteínas podem apresentar função biológica como atividade antioxidante, anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, antibacteriana e imunomodulatória. Algumas doenças como diabetes, aterosclerose, osteoporose, doenças cardiovasculares, problemas circulatórios, entre outros podem ser prevenidas ou tratadas por substâncias que possuem atividade biológica (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Uma variedade de peptídeos obtidos de fontes de proteína vegetal e animal tem mostrado função biológica quando hidrolisadas. Proteínas da soja podem gerar peptídeos benéficos para a saúde, como por exemplo, com ação no sistema cardiovascular (ação antihipertensiva e hipocolesterolêmica) (SINGH; VIJ; HATI, 2014), antioxidante (TAGHVAEI et al., 2014), anticâncer (MEJIA; LUMEN, 2006), e antidiabética (KWON et al., 2010). Peptídeos com atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA) vêm sendo preparados pela hidrólise das proteínas da soja com a enzima alcalase. Seus efeitos hipotensores

foram estudados e foi observada redução significativa na pressão arterial sistólica (WU; DING, 2001).

Diversos peptídeos de fontes de origem animal e vegetal são relatados como detentores de atividade antioxidante. Como exemplo, Piccolomini et al. (2012) observaram atividade antioxidante e anti-inflamatória de hidrolisados de soro de leite em células epiteliais expostas a peróxido de hidrogênio. Mao et al. (2011) concluíram que a caseína de leite hidrolisada apresenta maior atividade antioxidante e anti-inflamatória do que a não hidrolisada.

Algumas proteínas têm sido concentradas ou isoladas previamente à hidrólise, na tentativa de diminuir a quantidade de interferentes que possam prejudicar a eficiência da enzima. Adjonu et al. (2013) hidrolisaram as proteínas isoladas do soro de leite com e sem tratamento térmico com quimotripsina, pepsina e tripsina obtendo tanto melhora das propriedades funcionais quanto atividade bioativa dos peptídeos. Castro e Sato (2014) sugerem a utilização de diferentes fontes proteicas (proteínas isoladas de soja, soro de leite e clara de ovo) como método atrativo para aumentar a performance da enzima e otimizar a formulação de alimentos específicos.

4.5. APLICAÇÕES DOS HIDROLISADOS PROTÉICOS

As modificações nas proteínas, causadas pela hidrólise, são importantes para a incorporação de proteína em formulações específicas. Devido aos diversos benefícios nutricionais e funcionais que os hidrolisados protéicos apresentam, a utilização desses em formulações específicas é uma área de crescente interesse (MOURE et al., 2006).

A aplicação dos hidrolisados protéicos está relacionada com o seu grau de hidrólise (GH). Em valores de GH de 3-6 %, o tamanho médio dos peptídeos pode atingir de 2-5 kDa. Estes peptídeos costumam ser destinados para melhorar as propriedades físico-química de produtos alimentícios. GH acima de 8 % com 1 a 2 kDa de tamanho de peptídeos com elevada solubilidade são utilizados para uso em produtos esportivos ou nutrição clínica. GH mais extensivos (como 50-70 %) com geração de peptídeos e aminoácidos menores que 1 kDa de tamanho médio são aplicados para uso em alimentos infantis e hipoalergênicos (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

Os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados na prática clínica na fabricação de alimentos especiais para indivíduos com necessidades fisiológicas e nutricionais particulares. Desde 1940, estas preparações têm sido empregadas em formulações infantis e para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. A partir da

década de setenta, apresentou crescimento significativo, tanto para finalidades clínicas quanto para a melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CAPOBIONGO, et al., 2006).

Na indústria de alimentos, os hidrolisados protéicos são utilizados para fins especiais como suplementação dietética de idosos (PENNING et al., 2011), crianças que apresentam alergia à proteína intacta, crianças com diarreia aguda ou crônica, intolerâncias alimentares (PENTERICH et al., 2010) ou erro inato de metabolismo, como a fenilcetonúria (BIZZOTO et al., 2006), bem como em dietas para controle de peso (AIHARA; OSAKA; YOSHIDA, 2014) e nutrição de esportistas (MOBLEY et al., 2015).

Formulações contendo hidrolisados das proteínas de leite bovino têm sido elaboradas objetivando diminuir a alergenicidade. Os principais alérgenos alimentares identificados são de natureza proteica. O leite bovino é o alérgeno mais comum entre crianças. As principais fontes de proteínas que são utilizadas para elaboração de hidrolisados protéicos para elaboração de formulações para indivíduos com alergia a proteína são a caseína, proteínas de soro lácteo e soja. A hidrólise dessas proteínas é realizada com mistura de enzimas (endo e exopeptidases) para produzir o perfil desejado de aminoácidos e peptídeos que não causem alergia alimentar. Existem disponíveis no mercado fórmulas e dietas à base de proteína do leite extensivamente hidrolisada, compostas por peptídeos e aminoácidos livres para crianças menores do um ano (CLEMENTE, 2000).

Existem estudos a cerca da utilização de hidrolisados enzimáticos de fontes de proteína de pescado para suplementação humana. Nesse et al. (2014) avaliaram a segurança alimentar do consumo de amizato (um hidrolisado de uma espécie de salmão) em crianças desnutridas (de 6 a 8 anos). Esses autores acompanharam o consumo deste hidrolisado (3 a 6 g/dia) realizando exames de sangue e urina, que não apresentaram anormalidades e observaram ganho de massa corporal, crescimento em altura e índice de massa corpórea.

Na área farmacêutica, os hidrolisados protéicos são utilizados devido aos seus efeitos biológicos que seus peptídeos podem conter (citados anteriormente) (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2014). Novas sequências de peptídeos, como de hidrolisados de microalgas, com aplicações potenciais na prevenção e tratamento de problemas de saúde estão sendo investigadas, cujos resultados são de enorme importância para a comunidade científica, empresas farmacêuticas e consumidores.

A dietoterapia é uma importante área a qual faz uso dos hidrolisados protéicos para complementar ou suplementar dietas de indivíduos incapazes de ingerir quantidades adequadas de alimentos de forma convencional, ou prover nutrição especial para pacientes com necessidades fisiológicas e nutricionais particulares (CLEMENTE, 2000). Peptídeos bioativos,

portanto, são candidatos adequados para uma nova era de produtos farmacêuticos e alimentícios, especialmente com as crescentes preocupações sobre os efeitos colaterais de medicamentos e maior atenção aos produtos naturais e e nutracêuticos que possuem propriedades preventivas/promotoras de saúde.

4.5.1. Hidrolisados Protéicos para Suplementação de Atletas

Nas últimas décadas, as proteínas solúveis do soro do leite (*whey protein*), nas suas formas concentrada, isolada e hidrolisada vêm sendo mais utilizadas nas formulações alimentares com diferentes finalidades devido sua qualidade nutricional, porém elas precisam ser extraídas da porção aquosa do leite, gerada durante a fabricação do queijo. Atletas, praticantes de atividades físicas, pessoas fisicamente ativas e até mesmo portadores de doenças, vêm procurando benefícios nessa fonte proteica (HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006).

Atletas ou indivíduos que exercem atividade física intensa necessitam de alta quantidade de proteínas para aumentar a massa muscular, evitar o balanço negativo de nitrogênio, resultando em perda de massa magra, e para estimular o efeito anabólico através da suplementação de aminoácidos. A quantidade e o tipo de proteína ou de aminoácido, fornecidos após o exercício, influenciam a síntese proteica (CHURCHWARD-VENNE; BURD; PHILLIPS, 2012). Os hidrolisados protéicos se destacam neste nicho de consumidores, pois são mais rapidamente absorvidos pelo trato intestinal e digeridos pelo organismo. A ingestão de proteínas hidrolisadas na dieta, incluindo soro de leite (TANG et al., 2009), albumina de ovo (MOBLEY et al., 2015) e caseína (PENNING et al., 2011) capaz de estimular a síntese proteica muscular.

5. PROTEÍNAS MICROALGAIS: NOVOS INGREDIENTES PARA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR

Fontes alternativas de proteínas vêm sendo estudadas para garantir o desenvolvimento sustentável de produtos alimentícios. O interesse na pesquisa por novas fontes proteicas não convencionais para aplicação na indústria alimentícia é cada vez maior. Novas fontes de proteína, para serem usadas como ingredientes protéicos, são mais aceitos pela indústria de alimentos se estas forem neutras quanto ao sabor, possuírem excelentes propriedades

tecnológicas/funcionais (ou seja, alta solubilidade) e disponíveis a baixo custo (SCHWENZFEIER et al., 2013).

Nos últimos anos, a biomassa de microalgas tem sido proposta como uma fonte alternativa devido a seu elevado conteúdo de proteínas (GARCÍA; FERNÁNDEZ; SEVILLA, 2012). Microalgas como *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis* possuem elevado teor de proteínas (em torno de 50 % p/p). A microalga *Spirulina*, por exemplo, pode alcançar até 70 % (p/p) de proteínas na sua composição. Comparando-se com outros alimentos, apresenta teores mais elevados que de peixe (15-20 %), sementes de soja (35 %), ovos (12 %), cereais (8-14 %) e leite integral (3 %). As proteínas da microalga *Spirulina* contêm todos os aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, fenilalanina e valina) que representam 47 % do peso total das proteínas (DILLON; PHUN; DUBACQ, 1995).

Ursu et al. (2014) estudaram o método de concentração de proteínas de *Chlorella vulgaris* por precipitação isoeletrica associada com ultrafiltração. Esses autores avaliaram o concentrado proteico quanto à sua ação emulsificante e obtiveram melhores resultados quando comparados com emulsificantes comerciais como o caseinato de sódio.

O isolamento das proteínas de microalgas é um processo importante para aumentar sua aplicabilidade em produtos alimentícios. Gerde et al. (2013) estudaram o processo de isolamento das proteínas da biomassa desengordurada e não desengordurada da microalga *Nannochloropsis* sp. A quantidade máxima de proteína foi solubilizada a 60 °C em pH 11 e recuperadas em pH 3,2. As frações isoladas de proteína apresentaram 56,9 % e 40,5 % (p/p) de proteína da biomassa desengordurada e não desengordurada, respectivamente, sugerindo-se mais estudos de otimização do isolamento de proteínas dessa microalga. Schwenzfeier et al. (2013) estudaram a capacidade de formação de espuma de isolado de proteína solúvel de *Tetraselmis* sp. em função da concentração do isolado, pH e força iônica. Comparando a capacidade de formação de espuma do isolado proteico de soro de leite e albumina de clara de ovo, de agentes espumantes comerciais utilizados na indústria de alimentos, o isolado proteico microalgal foi o que apresentou melhores resultados.

A hidrólise enzimática de polímeros celulares de algas verdes tem sido descrito como um método promissor para melhorar a digestibilidade da proteína e para obter um produto equilibrado de proteína destinado à alimentação humana (WANG; ZHANG, 2012). Esse processo resulta em redução do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos protegidos na estrutura original da proteína. Lisboa et al. (2014) estudaram as condições de hidrólise da biomassa das microalgas *Chlorella* e *Spirulina* e obtiveram 55,3 e 52,9 % de grau de hidrólise, respectivamente. Os autores concluíram que os

hidrolisados de *Chlorella* e *Spirulina* podem ser utilizados como ingredientes para formulação de alimentos para indivíduos com intolerância alimentar, devido ao elevado grau de hidrólise.

Nos últimos anos, as proteínas de fontes microalgais vêm sendo hidrolisadas não só para melhorar os aspectos de absorção e digestibilidade, mas também para obtenção de compostos que apresentam benefícios a saúde. As microalgas mais estudadas são a *Chlorella* e *Spirulina*, por possuírem certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*), o que as tornam produtos comestíveis (MORAIS et al., 2010).

A biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* foi hidrolisada com a enzima pepsina pelos pesquisadores Sheih, Wu e FANG (2009) e estes isolaram um peptídeo capaz de inibir uma variedade de radicais livres, incluindo radical hidroxil, superóxido e radical peroxil. Os mesmos autores Sheih, Fang e WU (2009) detectaram capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) desses peptídeos, que contribui para o controle da pressão arterial, diminuindo a incidência de doenças cardíacas. Esta mesma atividade de inibição de ECA foi encontrada em proteínas hidrolisadas de *Nannochloropsis oculata* (SAMARAKOON et al., 2013). VO, RYU e KIM (2013) purificaram peptídeos com ação anti-inflamatória, verificada em células endoteliais, obtidos através de hidrólise da biomassa de *Spirulina maxima* com enzimas digestivas tripsina, quimotripsina e tirosina.

Sheih et al. (2010) foram os primeiros pesquisadores a estudar a ação anticancerígena que os peptídeos de microalgas possuem. Existem alguns estudos sobre esses peptídeos de fontes alimentícias, como proteína de soja, peixe, leite e carne bovina. No entanto, de acordo com os resultados encontrados por esses autores, os oligopeptídeos obtidos pela hidrólise enzimática das proteínas da microalga *Chlorella vulgaris* apresentam maior efeito de inibição e parada do ciclo de células cancerígenas em células gástricas humanas e maior atividade antioxidante do que os antioxidantes naturais. Esses resultados mostram a importância da ação biológica das proteínas de fontes microalgais.

A concentração ou isolamento de suas proteínas também pode ser realizado a fim de melhorar a eficiência dos processos de hidrólise, diminuir as características sensoriais de aroma e sabor e proporcionar melhores propriedades funcionais para aplicação em alimentos. Logo, os concentrados, isolados e hidrolisados protéicos de microalgas são promissoras fontes de alimentos que podem ser aplicados na elaboração de produtos com elevado teor de proteínas para suplementação alimentar.

6. CONCLUSÃO

As proteínas de soja, leite e pescado são as mais utilizadas para a elaboração de concentrados, isolados e hidrolisados protéicos, utilizados como ingredientes em alimentos para conferir propriedades funcionais requeridas e para a elaboração de suplementos alimentares. A pesquisa por novas fontes de proteína para elaboração desses produtos é importante para atender a demanda de alimentos. Algumas microalgas apresentam elevado teor de proteínas de alta qualidade nutricional, que podem ser concentradas, isoladas e hidrolisadas a fim de melhorar ainda mais suas propriedades funcionais e atividade biológica, o que sugere sua aplicação em suplementos alimentares.

7. REFERÊNCIAS

- ADJONU, R. et al. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1435–1443, 2013.
- AHN, C. B.; JE, J. Y.; CHO, Y. S. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 92–98, nov. 2012.
- AIHARA, K.; OSAKA, M.; YOSHIDA, M. Oral administration of the milk casein-derived tripeptide Val-Pro-Pro attenuates high-fat diet-induced adipose tissue inflammation in mice. **The British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 4, p. 513–9, 2014.
- ALASHI, A. M. et al. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 146, p. 500–506, 2014.
- ATTAALLAH, W. et al. Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. **Pathology and Oncology Research**, v. 18, n. 4, p. 817–822, 2012.
- BACURAU, R. F. **Nutrição e suplementação desportiva**. 5. ed. São Paulo: Phorte, 2007. ISBN 85-7655-095-4
- BALDASSO, C. **Concentração , Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas**. (Mestrado em Engenharia Química)—Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- BIZZOTO, C. S. et al. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase e uso do carvão ativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 308–316, 2006.
- BLANC, F. et al. Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 166–175, 2008.

BRANS, G. et al. Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, n. 1-2, p. 263–272, 2004.

BRANS, G. Design of membrane systems for fractionation of particle suspensions. Netherlands: Wageningen Universiteit, 2006.

CAPOBIANGO, M.; BIZZOTTO, C.S.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M.P.C. Action of pepsin on emulsifying properties of globin. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 2, p. 357-364, 2006.

CASTRO, R. J. S. DE; SATO, H. H. Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. **Food and Bioprocess Processing**, v. 92, n. 1, p. 80–88, 2014.

CHALAMAIAH, M. et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

CHANPUT, W.; THEERAKULKAIT, C.; NAKAI, S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 3, p. 422–428, 2009.

CHAO, D. et al. Effect of pressure or temperature pretreatment of isolated pea protein on properties of the enzymatic hydrolysates. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1528–1534, 2013.

CHURCHWARD-VENNE, T. A; BURD, N. A; PHILLIPS, S. M. Nutritional regulation of muscle protein synthesis with resistance exercise: strategies to enhance anabolism. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 40, 2012.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 254–262, 2000.

DILLON, J. C.; PHUN, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional Value of the Alga *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Diets**, v. 77, p. 32–46, 1995.

FANG, N.; YU, S.; BADGER, T. M. Comprehensive phytochemical profile of soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4012–4020, 2004.

FERREIRA, A. DE C. D. **Suplementos Alimentares: Adequabilidade à legislação e efeitos metabólicos em ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

FONTANA, A. et al. Obtenção e avaliação de concentrados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) Processados por Extração Química. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2299–2303, 2009.

GARCÍA, J. M. R.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F. Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 164–170, 2012.

GERDE, J. A. et al. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 145–153, 2013.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB, K. E. Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 9, p. 2135–2155, 2008.

GONZÁLES-TELLO, P. et al. Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 523–528, 1994.

HARAGUCHI, F. K.; DE ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: Composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. et al. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, n. 2, p. 82–100, 2014.

HILL, D. J. et al. The efficacy of amino acid-based formulas in relieving the symptoms of cow's milk allergy: A systematic review. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, n. 6, p. 808–822, 2007.

JEMIL, I. et al. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 963–972, 2014.

JL, N. et al. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 161, n. 10, p. 148–154, 2014.

KONG, B. et al. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1–2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 540–547, 2012.

KONG, X. et al. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8873–8879, 2008.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 131–139, 2000.

KUHN, K. R. et al. Assessing the potential of flaxseed protein as an emulsifier combined with whey protein isolate. **Food Research International**, v. 58, p. 89–97, 2014.

KWON, D. Y. et al. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 1–13, 2010.

LI, H. et al. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. **Food Chemistry**, v. 59, p. 1228–1036, 2011.

- LIANG, H. N.; TANG, C. H. Pea protein exhibits a novel pickering stabilization for oil-in-water emulsions at pH 3.0. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 463–469, 2014.
- LISBOA, C. R. et al. Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 5, p. 29–38, 2014.
- LIU, Y. et al. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, v. 151, p. 459–465, 2014.
- MAO, X. Y. et al. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 484–490, 2011.
- MCCARTHY, N. A. et al. Dissolution of milk protein concentrate (MPC) powders by ultrasonication. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 142–148, 2014.
- MEJIA, E. DE; LUMEN, B. O. DE. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. **Sexuality, Reproduction & Menopause**, v. 4, n. 2, p. 91–95, 2006.
- MOBLEY, C. et al. Effects of protein type and composition on postprandial markers of skeletal muscle anabolism, adipose tissue lipolysis, and hypothalamic gene expression. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 14, 2015.
- MORAIS, M. G. DE et al. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872–2876, 2010.
- MORRIS, H. J. et al. Composición bioquímica y propiedades bioestimulantes de un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyta, Chlorophyceae*). **Revista cubana de quimica**, v. XIII, n. 3, p. 28–54, 2001.
- MOURE, A. et al. Functionality of oilseed protein products: A review. **Food Research International**, v. 39, n. 9, p. 945–963, 2006.
- NESSE, K. O. et al. Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 1–6, 2014.
- NIGGEMANN, B. et al. Safety and efficacy of a new extensively hydrolyzed formula for infants with cow's milk protein allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 19, n. 4, p. 348–354, 2008.
- OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Proteínas do pescado: processamento com intervenção na fração protéica. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**, p. 99-134, 2006.
- OSEGUERA-TOLEDO, M. E. et al. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1175–1185, 2011.
- OVISSIPOUR, M. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 696–705, 2012.

PENNINGS, B. et al. Exercising before protein intake allows for greater use of dietary protein – derived amino acids for de novo muscle protein synthesis in both young and elderly men 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, p. 322–331, 2011.

PENTERICH, V. R. A. et al. Development of an infant formula with chicken hydrolysate for children from 0 to 12 months with adverse reaction to milk. **Supplement**, 2010.

PICCOLOMINI, A. F. et al. High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. **Food and Nutrition Research**, v. 56, p. 1–10, 2012.

SAIDI, S. et al. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. **Food Research International**, v. 65, p. 453–461, 2014.

SAMARAKOON, K. W. et al. Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 5, p. 1595–1606, 2013.

SCHWENZFEIER, A. et al. Foam properties of algae soluble protein isolate: Effect of pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 111–117, 2013.

SHCHEKOLDINA, T.; AIDER, M. Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2331–2343, 2014.

SHEIH, I. C. et al. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1202–1207, 2010.

SHEIH, I. C.; FANG, T. J.; WU, T. K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 279–284, 2009.

SHEIH, I. C.; WU, T. K.; FANG, T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3419–3425, 2009.

SILVA, J. F. X. et al. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, 2014.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1501–1508, 2007.

TAGHVAEI, M. et al. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 124–130, 2014.

- TANG, J. E. et al. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. **Journal of applied physiology**, v. 107, n. 3, p. 987–992, 2009.
- TAVARES, T. G. et al. Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 12, p. 926–933, 2011.
- URSU, A. V. et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014.
- VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1336–1346, 2013.
- WANG, X. J. et al. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate. **Process Biochemistry**, 2014.
- WANG, X.; ZHANG, X. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 307–313, 2012.
- WU, J.; DING, X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 1, p. 501–506, 2001.
- ZAVAREZE, E. DA R. et al. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, p. 1–8, 2014.
- ZHANG, M.; MU, T.-H.; SUN, M.-J. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 191–200, 2014.
- ZHOU, D. Y. et al. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 148–154, 2012.