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

NANOENCAPSULAMENTO DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 POR *ELECTROSPRAYING*

ANA GABRIELLE PIRES ALVARENGA

MICHELE GREQUE DE MORAIS
Orientadora
JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Co-orientador

RIO GRANDE, RS
2022

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

NANOENCAPSULAMENTO DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 POR *ELECTROSPRAYING*

ANA GABRIELLE PIRES ALVARENGA

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

MICHELE GREQUE DE MORAIS
Orientadora
JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Co-orientador

RIO GRANDE, RS
2022

Ficha Catalográfica

A473n Alvarenga, Ana Gabrielle Pires.
Nanoencapsulamento da biomassa de *spirulina* sp. LEB 18 por *electrospraying* / Ana Gabrielle Pires Alvarenga. – 2022.
75 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2022.
Orientadora: Dra. Michele Greque de Morais.
Coorientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

1. Nanotecnologia 2. Nanopartículas 3. Microalgas 4. Alimento 5. Polímero I. Morais, Michele Greque de II. Costa, Jorge Alberto Vieira III. Título.

CDU 338.45

Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Ana Gabrielle Pires Alvarenga, com orientação da Prof.ª Dr.ª Michele Greque de Morais, aprovada em 07 de março de 2022, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

Prof.ª Dr.ª Michele Greque de Morais – FURG

Prof.ª Dr.ª Elisângela Martha Radmann – FURG

Prof.ª Dr.ª Cristiane Reinaldo Lisboa - IFRS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus,

Por estar sempre comigo e permitir a realização dos meus sonhos

À minha família,

Em especial aos meus pais Cláudia e Paulo Sérgio pelo incentivo e apoio durante toda minha trajetória

À Universidade Federal do Rio Grande,

Por ter aberto as portas para mim me proporcionando ensino de alta qualidade

À minha orientadora Prof Dra Michele Greque de Morais

Por ter confiado em mim e no meu trabalho. Pelas oportunidades que sempre me deu, sou imensamente grata!

À Capes, Cnpq e MCTI,

Pelo auxílio financeiro

Aos meus grandes amigos Munise, Dani e Pedro,

Pela amizade, companheirismo, conselhos e apoio. Por tudo o que fizeram por mim e por estarem comigo em todos os momentos

À Suelen,

Que mesmo sem nos conhecermos pessoalmente se tornou uma grande amiga. Obrigada por ter me "adotado" e por toda ajuda de sempre

Às minhas amigas Júlia, Fabíola e Camila,

Que mesmo de longe se fizeram sempre presentes

Aos colegas do laboratório LebMibi,

Em especial: Ana Cláudia, Camila e Alex pela amizade e ajuda nos experimentos

Aos pós docs,

Em especial, a Bruna Vaz e Juliana Moreira por toda ajuda e amizade durante essa trajetória

Aos técnicos do LebMibi,

Em especial ao Andrei pela amizade e auxílio no decorrer dos experimentos.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

ARTIGO 1- NANOENCAPSULAÇÃO DA BIOMASSA DE *Spirulina* POR *ELECTROSPRAYING* PARA DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS – UMA REVISÃO

Figura 1 - Diagrama esquemático do processo de *electrospraying*.....388

Figura 2 - Produtos alimentícios com *Spirulina* sp. LEB: isotônicos (A), barra de cereal (B), sopas instantâneas (C), pudim (D), mistura para bolos em pó (E) e biscoitos (F). 41

ARTIGO 2 – NANOESFERAS POLIMÉRICAS CONTENDO BIOMASSA DE *Spirulina sp.* LEB 18 DESENVOLVIDAS POR *ELECTROSPRAYING* PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Figura 1 - Imagens MEV e MET das nanoesferas contendo 1% de quitosana e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nas concentrações de 1% (A, B) e 5% (C, D).....56

Figura 2 - Análise TGA das nanoesferas sem e com adição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB.....58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO 1- NANOENCAPSULAÇÃO DA BIOMASSA DE *Spirulina* POR *ELECTROSPRAYING* PARA DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS – UMA REVISÃO

Tabela 1 - Atividades bioativas das microalgas do gênero *Spirulina*.....40

ARTIGO 2 – NANOESFERAS POLIMÉRICAS CONTENDO BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 DESENVOLVIDAS POR *ELECTROSPRAYING* PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Tabela 1 - Distribuição de tamanho e diâmetro médio das nanoesferas com diferentes concentrações de quitosana AMM 53

Tabela 2 - Distribuição de tamanho e diâmetro médio das nanoesferas com diferentes concentrações de quitosana de BMM.....54

Tabela 3 - Valores de potencial zeta para nanoesferas com e sem biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.....57

NOMENCLATURA

SÍMBOLO	DEFINIÇÃO
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMM	Alto Massa Molecular
BMM	Baixa massa molecular
DC	Diâmetro do Capilar
DCC	Diâmetro do Capilar ao Coletor
EQA	Escola de Química e Alimentos
FDA	*Food and Drug Administration*
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
GRAS	*Generally Recognized as Safe*
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
PE	Potencial Elétrico
TA	Taxa de Alimentação
TGA	Análise Termogravimétrica

SUMÁRIO

CAPÍTULO I **16**
RESUMO GERAL **17**
ABSTRACT **18**
1. INTRODUÇÃO GERAL **21**
2. OBJETIVOS **23**
2.1 OBJETIVO GERAL 23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

CAPÍTULO II **25**
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **26**
3.1 MICROALGA *Spirulina* 26
3.1.1 *Spirulina* como fonte de alimentos 27
3.2 NANOTECNOLOGIA 28
3.2.1 Nanopartículas 28
3.2.2 Processo de *electrospraying* 29

CAPÍTULO III **33**
ARTIGO 1 - NANOENCAPSULAÇÃO DA BIOMASSA DE *Spirulina* POR *ELECTROSPRAYING* PARA DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS - UMA REVISÃO **34**
1.INTRODUÇÃO **35**
2.NANOTECNOLOGIA **36**
2.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS **37**
2.2 TÉCNICA DE *ELECTROSPRAYING* 38
3.MICROALGAS **39**
3.1 *Spirulina* sp. 39
3.2 *Spirulina* COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS 40
4.CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS **42**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **42**
ARTIGO 2 - NANOESFERAS POLIMÉRICAS CONTENDO BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 DESENVOLVIDAS POR *ELECTROSPRAYING* **47**
1.INTRODUÇÃO **48**
2. MATERIAL E MÉTODOS **50**
2.1 PRÉ TRATAMENTO DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 50
2.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESFERAS 51
2.2.1 Preparo da solução poliméricas por *electrospraying* **51**
2.2.2 Desenvolvimento de nanoesferas **51**
2.2.3 Viscosidade das soluções poliméricas **51**
2.2.4 Morfologia e tamanho das nanoesferas **51**
2.2.5 Potencial zeta **51**
2.2.6 Análises térmicas **52**
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA **52**
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **52**
4.1 PRODUÇÃO DE NANOESFERAS 52
4.2 INCORPORAÇÃO DA BIOMASSA MIGROALGAL NAS NANOESFERAS 55
4.3 POTENCIAL ZETA 56

4.4 ANÁLISE TÉRMICA..... 57
5. CONCLUSÃO 58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59

CAPÍTULO IV 63
CONCLUSÃO GERAL 64

CAPÍTULO V..... 65
RESÍDUOS GERADOS E DESTINO..... 66
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS..... 67

CAPÍTULO VI 69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....70

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL

A busca por produtos alimentícios nutritivos e benéficos para a saúde é crescente. Diante disso, o consumo de alimentos enriquecidos com *Spirulina* vêm se tornando tendência na indústria alimentícia. A biomassa de *Spirulina* contêm compostos bioativos que incluem proteínas, pigmentos, ácidos graxos e antioxidantes. No entanto, alimentos adicionados com a biomassa microalgal estão associados a baixa aceitação sensorial por conter sabor, aroma e cor indesejáveis. As pesquisas com nanotecnologia vêm revolucionando o mercado alimentício por meio do desenvolvimento de novos produtos. A nanoencapsulação dos compostos bioativos destaca-se como uma área atrativa da ciência e é alternativa para suprir desafios referentes à biomassa microalgal. Isso ocorre porque a redução no tamanho das partículas para a dimensão de nanoescala favorecem o aumento da área superficial por unidade de volume. Assim, a reatividade e biodisponibilidade dos compostos encapsulados e do material de revestimento é aumentada devido à mudança substancial nas propriedades físicas e químicas. Além disso, os compostos nanoencapsulados são protegidos por revestimento polimérico, proporcionando aumento da estabilidade, das propriedades nutricionais e valor nutricional. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoesferas de quitosana contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por *electrospraying*. Este estudo foi dividido em duas partes: por meio da redação de artigo de revisão publicado na *Biotechnology Research and Innovation* e artigo experimental. As nanoesferas foram desenvolvidas pela técnica de *electrospraying* definindo-se as propriedades da solução polimérica e parâmetros do processo. As condições selecionadas foram: polímero quitosana de alta e baixa massa molecular nas concentrações de 1, 2 e 3 % (p v^{-1}), potencial elétrico (PE) de 23 kV, taxa de alimentação da solução polimérica (TA) de 400 e 600 µL h^{-1}, distância entre o capilar e coletor (DCC) de 150 mm e diâmetro do capilar de 0,45 mm. Nanoesferas homogêneas com diâmetro de 200±50 nm foram desenvolvidas com o polímero quitosana de baixa massa molecular (BMM) na concentração de 1 % (p v^{-1}), PE 23 kV, TA 600 µL h^{-1} e DCC 150 mm. Após serem definidas as melhores condições para a produção de nanoesferas, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi adicionada às nanoesferas nas concentrações de 1 % e 5 % (p v^{-1}). Os nanomateriais com e sem biomassa microalgal foram caracterizados morfologicamente por microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET); por propriedades termogravimétricas (TGA) e potencial zeta. As nanoesferas contendo 1 % e 5 % (p v^{-1}) de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentaram diâmetro de 380±122 nm e 835±353 nm, respectivamente. A análise térmica demonstrou que as nanoesferas são estáveis até a temperatura de aproximadamente 331 °C. Além disso, não foi verificada a presença de solvente residual nos nanomateriais. Esses resultados demonstram a viabilidade das nanoesferas de quitosana para o nanoencapsulamento da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por *electrospraying*. Os nanomateriais desenvolvidos como sistemas de entrega dos compostos bioativos da biomassa microlgal foram produzidos com êxito. Esta pesquisa forneceu possibilidades para a incorporação bem-sucedida dos materiais nanoencapsulados nos alimentos em posterior estudo.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanopartículas. Microalgas. Alimento. Polímero.

ABSTRACT

NANOENCAPSULATION OF *Spirulina* sp. LEB 18 BIOMASS BY *ELECTROSPRAYING*

There is a growing consumer demand for nutritious and healthful food products. In view of this, the consumption of foods enriched with *Spirulina* is becoming a trend in the food industry. *Spirulina* biomass contains bioactive compounds including proteins, pigments, fatty acids, antioxidants, and biopeptides. However, foods added with microalgal biomass are associated with low sensory acceptance because they contain unpleasant taste, aroma and color. Research with nanotechnology has been revolutionizing the food market through the development of new products. This technology offers potential benefits from the manufacturing stages through to consumption. Improvements include increased sensory attributes, stability during storage, functionality, and component efficacy. The nanoencapsulation of bioactive compounds stands out as an attractive area of science in which nanotechnology is showing great promise. This is because the reduction in particle size to the nanoscale dimension favors an increase in surface area per unit volume. In addition, the reactivity of the encapsulated compounds and the coating material is increased due to the substantial change in physical and chemical properties. The objective of this work was to develop polymeric nanospheres containing *Spirulina* sp. LEB 18 biomass by *electrospraying*. This study was divided in two parts: experimental, with the writing of a paper, and theoretical, through bibliographical survey in a review article. The nanospheres were developed by the *electrospraying* technique defining the properties of the polymer solution and process parameters. In preliminary tests, the following conditions were selected: high and low molecular weight chitosan polymer at concentrations of 1, 2 and 3% (p v^{-1}), electric potential (EP) of 23 kV, polymer solution feed rate (TA) of 400 and 600 µL h^{-1}, distance between capillary and collector (DCC) of 150 mm and capillary diameter of 0.45 mm. Homogeneous nanospheres with a diameter of 200±50 nm were developed with the low molecular weight chitosan polymer (BPM) at a concentration of 1% (p v^{-1}), PE 23 kV, TA 600 µL h^{-1} and DCC 150 mm. After the best conditions for nanosphere production were defined, *Spirulina* sp. LEB 18 biomass was added to the nanospheres at concentrations of 1% and 5% (p v^{-1}). The nanomaterials without and with the addition of the microalgal biomass were characterized morphologically by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM); and by thermogravimetric properties (TGA). Nanospheres containing 1% and 5% (p v^{-1}) *Spirulina* sp. LEB 18 biomass showed nanoscale diameters of 380±122 nm and 835±353 nm, respectively. Thermal analysis demonstrated that the nanospheres are stable up to a temperature of approximately 331 °C. Furthermore, no residual solvent was found to be present in the nanomaterials. These results demonstrate the feasibility of chitosan nanospheres for the nanoencapsulation of *Spirulina* sp. LEB 18 biomass by *electrospraying*. The nanomaterials developed as delivery systems for the bioactive compounds of the microlgal biomass were successfully produced. This research provided possibilities for the successful incorporation of the nanoencapsulated materials into foods in further study.

Keywords**:** Nanotechnology. Nanoparticles. Microalgae. Food. Polymer.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Microalgas, como a *Spirulina*, vêm sendo amplamente explorada pela indústria alimentícia como fonte promissora para adição em alimentos. *Spirulina* representa tendência global para a indústria devido às propriedades nutricionais e terapêuticas (LAFARGA, 2019). Essa microalga contém alto teor de proteínas com aminoácidos essenciais, bem como é fonte de carboidratos, vitaminas, minerais, pigmentos fotossintéticos (ficocianina, clorofila e carotenoides), compostos fenólicos, ácidos graxos essenciais e compostos antioxidantes (BATISTA et al., 2012; EL- TANTAWY et al, 2016). Além disso, estudo demonstrou que *Spirulina* apresenta efeitos promotores à saúde (CZERWONKA et al., 2018).

Em 1981, *Spirulina* recebeu aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) e certificação *Generally Recognized As Safe* (GRAS). A partir de 1996 no Brasil, a equipe do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), deu início aos estudos envolvendo o cultivo de microalgas sob diferentes condições ambientais e design de fotobiorreatores. Concomitantemente, o grupo de pesquisa tem realizado desde 1998, estudos com a cepa *Spirulina* sp. LEB 18, isolada na Lagoa Mangueira (33° 30’13’’S e 53° 08’ 59’’ W) (MORAIS, 2010). Nestes estudos, biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram incorporadas em alimentos como suplementos (FREITAS et al., 2019), pão sem glúten (FIGUEIRA et al., 2011), *snack* (LUCAS et al., 2018), *shake* (SANTOS et al., 2016) e biscoitos (MORAIS; MIRANDA; COSTA, 2006).

No entanto, quando a biomassa de microalgas é adicionada em produtos alimentícios, pode haver limitações com relação a aceitação sensorial devido a cor, sabor e aroma indesejáveis, além da perda de compostos bioativos quando incorporada na sua forma livre (LAFARGA, 2019). Para superar os desafios referentes a adição da biomassa microalgal em alimentos, técnicas de encapsulamento vêm sendo estudadas. A nanoencapsulação da biomassa de *Spirulina* em nanopartículas poliméricas é estratégia para aumentar a qualidade, bioatividade e valor nutricional dos produtos alimentícios (JAFARI; MCCLEMENTS, 2017). Nos últimos anos, sistemas de entrega em nanoescala têm sido amplamente utilizados devido as suas propriedades diferenciadas, como pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica e elevada área superficial por unidade de volume. As nanoesferas são exemplos desses sistemas de entrega de compostos bioativos com revestimento polimérico no qual o composto fica adsorvido aumentando a qualidade dos produtos (KUANG et al., 2020). Assim, há proteção contra degradação de substâncias químicas ou bioquímicas, prevenção contra

interações adversas e redução de características sensoriais indesejáveis (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG et al., 2017).

Para desenvolvimento de nanoesferas, a quitosana é comumente utilizada como agente encapsulante dos compostos bioativos (YILMAZ et al., 2019). Este biopolímero apresenta como características atoxicidade e biodegradabilidade. O *electrospraying* é considerado técnica de encapsulamento promissora para produção de nanoesferas de quitosana (ESMAELI et al., 2021). Esse método oferece benefícios que incluem processo de única etapa, produção de partículas menores e uniformes, incorporação direta do composto bioativo em solução polimérica e maior eficiência de encapsulamento (ZAMANI; PRABHAKARAN; RAMAKRISHNA, 2013). Além disso, o solvente utilizado para o preparo da solução polimérica é evaporado durante o processo, e assim todo o solvente remanescente do nanomaterial é eliminado. O equipamento *electrospraying* consiste em fonte de alto potencial elétrico, bomba de deslocamento positivo para injeção da solução polimérica e coletor eletricamente aterrado para deposição das partículas (NIU et al., 2020; SMEETS; CLASEN; MOOTER, 2017).

Nanomateriais à base de diferentes materiais poliméricos vem sendo pesquisados pelo LEB. Os estudos demonstraram que esses nanomateriais podem atuar de forma eficiente como adsorventes de gás em cultivo de microalgas (VAZ; COSTA; MORAIS, 2019, 2020), como indicadores colorimétricos de pH para embalagens de alimentos (KUNTZLER et al., 2020) e para encapsulamento de ficocianina (SCHMATZ et al., 2020). Portanto, o desenvolvimento de nanoesferas poliméricas contendo a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentam potencialidades para aplicações alimentícias, compreendendo importante estratégia para entrega dos compostos promotores de saúde e de propriedades nutricionais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanoesferas de quitosana contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por *electrospraying*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento bibliográfico sobre a potencialidade de aplicação da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nanoencapsulada para desenvolvimento de alimentos funcionais;
- Definir as condições da técnica de *electrospraying* para produção de nanoesferas;
- Desenvolver nanoesferas de quitosana de alta e baixa massa molecular contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18;
- Caracterizar as nanoesferas de quitosana contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por meio de análises morfológicas e termogravimétricas.

CAPÍTULO II

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICROALGA *Spirulina*

Spirulina é pertencente ao grupo das *Cyanophytas* com forma helicoidal e tricomas verde azulados. Esta microalga apresenta organização celular procariótica, com ausência de grande parte das organelas celulares e flagelos. *Spirulina* é encontrada em lagos alcalinos e se desenvolve na forma de tricomas cilíndricos multicelulares variando de 6 a 12 μm (VONSHAK, 1997).

A composição centesimal da *Spirulina* varia entre 50-70 % de proteínas, 10-20 % de carboidratos, 5-10 % de lipídios (MORAIS et al., 2015) e 6-9 % de pigmentos, minerais e oligoelementos, sendo ferro, cálcio, magnésio, fósforo e potássio os mais importantes (COSTA; MORAIS, 2013). A microalga é fonte de ácidos graxos essenciais como o ácido γ-linolênico, precursor das prostaglandinas (CARCEA et al., 2015). Além disso, é fonte de vitamina A e C e vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 e B12), vitamina E, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico (RICHMOND, 2008). O β-caroteno representa aproximadamente 80 % dos carotenoides presentes na *Spirulina*, e outros componentes como tocoferóis, ficocianina e ficoeritrina, também fazem parte da sua composição (PRIYADARSHANI; RATH, 2012).

As cianobactérias apresentam potenciais efeitos antivirais, antifúngicos, antibacterianos, antitumores, antiflamatórios, antivirais, antioxidantes, antimaláricos, imunossupressores e herbicidas (HOSSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013). Diversos estudos relataram a importância terapêutica da *Spirulina* em tratamentos de hiperlipidemia (PONCE-CANCHIHUAMÁN et al., 2010), câncer (KURD; SAMAVATI, 2015), proteção contra obesidade e diabetes (ANITHA; CHANDRALEKHA, 2010).

Em 1981, *Spirulina* recebeu aprovação do FDA e certificação GRAS. Dessa forma, *Spirulina* pode ser comercializada na forma de alimento ou suplemento alimentar sem causar danos à saúde humana (COSTA; MORAIS, 2013). A partir de 1996 no Brasil, a equipe LEB da FURG, deu início aos estudos envolvendo o cultivo de microalgas sob diferentes condições ambientais e design de fotobiorreatores. Em 1998, a equipe começou a estudar a cepa *Spirulin*a sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira localizada no Sul do Brasil (33° 30’13’’S e 53° 08’ 59’’ W) (MORAIS, 2010).

3.1.1 *Spirulina* como fonte de alimentos

O desenvolvimento de alimentos com *Spirulina* tornou-se tendência global na indústria de alimentos por meio da alta demanda dos consumidores por produtos saudáveis (CHACON-LEE; GONZÁLEZ-MARINO, 2010). A maior parte da biomassa de *Spirulina* é comercializada como suplemento nutricional na forma de pó, comprimido ou cápsulas. Porém, nos últimos anos estudos estão incorporando a biomassa microalgal em produtos como pães (MARCO et al., 2014), molhos (ALMEIDA et al., 2020), shake (FREITAS et al., 2019), biscoitos (BATISTA et al., 2017), leite fermentado (BEHESHTIPOUR et al., 2013), snake (LUCAS et al., 2018), entre outros.

Spirulina apresenta potencial para se tornar o alimento do futuro e ser utilizada como ingrediente no desenvolvimento de alimentos. A biomassa microalgal vem sendo adicionada nos produtos como alternativa de fornecimento de nutrientes e efeitos benéficos a saúde (LAFARGA, 2019).

A microalga tem sido usada como potencial ingrediente na fabricação de alimentos para idosos. Santos et al. (2016) desenvolveram alimento em pó com sabor de chocolate, tipo shake enriquecido com *Spirulina* sp. LEB 18 em uma concentração de 750 $mg/100g^{-1}$. Os autores constataram que o teor de proteínas do produto aumentou de 41,3 % para 43,4% após a adição da biomassa microalgal.

Lucas et al. (2018) desenvolveram *snacks* enriquecidos com *Spirulina* sp. LEB 18 com concentração de 2,6% e avaliaram o conteúdo nutricional, características sensoriais, microbiológicas e propriedades físico químicas. O conteúdo de proteínas, lipídios e minerais dos *snacks* com *Spirulina* aumentaram cerca de 22,6%, 28,1% e 46,4% respectivamente. Além disso, características como a textura não foram alteradas, em comparação a um controle, com a adição da biomassa de *Spirulina*.

Embora a adição de *Spirulina* em produtos alimentícios seja estudada com frequência, a biomassa microalgal pode apresentar aspectos indesejáveis quando adicionados em alimentos (LAFARGA, 2019). Os principais aspectos incluem a coloração, sabor e odor intensos da microalga, resultando em baixa aceitação sensorial. Diante disso, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de buscar estratégias para minimizar ou eliminar esses interferentes (MORAIS et al., 2021).

3.2 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a tecnologia em escala nanométrica que possui átomos, moléculas ou macromoléculas com tamanho que varia de 1-1000 nm para o desenvolvimento de materiais com novas propriedades. Essa tecnologia apresenta potencial para revolucionar o desenvolvimento de sistemas alimentícios e têm atraído cada vez mais a atenção das indústrias de alimentos (KHAN, 2017). Projetar materiais em escala nanométrica pode proporcionar produtos alimentícios com novas propriedades físico-químicas, nutricionais e sensoriais, em termos de sabor, textura, aparência, estabilidade e destino gastrointestinal (SINGH et al., 2017).

A nanoencapsulação envolve a incorporação dos compostos bioativos em pequenas cápsulas com camada protetora. Dessa forma, os compostos ficam retidos e a biodisponibilidade é aumentada durante um período de tempo (CHOPDE et al., 2020). Através dessa técnica preserva-se os compostos bioativos de fatores ambientais e de fatores como pH e digestão gástrica. Assim, aumenta-se a qualidade, estabilidade e bioatividade dos compostos durante as etapas de processamento, armazenamento e transporte. Além disso, a nanoencapsulação mascara o sabor e aroma desagradáveis, promove a entrega controlada dos compostos e melhora a solubilidade dos compostos lipofílicos em meio aquoso (REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019).

3.2.1 Nanopartículas

A vantagem de usar nanomateriais como sistemas de entrega é baseada no fato de que as propriedades físico-químicas dos materiais mudam quando eles são reduzidos à nanoescala permitindo maior biodisponibilidade dos compostos bioativos encapsulados, devido a sua digestão mais rápida. Nanopartículas são definidas como partículas sólidas coloidais com diâmetros que variam de 1-1000 nm (EZHILARASI et al., 2013). Com base em sua morfologia o termo nanopartícula é classificado como nanoesferas e nanocápsulas. As nanocápsulas são compostas por invólucro polimérico em torno do núcleo; o composto pode ser dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas são compostas por matriz polimérica podendo adsorver a molécula e/ou composto bioativo (ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2018).

As nanopartículas ganharam atenção na área alimentícia com potencial aplicação para serem utilizadas como sistemas de distribuição de compostos bioativos em alimentos e

bebidas. Os principais benefícios são o aumento da biodisponibilidade dos nutrientes, o encapsulamento de compostos bioativos dentro das nanopartículas proporcionando proteção contra a degradação química ou bioquímica, prevenção contra interações adversas e mascaramento de sabor indesejado. Estas melhorias propiciaram o aumento do grau de aceitação dos produtos por parte dos consumidores (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANH, 2017).

Valencia et al. (2021) desenvolveram nanopartículas de lecitina/quitosana contendo curcumina com potencial de aplicação em matrizes alimentares para desenvolvimento de novos produtos. Segundo os autores, a nanopartículas apresentaram boa estabilidade, atividade antimicrobiana e também foi capaz de proteger a atividade antioxidante do composto bioativo. Em outro estudo, Schmatz et al. (2020) produziram nanopartículas de álcool polivinílico (PVA) adicionadas de ficocianina. Os autores demonstraram que as nanopartículas obtiveram resistência térmica à ficocianina e atividade antioxidante. As nanopartículas demonstraram potencial promissor como constituinte na formulação de novos alimentos.

3.2.2 Processo de *electrospraying*

O equipamento *electrospraying* é composto por injetor no qual é colocada a solução polimérica, dois eletrodos e suprimento de alto potencial elétrico. A solução polimérica é pulverizada pela aplicação de campo elétrico de alto potencial para transformar a gota pendente em partículas, seguida de deposição no coletor. O polímero em fase líquida é expelido a partir do capilar em taxa constante por bomba de seringa a qual forma a gota na ponta do capilar. Quando pequeno volume de líquido do polímero é exposto a gradiente elétrico, a tensão superficial é superada formando o cone de Taylor. Para que o cone de Taylor seja estável, com a consecutiva formação de nanopartículas poliméricas monodispersas, são recomendados o uso de capilar com pequeno diâmetro e taxa de alimentação reduzida (SONGSURANG et al., 2011).

O *electrospraying* produz nanopartículas com diâmetros em escala nanométrica. O tamanho e a forma das nanopartículas são controladas a partir de parâmetros do processo, parâmetros da solução e parâmetros ambientais. As propriedades da solução polimérica compreendem o solvente, viscosidade, peso molecular e concentração do polímero e tensão superficial. Os parâmetros do processo correspondem ao potencial elétrico, taxa de alimentação, diâmetro do capilar e a distância entre o capilar e o coletor. As principais

condições ambientais são a umidade relativa e a temperatura (SMEETS; CLASEN; MOOTER, 2017).

3.2.2.1 Propriedades, parâmetros e condições do *electrospraying*

O primeiro fator a ser considerado na técnica de *electrospraying* é o material polimérico. O tipo de polímero deve ser selecionado de acordo com a aplicação, como por exemplo, melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de compostos bioativos ou preparar sistemas de entrega de liberação controlada dos compostos. Após a escolha do material polimérico, o solvente no qual o polímero será dissolvido deve ser selecionado (YAO et al., 2008).

O tipo de solvente utilizado depende da solubilidade do polímero e tem como função inicial promover a dissolução. O solvente deverá ter boa volatilidade, pressão de vapor e ponto de ebulição moderados, bem como a capacidade de manter a integridade da solução polimérica. A evaporação completa do solvente ocorre durante o percurso das gotículas em direção ao coletor. Através de análise termogravimétrica de nanopartículas é possível avaliar se houve a eliminação completa do solvente durante o *electrospraying* (YAO et al., 2008).

A viscosidade da solução polimérica desempenha papel importante na determinação da forma e diâmetro das nanopartículas por *electrospraying*. Viscosidades muito baixas acarretam na formação de partículas irregulares; com o aumento da viscosidade há formação de partículas ovais; viscosidades muito altas poderão formar fibras. A viscosidade da solução vai depender do emaranhamento molecular do polímero (SMEETS; CLASEN; MOOTER, 2017).

A tensão superficial é a principal força que se opõe ao potencial elétrico durante o *electrospraying.* A alta tensão irá proporcionar cargas à solução e juntamente com o campo elétrico externo proporcionará o início do processo, demonstrando que a tensão superficial foi superada (BOCK; DARGAVILLE; WOODRUFF, 2012). Com o aumento da temperatura, o movimento das moléculas e taxa de volatilização do solvente é acelerado, reduzindo então a viscosidade e a tensão superficial da solução, o que gera redução do tamanho das partículas (NIU et al., 2020).

A distância entre capilar e coletor tem influência na produção de nanopartículas. Distâncias curtas produzem maior intensidade de campo elétrico, reduzindo assim o tamanho das partículas, em contrapartida o tempo de evaporação do solvente é menor, resultando em coalescência ou partículas úmidas. Longa distância entre o capilar e o coletor requer um maior

potencial elétrico, afim de fornecer uma força de campo elétrico suficiente. Porém, é necessário que se mantenha uma distância adequada entre o capilar e coletor, para garantir a volatilização do solvente (NGUYEN; CLASEN; VAN DEN MOOTER, 2016).

A taxa de alimentação determina a quantidade de solução disponível para o *electrospraying*. O aumento da taxa de alimentação provoca o aumento no diâmetro das nanopartículas, necessitando que seja fornecida maior potencial elétrico. A taxa de alimentação da solução polimérica também influencia na secagem das nanopartículas durante o percurso até o coletor. Se for alta, pode não permitir tempo suficiente para a evaporação do solvente, resultando em nanopartículas contendo resíduos de solvente (TEO; RAMAKRISHNA, 2006).

O diâmetro do capilar reduz a ocorrência de gotas nas nanopartículas. Esta redução pode ser devido à menor exposição da solução durante o *electrospraying*. Quando o tamanho da gota na ponta do orifício é reduzido, tal como no caso de pequenos diâmetros do capilar (0,45 mm), a superfície de tensão na gota aumenta e o diâmetro das nanopartículas diminui (TEO; RAMAKRISHNA, 2006).

Os parâmetros ambientais como umidade e temperatura influenciam no processo de *electrospraying* e na morfologia das nanopartículas. Existe uma relação direta entre a evaporação do solvente e a temperatura, bem como entre a condutividade do solvente e a temperatura. Ambos podem influenciar a capacidade do processo de formação das nanopartículas (CHEN; YU, 2010). Além disso, a viscosidade do polímero e a tensão superficial da solução são influenciadas pela temperatura. A temperatura da solução tem a função de aumentar o efeito da taxa de evaporação e reduzir a viscosidade da solução (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

A umidade relativa é a principal condição ambiental que afeta a morfologia das nanopartículas. Elevada umidade não é recomendada, uma vez que o solvente pode não ser volatilizado no percurso entre o capilar e o coletor e dessa maneira, são geradas nanopartículas úmidas ou ocorre o gotejamento da solução polimérica. Se no momento da técnica de *electrospraying* a umidade relativa estiver elevada, recomenda-se que a taxa de alimentação da solução seja reduzida para que o solvente evapore totalmente (SMEETS; CLASEN; MOOTER, 2017).

CAPÍTULO III

ARTIGO I

NANOENCAPSULAÇÃO DA BIOMASSA DE *Spirulina* POR *ELECTROSPRAYING* PARA DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS-UMA REVISÃO

MORAIS, M. G.; ALVARENGA, A. G. P.; VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V. Nanoencapsulation of *Spirulina* biomass by *electrospraying* for development of functional foods – a review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 5, e2021009, 2021.

NANOENCAPSULAÇÃO DA BIOMASSA DE *Spirulina* POR *ELECTROSPRAYING* PARA DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS - UMA REVISÃO

RESUMO

A indústria alimentícia vem buscando incorporar compostos bioativos em alimentos visando benefícios nutricionais e funcionais à saúde dos consumidores. A biomassa de *Spirulina* contêm compostos bioativos de alto valor biológico, como proteínas, vitaminas, carboidratos, pigmentos, ácidos graxos e biopeptídeos. O avanço da nanotecnologia permite o desenvolvimento de produtos alimentícios funcionais. A nanoencapsulação contribui para a redução de sabores e odores indesejáveis dos compostos. O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por *electrospraying* funcionam como suporte desses compostos melhorando a estabilidade e entrega controlada. Neste contexto, o artigo aborda a utilização de nanopartículas como material encapsulante para compostos bioativos e/ou biomassa de *Spirulina* pelo método e*lectrospraying*. A aplicação da *Spirulina* nanoencapsulada para o desenvolvimento de alimentos funcionais tem potencial promissor para aumentar a qualidade, bioatividade e valor nutricioanal dos produtos.

Palavras-chave: Compostos bioativos. GRAS. Microalgas. Suplemento nutricioanal. Nanopartículas poliméricas.

1. INTRODUÇÃO

As indústrias alimentícias vêm buscando inovações na produção de alimentos, por meio do aumento da demanda por produtos saudáveis (CHOPDE et al., 2020). Nesse sentido, a nanotecnologia é técnica promissora para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios podendo melhorar o valor nutricional sem alterar as características físicas e sensoriais do alimento, bem como aumentar a vida útil e a segurança alimentar (KUANG et al., 2020). A nanotecnologia é a ciência que permite a manipulação, organização e medição de materiais em nanoescala. Nesta dimensão os nanomateriais são desenvolvidos com propriedades físicas, químicas e biológicas aprimoradas devido a maior área de superfície de contato e maior interação que o nanomaterial permite, devido à redução de tamanho. Assim, a nanotecnologia é uma técnica promissora para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, porque pode melhorar o valor nutricional e a proteção dos compostos bioativos sem alterar o físico. Além disso, as características sensoriais do alimento aumentam a vida de prateleira e segurança alimentar (KUANG et al., 2020).

As nanopartículas são usadas como sistemas de entrega com base nas propriedades físico-químicas de materiais reduzidos à nanoescala. Os nanomateriais proporcionam maior biodisponibilidade dos compostos bioativos nanoencapsulados devido a sua rápida digestão (ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2018). O *electrospraying* é método versátil e prático para produção de nanopartículas que permite a incorporação direta do composto bioativo em solução polimérica.

A microalga *Spirulina* é fonte de proteínas com alto valor biológico, aminoácidos, micronutrientes, compostos antioxidantes, carboidratos, vitaminas e minerais (ABU-TAWEEL et al., 2019). Este gênero recebeu certificação *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e tem seu consumo autorizado como alimento ou suplemento alimentar (BOUKID; CASTELLARI, 2021). Diversos alimentos já foram produzidos com a biomassa de *Spirulina*: suplementos (CARVALHO et al., 2017; FREITAS et al., 2019), snack (LUCAS et al., 2018), gel energético (MOREIRA et al., 2018) e shake (SANTOS et al., 2016). No entanto, a biomassa pode conferir odor e sabor desagradáveis, perda da bioatividade e a aparência de cor verde no produto. Neste contexto, o nanoencapsulamento de compostos bioativos para aplicação em alimentos pode aprimorar o setor industrial e gerar benefícios aos produtos e consumidores. A técnica contribui para redução dos atributos sensoriais indesejáveis, permitindo o aumento da concentração de biomassa microalgal adicionada ao produto, além de estabilizar os compostos bioativos, permitindo a liberação controlada da substância no sítio-alvo e a absorção eficiente pelo sistema digestivo (JAFARI; MCCLEMENTS, 2017).

Neste sentido, a revisão aborda as nanopartículas como material encapsulante de compostos bioativos pelo método do *electrospraying*. Além disso, descreve o potencial de aplicação da biomassa de *Spirulina* nanoencapsulada para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

2. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma tecnologia que permite a manipulação de átomos, moléculas ou macromoléculas para o desenvolvimento de materiais com novas formas e tamanhos que podem variar entre 1-1000 nm. Essa tecnologia tem atraído cada vez mais a atenção das indústrias de alimentos, mostrando o potencial de revolucionar o desenvolvimento de sistemas alimentares (KHAN, 2019). A partir da nanotecnologia, podem ser desenvolvidos materiais de embalagem de alimentos inteligentes (KUNTZLER; COSTA;

MORAIS, 2018), nanosensores de alimentos (SILVA et al., 2019) e aditivos alimentares (SAHANI; SHARMA, 2021). Assim, projetar materiais em escala nanométrica pode fornecer produtos alimentícios com novas e melhores propriedades físico-químicas, nutricionais e sensoriais, em termos de sabor, textura, aparência, estabilidade, biodisponibilidade de nurientes e destino gastrointestinal (SINGH et al., 2017).

2.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas são definidas como partículas sólidas coloidais com diâmetros que variam de 10-1000 nm. Com base em sua morfologia o termo nanopartícula é classificado como nanoesferas e nanocápsulas. As nanocápsulas são compostas por invólucro polimérico ao redor do núcleo. O composto pode ser dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas são formadas por matriz polimérica densa. Neste caso, o composto bioativo pode ser adsorvido na superfície ou disperso na matriz (ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2018).

As nanopartículas ganharam atenção na área alimentícia com potencial aplicação para serem utilizadas como sistemas de entrega de compostos bioativos em alimentos e bebidas. O aumento da biodisponibilidade dos nutrientes e o encapsulamento de compostos bioativos em nanopartículas são os principais benefícios. Assim, há proteção contra a degradação química ou bioquímica, prevenção contra interações adversas e mascaramento de sabor indesejado. Essas melhorias na qualidade dos alimentos aumentam o grau de aceitação dos produtos pelos consumidores (PATHAKOTI et al., 2017).

Polímeros naturais e sintéticos podem ser utilizados para nanoencapsulação de compostos ativos. O polímero utilizado na área de alimentos deve ser biodegradável, atóxico e não deve causar danos ao entrar em contato com alimentos e posterior consumo humano. Alguns exemplos de polímeros biodegradáveis que podem ser aplicados em produtos alimentícios: poliácido láctico, polihidroxibutirato, quitosana, policaprolactona, polietilenoglicol, poli (ácido glicólico) (AMULYA et al., 2021). Estudos com quitosana na área de alimentos foram citados por Raza et al. (2020) para encapsulamento de compostos bioativos proporcionando aumento do valor nutricional, bem como proteção dos compostos. O ácido polilático foi usado para nanoencapsular compostos bioativos com atividade antioxidante da casca de batata-doce (GUERRERO-LÉON et al., 2021).

Diferentes métodos podem ser utilizados para encapsulamento, como secagem por pulverização, emulsificação e evaporação do solvente (ARAIZA-CALAHORRA; AKHTAR;

SARKAR, 2018). A principal desvantagem dessas técnicas é que envolvem diversas etapas, altas temperaturas ou requerem grandes quantidades de solventes orgânicos, resultando na degradação de compostos bioativos. Além disso, não são produzidas partículas homogêneas e o processo têm baixa eficiência (ROSTAMABADI et al., 2021).

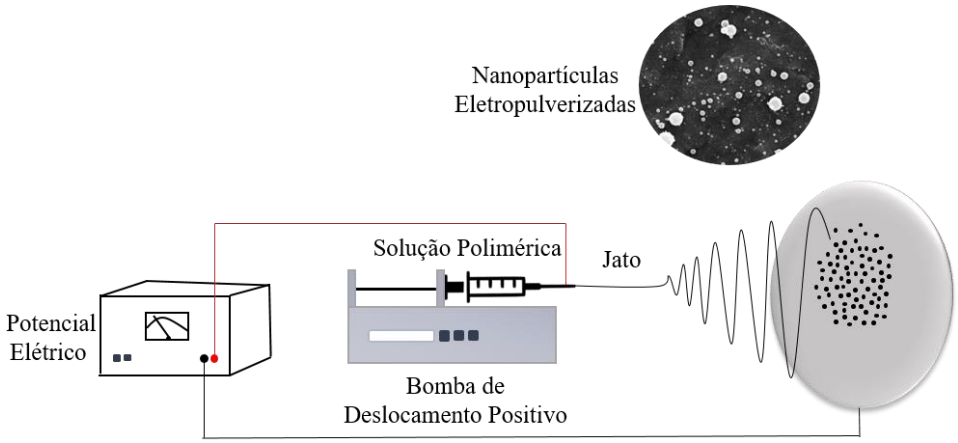
2.2 TÉCNICA DE *ELECTROSPRAYING*

O *electrospraying* é técnica eficaz para obtenção de partículas com diâmetros em escala nanométrica, pois não envolve condições severas de temperatura, pressão ou uso de produtos químicos agressivos (NIU et al., 2020). Além disso, nesse processo são produzidas nanopartículas com elevada porosidade e proporção da área de superfície em relação ao volume (COELHO; ESTEVINHO; ROCHA, 2021). O equipamento é composto por fonte de alto potencial elétrico, bomba de deslocamento positivo e coletor eletricamente aterrado para a deposição de nanopartículas (NIU et al. 2020) (Figura 1).

O tamanho e a forma das nanopartículas são controlados por parâmetros do processo, solução e ambientais. As propriedades da solução polimérica compreendem o solvente, viscosidade, tensão superficial, condutividade elétrica, peso molecular e concentração do polímero. Os parâmetros do processo correspondem ao potencial elétrico, taxa de alimentação, diâmetro do capilar e distância entre o capilar e coletor.

As principais condições ambientais são a umidade relativa e temperatura (COELHO; ESTEVINHO; ROCHA, 2021). Assim, *electrospraying* é técnica versátil aplicada ao desenvolvimento de materiais.

Figura 1 - Diagrama esquemático do processo de *electrospraying*



Nesse processo, os nanomateriais podem ser obtidos por meio de ajustes nos parâmetros do processo e propriedades da solução polimérica. O processo apresenta vantagens, como operação à temperatura ambiente e evaporação eficiente do solvente. Além disso, existe a possibilidade de ampliar a escala do processo. Essas vantagens são importantes para manter a bioatividade dos compostos ativos nanoencapsulados (NIU et al., 2020; COELHO; ESTEVINHO; ROCHA, 2021).

3. MICROALGAS

As microalgas são organismos microscópicos unicelulares, fotossintéticos, fisiologicamente podem ser eucarióticas ou procarióticas e são capazes de se desenvolverem em ambientes aquáticos (COSTA et al., 2020). Estima-se que existam 50.000 espécies conhecidas com aplicações em diversas áreas da ciência como farmacêutica, alimentícia, agrícola e médica (MOBIN; CHOWDHURYA; ALAM, 2019).

As microalgas são capazes de acumular moléculas e compostos bioativos em sua biomassa microalgal, principalmente proteínas, carboidratos e lipídios. Além disso, possuem a capacidade de sintetizar compostos como carotenóides, ácidos graxos de cadeia longa, aminoácidos essenciais e não essenciais, enzimas, vitaminas e minerais (MOBIN; CHOWDHURYA; ALAM, 2019).

A biomassa de microalgas produzida tem potencial para aplicações no desenvolvimento de alimentos (FREITAS et al., 2019), medicamentos (HU et al., 2019), biopesticidas (COSTA et al., 2019), biocombustíveis (NAGAPPAN et al., 2019) e biorremediação ambiental (KUMAR; BANERJEE; DAS, 2014).

3.1 *Spirulina* sp.

Spirulina (nome científico *Arthospira*) é uma microalga verde azulada pertencente ao grupo das *Cyanophytas*, com forma helicoidal. Esta microalga apresenta organização celular procariótica, com ausência de grande parte das organelas celulares. *Spirulina* é encontrada em lagos alcalinos e se desenvolve na forma de tricomas cilíndricos multicelulares (ABU-TAWEEL et al., 2019). O interesse na *Spirulina* deriva principalmente da sua composição química que varia entre 50-70% de proteínas, 10-20% de carboidratos, 5-10% de lipídios (ROSA et al., 2016).

Além disso, *Spirulina* se destaca por ser fonte de vitamina A e C, vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 e B12), vitamina E, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico, pigmentos (carotenoides, ficocianina e clorofila), minerais e oligoelementos, sendo ferro, cálcio, magnésio, fósforo e potássio os mais importantes (ABU-TAWEEL et al., 2019). Dessa forma, a biomassa de microalgas é matéria prima nutricionalmente importante para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios. Além disso, metabólitos intracelulares e extracelulares de cianobactérias apresentam atividades biológicas potenciais (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividades bioativas das microalgas do gênero *Spirulina*

Microalga	**Atividade bioativa**	**Referência**
Spirulina sp.	Anti-inflamatoria	Abu-Taweel et al. (2019)
Spirulina platensis	Antitumor	Wang e Zhang (2016)
Spirulina máxima	Antihipertensão	Suliburska et al. (2016)
Spirulina platensis	Anticâncer	Czerwonka et al. (2018)
Spirulina platensis	Anti-obesidade	Shariat et al. (2019)
Spirulina platensis	Antidiabético	Hu et al. (2019)

3.2 *Spirulina* COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

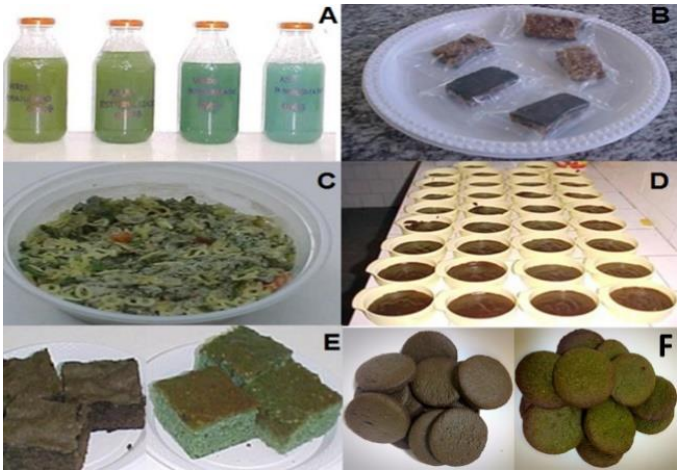
Spirulina é aplicada como ingrediente funcional no desenvolvimento de diversos produtos para aumentar a qualidade nutricional e o efeito terapêutico em doenças crônicas (ALTERTHUM et al., 2019). O desenvolvimento de alimentos com *Spirulina* tornou-se tendência mundial na indústria alimentícia pela alta demanda dos consumidores por produtos saudáveis. A maior parte da biomassa de *Spirulina* é comercializada como suplemento nutricional na forma de pó, comprimido ou cápsulas. No entanto, estudos vêm incorporando biomassa de microalgas em produtos como molhos (ALMEIDA et al., 2021), kefir (ATIK et al., 2021), entre outros.

No Brasil, desde 1996, o Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, Rio Grande, RS) desenvolve produtos alimentícios com

adição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 como shake para a população idosa (SANTOS et al., 2016), suplementos para atletas (FREITAS et al., 2019; CARVALHO et al., 2017), gel energético (MOREIRA et al., 2018) e *snacks* (LUCAS et al., 2018). Além desses produtos também foram produzidos biscoitos, mistura em pó para bolo, leite em pó, gelatina em pó, pudim, sopas instantâneas, barras de cereais, bebidas isotônicas, macarrão instantâneo (Figura 2) e cápsulas de *Spirulina* sp. LEB 18 como suplemento alimentar para comercialização (Olson Microalgas Macronutrição, Camaquã, RS). Além disso, os alimentos com *Spirulina* foram desenvolvidos visando a suplementação nas refeições de crianças. Todos os alimentos são desenvolvidos no Centro de Preparação de Alimentos com *Spirulina* (CEAS), localizado na FURG.

A capacidade comprovada da *Spirulina* para a produção de compostos bioativos destaca esses micro-organismos biotecnologicamente para aplicações em diversas áreas. No entanto, adicionar biomassa aos alimentos exige alguns desafios para comercialização que necessitam ser superados, principalmente a intensidade da cor verde e sabor e aroma de peixe (LAFARGA, 2019). Desta forma, a nanoencapsulação dos compostos de microalgas biologicamente ativos apresenta potencial para suprir esses desafios. Diante disso, é possível reduzir ou eliminar odores, controlar a liberação de compostos bioativos no sítio-alvo e aumentar a biodisponibilidade desses compostos.

Figura 2 - Produtos alimentícios com *Spirulina* sp. LEB: isotônicos (A), barra de cereal (B), sopas instantâneas (C), pudim (D), mistura para bolos em pó (E) e biscoitos (F).



Fonte: Vaz et al. (2016)

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os compostos bioativos da microalga *Spirulina* são importantes para a indústria alimentícia, pois podem oferecer benefícios à saúde, como propriedades nutracêuticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas. No entanto, a incorporação direta dos compostos em alimentos é limitada, pois pode alterar as características sensoriais do produto, como odor, sabor e aparência. Além disso, os compostos bioativos são afetados por fatores ambientais, pH e digestão gástrica. As nanopartículas poliméricas produzidas por *electrospraying* desempenham papel essencial no encapsulamento dos compostos. Eles permitem aumento do valor nutricional dos produtos, protegem os compostos bioativos da degradação antecipada e promovem a liberação controlada. Assim, a nanoencapsulação da biomassa de microalga *Spirulina* é alternativa promissora e eficaz para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Além disso, há aumento na qualidade, estabilidade e bioatividade dos compostos durante as etapas de processamento, armazenamento e transporte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-TAWEEL, G. M.; ANTONISAMY, P.; AROKIYARAJ, S.; KIM, H. J.; KIM, S. J.; PARK, K. H.; Kim, Y. O. *Spirulina* consumption effectively reduces anti-inflammatory and pain related infectious diseases. **Journal of infection and public health**, v. 12, p. 777-782, 2019.

ALMEIDA, L. M. R.; CRUZ, L. F. S.; MACHADO, B. A. S.; NUNES, I. L.; COSTA, J. A. V.; FERREIRA, E. S.; LEMOS, P. V. F.; DRUZIAN, J. I.; Souza, C. O. Effect of the addition of *Spirulina* sp. biomass on the development and characterization of functional food. **Algal Research**, v. 58, p. 102387, 2021.

ALTERTHUM, F.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; MORAES, I. (2019). **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3. 2 ed. Blucher (Capítulo 15).

AMULYA, K.; KATAKOJWALA, R.; RAMAKRISHNA, S.; MOHAN, S. V. Low carbon biodegradable polymer matrices for sustainable future. **Composites Part C: open access**, v. 4, p. 100111, 2021.

ARAIZA-CALAHORRA, A.; AKHTAR, M.; SARKAR, A. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 155-169, 2018.

ATIK, D. S.; GÜRBÜZ, B.; BÖLÜK, E.; PALABIYIK, I. Development of vegan kefir fortified with Spirulina platensis. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101050, 2021.

BOUKID, F.; CASTELLARI, M. Food and beverages containing algae and derived ingredients launched in the market from 2015 to 2019: a front-of-pack labeling perspective with a special focus on Spain. **Foods,** v. 10, n. 1, p. 173, 2021.

CARVALHO, L. F.; MOREIRA, J. B.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Novel Food Supplements Formulated With Spirulina To Meet Athletes' Needs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2017.

CHOPDE, S.; DATIR, R.; DESHMUKH, G.; DHOTRE, A.; PATIL, M. Nanoparticle formation by nanospray drying & its application in nanoencapsulation of food bioactive ingredients. **Journal of Agriculture and Food Research,** v. 2, p. 100085, 2020.

COELHO, S. C.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying- A review. **Food Chemistry**, v. 339, p. 127850, 2021.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; CRUZ, C. G.; SILVEIRA, J.; Morais, M. G. Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, p. 366-375, 2019.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; MORAES, L.; ZAPAROLI, M.; MORAIS, M. G. Progress in the physicochemical treatment of microalgae biomass for value- added product recovery. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122727, 2020.

CZERWONKA, A.; KAŁAWAJ, K.; SŁAWIŃSKA-BRYCH, A.; LEMIESZEK, M. K.; BARTNIK, M.; WOJTANOWSKI, K. K.; ZDZISINSKA, B., RZESKI, W. Anticancer effect of the water extract of a commercial Spirulina (Arthrospira platensis) product on the human lung cancer A549 cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 292-302, 2018.

FREITAS, B. C. B.; SANTOS, T. D.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Novel foods: a meal replacement shake and a high-calorie food supplemented with Spirulina biomass. **International Food Research Journal**, v. 26, p. 59-65, 2019.

GUERRERO-LEÓN, B.; CORBINO, G.; DUFRESNE, A.; ERREA, M. I.; D'ACCORSO, N.; GARCIA, N. L. Arapey sweet potato peel waste as renewable source of antioxidant: extraction, nanoencapsulation and nanoadditive potential in films. **Journal of Polymer Research,** v. 28, n. 1, p. 1-8, 2021.

HU, S.; FAN, X.; QI, P.; ZHANG, X. Identification of anti-diabetes peptides from Spirulina platensis. **Journal of functional foods**, v. 56, p. 333-341, 2019.

JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. (2017). Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability. Elsevier (Capítulo 1).

KHAN, M. A.; YUE, C.; FANG, Z.; HU, S.; CHENG, H.; BAKRY, A. M.; LIANG, L. Alginate/chitosan-coated zein nanoparticles for the delivery of resveratrol. **Journal of Food Engineering,** v. 258, p. 45-53, 2019.

KUANG, L.; BURGESS, B.; CUITE, C. L.; TEPPER, B. J.; HALLMAN, W. K. Sensory acceptability and willingness to buy foods presented as having benefits achieved through the use of nanotechnology. **Food Quality and Preference**, 83, 103922, 2020.

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. International Journal of Biological Macromolecules Development of electrospun nanofibers containing chitosan / PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 800-806, 2018.

LAFARGA, T. Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. **Algal Research**, v. 41, p. 101566, 2019.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Spirulina for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **Food Science and Technology**, v. 90, p. 270-276, 2018.

MOBIN, S. M. A.; CHOWDHURY, H.; ALAM, F. Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review. **Energy Procedia,** v. 160, p. 752–760, 2019.

MOREIRA, J. B.; CARVALHO, L. F.; SANTOS, T. D.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Microalgal biotechnology for development of energy gel in sports. **International Food Research Journal,** v. 25, p. 1942-1947, 2018.

NAGAPPAN, S.; DEVENDRAN, S.; TSAI, P. C.; DAHMS, H. H.; PONNUSAMY, V. K. Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. **Fuel,** v. 252, p. 339-349, 2019.

NIU, B.; SHAO, P.; LUO, Y.; SUN, P. Recent advances of electrosprayed particles as encapsulation systems of bioactives for food application. **Food Hydrocoll**, v. 99, p. 105376, 2020.

PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. M. Nanostructures: Current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Analysis,** v. 25, n. 2, p. 245-253, 2017.

RAZA, Z. A.; KHALIL, S.; AYUB, A.; BANAT, I. M. Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. **Carbohydrate Research**, v. 492, p. 108004, 2020.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; COSTA, J. A. V. Spirulina cultivation with a CO2 absorbent: influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource technology**, v. 200, p. 528-534, 2016.

ROSTAMABADI, H.; FALSAFI, S. R.; ROSTAMABADI, M. M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Electrospraying as a novel process for the synthesis of particles/nanoparticles loaded with poorly water-soluble bioactive molecules. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 290, p. 102384, 2021.

SAHANI, S.; SHARMA, Y. C. Advancements in applications of nanotechnology in global food industry. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128318, 2021.

SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; Costa, J. A. V. Development of powdered food with the addition of Spirulina for food supplementation of the elderly population. Innovative **Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216-220, 2016.

SHARIAT, A.; FARHANGI, M. A.; ZEINALIAN, R. Spirulina platensis supplementation, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), oxidative stress markers and anthropometric features in obese individuals: A randomized controlled trial. **Journal of Herbal Medicine**, v. 17, p. 100264, 2019.

SILVA, C. K.; MASTRANTONIO, D. J. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, G. M. Innovative pH sensors developed from ultrafine fibers containing acai (Euterpe oleracea) extract. **Food Chemistry**, v. 294, p. 397-404, 2019.

SINGH, T.; SHUKLA, S.; KUMAR, P.; WAHLA, V.; BAJPAI, V. K.; RATHER, I. A. Application of Nanotechnology in Food Science: Perception and Overview. **Frontiers in microbiology,** v. 8, p. 1–7, 2017.

SULIBURSKA, J.; SZULIŃSKA, M.; TINKOV, A. A.; BOGDAŃSKI, P. Effect of Spirulina maxima supplementation on calcium, magnesium, iron, and zinc status in obese patients with treated hypertension. **Biological trace element research**, v. 173, p. 1-6, 2016.

VAZ, B. S.; MOREIRA, J. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73–77, 2016.

WANG, Z.; ZHANG, X. Characterization and antitumor activity of protein hydrolysates from Arthrospira platensis (Spirulina platensis) using two-step hydrolysis. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 379-3385, 2016.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; GONZÁLEZ-REZA, R.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; MIRANDA-LINARES, V.; BERNAL-COUOH, T. F.; MENDOZA-ELVIRA, S.;

QUINTANAR-GUERRERO, D. Nanosystems in Edible Coatings: A Novel Strategy for Food Preservation. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 705, 2018.

ARTIGO II

NANOESFERAS POLIMÉRICAS CONTENDO BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 DESENVOLVIDAS POR *ELECTROSPRAYING*

NANOESFERAS POLIMÉRICAS CONTENDO BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 DESENVOLVIDAS POR *ELECTROSPRAYING*

RESUMO

O consumo de alimentos enriquecidos com *Spirulina* podem apresentar benefícios para a saúde. A biomassa microalgal contêm compostos bioativos de elevado valor proteico que incluem proteínas, pigmentos, ácidos graxos e antioxidantes. No entanto, alimentos contendo biomassa de *Spirulina* podem apresentar características sensoriais indesejáveis, prejudicando a qualidade e aceitação pelos consumidores. Além disso, quando a biomassa microalgal é adicionada na forma livre, pode haver perda dos compostos bioativos. Dessa forma, a nanoencapsulação vem ganhando destaque na área de alimentos como estratégia para suprir os desafios referentes à biomassa microalgal. Em escala nanométrica, os materiais adquirem propriedades diferenciadas proporcionando benefícios como aumento dos atributos sensoriais, e melhorias na estabilidade, funcionalidade e eficácia dos compostos, favorencendo o aumento nutricional. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanoesferas de quitosana com biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por *electrospraying* para potencial aplicação em alimentos. As nanoesferas foram caracaterizadas por meio de análises físico-químicas e gravimétricas. Nanoesferas com diâmetro de 200±50 nm foram desenvolvidas com o polímero quitosana de baixa massa molecular. Após a definição dos melhores parâmetros para desenvolvimento de nanoesferas, biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi adicionada nas concentrações de 1% e 5% (p v^{-1}) e apresentaram diâmetro em nanoescala de 380±122 nm e 835±353 nm, respectivamente. A análise térmica demonstrou que as nanoesferas são estáveis até a temperatura de 331 °C e não foi verificada a presença de solvente residual. Os resultados mostraram que, nanoesferas de quitosana desenvolvidas por *electrospraying* apresentam potencial como suporte para incorporação da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e adição em alimentos.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanopartículas. Microalgas. Polímero. Alimentos.

1. INTRODUÇÃO

A microalga *Spirulina* tem se tornado promissora para obtenção de alimentos benéficos para a saúde. *Spirulina* é conhecida principalmente pelo seu elevado conteúdo proteico (55-70%) que inclui os aminoácidos essenciais, carboidratos (10-20%) e lipídios (5-10%). Esta microalga se destaca por ser fonte de compostos bioativos, vitaminas, minerais, pigmentos fotossintéticos e propriedades antioxidantes (BATISTA et al., 2012; EL-TANTAWY, 2016). Além das propriedades nutricionais, estudos demonstraram o potencial da *Spirulina*, devido as suas propriedades nutracêuticas no combate à obesidade (BOHÓRQUEZ-MEDINA et al., 2021), câncer (CZERWONKA et al., 2018) e diabetes (HU

et al., 2019). *Spirulina* recebeu certificação *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e no Brasil tem seu consumo autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005). A maior parte da biomassa de *Spirulina* é comercializada como suplemento nutricional na forma de pó ou cápsulas. Porém, estudos vêm incorporando a biomassa microalgal em produtos como *shakes* (SANTOS et al., 2016) e *snacks* (LUCAS et al., 2018). No entanto, a adição de biomassa de *Spirulina* é limitada em alimentos devido ao impacto indesejável na qualidade sensorial. A biomassa normalmente confere cor, sabor e aroma indesejáveis. A biodisponibilidade dos compostos bioativos também podem ser comprometidos quando a biomassa microalgal é adicionada na forma livre. Tais parâmetros precisam ser superados para a incorporação bem-sucedida de biomassa de *Spirulina* em matrizes alimentares (LAFARGA, 2019).

As nanopartículas como sistemas para entrega de compostos vem sendo alternativa para o aumento da biodisponibilidade e encapsulamento dos compostos bioativos com potencial aplicação na indústria de alimentos (PATHAKOTI et al., 2017). Dessa forma, há redução dos atributos sensoriais indesejáveis, possibilitando assim o aumento da adição de compostos bioativos na matriz alimentar, além de proteção contra degradação e prevenção contra interações adversas. A aplicação de nanopartículas em processos alimentícios também vem ganhando destaque devido ao fato de que, em escala nanométrica, as forças de atrito e gravitacionais são reduzidas. Essa característica pode eliminar problemas relacionados a decantação, proporcionando melhor aparência do produto alimentício. As nanoesferas compreendem uma classe de nanopartículas no qual o composto bioativo pode ser adsorvido no interior da matriz polimérica (ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2018). Nanoesferas podem ser produzidas pela técnica *electrospraying* a partir de fonte de alimentação de alta tensão, bomba de deslocamento positivo e coletor aterrado. O princípio da técnica baseia-se na aplicação de potencial elétrico entre o capilar contendo a solução polimérica e o coletor. Quando a força do campo elétrico supera a tensão superficial da solução polimérica na ponta do capilar, há o desenvolvimento do jato polimérico na forma de cone, conhecido como cone de Taylor. O cone se propaga e se quebra em pequenas gotículas que são depositadas no coletor na forma de nanoesferas (NIU et al., 2020; SMEETS; CLASEN; MOOTER, 2017).

Polímeros naturais ou sintéticos, biodegradáveis e atóxicos podem ser utilizados na nanoencapsulação de compostos bioativos (AMULYA et al., 2021). Quitosana é um polissacarídeo de quitina (poli-N-acetilglucosamina) que abrange grupos amino ativos com propriedades catiônicas e grupos funcionais hidroxilas (KURITA, 2006). Este polímero natural é biocompatível e não causa reações adversas quando entram em contato com o

organismo (LIANG et al., 2017). Estudos com quitosana na área de alimentos foram citados por Raza et al. (2020) para encapsulamento de compostos ativos afim de proporcionar aumento no valor nutricional, bem como proteção dos compostos. Essas características tornam a quitosana alternativa promissora para ser utilizada como material de parede no desenvolvimento de nanoesferas por *electrospraying*.

Assim, o objetivo do estudo foi desenvolver e caracterizar nanoesferas poliméricas com adição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRÉ TRATAMENTO DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18

A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada na Universidade Federal do Rio Grande (FURG), isolada na Lagoa Mangueira (33°30'13"S 53°08'59"W) (MORAIS et al., 2009).

A biomassa microalgal foi seca a 50°C por 5 h em secador de bandejas, moída em moinho de bolas (Modelo Q298, Quimis, Brasil) e peneirada em agitador de peneira granulométrica (Bertel, Brasil) de 400 mesh. Para reduzir e uniformizar o tamanho das partículas, a biomassa foi macerada com nitrogênio líquido. Essa etapa permitiu adicionar maior quantidade de biomassa microalgal às nanoesferas, além disso, evitou problemas de entupimento do capilar durante o processo.

2.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESFERAS

2.2.1 Preparo da solução polimérica por *electrospraying*

Soluções contendo o polímero quitosana de alta massa molecular (AMM) (60-120,000 g mol^{-1}) e de baixa massa molecular (BMM) (50-190,000 kDa) fornecidas pela Sigma-Aldrich®, USA nas concentrações de 1%, 2% e 3% (p v^{-1}), foram preparadas com solução de ácido acético a 90% (p p^{-1}) como solvente orgânico.

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi adicionada nas concentrações de 1% e 5% (p v^{-1}) na solução polimérica. Em seguida, as soluções foram homogeneizadas a 10 rpm em agitador magnético (Fisatom, Brasil) por 16 h.

2.2.2 Desenvolvimento de nanoesferas

O equipamento utilizado foi o *electrospraying* composto por bomba de deslocamento positivo (KDS 100, KD Scientific, Estados Unidos) e fonte de alimentação com corrente contínua de alto potencial elétrico (ET 5000 CC, Eletric Test Serta, Brasil). As soluções poliméricas foram injetadas com taxa de alimentação de 400 µL h^{-1} e 600 µL h^{-1}. Os parâmetros do processo fixos foram o diâmetro do capilar de 0,45 mm, o potencial elétrico de 23 kV e a distância entre capilar e coletor 150 mm. Todos os ensaios foram conduzidos à 20 °C e umidade relativa de 50±5%.

2.2.3 Viscosidade das soluções poliméricas

A viscosidade das soluções poliméricas (0,5 mL de amostra) foi determinada por reômetro (Brookfield DV-III, Ultra Programmable Rheometer, Estados Unidos).

2.2.4 Morfologia e tamanho das nanoesferas

A forma e tamanho das nanoesferas com e sem adição de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram analisadas utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol, JSM-6610 LV, Japão). Antes da análise, as amostras foram fixadas em suporte metálico contendo fita de carbono e recobertas com ouro utilizando metalizador *diiode sputtering* (ASTM E986-04, 2010). O diâmetro médio foi obtido a partir das imagens de MEV, por meio da medida direta dos diâmetros em 60 diferentes pontos e realizada no *software* ImageJ (1.50i, Estados Unidos).

A avaliação morfológica das nanoesferas com e sem adição de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 também foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (JEOL JEM 1400 120 KV) utilizando o método de contraste negativo. Para a análise, a amostra foi dissolvida em 20 µL de água destilada, transferida para um gride de 200 mesh e logo após foram adicionados 5 µL de solução de ácido fosfotúngstico a 1%.

2.2.5 Potencial zeta

A carga superficial das nanoesferas com e sem adição de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foram determinadas usando o medidor de potencial zeta em equipamento

Zetasizer (Nano-ZS90, Zetasizer, Inglaterra).

2.2.6 Análises térmicas

As propriedades de degradação térmica e solvente residual nas nanoesferas poliméricas com e sem adição de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 serão avaliadas por análise termogravimétrica (TGA) (DTG 60, Shimadzu, Japão). Essa análise foi realizada com 3 mg de cada amostra na faixa de temperatura de 0 °C a 500 °C sob atmosfera de nitrogênio (30 mL min^{-1}) com taxa de aquecimento constante de 10 °C min^{-1}.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

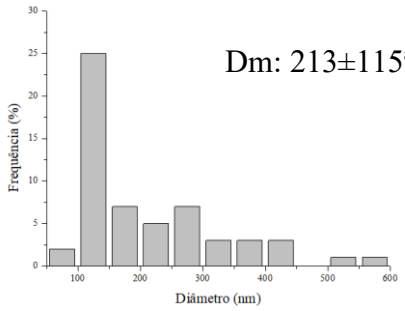
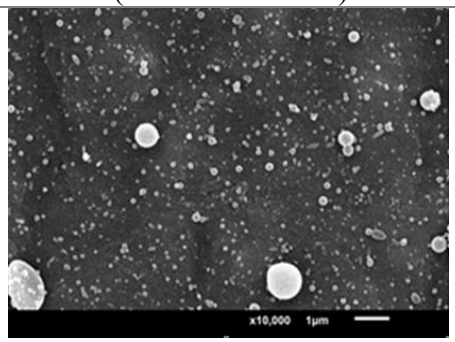
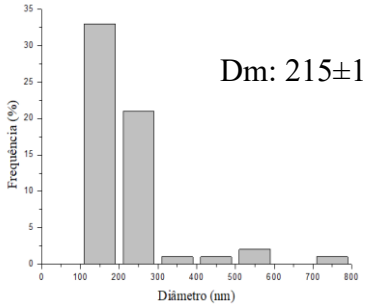
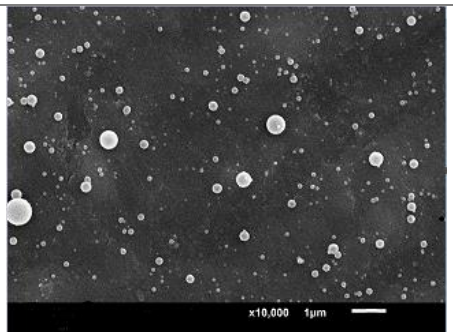
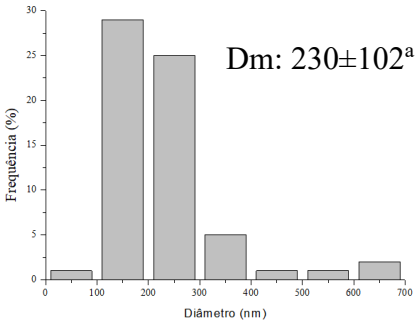
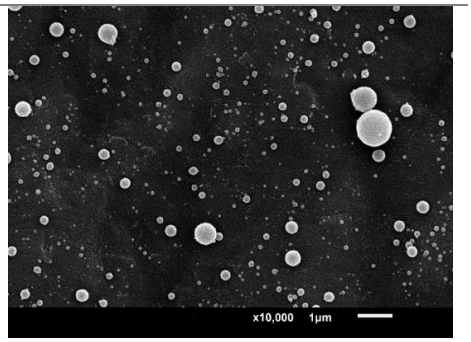
Os resultados dos tamanhos dos diâmetros das nanoesferas e potencial zeta foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 95% de confiança.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE NANOESFERAS

Testes preliminares foram realizados para definir as condições ideais para obtenção de nanoesferas uniformes com quitosana. Ao utilizar quitosana de alta massa molecular (AMM) com taxa de alimentação de 400 µL h^{-1}, diâmetro do capilar de 0,45 mm, distância do capilar ao coletor de 150 mm e potencial elétrico de 23 kV não foram produzidas nanoesferas. Para a técnica de *electrospraying*, recomenda-se que baixos valores de taxa de alimentação sejam aplicados (THAKKAR; MISRA, 2020; SURIB; PAAD, 2020). No entanto, a redução da taxa de alimentação pode ocasionar na formação de nanomateriais com morfologia heterogênea, conforme observado por Ibili e Dasdemir (2019). Ao desenvolver nanopartículas de poli ácido lático por *electrospraying*, os autores concluíram que a redução da taxa de alimentação reduziu o diâmetro das nanopartículas, porém aumentou sua heterogeneidade, além de induzir a formação de fibras. Optou-se então por alterar a taxa de alimentação para 600 µL h^{-1} e fixar os demais parâmetros. Com esses parâmetros foi possível produzir nanoesferas (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição de tamanho e diâmetro médio (Dm) das nanoesferas com diferentes concentrações de quitosana AMM

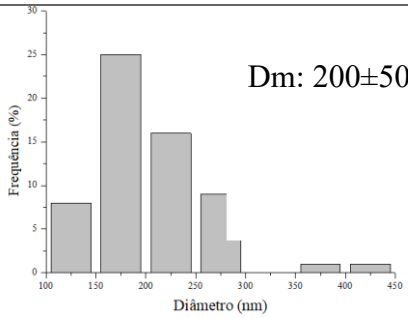
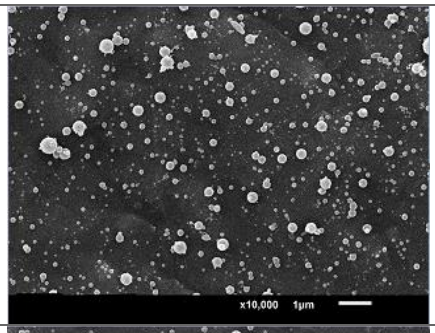
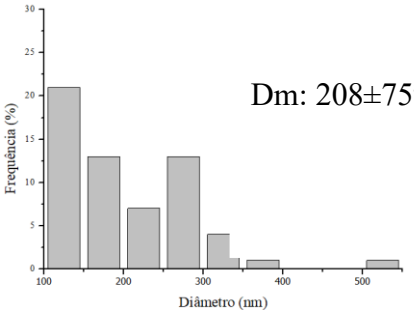
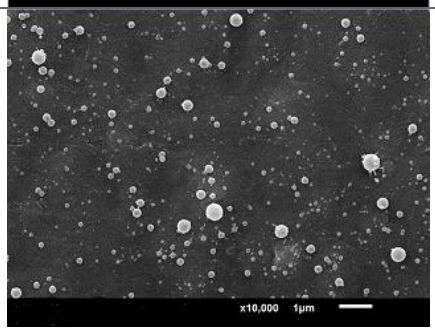
Concentração de polímero	Distribuição de tamanho	Nanoesferas (aumento 10000x)
1%		
2%		
3%		

Letras minúsculas idênticas indicam que não há diferença significativa ($p<0,05$) entre os diâmetros das nanoesferas.

Os parâmetros do processo de *electrospraying* foram fixados para a realização dos testes com quitosana de baixa massa molecular (BMM) (Tabela 2). A solução polimérica com quitosana de BMM na concentração de 3% (p v^{-1}) apresentou elevada viscosidade causando o entupimento do capilar durante o processo, portanto, não foi submetida a análise. A viscosidade tem relação direta com a concentração da solução polimérica, sendo que soluções com maior concentração de polímero são mais concentradas e viscosas. Quando a concentração da solução de polímero aumentou de 1% para 2% (p v^{-1}), as soluções apresentaram aumento da viscosidade de 0,28 para 0,65 Pa s, resultando na instabilidade do jato e na presença de gotas na solução contendo 2% de polímero quitosana. O mesmo efeito

foi relatado por Kuntzler et al. (2018) ao desenvolverem nanofibras poliméricas contendo 2% e 3% de polímero quitosana. O aumento da concentração de quitosana na solução, ocasionou no aumento da viscosidade de 1,7 para 2,6 Pa s.

Tabela 2 - Distribuição de tamanho e diâmetro médio (Dm) das nanoesferas com diferentes concentrações de quitosana de BMM

Concentração de polímero	Distribuição de tamanho	Nanoesferas (aumento 10000x)
1%		
2%		

Letras minúsculas idênticas indicam que não há diferença significativa ($p<0,05$) entre os diâmetros das nanoesferas.

Os resultados mostram que, a partir das soluções de quitosana de BMM o aumento da concentração de polímero nas concentrações de 1% para 2% (p v^{-1}) não alterou o diâmetro das nanoesferas ($p<0,05$) e promoveram materiais em nanoescala com formato esférico. Os resultados corroboram com os obtidos por Ibili e Dasdemir (2019). Estes autores desenvolveram nanopartículas de poli ácido lático por *electrospraying* e constataram que não houve diferença significativa no diâmetro dos nanomateriais ao aumentar a concentração de polímero da solução de 0,25 para 0,5 % (p v^{-1}).

No presente estudo, as nanoesferas de quitosana de maior massa molecular apresentaram menor homogeneidade dos materiais e presença de gotas. Gómez-Mascaraque et al. (2016) estudaram o impacto dos diferentes pesos moleculares da quitosana, variando de 25 a 300 KDa, por *electrospraying*. A quitosana de menor massa molecular testada (25 KDa) foi selecionada para produzir estruturas de encapsulamento carregadas de galato de

epigalocatequina (EGCG). Um outro estudo de Shenoy et al. (2005) relatou que a medida que a massa molecular do polímero aumenta, proporcionam maior frequência de emaranhados de cadeia. Segundo os autores, a formação de emaranhados tem sido reconhecida como o principal fator determinante das diferentes morfologias obtidas.

Portanto, com base nos resultados obtidos, nanoesferas de quitosana de BMM na concentração de 1% (p v^{-1}), foram selecionadas para o nanoencapsulamento da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por *electrospraying*.

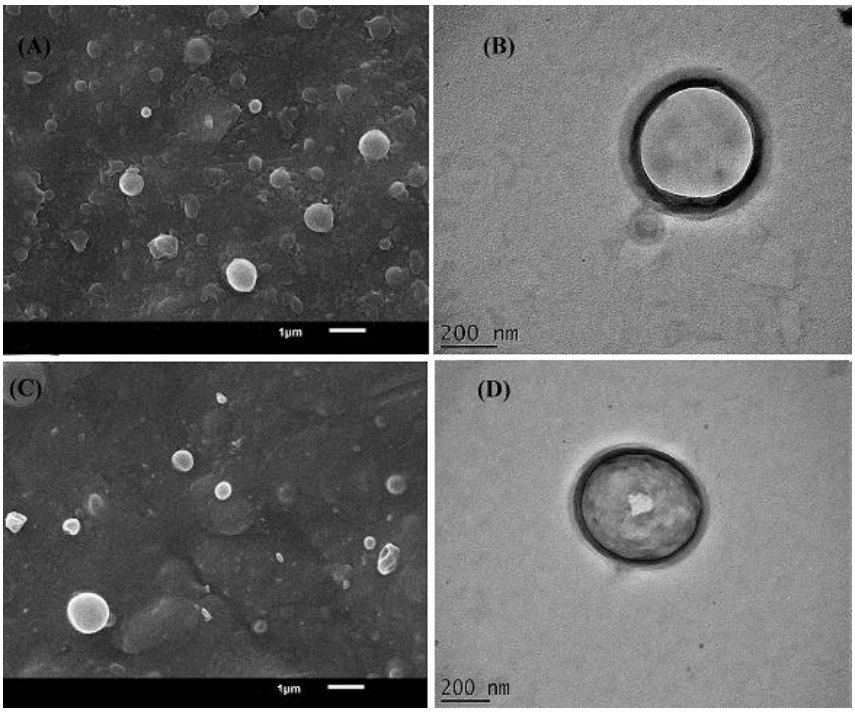
4.2 INCORPORAÇÃO DA BIOMASSA MIGROALGAL NAS NANOESFERAS

Após a determinação das condições para a produção de nanoesferas, foram produzidas nanoesferas contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. A partir das imagens de MEV observou-se que as nanoesferas de quitosana contendo biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nas concentrações de 1% e 5% (p v^{-1}) são regularmente distribuídas e apresentam diâmetro médio de 380±122 nm e 835±353 nm, respectivamente (Figura 1A e 1C).

Oliveira et al. (2021) microencapsularam a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 pelo método *spray dryer*. A biomassa microalgal na concentração de 5% (p v^{-1}) foi microencapsulada utilizando maltodextrina e lecitina de soja. Os autores encontraram tamanho da partícula de 680±231 μm. Partículas menores, com tamanho de diâmetro em nanoescala, são preferíveis uma vez que podem interagir mais facilmente com o composto de interesse durante a aplicação (REINECCIUS, 2004).

Através da análise de MET observou-se que as nanoesferas de quitosana com 1% e 5% (p v^{-1}) de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentaram formato esférico. Além disso, demonstraram que a biomassa microalgal foi adsorvida às nanoesferas (Figura 1B e 1D). Valencia et al. (2021) desenvolveram nanopartículas de lecitina e quitosana contendo curcumina pelo método de injeção direta. As nanopartículas foram avaliadas por MET e apresentaram formato esférico semelhante aos nanomateriais desse estudo.

Figura 1 - Imagens obtidas por MEV e MET das nanoesferas contendo 1% de quitosana e biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nas concentrações de 1% (A, B) e 5% (C, D)



4.3 POTENCIAL ZETA

Os resultados da análise de potencial zeta são fornecidos na Tabela 3. O potencial zeta indica a estabilidade de supensão coloidal das nanoesferas. Valores próximos ao valor absoluto 30 mV (±30 mV) proporciona sistemas estáveis e previnem a agregação das partículas (MÜLLER et al., 2001; ELZOGHBY et al., 2013). Neste estudo, o potencial zeta das nanoesferas com e sem biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nas concentrações de 1% e 5% variou entre 5,6900 a -19,5000 mV com diferença significativa ($p<0,05$). Dessa maneira, nanoesferas de quitosana apresentaram menor estabilidade coloidal quando comparada às nanoesferas de quitosana com biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, em ambas as concentrações. O valor positivo de potencial zeta pode estar associado à protonação de grupos amino da quitosana ($-NH^{+3}$) sendo mais susceptíveis a apresentar agregação (SONVICO et al., 2006; SOUZA et al., 2014). No entanto, quando a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi adicionada, induziu a mudança nas cargas superficiais. Estes resultados estão de acordo com o relatado por Oliveira et al. (2021) que encontraram valores semelhantes ao deste estudo. Os autores microencapsularam a biomassa da microlga *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando maltodextrina como revestimento polimérico e obtiveram valor de potencial zeta carregado negativamente (-

35,50 mV).

Tabela 3 - Valores de potencial zeta para nanoesferas com e sem biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

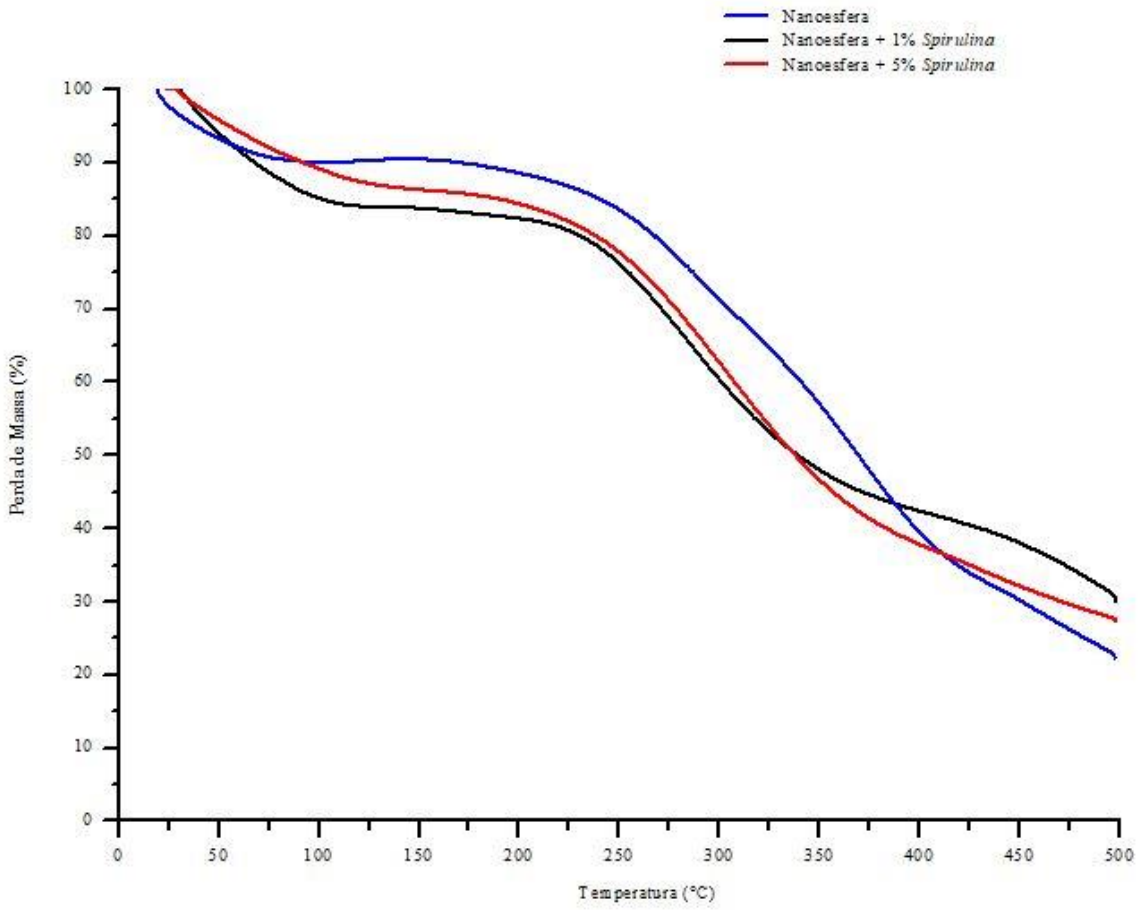
Nanoesferas	**Potencial zeta (mV) ± SD**
Nanoesferas de quitosana	5.6900[a] ± 1,41
Nanoesferas com 1% de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18	-17.9667[b] ± 1,51
Nanoesferas com 5% de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18	-19.5000[b] ± 0,65

4.4 ANÁLISE TÉRMICA

As curvas TGA das amostras de nanoesferas com e sem adição de biomassa de *Spirulina* estão apresentadas na Figura 2. O primeiro pico endotérmico ocorreu próximo a 100 °C para ambas as amostras, que podem ser atribuídas à evaporação da água. A primeira etapa de degradação de nanoesferas de quitosana ocorreu na faixa de temperatura de 300 °C a 390 °C. A segunda etapa de degradação ocorreu de 390 °C a 404 °C. A primeira reação observada pode estar relacionada à oxidação térmica dos grupos amina e hidroxila. A segunda reação pode estar associada à decomposição da estrutura do hidrocarboneto remanescente. Gerhardt et al. (2020) desenvolveram filmes de quitosana e realizaram a análise de TGA até 500 °C. Os autores observaram que os filmes de quitosana foram estáveis até 185 °C.

Comparando os termogramas das nanoesferas de quitosana contendo 1% de biomassa de *Spirulina* e 5% de biomassa de *Spirulina*, as nanoesferas apresentaram características semelhantes. O primeiro estágio de degradação ocorreu em faixas de temperatura muito próximas de 331 °C até 342 °C, devido a decomposição dos grupos funcionais que compõem o material orgânico. E a segunda etapa de degradação ocorreu acima de 388 °C devido à carbonização. Silva et al. (2019) produziram microcápsulas de maltodextrina contendo *Spirulina*. Os autores relataram que as taxas de degradação ocorreram na faixa de temperatura de 242 °C até 304 °C.

Figura 2 - Análise TGA das nanoesferas com e sem adição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18



Outra característica importante observada pela análise de TGA é a evaporação total do solvente das soluções poliméricas. Nos termogramas não foram observados resíduos de solventes nas temperaturas de evaporação do ácido acético (118 °C). Assim, concluímos que o solvente foi completamente eliminado durante a produção das nanoesferas por *electrospraying.* Este resultado confirma que os parâmetros fixados na técnica de *electrospraying* promoveram o desenvolvimento de nanomateriais promissores para aplicação em alimentos.

5. CONCLUSÃO

A técnica *electrospraying* foi utilizada para nanoencapsular biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando polímero quitosana de BMM na concentração de 1% (p v^{-1}), potencial elétrico de 23 kV, taxa de alimentação de 600 µL h^{-1} e distância entre capilar e coletor de 150

mm. Após a definição dos melhores parâmetros para o desenvolvimento de nanoesferas, a biomassa microalgal foi adicionada nas concentrações 1% e 5% (p v^{-1}) e avaliadas físico-quimicamente. A análise de MEV demonstrou que as nanoesferas apresentaram diâmetro em nanoescala de 380±122 nm e 835±353 nm, respectivamente. Por meio da análise de MET foi possível verificar o formato esférico definido e o composto adsorvido na matriz polimérica. Além disso, as nanoesferas se mantiveram estáveis até a temperatura de 331 °C e não foi observada a presença de solvente residual. Portanto, nanoesfera de quitosana com biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 pode potencialmente ser incorporada em alimentos para melhoria da qualidade, valor nutricional e biodisponibilidade dos compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMULYA, K.; KATAKOJWALA, R.; RAMAKRISHNA, S.; MOHAN, S. V. Low carbon biodegradable polymer matrices for sustainable future. **Composites Part C**: open access, v. 4, p. 100111, 2021.

BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; FRADINHO, P.; GOUVEIA, L.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; FRANCO, J. M. Novel foods with microalgal ingredients – Effect of gel setting conditions on the linear viscoelasticity of Spirulina and Haematococcus gels. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 182–189, 2012.

BOHÓRQUEZ-MEDINA, S. L.; BOHÓRQUEZ-MEDINA, A. L.; ZAPATA, V. A. B.; IGNACIO-CCONCHOY, F. L.; TORO-HUAMANCHUMO, C. J.; BENDEZU-QUISPE, G.; PACHECO-MENDOZA, J.; Hernandez, A. V. Impact of spirulina supplementation on obesity-related metabolic disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **NFS Journal**, v. 25, p. 21-30, 2021.

BRASIL. Resolução RDC n°269, de 22 de setembro de. (2005). Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. ANVISA—Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1884970047457811857dd53fbc4c6735/RDC_269_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 26 fev. 2021.

CZERWONKA, A.; KAŁAWAJ, K.; SŁAWIŃSKA-BRYCH, A.; LEMIESZEK, M. K.; BARTNIK, M.; WOJTANOWSKI, K. K.; ZDZISINSKA, B.; Rzeski, W. Anticancer effect of the water extract of a commercial Spirulina (Arthrospira platensis) product on the human lung cancer A549 cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 292-302, 2018.

EL-TANTAWY, W. H. Antioxidant effects of Spirulina supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 327-331, 2016.

ELZOGHBY, A. O.; HELMY, M. W.; SAMY, W. M.; Elgindy, N. A. Spray-dried casein-based micelles as a vehicle for solubilization and controlled delivery of flutamide: Formulation, characterization, and in vivo pharmacokinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 487-496, 2013.

GERHARDT, R.; FARIAS, B. S.; MOURA, J. M.; ALMEIDA, L. S.; SILVA, A. R.; DIAS, D.; JÚNIOR, T. R. S. C.; PINTO, L. A. Development of chitosan/Spirulina sp. blend films as biosorbents for Cr6+ and Pb2+ removal. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 142-152, 2020.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; SANCHEZ, G.; LÓPEZ-RUBIO, A. Impact of molecular weight on the formation of electrosprayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 121-130, 2016.

HU, S.; FAN, X.; QI, P.; ZHANG, X. Identification of anti-diabetes peptides from Spirulina platensis. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 333-341, 2019.

IBILI, H.; DASDEMIR, M. Investigation of electrohydrodynamic atomization (electrospraying) parameters' effect on formation of poly (lactic acid) nanoparticles. **Journal of Materials Science**, v. 54, n. 23, p. 14609–14623, 2019.

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **International journal of biological macromolecules** v. 117, p. 800-806, 2018.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.

LAFARGA, T. Effect of microalgal biomass incorporation into foods : Nutritional and sensorial attributes of the end products. **Algal Research**, v. 41, p. 101566, 2019.

LIANG, J.; YAN, H.; WANG, X.; ZHOU, Y.; GAO, X.; PULIGUNDLA, P.; WAN, X Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. Food Chemistry, v. 231, p. 19–24, 2017.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Spirulina for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **Food Science and Technology**, v. 90, p. 270-276, 2018.

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.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. Advanced drug delivery reviews, v. 47, n.1, p. 3-19, 2001.

NIU, B.; SHAO, P.; LUO, Y.; SUN, P. Recent advances of electrosprayed particles as encapsulation systems of bioactives for food application. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105376, 2020.

OLIVEIRA, T. T. B.; REIS, I. M.; SOUZA, M. B.; BISPO, E. S.; MACIEL, L. F.; DRUZIAN, J. I., TAVARES, P.P. L. G.; CERQUEIRA, A. O.; MORTE, E. S. B.; GLÓRIA, M. B. A.; DEUS, V. L.; SANTANA, R. L. L. Microencapsulation of Spirulina sp. LEB-18 and its incorporation in chocolate milk: Properties and functional potential. **Food Science and Technology**, v. 148, p. 111674, 2021.

PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. M. Current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Analysis,** v. 25, n. 2, p. 245-253, 2017.

RAZA, Z. A.; KHALIL, S.; AYUB, A.; BANAT, I. M. Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. **Carbohydrate Research**, v. 492, p. 108004, 2020.

REINECCIUS, G. A. The spray drying of food flavors. **Drying Technology**, v. 22, n.6, p. 1289–1324, 2004.

SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered foodwith the addition of Spirulina for food supplementation of the elderly population. Innovative **Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216-220, 2016.

SHENOY, S. L.; BATES, W. D.; FRISCH, H. L.; WNEK, G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit. **Polymer**, v. 46, n. 10, p. 3372-3384, 2005.

SILVA, S. C.; FERNANDES, I. P., BARROS, L., FERNANDES, Â., ALVES, M. J., CALHELHA, R. C., PEREIRA, C.; BARREIRA, J. C. M.; MANRIQUE, Y.; COLLA, E.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Spray-dried Spirulina platensis as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. **Journal of Functional Foods**, v. 60, p. 103427, 2019.

SMEETS, A.; CLASEN, C.; MOOTER, G. V. D. Electrospraying of polymer solutions: Study of formulation and process parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 114-124, 2017.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S., DI BARI, M. T.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M. J.; DERIU, A.; Colombo, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International journal of pharmaceutics,** v. 324, n. 1, p. 67-73, 2006.

SOUZA, M. P.; VAZ, A. F.; CORREIA, M. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Quercetin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles for functional food applications. **Food and bioprocess technology**, v.7, n. 4, p. 1149-1159, 2014.

SURIB, N. A.; PAAD, K. M. Electrospray flow rate influenced the sized of functionalized soot nanoparticles. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 15, p. e2417, 2020.

THAKKAR, S.; MISRA, M. Electrospray drying of docetaxel nanosuspension: A study on particle formation and evaluation of nanocrystals thereof. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, p. 102009, 2020.

VALENCIA, M. S.; SILVA, J.; M. F., XAVIER-JÚNIOR, F. H.; VERAS, B. O.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; BORBA, E. F. O.; SILVA, T. G.; XAVIER, V. L.; SOUZA, M. P.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Characterization of curcumin-loaded lecithin-chitosan bioactive nanoparticles. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100119, 2021.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; GONZÁLEZ-REZA, R.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; MIRANDA-LINARES, V.; BERNAL-COUOH, T. F.; MENDOZA-ELVIRA, S.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Nanosystems in Edible Coatings : A Novel Strategy for Food Preservation. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 705, 2018.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

Nanoesferas poliméricas foram desenvolvidas por meio da técnica de *electrospraying*, utilizando polímero quitosana de baixa massa molecular (BMM) na concentração de 1% (p v^{-1}), potencial elétrico de 23 kV, taxa de alimentação de 600 µL h^{-1}, distância entre o capilar e coletor de 150 mm e diâmetro do capilar de 0,45 mm. As nanoesferas de quitosana BMM apresentaram formato esférico e diâmetro em nanoescala (200±50 nm), sendo as selecionadas para o nanoencapsulamento da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. A biomassa microalgal foi adicionada às nanoesferas de quitosana nas concentrações de 1% e 5% (p v^{-1}) e apresentaram diâmetro de 380±122 nm e 835±353 nm, respectivamente. As nanoesferas contendo a biomassa microalgal em ambas as concentrações apresentaram formato esférico definido e os compostos demonstraram estar encapsulados na matriz polimérica. Nanoesferas mostraram-se estáveis até a temperatura de aproximadamente 331 °C. Além disso, não foi verificada a presença de solvente residual, característica importante para incorporação em alimentos. Os resultados mostraram que os nanomateriais desenvolvidos apresentam potencial aplicação como suporte para incorporação de compostos bioativos e adição em alimentos. Nanoesferas desenvolvidas pela técnica de *electrospraying* utilizando quitosana como revestimento polimérico e para o nanoencapsulamento da biomassa microlgal foram produzidas com êxito. Portanto, são necessárias novas pesquisas para responder questões como biodisponibilidade, aceitabilidade sensorial e aumento do enriquecimento nutricional dos compostos bioativos quando incorporados em alimentos.

Por meio do levantamento bibliográfico presume-se que a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 apresenta efeito nutricional e terapêutico comprovado. No entanto, desafios relacionados a incorparação da biomassa microlgal nos produtos alimentícios foram relatados. O nanoencapsulamento da biomassa de *Spirulina* em nanoesferas poliméricas por meio da técnica e*lectrospraying* é alternativa promissora e eficaz para o desenvolvimento de alimentos funcionais. A nanoencapsulação oferece vantagens potenciais na melhoria da solubilidade dos compostos bioativos em alimentos, controlam a liberação no trato gastrointestinal, mascara as propriedades sensoriais indesejáveis, melhora a estabilidade química em alimentos durante as etapas de fabricação, armazenamento e transporte.

CAPÍTULO V

RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Todos os resíduos de substâncias químicas gerados durante o desenvolvimento da pesquisa foram conduzidos de acordo com o manual de gerenciamento de resíduos da unidade acadêmica Escola de Química e Alimentos – EQA, visando a identificação, estocagem e tratamento adequado.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das perspectivas para ampliar o conhecimento científico, sugere-se para novos trabalhos:

- A aplicação de nanoesferas de quitosana com e sem adição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 em produto alimentício;
- A realização das análises físico-químicas, microbiológicas e sensorial no alimento com e sem adição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18;
- Realizar análise de digestibilidade *in vitro*.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. M. R.; FALCÃO, J. S.; TAVARES, P. P. L. G.; CRUZ, L. F. S.; NUNES, I. L.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O. Utilização de Biomassa de *Spirulina Platensis* para desenvolvimento de molho com alto teor proteico: um estudo piloto. **Brazilian Journal of Development.** v. 6, n. 4, p. 21172-21185, 2020.

ANITHA, L.; CHANDRALEKHA, K. Effect of supplementation of *Spirulina* on blood glucose, glycosylated hemoglobin and lipid profile of male non-insulin dependent diabetics. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 36-46, 2010

BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; FRADINHO, P.; GOUVEIA, L.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; FRANCO, J. M. Novel foods with microalgal ingredients – Effect of gel setting conditions on the linear viscoelasticity of Spirulina and Haematococcus gels. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 182–189, 2012.

BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; FRADINHO, P.; FRAGOSO, S.; BURSIC, I.; RODOLF, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and *in vitro* digestibility. **Algal Research**, v. 26, p. 161–171, 2017.

BEHESHTIPOUR, H.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; KHOSRAVI-DARANI, K. Supplementation of *Spirulina platensis* and C*hlorella vulgaris* Algae into Probiotic Fermented Milks. **Comprehensive Reviewsin Food Scienceand Food Safety**, v. 12, p. 144–154, 2013.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, 2010.

BOCK, N.; DARGAVILLE, T. R.; WOODRUFF, M. A. Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. **Progress in Polymer Science,** v. 37, p. 1510–1551, 2012.

CARCEA, M.; SORTO, M.; BATELLO, C.; NARDUCCI, V.; AGUZZI, A.; AZZINI, E.; FANTAUZZI, P.; FINOTTI, E.; GABRIELLI P.; GALLI, V.; GAMBELLI, L.; MAINTHA, K. M.; NAMBA, F.; RUGGERI, S.; TURFANI, V. Nutritional characterization of traditional and improved dih e alimentary blue-green algae from the lake Chad region in Africa. **Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 753–763, 2015.

CZERWONKA, A.; KAŁAWAJ, K.; SŁAWIŃSKA-BRYCH, A.; LEMIESZEK, M. K.; BARTNIK, M.; WOJTANOWSKI, K. K.; ZDZISINSKA, B.; RZESKI, W. Anticancer effect of the water extract of a commercial Spirulina (Arthrospira platensis) product on the human lung cancer A549 cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 292-302, 2018.

CHACÓN-LEE, T. L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “healthy” foods—possibilities and challenges. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9,

n. 6, p. 655-675, 2010.

CHEN, H. M.; YU, D.G. An elevated temperature electrospinning process for preparing acyclovir-loaded PAN ultrafine fibers. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 210, n. 12, 2010.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Microalgae for Food Production. *In*: SOCCOL, C. R; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Fermentation Processes in the Food Industry**. New York: Taylor & Francis Group, p. 405-415, 2013.

CHOPDE, S.; DATIR, R.; DESHMUKH, G.; DHOTRE, A.; PATIL, M. Nanoparticle formation by nanospray drying & its application in nanoencapsulation of food bioactive ingredients. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, n.8, p. 100085, 2020.

EL-TANTAWY, W. H. Antioxidant effects of Spirulina supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 327-331, 2016.

ESMAEILI, F.; AGHAJANI, M.; RASHTI, A.; ABDOLLAHI, M.; FARIDI-MAJIDI, R.; GHANBARI, H. Amani, A. Parameters influencing size of electrosprayed chitosan/HPMC/TPP nanoparticles containing alendronate by an artificial neural networks model. **Journal of Electrostatics**, v. 112, p. 103598, 2021.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628-647, 2013.

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

FREITAS, B. C. B.; SANTOS, T. D.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Novel foods : a meal replacement shake and a high-calorie food supplemented with *Spirulina* biomass. **International Food Research Journal**, v. 26, p. 59–65, 2019.

JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability. **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, v. 81, p. 1-130, 2017.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-937, 2017.

KUANG, L.; BURGESS, B.; CUITE, C. L.; TEPPER, B. J.; HALLMAN, W. K. Sensory acceptability and willingness to buy foods presented as having benefits achieved through the use of nanotechnology. **Food Quality and Preference**, v. 83, p. 103922, 2020.

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; BRIZIO, A. P. D. R.; MORAIS, M. G. Development of a colorimetric pH indicator using nanofibers containing Spirulina sp. LEB 18. **Food Chemistry**, v. 328, p. 126768, 2020.

KURD, F.; SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from Spirulina platensis : Extraction and in vitro anti-cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 498-506, 2015.

LAFARGA, T. Effect of microalgal biomass incorporation into foods : Nutritional and sensorial attributes of the end products. **Algal Research**, v. 41, p. 101566, 2019.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **Food Science and Technology**, v. 90, p. 270-276, 2018.

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. **Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 102-108, 2014.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 323-328, 2006.

MORAIS, M. G. Bioresource Technology Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (Arthrospira). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872–2876, 2010

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

MORAIS, M. G.; ALVARENGA, A. G. P.; SILVA, B. V.; COSTA, J. A. V. Nanoencapsulation of Spirulina biomass by electrospraying for development of functional foods–a review. **Biotechnology Research and Innovation Journal**, v. 5, n. 2, p. 1-6, 2021.

NIU, B.; SHAO, P.; LUO, Y.; SUN, P. Recent advances of electrosprayed particles as encapsulation systems of bioactives for food application. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105376, 2020.

NGUYEN, D. N.; CLASEN, C.; VAN DEN MOOTER, G. Pharmaceutical Applications of Electrospraying. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2601–2620, 2016.

PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. M. Current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 2, p. 245-253, 2017.

PONCE-CANCHIHUAMÁN, J. C.; PÉREZ-MÉNDEZ, O.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; TORRES-DURÁN, P. V.; JUÁREZ-OROPEZA, M. A. Protective effects of Spirulina maxima on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and

kidney. **Lipids in health and disease**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2010.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

REZAEI, A.; FATHI, M.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 146-162, 2019.

RICHMOND A. **Handbook of microalgal culture**. Oxford; Blackwell, 2008.

SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered foodwith the addition of Spirulina for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216-220, 2016.

SCHMATZ, D. A.; SILVEIRA-MASTRANTONIO, D. J.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. A promising approach for the protection of sensitive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 119, p. 206-215, 2020.

SINGH, T.; SHUKLA, S.; KUMAR, P.; WAHLA, V.; BAJPAI, V. K.; RATHER, I. A. Application of nanotechnology in food Science. **Frontiers in microbiology,** v. 8, n.8, p. 1501, 2017.

SMEETS, A.; CLASEN, C.; MOOTER, G. V. D. Electrospraying of polymer solutions: Study of formulation and process parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 114-124, 2017.

SONGSURANG, K.; PRAPHAIRAKSIT, N.; SIRALEARTMUKUL, K.; MUANGSIN, N. Electrospray fabrication of doxorubicin-chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of doxorubicin. **Archives of pharmacal research**, v. 34, n. 4, p. 583-592, 2011

TEO, W. E.; RAMAKRISHNA, S. A. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. **Nanotechnology**, v. 17, n. 14, 2006.

VALENCIA, M. S.; JÚNIOR, M. F. S.; XAVIER-JÚNIOR, F. H.; VERAS, B. O.; ALBUQUERQUE, P. B. S., BORBA, E. F. O.; SILVA, T. G.; XAVIER, V. L.; SOUZA, M. P.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Characterization of curcumin-loaded lecithin-chitosan bioactive nanoparticles. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100119, 2021

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Innovative nanofiber technology to improve carbon dioxide biofixation in microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 592-598, 2019.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Physical and biological fixation of CO2 with polymeric nanofibers in outdoor cultivations of *Chlorella fusca* LEB 111. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151 p. 1332-1339, 2020.

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

YAO, J.; LIM, L. K.; XIE, J.; HUA, J.; WANG, C. H. Characterization of electrospraying process for polymeric particle fabrication. **Journal of Aerosol Science,** v. 39, n. 11, p. 987-1002, 2008.

YILMAZ, M. T.; YILMAZ, A.; AKMAN, P. K.; BOZKURT, F.; DERTLI, E.; BASAHEL, A.; AL-SASI, B.; TAYLAN, O.; SAGDIC, O. Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 166-178, 2019.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; GONZÁLEZ-REZA, R.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; MIRANDA-LINARES, V.; BERNAL-COUOH, T. F.; MENDOZA-ELVIRA, S.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Nanosystems in Edible Coatings : A Novel Strategy for Food Preservation. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 705, 2018

ZAMANI, M.; PRABHAKARAN, M. P.; RAMAKRISHNA, S. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 2997–3017, 2013.