

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

JUAN CARLOS LETELIER CARVAJAL

**CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA
PROTEÍNA DA MICROALGA SPIRULINA
(*Spirulina maxima*)**

**JOÃO PESSOA / PB
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JUAN CARLOS LETELIER CARVAJAL

**CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA
PROTEINA DA MICROALGA SPIRULINA**
(Spirulina maxima)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Pushkar Singh Bora

JOÃO PESSOA / PB
2009

C331c Carvajal, Juan Carlos Letelier.

Caracterização e modificações químicas da
proteína da microalga spirulina (Spirulina máxima) /
Juan Carlos Letelier Carvajal. – João Pessoa, 2009.
129f. : il.

Orientador: Pushkar Singh Bora

Tese (Doutorado) – UFPB/CT

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Microalga. 3.
Proteínas. 4. Propriedades funcionais. 5.
Modificações químicas.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

JUAN CARLOS LETELIER CARVAJAL

**CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA
PROTEÍNA DA MICROALGA SPIRULINA**
(Spirulina maxima)

Tese aprovada em: 14 de Agosto de 2009

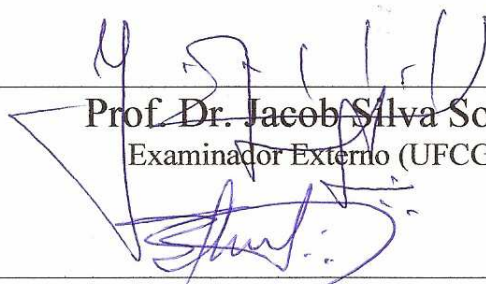
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Pushkar Singh Bora
Orientador

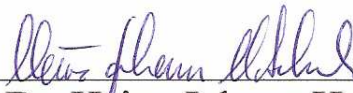


Prof. Dr. Pedro Cerezal Mezquita
Examinador Externo (Universidad de Antofagasta – Chile)

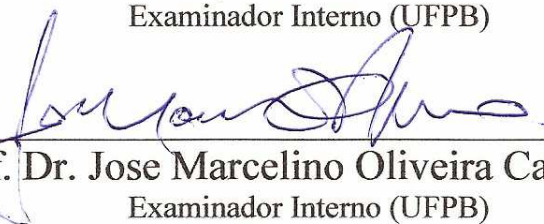


Prof. Dr. Jacob Silva Souto
Examinador Externo (UFCG)

Prof. Dr. Vicente Queiroga Neto
Examinador Interno (UFPB)



Prof. Dr. Heinz Johann Holschuh
Examinador Interno (UFPB)



Prof. Dr. Jose Marcelino Oliveira Cavalheiro
Examinador Interno (UFPB)

OFERECIMENTO

Aos meus pais Carlos Letelier Lobos e Rina Carvajal Mundaca (in memoriam), por me guiarem e servirem de exemplo de vida.

Aos meus filhos Juan Andrés e Francisco Javier pela amizade, apoio, carinho e compreensão.

DEDICATÓRIA

Ao meu Orientador e “amigo” Prof. Dr. Pushkar Singh Bora por ter contribuído de forma significativa na formação deste doutorando, com toda sua experiência e conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guia pelo caminho adequado e que me ajuda a seguir superando obstáculos na vida.

Ao Prof. Dr. Pushkar Singh Bora, pela orientação, compreensão, amizade e por ter me orientado nesta etapa importante da mia vida, compartilhando suas idéias e conhecimentos, possibilitando assim o meu aperfeiçoamento técnico-científico.

Às Universidades Federais da Paraíba de Brasil e Universidad de Antofagasta de Chile pela oportunidade concedida para o meu crescimento profissional.

Aos Professores Doutores Sr. Pedro Cerezal Mezquita (Membro Externo – Universidad de Antofagasta - Chile), Sr. Jacob Silva Souto (Membro Externo – Universidade Federal de Campina Grande), Sr. Vicente Queiroga Neto, Sr. Heinz Johann Holschuh e Sr. Marcelino Oliveira Cavaleiro, pela anuência e boa disposição em participar da Banca examinadora e pelas valiosas sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Dirección de Investigación (DIRINV) de la Universidad de Antofagasta – Chile, pelo apoio e cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Departamento de Alimentos de la Universidad de Antofagasta Chile, pela compreensão e apoio quando do meu período de afastamento, em especial ao Diretor Sr. Pedro Cerezal pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza por ter disponibilizado toda estrutura do Laboratório de Combustíveis e Materiais/CCEN/UFPB necessária às análises térmicas deste trabalho e em especial à técnica Maria Lúcia Braga pelas análises realizadas.

Ao Prof. Dr. Vicente Queiroga Neto pela amizade, constante apoio, sugestões feitas no aperfeiçoamento deste trabalho e por ter viabilizado o analise de eletroforese.

Ao Laboratório de Fontes Protéicas da Universidade Estadual de Campinas- São Paulo em nome do Prof. Jaime Amaya Farfan, pelo apoio e análises de aminoácidos realizadas.

Ao Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, em nome da Professora Dra. Tatiane Santi, pelo fornecimento de hemácias destinadas aos ensaios de hemaglutinação deste trabalho.

Ao meus amigos e colegas Bianco Neto e Sra, Elcke Almeida, Mike, Harley e Edivaldo Vasconcelos pela convivência alegre, amizade e apoio que me entregaram desde o início e durante este doutorado.

Ao meu amigo e colega de trabalho Sergio Márquez, pelo apoio, amizade e compartilhar momentos bons e não tão bom no laboratório.

Aos meus amigos e colegas doutorandos João Paulo Prado e sua Senhora esposa Vanessa, Robson pela amizade, carinho, apoio e aporte acadêmico deste trabalho.

A meus colegas de Pós Graduação Olivaldo, Margarete, Fátima, André, Mônica Tejo, e June, pelo apoio e amizade.

A minha amiga e colega Ana Paula, por toda a sua disponibilidade e apoio no desenvolvimento deste estudo.

Ao Secretario do Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Humberto Bandeira pelo seu apoio e atenção na secretaria do Programa de Pós-Graduação.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório Gilvandro, por estar sempre disposto nos momentos adequados.

Aos todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, que contribuíram na formação deste doutorando.

Enfim, a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho.

LETELIER CARVAJAL, J. C. **Caracterização e Modificações Químicas da Proteína da microalga spirulina (*Spirulina máxima*)**.

RESUMO

A *Spirulina maxima* é uma microalga unicelular, que tem forma de filamento helicoidal e que se desenvolve em águas fortemente alcalinas; pertence ao grupo de cianobactérias, cianofíceas ou algas verde-azulada e têm sido utilizados desde tempos muito antigos. A microalga apresentou um crescimento de biomassa durante o verão de 1,07 g/L e um 23,63% de rendimento. Apresenta um elevado teor de proteínas (54,93%) e baixo conteúdo de lipídeos (6,84%) e cinzas (13,05 %). Este conteúdo de proteínas elevou-se na farinha desengordurada para 61,14%. Fracionando-se as proteínas obteve-se rendimentos majoritários de albuminas (36,61%), glutelina básica (31,29%) e globulina (21,03%), e minoritário de prolaminas (3,95%) e glutelina ácida (0,29%). Na obtenção do isolado protéico, o índice em proteína total extraída nas três extrações foi 54,36%, o índice de precipitação isoelétrica no extrato de pH 10,0 foi 46,81% e o índice de proteína total no isolado protéico foi de 95,44% em pH 10,0. A análise do peso molecular das proteínas da farinha em PAGE-SDS- β Me revelou de 8 a 13 bandas. As subunidades de 16,21 e 15,74 kDa apareceram proeminentes na amostra. A termoestabilidade (T_d , °C) e a variação entálpica (ΔH , Kcal por g), examinadas por DSC, respectivas a farinha desengordurada e isolado protéico foram de 104,58°C e 102,47°C, 0,65 Kcal.g⁻¹ e 0,59 Kcal.g⁻¹, respectivamente. A caracterização nutricional da proteína da *Spirulina máxima*, demonstrou um conteúdo de taninos de 17,5 mg.g⁻¹ e ausência dos inibidores de lectina e tripsina. A composição de aminoácidos revelou a presença de todos os aminoácidos essenciais em quantidades superiores ao padrão FAO/WHO/UNU, com predominância da leucina (3,96g por 100g proteína), fenilalanina (2,92 g por 100g proteínas) e valina (2,71 g por 100 g proteínas). Os resultados das modificações químicas revelaram que a acetilação se mostrou mais efetiva que a succinilação nos diferentes graus de modificação (1; 2,5; 5; 10 e 15 %). A solubilidade do isolado não modificado indicou um ponto isoelétrico (mínima solubilidade) em pH 5,0, para os isolados modificados o ponto isoelétrico se observou no pH 4,0. A solubilidade aumentou com a modificação química, detectando-se um maior aumento na succinilação. A capacidade de absorção de água foi influenciada positivamente com a modificação química, observando-se um maior aumento na acetilação em relação a succinilação. Da mesma forma a capacidade de absorção de óleo aumentou com a modificação, observando-se um maior aumento da capacidade na acetilação. A capacidade de emulsão aumentou com a modificação química em todos os graus de modificação, detectando-se um leve aumento na succinilação. A atividade de emulsão foi aumentada com a modificação química, observando-se um leve aumento na succinilação. A estabilidade da emulsão aumentou com a modificação química, detectando-se um maior aumento na succinilação. A viscosidade relativa dos isolados protéicos modificados aumentou com a concentração da solução de proteína, com a temperatura ambiente e com o aquecimento (90°C), na medida que aumenta o grau de modificação, também aumenta a viscosidade. A capacidade de espumação aumentou com a modificação química, observando-se um maior índice na succinilação, na estabilidade de espumação percebe-se que o decréscimo na estabilidade foi menos acentuado na acetilação do que na succinilação, em todos os tempos analisados e todos os graus de modificação testados. A proteína da *Spirulina máxima* apresentou uma característica química e nutricional satisfatória em relação a exigências mínimas estabelecidas pelos organismos internacionais.

Palavras Chave: microalga, proteínas, propriedades funcionais, modificações químicas.

LETELIER CARVAJAL, J. C. **Characterization and Chemical Modifications of the Protein of the microalga Spirulina (*Spirulina maxima*)**

ABSTRACT

Maximum Spirulina is an unicellular microalga, that she has form of helical filament and that she grows in waters strongly alkaline; she belongs to the cianobacterial group, cianofíceas or algae green-blued and they have been used since times many old. The microalgae presented a biomass growth in summer of 1,07 g/L and a 23,63% of rental. Present a high contend of proteins (54.93%) and low oils content (6,84%) and ashes (13,05%), this content of proteins rises in the flour degreased for 61,14%. being Fractioned the proteins was obtained majority incomes of albumins (36,61%), basic glutelina (31,29%) and globulin (21,03%), and minority of prolaminas (3,95%) and acid glutelina (0,29%). In the obtaining of the isolated proteic, the index in extracted total protein in the three extractions was 54,36%, the index of precipitation isoelectric in the extract of pH 10,0 was 46,81% and the index of total protein in the isolated proteic was of 95,44% in pH 10,0. the analysis of the molecular weight of the proteins of the flour in PAGE-SDS - she revealed from 8 to 13 bands. The subunidades of 16,21 and 15,74 kDa appeared prominent in the sample. The term-stability (Td, °C) and the variation entálpica (H, KCal/g), examined by DSC, respective the degreased flour and isolated proteic were of 104,58°C and 102,47°C and 0,65 Kcal.g-1 and 0,59 Kcal.g-1, respectively. The nutritional characterization of the protein of maximum Spirulina, they demonstrated a content of tannins of 17,5 mg.g-1 and absence of the lectina inhibitors and tripsina. The composition of amino acids revealed her witnesses of all of the essential amino acids in superior amounts to the pattern FAO/WHO/UNU, with predominance of the leucina (3,96g/100g protein), fenilalanina (2,92 g/100g proteins) and valina (2,71 g/100 g proteins). The results of the chemical modifications revealed that the acetilation was shown more it executes than the succinylation in the different modification degrees (1; 2.5; 5; 10 and 15%). the solubility of the isolated not modified indicated a point isoelectric (low solubility) in pH 5,0, for the isolated ones modified the point isoelectric was observed in the pH 4,0. the solubility increased with the chemical modification, being observed a larger increase in the succinylation. The capacity of absorption of water was influenced positively with the chemical modification, being observed a larger increase in the acetilation in relation to succinylation. In the same way the capacity of oil absorption increases with the modification, being observed a larger increase of the capacity in the acetilation. The emulsion capacity increased with the chemical modification in all of the modification degrees, being observed a light increase in the succinylation. The emulsion activity was increased with the chemical modification, being observed a light increase in the succinylation. The stability of the emulsion increased with the chemical modification, being observed a larger increase in the succinylation. The relative viscosity of the isolated modified proteic increased with the concentration of the protein solution, with to room temperature and with the heating (90°C), in the measure that increases the modification degree, it also increases the viscosity. The floaming capacity increased with the chemical modification, being observed a larger index in the succinylation, in the espumação stability is noticed that the decrease in the stability was less accentuated in the acetilation than in the succinylation, in all of the analyzed times and all of the modification degrees tested. The protein of maximum Spirulina presented a chemical and nutritional characteristic satisfactory in relation to minimum demands established by the international organisms.

Key Words: microalgae, proteins, functional properties, chemical modifications

LISTA DE ABREVIOS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| ΔH | Variação entálpica |
| AAAB | Ácido Alfa Aminobutírico |
| A.E | Atividade de emulsão |
| AA | Aminoácidos |
| AIDS | Síndrome de Imunodeficiência Adquirida |
| ANOVA | Análise de Variância |
| BAU | Bangladesh Agricultural University |
| °C | Grau Celsius |
| Cal | Calorias |
| C.E | Capacidade emulsificante |
| cm | Centímetro |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| Co. Ltd. | Companhia Limitada |
| DSC | Calorimetria Exploratoria Diferencial |
| Da | Daltons |
| DMSO | Dimetil Sulfoxido |
| DTQA | Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos |
| E.E | Estabilidade de emulsão |
| ENN | Extrato não Nitrogenado |
| E.Q | Escore químico de aminoácidos |
| FAO | Food And Agriculture Organization |
| Fd | Farinha Desengordurada |
| FDSp | Farinha desengordurada de Spirulina |
| FDT | Farinha desengordurada tegumentada |
| G | Força gravitacional |
| g | Gramas |
| h | Horas |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Pressão |
| kDa | Quilo Dalton |
| L | Litro |
| LYS | Lisina |

| | |
|--------------------------|---------------------------------------|
| mg | Miligramas |
| mL | Mililitros |
| Min | Minutos |
| mm | Milímetro |
| β Me | Beta Mercaptoetanol |
| Met | Metionina |
| Mp | Marcador Proteico Molecular |
| N | Normalidade |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| Na_2CO_3 | Carbonato de Sódio |
| NaHCO_3 | Bicarbonato de Sódio |
| nm | Nanómetros |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| S.A. | Sociedade Anónima |
| pH | Acidez |
| pI | Ponto isoelétrico |
| PICO-TAG | Sistema de Análise Cromatográfico |
| ppm | Partes por Millão |
| PITC | Fenilisotiocianato |
| PTC-AA | Feniltiocarbonil-Aminoácido |
| Prot. | Proteína |
| PTE | Proteína total extraída |
| PVC | Cloreto de Polivinilo |
| Rpm | Revoluções por minuto |
| SDS | Duodecil sulfato de sódio |
| T | Temperatura |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| <i>T_d</i> | Temperatura de desnaturação |
| Tris | Hidroximetilaminometano |
| UFPB | Universidade Federal da Paraíba |
| UN | United Nations |
| US\$ | Dólares Americanos |
| UV | Ultravioleta |
| W | Watts |

WHO

World Health Organization

%

Procentagem

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Fotografia microscópica da microalga <i>Spirulina</i> | 27 |
| Figura 2 – Gráfico da Composição Química média da microalga <i>Spirulina</i> | 30 |
| Figura 3 – Fotografia de cultivos artificiais abertos da microalga <i>Spirulina</i> | 33 |
| Figura 4 – Reação de derivatização | 43 |
| Figura 5 – Esquema da reação de acetilação e succinilação das proteínas | 57 |
| Figura 6 – Sistema de cultivo microalgal da <i>Spirulina máxima</i> | 59 |
| Figura 7 – Sistemas de cultivos em tanques de produção massiva (raceway) da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 59 |
| Figura 8 – Fluxograma das etapas de obtenção da farinha desengordurada da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 61 |
| Figura 9 – Fluxograma das etapas de preparação do isolado protéico da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 62 |
| Figura 10 – Fluxograma da metodologia de fracionamento do isolado protéico da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 63 |
| Figura 11 – Fluxograma da metodologia na determinação de inibidor de tripsina | 66 |
| Figura 12 – Fluxograma do processo de modificação química por acetilação e succinilação do isolado protéico da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 70 |
| Figura 13 – Diagrama das etapas do análise da capacidade de emulsão dos isolados protéicos modificados da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 73 |
| Figura 14 – Variação da concentração de biomassa (peso seco) da microalga <i>Spirulina máxima</i> durante o verão e inverno | 76 |
| Figura 15 – Imagem da eletroforese em gel de policramida em presença de SDS e 2 β Me, do marcador molecular (Mp) e farinha desengordurada (Fd) da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 83 |
| Figura 16 – Termograma e curva de estabilidade térmica da farinha desengordurada da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 84 |
| Figura 17 – Termograma e curva de estabilidade térmica da farinha desengordurada da Microalga <i>Spirulinamáxima</i> | 85 |

| | |
|---|-----|
| Figura 18 – Percentual de proteínas solúveis dos isolados protéicos não modificado e acetilados da microalga <i>Spirulina máxima</i> , em níveis de pH 2.0; 4.0; 5.0; 6.0; 8.0; 10.0 e 12.0..... | 93 |
| Figura 19 – Percentual de proteínas solúveis dos isolados protéicos não modificado e succinilados da microalga <i>Spirulina máxima</i> , em níveis de pH 2.0; 4.0; 5.0; 6.0; 8.0; 10.0 e 12.0 | 94 |
| Figura 20 – Capacidade de emulsão do isolado protéico não modificado e acetilado da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 102 |
| Figura 21 – Capacidade de emulsão do isolado protéico não modificado e succinilado da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 103 |
| Figura 22 – Capacidade de espumação dos isolados protéicos não modificados, acetilado e succinilado da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 109 |
| Figura 23 – Estabilidade de espumação dos isolados protéicos não modificados e acetilados da microalga <i>Spirulina máxima</i> , nos intervalos de tempo de 5, 10, 30 e 60 minuto | 111 |
| Figura 24 – Estabilidade de espumação dos isolados protéicos não modificados e succinilados da microalga <i>Spirulina máxima</i> , nos intervalos de tempo de 5, 10, 30 e 60 minutos | 112 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 – Soluções tampões utilizados na determinação de Lectinas | 68 |
| Tabela 2 – Taxa de crescimento e rendimento da biomassa da microalga <i>Spirulina máxima</i> , mantido no reator massivo de alta velocidade “raceway” | 77 |
| Tabela 3 – Composição centesimal da farinha integral da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 78 |
| Tabela 4 – Teor de proteínas das frações proteicas da microalga <i>Spirulina máxima</i> , de acordo com sua solubilidade | 80 |
| Tabela 5 – Extração e recuperação de proteínas na obtenção do isoldo protéico de 100 g de farinha desengordurada da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 81 |
| Tabela 6 – Parâmetros de avaliação da estabilidade térmica da farinha desengordurada e do isolado proteico da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 86 |
| Tabela 7 – Composição de Aminoácidos essenciais e não essenciais da farinha da microlaga <i>Spirulina máxima</i> e sua comparação com a proteína padrão FAO/WHO/UN..... | 89 |
| Tabela 8 – Escore químico dos aminoácidos da farinha da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 90 |
| Tabela 9 – Grau de modificação do isolado protéico da microalga <i>Spirulina máxima</i> , tratado com anidrido acético e succinico | 91 |
| Tabela 10 – Capacidade de absorção de água dos isolados protéicos não modificados, acetilados e succinilados da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 97 |
| Tabela 11 – Capacidade de absorção de óleo dos isolados protéicos não modificados, acetilados e succinilados da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 100 |
| Tabela 12 – Atividade de emulsão dos isolados não modificado, acetilado e succinilado da microalga <i>Spirulina máxima</i> em função do pH | 104 |
| Tabela 13 – Estabilidade de emulsão dos isolados não modificado, acetilado e succinilado da microalga <i>Spirulina máxima</i> em função do pH | 105 |
| Tabela 14 – Viscosidade relativa dos isolados protéicos não modificado, acetilado e succinilado da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 107 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Composição bioquímica da microalga <i>Spirulina</i> | 31 |
| Quadro 2 – Teor de proteínas de alimentos e sua classificação como fonte de proteínas..... | 37 |
| Quadro 3 – Classificação das propriedades funcionais usadas nos alimentos | 48 |
| Quadro 4 – Reatividade de grupos funcionais em proteínas | 55 |

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 Geral | 23 |
| 2.2 Específicos | 23 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 25 |
| 3.1 Historia e importância das microalgas | 25 |
| 3.2 Classificação e descrição das algas verde-azuladas | 26 |
| 3.3 A Spirulina.... .. | 27 |
| 3.3.1 Composição e características nutritivas da Spirulina | 28 |
| 3.3.1.1 Características nutritivas da Spirulina..... | 28 |
| 3.3.1.2 Composição química da Spirulina..... | 30 |
| 3.3.2 Localização e produção da Spirulina..... | 31 |
| 3.3.2.1 Sistemas de cultivos da Spirulina..... | 32 |
| 3.3.3 As aplicações da Spirulina..... | 34 |
| 3.3.4 Propriedades medicinais da Spirulina. | 35 |
| 3.4 As proteínas | 37 |
| 3.4.1 Classificação das proteínas..... | 38 |
| 3.4.2 Peso molecular das proteínas | 39 |
| 3.4.3 Estabilidade térmica das proteínas | 40 |
| 3.4.4 Propriedades nutricionais das proteínas | 42 |
| 3.4.4.1 Composição de aminoácidos | 42 |
| 3.4.4.1.1 Cromatografia de fase reversa em HPLC com derivatização pré-coluna | 43 |
| 3.4.5 Propriedades antinutricionais | 44 |
| 3.4.5.1 Lectinas | 44 |
| 3.4.5.2 Inibidores de tripsina..... | 45 |
| 3.4.5.3 Taninos | 45 |
| 3.5 Propriedades funcionais | 46 |
| 3.5.1 Solubilidade | 49 |
| 3.5.2 Capacidade de absorção de água | 50 |
| 3.5.3 Capacidade de absorção de óleo..... | 51 |
| 3.5.4 Propriedades emulsificantes | 51 |
| 3.5.5 Propriedades espumantes | 52 |
| 3.6 Modificações químicas..... | 54 |

| | |
|--|----|
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 58 |
| 4.1 Materiais | 58 |
| 4.1.1 Cultivo e produção de biomassa da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 58 |
| 4.2 Métodos | 60 |
| 4.2.1 Processo de secagem da biomassa da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 60 |
| 4.2.2 Obtenção da farinha desengordurada da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 60 |
| 4.2.3 Composição centesimal | 61 |
| 4.2.4 Preparação do isolado protéico..... | 61 |
| 4.2.5 Caracterização da fração protéica da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 63 |
| 4.2.5.1 Fracionamento de proteínas..... | 63 |
| 4.2.5.2 Análise eletroforética | 64 |
| 4.2.5.3 Análise térmicas | 65 |
| 4.2.6 Caracterização nutricional da proteínas da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 65 |
| 4.2.6.1 Propriedades antinutricionais | 65 |
| 4.2.6.1.1 Taninos | 65 |
| 4.2.6.1.2 Inibidor de tripsina | 66 |
| 4.2.6.1.3 Lectina | 67 |
| 4.2.6.2 Composição de aminoácidos | 68 |
| 4.2.7 Modificações químicas da proteína da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 69 |
| 4.2.7.1 Acetilação do isolado protéico da <i>Spirulina máxima</i> | 69 |
| 4.2.7.2 Succinilação do isolado protéico da <i>Spirulina máxima</i> | 70 |
| 4.2.7.3 Grau de modificação | 71 |
| 4.2.8 Propriedades funcionais do isolado não modificado, acetilado e succinilado | 71 |
| 4.2.8.1 Solubilidade..... | 71 |
| 4.2.8.2 Capacidade de absorção de água | 72 |
| 4.2.8.3 Capacidade de absorção de óleo..... | 72 |
| 4.2.8.4 Propriedades emulsificantes | 72 |
| 4.2.8.4.1 Capacidade de emulsão | 72 |
| 4.2.8.4.2 Atividade e estabilidade de emulsão | 73 |
| 4.2.8.5 Viscosidade relativa | 74 |
| 4.2.8.6 Atividade e estabilidade de espumação..... | 74 |
| 4.2.9 Análise estatístico..... | 75 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 76 |
| 5.1 Cultivo e produção da biomassa da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 76 |
| 5.2 Composição centesimal | 78 |
| 5.3 Caracterização da fração protéica da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 79 |
| 5.3.1 Fracionamento de proteínas..... | 79 |
| 5.3.2 Rendimento do isolado protéico..... | 81 |
| 5.3.3 Análise eletroforética | 82 |
| 5.3.4 Análise térmicas | 84 |
| 5.4 Caracterização nutricional das proteínas da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 86 |
| 5.4.1 Propriedades antinutricionais | 86 |
| 5.4.1.1 Taninos | 86 |
| 5.4.1.2 Inibidor de tripsina | 87 |
| 5.4.1.3 Lectina | 87 |
| 5.4.2 Composição em aminoácidos | 88 |
| 5.5. Modificações químicas da proteína da microalga <i>Spirulina máxima</i> | 90 |
| 5.5.1 Grau de modificação | 90 |
| 5.6 Propriedades funcionais do isolado não modificado, acetilado e succinilado | 92 |

| | |
|---|-----|
| 5.6.1 Solubilidade..... | 92 |
| 5.6.2 Capacidade de absorção de água | 96 |
| 5.6.3 Capacidade de absorção de óleo..... | 99 |
| 5.6.4 Propriedades emulsificantes | 101 |
| 5.6.4.1 Capacidade de emulsão | 101 |
| 5.6.4.2 Atividade e estabilidade de emulsão | 104 |
| 5.6.5 Viscosidade relativa | 106 |
| 5.6.6 Capacidade e estabilidade de espumação..... | 109 |
| | |
| 6 CONCLUSÕES..... | 113 |
| | |
| 7 REFERÊNCIAS | 115 |
| | |
| APÊNDICE | 130 |
| | |
| ANEXOS | 136 |

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial provocou uma falta de alimentos adequados para satisfazer às necessidades de alimentação. Esse fato criou a necessidade de se encontrarem novas fontes alimentares, o que ocasionou um impacto na indústria de suplementos nutricionais, que excedeu bilhões de dólares de vendas anuais. Mas o mercado ainda não alcançou seu nível máximo de comercialização. Os pesquisadores dizem que a demanda continuará aumentando. Como exemplo dessa tendência acelerada, está o fato de que três de cada quatro consumidores têm idade acima de 35 anos, e é nesse seguimento demográfico da população, que tem maiores níveis de consumo, que se espera alcançar uma cifra próxima de 150 milhões de pessoas para 2005 em todo o mundo (ADEBOWALE, LAWAL, 2003).

Muitas investigações indicam que a insuficiência proteica na nutrição humana é um dos problemas dos países subdesenvolvidos, por isso, é necessário aumentar e diversificar as fontes de proteínas e desenvolver novas fontes não-convencionais (CHEL-GUERRERO *et al.*, 2002). Nesse sentido, as microalgas se apresentaram como uma alternativa no aporte desses nutrientes.

As proteínas, que podem ser consideradas como uma alternativa no déficit de alimentos, estas são classificadas como macro-nutrientes e, além de representarem um importante papel nutricional nos alimentos, que podem ser apresentados em forma de farinha, como isolados em diversos produtos alimentícios. O estudo da funcionalidade desses concentrados e isolados proteicos é sobremaneira importante para sua efetiva utilização como ingredientes alimentares (KINSELLA, 1976).

As organizações internacionais recomendam que os nutrientes procedam de fontes naturais e que o organismo esteja capacitado para absorvê-los facilmente. É preciso, ainda, assumir que algumas fontes naturais são deficitárias em alguns nutrientes essenciais. Para balancear a dieta, procuram-se suplementos nutricionais, e nisso, a spirulina não tem competidores, principalmente referentes a seu conteúdo integral e origem inteiramente natural.

Pesquisadores relataram que, nos últimos 30 anos, o uso de isolados proteicos em alimentos como ingrediente aumentou consideravelmente, sobretudo, devido à grande quantidade de informação e de conhecimento das propriedades funcionais e do valor nutritivo,

que deveriam contribuir para o melhoramento dos atributos sensoriais e de qualidade dos alimentos (SÁNCHEZ-VIOQUE *et al.*, 1999; RANGEL *et al.*, 2004; HORAX *et al.*, 2004).

Nesse sentido, as algas e microalgas podem ser consideradas como uma fonte interessante no fornecimento de nutrientes na fabricação de alimentos. Muitas das espécies de algas e microalgas vêm sendo empregadas como fonte de alimentos, em produtos farmacológicos, bioquímicos e fertilizantes. Enquanto alimento humano, as algas microscópicas têm sido utilizadas no mundo de forma moderada, como exemplo, a microalga spirulina.

A spirulina é uma microalga unicelular, que tem forma de filamento helicoidal e que se desenvolve em águas fortemente alcalinas; pertence ao grupo de cianobactérias, também denominadas cianófitas ou algas verde-azuladas. Com um comprimento de meio milímetro de comprimento, encontra-se entre os seres mais antigos conhecidos, que além da sua natureza elementar, são capazes de realizar fotossíntese, análoga à que ocorre nas plantas superiores (HABIB *et al.*, 2008).

Essas algas captam a energia luminosa por meio dos complexos proteicos exclusivos das células procarióticas e das algas vermelhas, as quais se ordenam sobre a membrana tilacoidal. Nos ficobilisomas, há um complexo único de pigmentos formado pela ficocianina (azulada) que, junto com a clorofila (a esverdeada), confere às cianobactérias sua coloração verde-azulada característica (STALEY *et al.*, 1987).

A análise bioquímica das células secas da Spirulina demonstrou que, em média, 60% do seu peso são constituídos por proteína. As proteínas presentes na spirulina são, principalmente, ficobiliproteínas, que contêm bons níveis dos aminoácidos essenciais, excetuando-se a cisteína e a metionina (WEBB, CHU, 1982; TOKUSOGLU, UNAL, 2003). Pela sua composição, as proteínas dessa microalga estão aptas para o consumo animal e humano, podendo ser comercializadas na forma de cápsula e de comprimidos (BOROWISTZKA, 1999).

Ao analisar as estatísticas disponíveis, pode-se observar que, entre 1990 e 2000, a produção mundial de *Arthrospira sp* triplicou, subindo de 710 toneladas produzidas no ano 1990 para mais de 3.300, no ano 1999 (FAO, 2006). Habib *et al.*, (2008) referem que as estatísticas industriais da Food Agriculture Organization (FAO) descrevem que, no ano de 2003, a China produziu 19.080 toneladas de Spirulina, aumentando para 41.570 toneladas em 2004.

O presente trabalho justifica-se pelo fato de que nenhum estudo tenha sido realizado sobre importantes aspectos das proteínas da microalga *Spirulina maxima*, tanto seja em relação á caracterização das propriedades físico-químicas e nutricionais das proteínas contidas na microalga e comparação das propriedades funcionais dos isolados protéicos da microalga não-modificado e modificado quimicamente por succinilação e acetilação. Podendo-se estabelecer a qualidade nutricional da proteína da microalga e sua provável utilização na elaboração de produtos alimentícios, além de gerar informação científica que complemente a já existente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar a proteína da microalga spirulina (*Spirulina maxima*), não modificada e modificada quimicamente em relação á propriedades físico-químicas, funcionais modificados e não modificados quimicamente e aspectos nutricionais.

2.2.-Objetivos específicos

- Cultivar e obter a biomassa liofilizada da microalga *Spirulina maxima*;
- Obter a farinha integral da microalga *Spirulina maxima*;
- Determinar a composição centesimal da farinha integral da microalga *Spirulina maxima*;
- Quantificar e classificar as diferentes frações proteicas na microalga *Spirulina maxima*;
- Obter isolado protéico da farinha da microalga *Spirulina maxima*;
- Determinar o peso molecular das subunidades que constituem a proteína na farinha da microalga *Spirulina maxima*, através de eletroforese (SDS PAGE);
- Caracterizar a farinha e o isolado proteico da microalga *Spirulina maxima*, em relação às propriedades de estabilidade térmica (temperatura de desnaturação térmica - T_d e entalpia de transição ΔH);
- Determinar a composição dos aminoácidos da proteína da microalga *Spirulina maxima*;
- Determinar a presença ou ausência de componentes antinutricionais como: taninos, inibidor de tripsina e de lectina, na proteína de *Spirulina maxima*;
- Modificar quimicamente o isolado proteico da microalga *Spirulina maxima*, através de succinilação e acetilação;

- Determinar e comparar as propriedades funcionais (solubilidade, capacidade de absorção de água e óleo, capacidade de emulsão, estabilidade de emulsão capacidade de espumação, estabilidade de espumação,) da proteína no isolado não modificado e modificado da microalga *Spirulina maxima*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 História e importância das microalgas

Segundo Habib *et al.*; (2008), no planeta terra, as algas formam uma imensa população de indivíduos de estrutura celular simples, das quais se conhecem, aproximadamente, 110 mil espécies, reunidas em quatro grandes grupos, que são:

As cianofitas (*Cyanophyceae*) ou algas verde-azuladas;

As clorofitas (*Chlorophyceae*) ou algas verdes;

As feófitas (*Phaeophyceae*) ou algas pardas;

As rodofitas (*Rhodophyceae*) ou algas vermelhas.

As algas verde-azuladas e verdes encontram-se tanto em água marinha quanto doce, porém as algas dos outros grupos são exclusivas de ambientes marinhos. Seu tamanho é variável: algumas, como a alga verde-azulada do gênero spirulina, são microscópicas e formam filamentos que medem amstromg (milésimos de milímetros). Porém existem outras, gigantes, que chegam a medir até 60 metros, como a alga parda, chamada sargaço gigante.

As microalgas, em especial, a spirulina, têm feito parte da alimentação de civilizações antigas, como os Maias, os Astecas e algumas tribos africanas e asiáticas. O povo asteca tinha a spirulina como base de sua alimentação, a qual era dissecada ao sol e transformada em uma espécie de bolo. Usada como parte da sua alimentação, essa tradição da spirulina tinha-se perdido, mas, nos últimos tempos, até nossos dias, vem aumentando. Também tem se observado que, para muitas aves africanas, essa alga constitui a única fonte alimentícia. Os flamingos, por exemplo, na zona do Chade, na África, só se alimentam da Spirulina que encontram na superfície das lagoas.

Segundo Vonshak *et al.*, (1996), o efeito positivo das microalgas deve-se às seguintes razões:

- A vitamina E e o caroteno determinam uma maior capacidade de resistência ao ataque de radicais livres; as vitaminas B1, B2, B12 e C cobrem a necessidade corpórea de princípios ativos fundamentais;

- O alto conteúdo de albumina e a variedade de aminoácidos essenciais são fundamentais para um desenvolvimento corpóreo sadio e uma ótima condição física.

Existe um projeto europeu para a "Produção e o processamento de algas para aplicação industrial", já que as mesmas estão sendo cada vez mais cotizadas na obtenção de produtos, tais como alimentos, têxteis e na indústria de polímeros; óleos essenciais ácidos (para aplicação alimentícia); antioxidantes e vitaminas (para cosmetologia e indústrias farmacêuticas e da alimentação). No entanto, a produção em grande escala de algas de alta qualidade (e de seus derivados) encontra-se em estado de subdesenvolvimento nas zonas de microclima moderado na Europa. A limitação climática impede um sistema de cultura com um mesmo método. Por essa razão, a alternativa é desenvolver outras tecnologias de culturas, como poderiam ser as estufas. A produção potencial está centrada na Spirulina, considerando-se também outros derivados que sejam de alta qualidade (HABIB *et al.*, 2008).

3.2 Classificação e descrição celular das algas verde-azuladas

As algas verde-azuladas ocupam uma posição intermediária entre as bactérias fotossintetizantes e as algas eucarióticas. Não têm bacterioclorofila, porém contêm clorofila e outros pigmentos. Com sua estrutura celular procariótica (parede celular, ribossomos e ácido nucléico), classificam-se, taxonomicamente, dentro do grupo das bactérias (Reino *Procarvotae*), com a denominação de cianobactérias (STALEY *et al.*, 1989).

Nesse contexto, as cianobactérias ou procarióticas têm sido consideradas tradicionalmente dentro das microalgas. De fato, algumas dessas cianobactérias, como é o caso da Spirulina, que fornece uma das principais contribuições da biotecnologia das microalgas (RODRIGUEZ, GUERRERO, 1992). Assim sendo, o termo microalga não tem sentido taxonômico algum e, dentro do mesmo, incluem-se organismos com dois tipos de células diferentes: as cianobactérias, que têm estrutura celular procariótica, e as outras microalgas, com estrutura celular eucariótica.

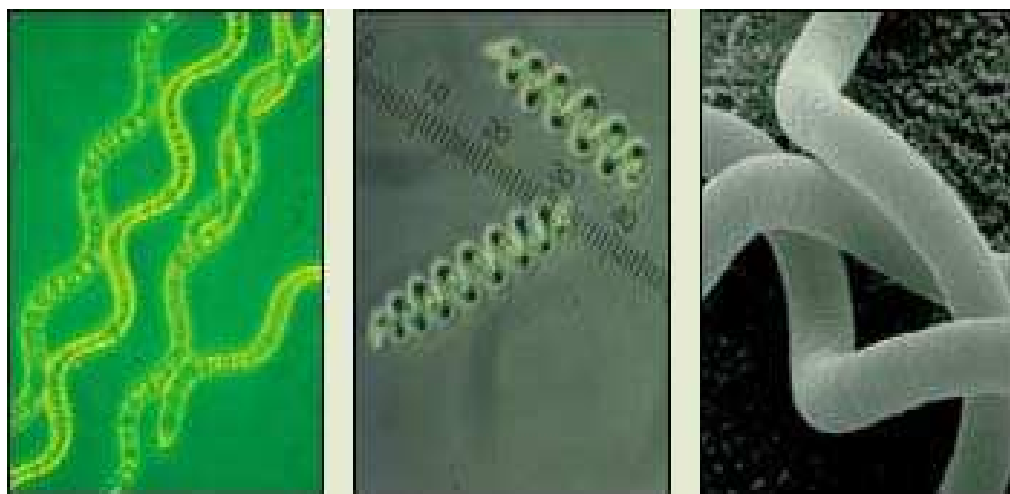
As cianobactérias são muito mais simples, podem aparecer como células individuais, mas também são frequentes nas formas filamentosas. Apesar da sua organização celular procariótica, estruturalmente são muito mais complexas que a maioria das bactérias. Elas têm uma seção central, onde fica o ácido nucléico (apenas uma molécula de DNA). Além das grandes diferenças estruturais, fisiologicamente, os dois tipos de microalgas são similares,

com um metabolismo fotossintético semelhante ao das plantas superiores. Sua reprodução é, geralmente, por divisão binária, com tempos de duplicação de 1h ou menos para as procarióticas (cianobactérias), porém de 8 a 24 h ou mais para as eucarióticas. Muitas se dividem no momento particular do ciclo dia – noite. As espécies que se dividem durante o período de obscuridade sintetizam o material celular durante o período de luz, bem como, na fase de obscuridade, realizam diferentes reações relacionadas com a divisão celular (TAYLOR, 1980).

Habib *et al.* (2008) indicaram que a diversidade ou classificação das espécies de *Spirulina* é limitada a 15, que são as seguintes: *Spirulina platensis* (Gomont) (*Arthrospira fusiformis*) (Voronichin); *S. platensis* NIES-39; *S. platensis* Geitler; *S. platensis* (Nordstedt) Geitler; *S. subsalsa* fo. *Versicolor* (Cohn) Koster; *S. subsalsa* Oersted; *S. maxima* (ou *S. geitleri*) (Setch. et Gardner); *S. subsalsa* Oersted ex Gomont; *S. major* Kutzing; *Arthrospira fusiformis* (Voronichin); *A. maxima*; *A. jenneri* (Kutzing) Stitz; *S. labyrinthiformis*; *S. laxissima*; *S. lonar*; *S. nodosa*; *S. princeps* West & West e *S. laxa* G.M. Smith.

3.3 A Spirulina

A *Spirulina* é uma alga verde-azulada, que se desenvolve em águas fortemente alcalinas, seu tamanho é microscópico, e sua forma, filamentosa. Está constituída por células de 2 a 8 µm de comprimento, que formam um espiral (Figura 1), o que origina seu nome. É unicelular e descendente das primeiras formas fotossintéticas surgidas a aproximadamente 3 bilhões de anos, sem mudanças evolutivas (SHIMAMATSU, 2004).



FONTE: (SHIMAMATSU, 2004)

Figura 1- Fotografia microscópica da microalga *Spirulina*

A microalga spirulina foi encontrada fossilizada e tem-se comprovado que, graças a sua adaptação ao hábitat, tem permanecido praticamente sem evoluir até nossos dias. Trata-se de um organismo fotossintético, isto é, que utiliza o gás carbônico da atmosfera, produzindo oxigênio e alimento. Por isso as algas verde-azuladas, em geral, colaboraram com a atmosfera da terra desde seus primórdios tal como existe hoje, com alta porcentagem de oxigênio. Dessa forma, surgiram novos tipos de seres vivos, os que realizavam uma respiração aeróbia, nos quais se incluem os seres humanos (STALEY *et al.*, 1989).

Hoje em dia, nos países mais avançados, esse tipo de microalga, é um poderoso micronutriente biológico, em virtude das substâncias que tem: proteínas (60-70%), carboidratos (20%), lipídios (8%), minerais e oligoelementos (13%). Por essa razão, é considerada como a maior fonte natural de proteínas, acima do ovo e da soja, com múltiplas aplicações no campo da saúde, da dietética e da estética (RODRIGUEZ, GUERRERO, 1992; TOKUSOGLU, UNAL, 2003).

3.3.1 Composição e características nutricionais da Spirulina

3.3.1.1 Características nutritivas da Spirulina

O valor da spirulina é determinado pela variedade dos nutrientes que contém, alguns dos quais não são sintetizados pelo organismo humano. Tem muitos macronutrientes e micronutrientes e, devido à sua variedade, torna-se um alimento completo, qualitativamente e se consumida em doses elevadas também quantitativamente. Pode-se dizer que a Spirulina é o alimento com maior número de elementos nutritivos diferentes por unidade de peso, e o organismo só necessita de 20 gramas diários dessa alga para satisfazer todas as suas necessidades nutritivas. (PHANG *et al.*, 2000).

As proteínas da Spirulina contêm todos os aminoácidos essenciais, a partir dos quais o organismo constrói a sua arquitetura. Porém seus aminoácidos não são tão completos como o da carne animal, especialmente no que se refere à metionina, à cisteína e à lisina, mas são muito mais completos que os de origem vegetal, incluindo-se as dos legumes. Além disso, a Spirulina não apresenta os inconvenientes das carnes animais no que se refere a seu conteúdo em colesterol, pois sua elevada concentração proteica ativa o metabolismo. A energia necessária para a combustão de um grama de proteína é maior do que para um grama de

glicídios ou de gorduras. Logo, uma dieta normocalórica hiperproteica tem um gasto energético muito superior ao da equilibrada, visto que o balanço energético é muito inferior, obrigando à utilização das reservas orgânicas, o que, unido à presença de fibras alimentares, que dão a sensação de saciedade, devido à retenção hídrica, faz da Spirulina um alimento indispensável nas dietas de emagrecimento. Também regula o funcionamento intestinal, a reprodução celular, a fluidez do sangue e a formação da hemoglobina (HABIB *et al.*, 2008).

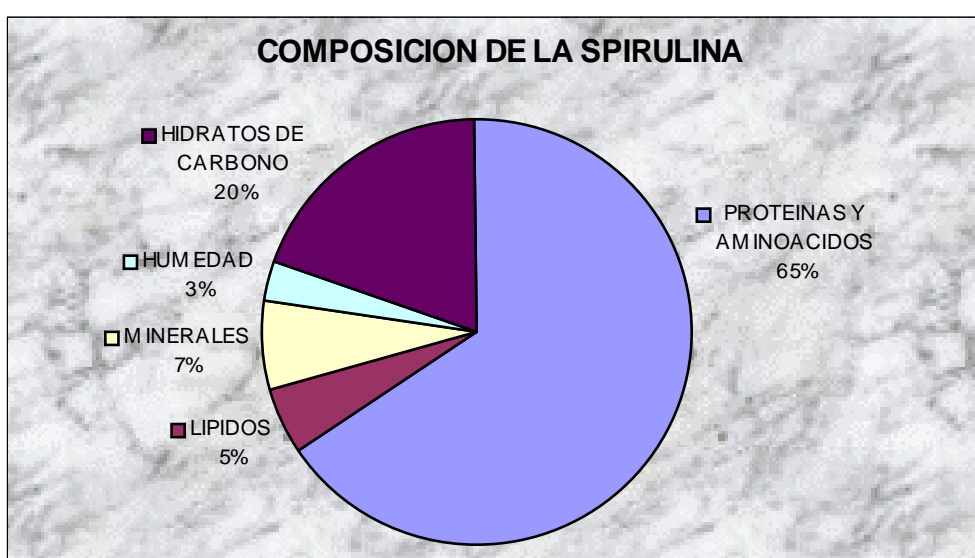
Por todas as razões aqui expressas, a spirulina se converteu em uma alternativa natural ao consumo de proteína animal e se faz muito reconhecida, junto com a soja, como fonte proteica das dietas vegetarianas. Os desportistas vegetarianos podem fazer uso dela para cobrir parte da suas necessidades.

A Spirulina tem vitaminas, especialmente a vitamina A na forma de betacaroteno, vitamina C e vitaminas do grupo B. É sabido da importância da vitamina A e da vitamina C como antioxidantes na prevenção de numerosas doenças degenerativas. A Spirulina destaca-se, sobretudo, pelo seu conteúdo em cobalamina ou vitamina B12, difícil de encontrar em dietas vegetarianas, e em ácido fólico ou vitamina B9, que é necessário para a formação das células e o bom funcionamento do coração e do sistema nervoso. Outros autores indicam que a Spirulina também contém uma elevada quantidade de vitaminas do complexo B (B1, B2, B6), β -caroteno e vitamina E, além de minerais como o zinco, o magnésio, o cromo, o selênio e o ferro, necessários para a manutenção do metabolismo, para a conservação da pele e das mucosas e para o desenvolvimento normal dos ossos e dos dentes, além de aminoácidos essenciais, que são necessários em nossa dieta e que contribuem para uma melhor nutrição humana (BROWN *et al.*, 1989; BECKER, 1994).

Para uma microalga ser consumida e digerida, o valor nutricional dependerá da sua composição bioquímica. Nesse contexto, não só a composição de macro nutrientes como também a composição e a concentração de aminoácidos, além da composição dos lipídeos, são de primeira importância no valor nutricional das microalgas. Essa composição bioquímica muda com as condições do cultivo (temperatura, iluminação, composição do médio etc) (WEBB, CHU, 1982).

3.3.1.2 Composição química da Spirulina

Segundo Habib *et al.*, (2008), a Spirulina é uma microalga que tem a seguinte composição química: proteínas (50 - 70%); carboidratos (15 - 25%); lipídeos (6 - 8%); minerais (7 - 13%); umidade (3 - 7%) e fibra (8 - 10%). Essa composição faz que seja considerado um micronutriente biológico, que aporta uma abundante quantidade de proteína natural, depois do ovo e da soja. A figura 2, descreve valores médios da composição química encontrada na microalga Spirulina.



FONTE: Pesquisa própria

Figura 2 – Gráfico da composição química média da microalga Spirulina.

No quadro 1, descrevem-se os dados da composição média dos diferentes compostos (componentes nutricionais, aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais, pigmentos, ácidos graxos, minerais e vitaminas) encontrados na microalga Spirulina.

Quadro 1 – Composição química da microalga *Spirulina*

| Composição (% Matéria Seca) | | Ácidos grassos média mg/Kg |
|--|---------|---------------------------------------|
| Carboidratos | 13-16 % | Ácido gamma-linolénico (AGL) 10.000 |
| Gorduras | 6-7 % | Ácido linoleico essencial 11.000 |
| Minerais | 6-15 % | Ácido dihomogamma-linoléico 530 |
| Umidade | 3-7 % | Ácido alfa-linoléico 14,5 |
| Proteínas média | 50-70 % | Ácido docosahexanoico (ADH) 14,5 |
| | | Ácido arcaquico 48 |
| Aminoácidos essenciais (% Matéria seca) | | Ácido behénico 48 |
| Isoleucina | 6 | Ácido erúxico 24 |
| Leucina | 8 | Ácido lignocerónico 24 |
| Lisina | 4,6 | |
| Metionina | 1,4 | Minerais Media mg/Kg |
| Fenilalanina | 4,9 | Cálcio (Ca) 4.000 |
| Treonina | 4,6 | Ferro (Fe) 1.060 |
| Triptófano | 1,4 | Potássio(K) 15.200 |
| Valina | 6,5 | Magnésio (Mg) 4.800 |
| | | Manganeso(Mn) 26 |
| Aminoácidos no essenciais | | Molibdênio(Mb) 1,50 |
| Alanina | 6,8 | |
| Arginina | 6,5 | Vitaminas mg/Kg (Matéria seca) |
| Tirosina | 3,9 | Vit.A 225 |
| Alanina | 6,8 | VitC 103 |
| Arginina | 6,5 | Vit.B1 14 |
| Ac. Aspartico | 8,6 | Vit. B2 28,5 |
| Ac. Glutâmico | 12,6 | Vit. B6 1,3 |
| Cistina | 0,4 | Vit. B12 0,3 |
| Glicina | 4,8 | |
| Histidina | 1,8 | |
| Prolina | 3,9 | |
| Serina | 4,2 | |

FONTE: (BROWN *et al.*, 1989; BECKER, 1994)

3.3.2 Localização e produção da *Spirulina*

Originariamente, trata-se de um organismo procedente de lagoas da África e da América tropical, que tem se estendido em outras zonas quentes do mundo, aproveitando a sua capacidade de adaptação em lugares onde não podem crescer outros organismos (HABIB *et al.*, 2008).

A *Spirulina* cresce de forma natural em lagoas alcalinas que contêm carbonato sódico (Na_2CO_3), o bicarbonato sódico (NaHCO_3) e outros minerais, assim como compostos

fixadores do Nitrogênio. Essas lagoas se encontram em todos os continentes, incluindo a Antártida, algumas vezes perto de lagoas muito salgadas, vulcões e desertos. A Spirulina tem crescido na África (Argélia, Chade, Bodou, Sudão, Djibouti, Etiópia, Zaire, Quênia, Tanzânia, Tunísia, Zâmbia, Madagascar, Botswana, Namíbia, África do Sul, Mauritânia); na Ásia (Índia, Myanmar, Sri Lanka, Paquistão, Tailândia, Azerbaijão); na América do Sul (Uruguai: Montevideu; Chile: zona desértica da I e II regiões; Peru: Lago Huacachina, perto do Ica, Lagoa Orovilca: lagoa agora seca, Lagoa Ventanilla, na costa perto de Lima, no Reservatório de água, perto de Paracas, Lagoa Titicaca); na América do Norte (México: Lago Texcoco Cráter; Califórnia, Haiti, República Dominicana); na Europa (Hungria, França). (KEBEDE, AHLGREN, 1996; SAZÓN, 1997)

3.3.2.1. Sistemas de cultivo da Spirulina

O sistema de cultura da microalga Spirulina pode ser feito em lugares abertos ou fechados. Esses dois sistemas têm vantagens e desvantagens. O sistema aberto (Figura 3), tipo piscina (race-way), é o mais utilizado naqueles lugares onde as condições de luz, temperatura e espaço são favoráveis. Ao aumentar a densidade microalgal, requer-se da transferência de cultura a volumes maiores, sendo pouco prático manter esse sistema em condições do laboratório com luz artificial. Essa metodologia necessita de luz solar como a fonte principal de energia necessária para o metabolismo microalgal. (RICHMOND, 1990; LOURENÇO, 2006)

O esquema de produção inicia-se inoculando microalgas que se encontram em fase de crescimento exponencial (5 a 7 dias). O tempo de crescimento depende, principalmente, do tamanho do inóculo médio e das condições de cultura (temperatura, iluminação), assim como da taxa de crescimento da espécie. Obtida a fase de crescimento exponencial, coleta-se a cultura e se utiliza como inóculo para os canais de alta velocidade (race-way). Esse sistema é o mais empregado em nível industrial, e as paredes dessas piscinas geralmente são construídas de cimento, concreto ou simplesmente pilha de terra, cobertas de PVC de 1-2 mm de espessura ou outro material plástico; podem ser tanques completos de fibra de vidro, com uma profundidade média de 20 a 30 cm.

Nesse sistema de cultura, a mistura e a turbulência são necessárias para evitar limitações no crescimento por causa da foto-inibição, que depende da intensidade da luz e da concentração de oxigênio. A aeração e a agitação favorecem a oxigenação das culturas e a

homogeneização de nutrientes, movimento constante de algas para a superfície luminosa, obtendo-se uma melhor fotossíntese e aporte de CO₂ para o crescimento celular (0,03% do ar) (HERRERA, 2002; HABIB *et al.*, 2008).

Habib *et al.*, (2008) indicaram que a *Spirulina* é produzida em forma artificial (Figura 3) em, no mínimo, 22 países, a saber: Benin, Brasil, Burkina Faso, Chade, Chile, China, Costa Rica, Costa do Marfim, Cuba, Equador, França, Índia, Madagascar, México, Myanmar, Peru, Israel, Espanha, Tailândia, Togo, Estados Unidos e Vietnã.

Os principais produtores de *Spirulina*, em nível mundial, localizam-se nos Estados Unidos, no Japão, em Israel e na Austrália, abastecendo a seus próprios mercados e a outros, como a Comunidade Europeia e o Canadá. Por outra parte, China e Índia constituem importantes produtores de biomassa de culturas de pequena a média escala, que realizam agrupações comunitárias para consumo interno, principalmente.



FONTE: (BOROWISTZKA, 1999)

Figura 3 - Fotografia de cultivos artificiais abertos da microalga *Spirulina*

Shimamatsu (2004) informa que a produção industrial total de *Spirulina* é de cerca de 3.000 toneladas ao ano. A FAO (2006) afirma que, na China, no ano 2003, houve uma produção de 19.080 toneladas e mostrou um aumento considerável de 41.570 toneladas no ano de 2004, com um valor aproximado de US\$ 7,6 milhões e US\$ 16,6 milhões respectivamente.

3.3.3 Aplicações da Spirulina

Tradicionalmente, tem-se utilizado a Spirulina de uma forma muito ampla. Existem referências escritas de seu uso na América pré-colombina, por parte dos astecas, que a extraíam da lagoa Texcoco (México) (KEBEDE, AHLGREN, 1966).

Essa alga foi usada amplamente na China, sobretudo com fins medicinais, já que era utilizada para aumentar o desejo sexual e para prevenir a queda de cabelo. Além disso, formava parte dos alimentos que eram consumidos regularmente por muitos povos do mundo, os quais, além de tê-la como um alimento muito proteico, pensavam que os protegia de numerosas doenças, algumas tão fatais como os ataques do coração ou o câncer. Hoje em dia, é muito consumida no Japão e nos Estados Unidos, lugares onde muita gente a considera como o melhor medicamento para perder peso. (BECKER, 1986; BOROWITZKA, 1999)

Essa microalga pode ser utilizada com diversas finalidades, entre elas, destacam-se: para se emagrecer e reduzir o apetite naturalmente, devido à sua alta porcentagem de fenilalanina; regular os níveis de glicose, porque contém cromo; como energético natural para crianças, adultos, convalescentes e desportistas, por causa do seu alto valor nutricional, baixo valor energético e baixo nível calórico (4 cal/gr.); para corrigir os desequilíbrios metabólicos e funcionais dos sistemas nervoso, cardiovascular e hormonal. Inclui cofatores da síntese de prostaglandinas. Em Biomedicina e Farmacologia, além da sua utilização em dietética, apresentam efeitos hipocolesterolêmicos, atividades antibacterianas, antifúngica e antitumorais (COHEN, 1986; BOROWITZKA, BOROWITZKA, 1988 a, b; PESANDO, 1990; GUVEN *et al.*, 1990); na alimentação, é usado para espécies zooplancônicas, como *Artemia*, que é utilizada na alimentação de larvas de camarão (STROMGREN, CARY, 1984; ENRIGHT *et al.*, 1986; ALBERTOSA *et al.*, 1993); como estabilizador de piscinas, para melhorar o crescimento e a sobrevivência das larvas. Isso se deve à manutenção da qualidade da água pela ação das microalgas – produção do oxigênio e utilização do amônio (SEYMOUR, 1980), bem como a excreção dos fatores do crescimento (BROWN *et al.*, 1989). Sob certas condições, muitas espécies de microalgas podem acumular, em altas concentrações, compostos de interesse comercial, como proteínas, lipídeos, amidos, glicerol, pigmentos naturais ou biopolímeros (RICHMOND, 1983; COHEN, 1986). Na agricultura, a biomassa da microalga é utilizada como biofertilizador (BECKER, VENKATARAMAN, 1982).

A Spirulina pode ser consumida em comprimidos, cápsulas ou em pó. Porém, esta última apresentação é a ideal para ser usada como condimento, adereço de saladas, sucos, crepes, abacate ou outras receitas de muito interesse nutricional e culinário.

3.3.4 Propriedades medicinais da Spirulina

Liu *et al.*, (2000) asseveram que o papel dessas microalgas na medicina tem sido considerados devido aos numerosos estudos que têm demonstrado, principalmente em animais, suas possíveis propriedades curativas em humanos, como por exemplo:

- Perda da visão: A Spirulina tem sido usada para o tratamento das deficiências de vitamina A, responsáveis pela perda da visão em pessoas cuja dieta é deficiente nessa vitamina. A Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstrou que, na Índia, a decisão de adicionar um grama diário de Spirulina na dieta dos meninos tinha um efeito muito positivo. A estatística posterior a esse fato tem demonstrado que a porcentagem de cegueira tem diminuído desde que se adotou essa iniciativa. Então, a inclusão de suplementos de Spirulina para pessoas que apresentam problemas de visão, como degeneração macular e cegueira noturna, poderia trazer resultados muito positivos.
- Artrite: a Spirulina apresenta um elevado conteúdo em ácidos graxos poliinsaturados, especialmente o ácido γ -linolênico, um dos ácidos graxos que toma parte do grupo Ômega-6. A capacidade desse componente para diminuir os processos inflamatórios faz da Spirulina um importante suprimento no combate a doenças como a artrite reumatoide.
- Problemas do aparelho circulatório: numerosos estudos realizados em ratos têm demonstrado que os níveis elevados de ácidos graxos essenciais, especialmente Ômega-6, da Spirulina exerciam um efeito positivo sobre o aparelho circulatório. A ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos Ômega-6 ou complementos que contenham esse princípio rebaixa as triglicérides, diminui o colesterol, previne a formação de coágulos nas artérias ao impedir a agregação plaquetária e diminui levemente a pressão arterial. Em geral, fluidifica o sangue e protege contra os ataques cardíacos, as apoplexias, os derrames cerebrais, as anginas de peito, a doença de Reynaud etc.

- Remédio para aumentar as defesas: outro estudo tem demonstrado a capacidade dessa microalga para estimular a imunidade, de maneira que seu uso poderia ser adequado para prevenir certas doenças, devido às quais as defesas se encontram comprometidas. Numerosas investigações estão sendo realizadas para comprovar se a Spirulina resulta em benefícios no combate à AIDS (HIV), a certos tipos de câncer, intoxicações causadas por metais pesados, etc.

Uso externo

- Mau hálito: O conteúdo em clorofila dessa microalga a faz muito adequada no tratamento das halitoses ou mau cheiro da boca. A clorofila refresca a boca e proporciona um bom hálito. É por esse motivo que muitos produtos para enxágues bucais industriais a incluem na sua composição.
- Feridas na boca: O conteúdo em vitamina C determina que os enxágues realizados com esse tipo de produto que contém Spirulina ajudam a desinfetar as úlceras da boca e facilitam a sua cicatrização. A clorofila também tem propriedades antiulcéricas e vulnerárias.
- Câncer da boca: O tratamento mostra-se adequado para tratar as placas brancas da boca (leucoplaquia oral) que poderiam produzir e conduzir a um câncer. A clorofila tem propriedades preventivas não somente do câncer de boca como também de fígado e de colo. Portanto, os remédios compostos com Spirulina não somente beneficiam a prevenção externa dessa doença, como também as que se desenvolvem no interior do organismo.

Um estudo reportado em dezembro de 2008, na Revista Medicina Natural (Tóquio), foi realizado para por à prova a capacidade da Spirulina para modular o sistema imunológico. Os investigadores encontraram que essa alga inibiu significativamente a resposta imune humoral, mediada pelas células de reação, e o fator de necrose tumoral alfa, nos ratos, em forma de dose-dependente. Os cientistas concluíram que a capacidade da Spirulina para suprir a resposta imunitária foi notável (HABIB *et al.*, 2008).

3.4 Proteínas

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes das células vivas, que contêm entre 30% e 70% do peso seco total da célula; são componentes celulares muito importantes, que se formam a partir da informação genética da célula e, posteriormente, dirigem a sua maquinaria metabólica. Podem-se classificar como fibrosas ou globulares. As fibrosas são insolúveis na água, fisicamente resistentes, construídas pelas estruturas repetitivas e têm funções estáticas (SCRAGG,1996; TOKUSOGLU, UNAL, 2003).

Sze-Tao e Sathe (2000) referem que as proteínas são componentes essenciais dos alimentos porque são fontes de aminoácidos necessários para o crescimento e a manutenção do organismo; são importantes no processamento de alimentos e no desenvolvimento de produtos alimentícios, porquanto são responsáveis por muitas propriedades funcionais que influenciam o consumidor a aceitar esses produtos. Essas propriedades funcionais incluem tanto as propriedades nutricionais quanto as físico-químicas.

Bobbio e Bobbio (2001) afirmam que, com exceção das proteínas de origem animal, as demais apresentam deficiências em alguns aminoácidos essenciais. No quadro 2 se indica o teor de proteínas de alguns alimentos e a sua classificação como fonte de proteínas para a nutrição humana.

Quadro 2 - Teor de proteínas de alimentos e sua classificação como fonte de proteínas

| Alimentos | % de Proteína | Classificação |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| Soja | 30-44 | Incompleta |
| Feijão | 20-25 | Incompleta |
| Arroz | 6-10 | Incompleta |
| Milho | 8-11 | Incompleta |
| Trigo | 8-15 | Incompleta |
| Amendoim | 20-35 | Incompleta |
| Crustáceos e peixes | 20-24 | Completa |
| Leite de vaca | 3,5 | Completa |
| Ovos de galinha | 12 | Completa |
| Carne de mamífero | 15-25 | Completa |
| Carne de galinha | 18-20 | Completa |

Fonte: (BOBBIO, BOBIO, 2001).

As proteínas tem funções estruturais e formam parte das membranas celulares e dos tecidos do organismo. Além disso, tem outras funções importantíssimas para o funcionamento do organismo, atuando diretamente nas reações do metabolismo, do sistema imunológico e do hormonal. Do ponto de vista da alimentação da humanidade, as proteínas são o componente mais crítico, escasso e caro da dieta (SGARBIERI, 1996).

3.4.1 Classificação das proteínas

Geralmente, as proteínas são divididas em quatro classes: globulinas, albuminas, prolaminas e glutelinas. Essa classificação é feita com base na metodologia operacional e relacionada às respectivas solubilidades em soluções salinas, água, álcool e soluções ácidas e básicas diluídas, respectivamente (OSBORNE, 1924). As globulinas são coaguláveis pelo calor e apresentam insolubilidade em água e solubilidade em soluções salinas. Ao serem extraídas de tecidos animais e vegetais em soluções salinas, são precipitadas da solução por diluição ou diálise (SANCHEZ-VIOQUE *et al.*, 1999).

As albuminas são solúveis em água, coaguláveis pelo calor e se apresentam na albumina do ovo, do leite e do soro sanguíneo. Com coeficiente de sedimentação de aproximadamente 2S e ricas em cisteína, glutamina e arginina, as albuminas constituem o mais diverso grupo de proteínas (BARTOLOMÉ *et al.*, 1997). Normalmente, elas são representadas pelos duzentos diferentes tipos de enzimas necessárias ao metabolismo celular (DURANTI, GIUS, 1997).

As prolaminas encontram-se, normalmente, em cereais, são insolúveis em água e soluções salinas, e solúveis, em soluções alcoólicas (50 a 90%). Exemplos de prolaminas são a zeína do milho e a gliadina do trigo. Têm alto conteúdo de prolina e nitrogênio amídico (derivado da glutamina) (SHEWRY, TATHAM, 1990).

As glutelinas são solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas. Elas se encontram no trigo e no arroz. As glutelinas são insolúveis em água, soluções salinas e alcoólicas, sendo, porém, solúveis em soluções ácidas (glutelina ácida) e alcalinas diluídas (glutelina básica). Convém ressaltar que, embora as glutelinas e as prolaminas constituam diferentes grupos de proteínas, elas têm estruturas semelhantes. No entanto, as glutelinas não são solúveis em álcool, pelo fato de formarem polímeros estáveis, devido às ligações dissulfídicas entre as cadeias proteicas (SHEWRY, TATHAM, 1990).

Segundo Farfán (1994), as proteínas podem ser classificadas com base em três critérios diferentes: bioquimicamente, em proteínas funcionais ou específicas e em proteínas estruturais. Outra classificação é pela sua complexidade, que depende do tipo de grupo prostético (aproteico) que elas possuem. E, finalmente, uma classificação útil para o pesquisador é baseada na solubilidade, que é consequência da composição química e da estrutura da proteína. Essa classificação é aplicada às proteínas simples, não existindo justificativa para excluir algumas proteínas complexas. Em relação à solubilidade, a classificação é a seguinte:

- Albuminas: proteínas solúveis em água e em soluções salinas diluídas. Desnaturam e precipitam facilmente com o calor. Exemplo: a soralbumina.
- Globulinas: proteínas simples, insolúveis em água pura, mas solúveis em soluções diluídas de sais neutros, como por exemplo: soroglobulina, miosina muscular e outras provenientes das sementes.
- Glutelinas: proteínas simples, insolúveis em solventes neutros, mas solúveis em soluções ácidas ou alcalinas muito diluídas. Exemplos: a glutelina do trigo e a orizenina do arroz.
- Prolaminas: proteínas simples, geralmente de origem vegetal, solúveis em álcool (70-80%), mas insolúveis em água ou álcool puro. Exemplo: a zeína do milho e a gliadina do trigo.
- Albuminoides: proteínas simples, insolúveis em solventes clássicos neutros, soluções diluídas de ácidos, álcalis ou sais. Exemplos: a queratina do cabelo e das unhas, o colágeno do tendão e a elastina dos ligamentos.
- Histonas: proteínas de caráter básico, solúveis em água e ácidos diluídos, porém insolúveis em soluções ligeiramente amoniacais. Exemplos: a globina da hemoglobina e as proteínas cromossomais.

3.4.2 Peso molecular das proteínas

A bibliografia descreve que o peso molecular das proteínas é uma característica muito importante, visto que muitas das propriedades físicas dependem dessa característica. Pode ser determinado tomando-se como base algumas propriedades, como por exemplo, a viscosidade,

a pressão osmótica, o desvio da luz e a mobilidade em um campo elétrico em meio de porosidade controlada. A mobilidade em um campo elétrico se refere à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, em que a amostra pode ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou desnaturada pela ação de dodecil sulfato de sódio (SDS).

A eletroforese em gel de policramida atua sob dois princípios: por exclusão molecular, devido à porosidade do gel, e por migração no campo elétrico, por causa da diferença na densidade de cargas de cada proteína. A eletroforese em presença de SDS causa desnaturação e dissociação das proteínas poliméricas e apresentam um grande excesso de cargas negativas devido ao SDS que se liga às moléculas de proteínas. Por essa razão, o fator de mobilidade das proteínas desnaturadas será somente o tamanho molecular. As amostras submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com tratamento de SDS têm uma mobilidade inversamente proporcional aos pesos moleculares. Com o uso da curva padrão, pode-se determinar o peso molecular de qualquer outra proteína (SGARBIERI, 1996).

Machuka (2000) relatou que as leguminas apresentam pesos moleculares de 320,0 a 400,0 kDa. A estrutura global é composta de seis subunidades idênticas de 52,0 a 65,0 kDa, sendo cada uma delas composta por um polipeptídeo ácido (33,0 – 42,0 kDa) unido a um básico (19,0 – 23,0 kDa) por ligação dissulfídica, e as vicilinas apresentam pesos moleculares de 145,0 a 190,0 kDa.

Jacob-Lopes *et al.*, (2006) relataram, para a cianobactéria *Aphanothece microscópica* Nägeli, uma distribuição em uma faixa de peso molecular entre 15 kDa e 62,5 kDa. Venkataraman *et al.*, (1992) descreveram para a cianobactéria *Spirulina* pesos moleculares entre 14,3 kDa e 66,0 kDa respectivamente.

3.4.3 Estabilidade térmica das proteínas

A bibliografia indica que, na preparação de alimentos, as proteínas são submetidas a diferentes tratamentos térmicos e, em alguns casos, tratamentos excessivos que podem causar mudanças indesejáveis, como a redução da digestibilidade e a biodisponibilidade de aminoácidos. Além disso, algumas propriedades funcionais são relacionadas à elevada estabilidade térmica (*Td*) de sua estrutura molecular. Um exemplo disso é o fato de que a gelatinização induzida pelo calor é afetada pela estabilidade térmica das proteínas (DESHPANDE, DAMODARAN, 1990; MENG, MA, 2001).

Pesquisadores indicam que a estrutura nativa das proteínas é estabilizada por forças moleculares internas, que são reduzidas com o aumento da temperatura. Ao atingir certa temperatura, ocorre uma transição ou desdobramento (“unfolding”), conhecido como desnaturação. Esse fenômeno é uma transição de fase de primeira ordem, que é caracterizado pela temperatura (T_d) e pela entalpia de desnaturação (ΔH). Essa desnaturação, induzida termicamente, pode ser causada pelo rompimento de várias forças químicas. Mudanças endotérmicas estão associadas ao rompimento de pontes de hidrogênio e de interações polares, entretanto as mudanças exotérmicas provocam um fortalecimento de interações hidrofóbicas e agregação de proteínas. Todas essas mudanças podem ser descritas em um termograma DSC (ARNTFIELD, MURRAY, 1981; PARK, LANIER, 1990; BERTOLA, BEVILACQUA, ZARITKI, 1994).

A estabilidade térmica de uma proteína pode ser controlada através da temperatura de desnaturação ou pico de temperatura de transição (T_d), no entanto, a proporção de proteínas desnaturadas pode ser observada pela área abaixo do pico endotérmico, representando as mudanças entálpicas. O valor da temperatura de transição (T_d) permite que se estabeleça a temperatura final do processo térmico (cozimento), todavia as mudanças entálpicas (ΔH) são conhecidas e utilizadas nos cálculos de transferência de calor do produto durante o processo térmico (ARNTFIELD, MURRAY, 1981; GARCIA, GAGLEAZZI, SOBRAL, 2000; CARCIOFI *et al.*, 2002).

Koshiyama, Hemano e Fukushima (1981) descrevem que a T_d é uma medida da estabilidade térmica, enquanto ΔH se correlaciona com a extensão da estrutura secundária de uma proteína. Ismond e Welsh (1992) indicam que ΔH representa o fluxo de calor na proteína, no processo de desnaturação térmica, observando que um fluxo de calor mais elevado indica um estado de natividade mais acentuado da proteína.

Então, de acordo com a bibliografia consultada, pode-se indicar que os métodos termoanalíticos, como é a calorimetria exploratória diferencial (DSC), pode ser utilizada como uma técnica valiosa na avaliação e no estudo dos efeitos do tratamento térmico sobre a qualidade das proteínas e dos sistemas alimentícios (KWON, PARK, RHEE, 1996).

O tratamento térmico usualmente empregado em produtos proteicos de vegetais tem os seguintes objetivos:

- a) Melhorar a qualidade nutricional, por destruir fatores antinutricionais e de flavor;
- b) Facilitar a mobilidade do óleo para extração;

- c) Reduzir a flora bacteriana;
- d) Remover solventes e
- e) Inativar enzimas.

Normalmente, o calor aplicado às proteínas diminui a capacidade de cristalização e a solubilidade (SIQUEIRA *et al.*, 1990), eleva a absorção de água e de óleo e, dependendo do tipo de proteína, pode aumentar ou reduzir as propriedades superficiais.

Guil-Guerrero *et al.*, (2004) estudaram as propriedades funcionais da biomassa de três espécies de microalgas e concluíram que é possível utilizá-las, como ingredientes, em alimentos funcionais.

3.4.4 Propriedades nutricionais das proteínas

As proteínas são moléculas orgânicas essenciais no processo de nutrição humana e animal e, além do aspecto quantitativo, também se deve considerar o aspecto qualitativo ou valor nutritivo. As propriedades nutritivas das proteínas podem ser avaliadas em três grupos: químicos ou bioquímicos, biológicos e microbiológicos (SGARBIERI, 1996). Os métodos químicos ou bioquímicos medem índices tais como: composição de aminoácidos ou aminograma e escore químico, poder de proteólise ou digestibilidade da proteína e ausência de toxicidade e/ou propriedades antinutricionais.

3.4.4.1 Composição dos aminoácidos

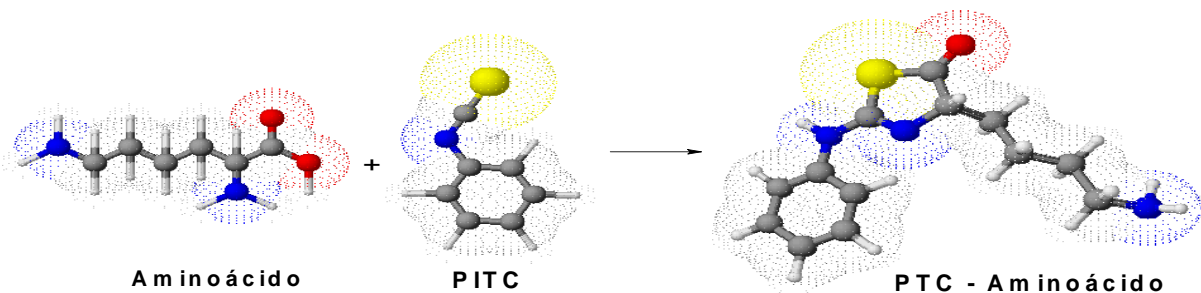
Em relação à composição, a literatura indica que as proteínas simples são compostas por cerca de 20 aminoácidos. Desses, nove (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) são considerados essenciais e devem ser encontradas na dieta em quantidades e proporções definidas, visto que o organismo não tem a capacidade de sintetizá-los. Em Ciência de Alimentos e Nutrição, é importante a quantificação de aminoácidos (aminograma) para determinar a presença ou ausência deles e compararmos com a quantidade de aminoácidos de uma proteína padrão teórica (FAO/WHO/UNU, 1991). Além disso, é preciso calcular o valor químico para cada aminoácido essencial, descrevendo uma primeira identificação do valor nutritivo e dos aminoácidos limitantes. Os métodos para determinar a composição de aminoácidos podem

ser: a cromatografia de troca iônica, com derivatização pós-coluna com ninidrina; a cromatografia de fase reversa em cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC), com derivatização pré-coluna, com fenilisotiocianato; e a cromatografia líquido-gasosa, após derivatização dos aminoácidos com n-butanol e trifluoracetato. (FARFÁN, 1994; SGARBIERI, 1996)

3.4.4.1.1 Cromatografia de fase reversa em HPLC com derivatização pré-coluna

A bibliografia indica que o método se baseia na reação do aminoácido livre (hidrolizado) com fenilisotiocianato (PITC), formando derivados estáveis, como o Feniltiocarbonil-Aminoácido (PTC-AA), que são separados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), em coluna de fase reversa. A detecção dos derivados obtidos é feita por absorvância em UV a 254 nm. Esse método está dividido nas seguintes etapas:

- a) Hidrólise, podendo ser por via seca, com vapor aquoso de HCl (proteínas puras), ou solução 6N de HCl (alimentos sólidos ou complexos);
- b) Preparação do hidrolisado para cromatografia: nessa etapa, provoca-se a eliminação do ácido e a derivatização. Essa derivatização do aminoácido é feita com o reagente de derivatização que é constituído por etanol 95%: água: trietilamina: fenilisotiocianato nas seguintes proporções: 7:1:1:1. A reação produzida na derivatização está descrita na figura 4. Terminada a reação, o solvente e os subprodutos da reação deverão ser totalmente eliminados por evaporação a vácuo, antes da análise cromatográfica, para evitar a aparição de picos interferentes. Posteriormente secas, as amostras podem ser estocadas por várias semanas no congelador.



FONTE: (FARFÁN, 1994)

Figura 4 - Reação de derivatização

c) Análise cromatográfica: nessa etapa, utiliza-se o sistema PICO-TAG, com coluna selecionada e testada para separação de PTC-aminoácido, utilizando-se um gradiente que vai de 10% do eluente B (acetonitrila e água) a 51%, em 10 minutos, ao fluxo de 1mL/min. Numa segunda etapa, o gradiente vai a 100%. A detecção dos PTC-aminoácidos é feita a UV 254 nm. Todos os aminoácidos comuns são eluídos em, no máximo, 12 minutos. Para equilibrar a coluna, são necessários oito minutos. Então, em média, necessita-se de 20 minutos para a passagem de cada amostra (FARFÁN, 1994).

3.4.5 Propriedades antinutricionais

Além de toxinas produzidas pelos microorganismos, podem ser encontradas, nos alimentos, algumas proteínas que apresentam propriedades tóxicas e antinutricionais. As propriedades antinutricionais são aquelas que, embora não causem alterações teciduais e fisiológicas evidentes, atuam no sentido de diminuir a eficiência do metabolismo, interferindo com a eficiência da utilização dos nutrientes. Altas temperaturas (doméstica e industrial) destroem essas propriedades, melhorando o valor nutritivo do alimento que as contém. (SGARBIERI, 1996)

3.4.5.1 Lectinas

Nesse grupo, temos a lectina, que é uma proteína ou glicoproteína não imune, que se liga reversível e especificamente a carboidratos, e se caracteriza pela capacidade de reagir, seletivamente, com um ou mais tipo de carboidrato ou de glicopeptídeo, através de, pelo menos, dois sítios de ligação, provocando aglutinação, que é utilizada como teste para detectar e avaliar a atividade das lectinas. É de ocorrência muito generalizada, tendo sido encontrada em inúmeros tecidos animais e vegetais, em sementes de leguminosas (feijão, soja, amendoim) e em microorganismos. Em tomates, as lectinas não são tóxicas, e as de cereais ou não são tóxicas ou apresentam baixa toxicidade. As moléculas das lectinas são oligoméricas, apresentando massa molecular entre 25.000 e 104.000 Da. De acordo com a bibliografia, o reconhecimento entre lectinas e moléculas receptoras pode ocorrer em três níveis: dentro da célula, entre células do mesmo organismo ou entre diferentes organismos. A toxicidade das lectinas de plantas para animais superiores está bem esclarecida. Por exemplo, a ingestão de pectina de feijão comum causa náuseas, seguida de vômitos e diarreia. Esses efeitos severos

ilustram o potencial da lectina na proteção da semente contra seus predadores, para a sobrevivência das espécies. O mecanismo pelo qual a ação tóxica das lectinas se manifesta ainda não foi totalmente esclarecido e, ao contrário de muitas proteínas, as lectinas são parcialmente resistentes à degradação pelas enzimas proteolíticas presentes no intestino delgado, sobrevivendo à passagem ao longo do trato gastrointestinal. Embora os efeitos tóxicos da lectina de leguminosas possam geralmente ser eliminados por tratamento térmico apropriado, algumas condições, como o calor seco, por exemplo, é pouco efetivas para a inativação de lectinas (LIENER, 1986; SGARBIERI, 1996; PEUMANS, VAN DAMME, 1996; ARGOLO, 2003).

3.4.5.2 Inibidores de tripsina

Outros compostos antinutricionais são os inibidores de proteases, que são proteínas capazes de inibir as atividades da tripsina e da quimiotripsina. São encontrados tanto em alimentos de origem vegetal (sementes de leguminosas e cereais) quanto animal (clara de ovos). Em muitos casos, esses inibidores são produzidos e permanecem nos tecidos de forma inativa (proinibidores), que somente são ativados para o controle de determinados processos metabólicos. Os inibidores de tripsina presentes na soja foram classificados em dois grupos: os de alto peso molecular (20 kDa), que apresentam duas pontes de dissulfeto, 181 resíduos de aminoácidos e especificidade primária para tripsina, e os de peso molecular entre 6 e 10 kDa, com alta proporção de ligações dissulfeto, 71 resíduos de aminoácidos e capacidade para inibir tripsina e quimiotripsina. Os inibidores de proteases são proteínas reguladoras que controlam eventos proteolíticos em todos os organismos vivos (SGARBIERI, 1996; SILVA, SILVA, 2000; DATTA *et al.*, 2001).

3.4.5.3 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos pertencentes a uma classe de metabólitos secundários, que se encontram distribuídos geralmente em plantas. Podem ser classificados como hidrolisáveis e não hidrolisáveis, e apresentam pesos moleculares entre 500 e 3000 Da e entre 500 a 20.000 Da, respectivamente.

Os taninos são considerados potentes inibidores de enzimas, devido a sua complexação com proteínas enzimáticas. Essa tendência de formar complexos pode explicar a

baixa digestibilidade da proteína das leguminosas. Esses taninos reagem com as proteínas na sua forma não oxidada, através de pontes de hidrogênios ou ligações hidrofóbicas. Quando oxidados, os taninos se transformam em quinonas, que formam ligações covalentes com grupos funcionais das proteínas. A formação desse complexo depende não somente do tamanho, da conformação e da carga elétrica da molécula, mas também, do tamanho, do comprimento e da flexibilidade do tanino envolvido. Os tipos de ligações envolvidas no complexo tanino-proteína são: pontes de hidrogênios, interações hidrofóbicas, atrações eletrostáticas e ligações covalentes (HOFF *et al.*, 1980; SGARBIERI, 1996; SILVA, SILVA, 1999; NACZK *et al.*, 2001;).

3.5 Propriedades funcionais

Segundo a bibliografia consultada, os pesquisadores indicam que as propriedades funcionais das proteínas são características físico-químicas, que lhes permitem contribuir para as características desejadas de um alimento. Ribeiro e Saravalli (2007) definem as propriedades funcionais como as propriedades físico-químicas que afetam seu comportamento em sistemas alimentares durante a preparação, o processo, o armazenamento e o consumo, contribuindo para a qualidade e os atributos sensoriais dos alimentos. O somatório dessas propriedades é referido como “funcionalidade”. As principais propriedades funcionais das proteínas são aquelas que as tornam capazes de contribuir para as características desejáveis de um alimento. (FARFAN, 1994)

Normalmente, usa-se, nos alimentos, proteína isolada, devido as suas propriedades funcionais únicas, quer dizer, sua habilidade para produzir uma aparência desejável, textura e estabilidade. O mais típico é usar proteínas como agentes gelatinizantes, emulsificadores, espumantes e emagrecedores. Muitas proteínas de alimentos são enzimas (globulinas) capazes de promover certas reações químicas. Essas reações podem ter um efeito favorável ou não nas propriedades dos alimentos. Os analistas de alimentos estão muito interessados em conhecer a concentração total, o tipo, a estrutura molecular e as propriedades funcionais das proteínas presentes nos alimentos (FARFÁN, 1994).

As propriedades funcionais das proteínas alimentícias podem ser classificadas, segundo Ribeiro e Saravalli (2007), em três grupos:

1. As propriedades de hidratação, que dependem das interações entre água e proteínas, entre as quais, temos a absorção e a retenção de água, molhabilidade, formação de gel, adesividade, dispersibilidade, solubilidade e viscosidade;

2. As propriedades relacionadas com interações proteína-proteína: nesse grupo, encontram-se a formação de gel, a coagulação, a formação e as estruturas como fibras e glúten;

3. As propriedades de superfície, onde se encontram as emulsificações, a formação de espuma e a formação de películas.

A composição química, as propriedades físico-químicas e as propriedades funcionais de um alimento definem a sua qualidade. A composição caracteriza-se pela quantidade de seus componentes; as propriedades nutricionais, pela presença de nutrientes essenciais, e a sua biodisponibilidade e as propriedades funcionais são as que determinam a sua utilização (RIBEIRO, SERAVALLI, 2007).

Farfán *et al.* (1994) afirmam que as propriedades físico-químicas e organolépticas de uma suspensão coloidal de proteínas mudam a textura, a cor, o flavor e a estrutura dos produtos alimentícios que contêm proteínas. As propriedades funcionais das proteínas refletem os atributos físicos que lhes são intrínsecos, como é a estrutura, a sequência de aminoácidos, a conformação e a composição, que são afetadas pelos outros componentes dos alimentos (água, lipídeos, carboidratos etc.), além do meio imediato, pH, temperatura, pressão e, ainda, pelo método de isolamento, precipitação, secagem e modificações químicas e enzimáticas.

Kinsella (1981) relata que as propriedades estruturais de algumas proteínas são as responsáveis pela proliferação de diversos alimentos com características flavorizantes, de estabilidade e textura elevada. Alimentos em forma de espuma e emulsão são dependentes de componentes proteicos presentes em níveis relativamente baixos.

Das propriedades funcionais que contribuem para as características tecnológicas e organolépticas dos alimentos, destaca-se o modo como a proteína interage com a água, a capacidade de formar espuma, a capacidade de emulsificar gordura e água, a viscosidade em suspensão aquosa, a capacidade de formar um gel, sua cor etc. (JOHNSON, 1982). No quadro 3, apresentam-se algumas propriedades relacionadas às suas respectivas aplicações.

Para prever as propriedades funcionais das proteínas, é necessária uma avaliação experimental, considerando-se os seguintes aspectos:

- a) Medidas concretas, como são a viscosidade, a tensão superficial e a solubilidade;
- b) Medidas simples, como são os aumentos do volume após cocção;
- c) Medidas teóricas, propriedades emulsificantes e espumantes.

Para a obtenção de previsões e de uma avaliação definitiva sobre a funcionalidade das proteínas ingredientes, o conhecimento dos métodos, sua ordem de execução, as condições ambientais e a combinação de um adequado conhecimento da composição química e de propriedades físicas sobre várias condições ambientais são necessários (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Quadro 3 – Classificação das propriedades funcionais usadas nos alimentos

| Propriedade funcional | Modo de ação | Uso em alimentos |
|------------------------------|---|---|
| Solubilidade | Solvatação de proteínas em função do pH | Bebidas |
| Absorção de água | Pontes de Hidrogênio com a água, retenção de água | Produtos de carne, pães, bolos, macarrão |
| Viscosidade | Espessamento, retenção de água | Sopas, molhos, chili |
| Coesão-adesão | Proteína atua como material adesivo. | Linguixas, patês de carne, carnes desidratadas, carnes simuladas, produtos de padaria, macarrão |
| Elasticidade | Ligação dissulfeto nos géis formados | Produtos de padaria, carnes simuladas |
| Emulsificação | Formação e estabilização de emulsões de lipídios | Salsichas, mortadela, linguixa, maionese, pães, bolos, sopas, chantilly simulado, sobremesas congeladas |
| Absorção de gordura | Retenção de lipídeos livres. | Salsichas, mortadela, linguixas, patês de carne. |
| Retenção de flavor | Adsorção, retenção, liberação. | Carnes simuladas, produtos da padaria |
| Controle de cor | Branqueamento, escurecimento | Pães, panquecas, waffles |
| Espumabilidade | Formação de filmes estáveis para reter gases (ar) | Coberturas para sobremesas, bolos, chantilly simulado |

Fontes: (CABRAL, MODESTA, 1982; CHEFTEL, 1989).

Segundo Sgarbieri (1996), as propriedades funcionais poderão determinar o campo de aplicação de um novo ingrediente proteico, assim como sua competitividade de mercado. O

autor, quando se refere à escolha da proteína a ser utilizada na elaboração de alimentos, afirma que as propriedades funcionais se equiparam a “impressões digitais”, que podem ser usadas na orientação do desenvolvimento de produtos e restringem a quantidade de teste em larga escala.

3.5.1 Solubilidade

Desde o ponto termodinâmico, a solubilização corresponde a uma dissociação simultânea das moléculas do dissolvente e das moléculas de proteínas, com uma superfície interfacial de máximo contato entre a proteína e o dissolvente. Então, para que a proteína possa se solubilizar, é necessário que reaja, o máximo possível, com o solvente.

A solubilidade é determinada como a primeira propriedade funcional que a proteína tem, em cada etapa de preparação ou de transformação de um ingrediente proteico, uma vez que o grau de insolubilidade é, provavelmente, a medida mais prática da desnaturação – agregação proteica (CHEFTEL, 1989). As proteínas que, inicialmente, estão no estado desnaturado ou parcialmente agregado, mostram, frequentemente, um decréscimo da capacidade de gelificação, emulsão ou formação de espumas. Do ponto de vista prático, os valores de solubilidade estabelecem:

- As condições ótimas de extração;
- As informações gerais sobre aplicações potenciais de proteínas em sistemas líquidos e em relação às demais propriedades funcionais dependentes de suas interações com a água;
- As condições úteis sobre a otimização de processamento;
- As condições de determinação dos efeitos do tratamento térmico, que pode afetar suas aplicações potenciais.

O fenômeno da solubilidade de uma proteína deve ser visualizado como a capacidade que um número substancial de grupos polares localizados na superfície da mesma tem para se solvatar na água através de pontes de hidrogênios (FARFAN, 1994). O número de grupos polares dependerá, inevitavelmente, das estruturas primárias, secundárias etc. que, em última

instância, determinarão também a densidade e a forma da macromolécula. Porém a capacidade de solvatação dependerá do pH e da força iônica μ do solvente.

Outras propriedades funcionais (emulsificação e espumação) são afetadas pela solubilidade. Quando essas propriedades funcionais são requeridas, uma proteína altamente solúvel é necessária. Proteínas com baixa solubilidade têm propriedades funcionais limitadas (WILDING *et al.*, 1984).

A solubilidade de uma molécula proteica é um processo simultâneo, que envolve umidificação, solvatação, dissolução e tumefação, e as ligações responsáveis pela solubilidade das proteínas em água são pontes de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, iônica (CHEFTEL *et al.*, 1989).

3.5.2 Capacidade de absorção de água

Os teores de capacidade de ligação com água, retenção de água e hidratação têm sido relacionados pela literatura para descrever a quantidade máxima de água que uma proteína pode absorver, e que essa capacidade de ligação é devido às pontes de hidrogênio que existem entre as moléculas de água e os grupos polares das cadeias proteicas (PATEL, FRY, 1987).

A interação de proteínas com a água, por determinar a conformação da proteína, é fundamental na qualidade da textura de vários alimentos, como os processados, produtos derivados da carne, pães, bolos, massas e sopas (CHEFTEL *et al.*, 1989).

A capacidade de absorção de água é uma indicação da quantidade de água retida dentro de uma matriz proteica sobre certas condições definidas. De acordo com Lin e Zayas (1987), a capacidade de retenção de água, quando as proteínas são utilizadas como componentes de produtos alimentícios, determina sua qualidade (aparência, textura, suculência, etc.). Essas propriedades têm sido usadas como um critério para a seleção de proteínas a serem adicionadas a alimentos formulados, especialmente derivados de carne.

Anusuya Devi e Venkataraman (1984) conceberam que a farinha e o concentrado proteico da microalga *Spirulina platensis* tem uma capacidade de absorção de água e de óleo de 220g/100g de amostra e 109g/100g de amostra, e de 440 g/100g de proteína e 145g/100g de proteína respectivamente.

3.5.3 Capacidade de absorção de óleo

O mecanismo de retenção do óleo é atribuído às moléculas protéicas, e sua capacidade de ligação é muito importante quando for utilizada como substituta de carne, principalmente porque aumenta a retenção do flavor e melhora, consideravelmente, a sensação na boca.

Embora não tenha sido esclarecido, o mecanismo envolvido na interação proteína-óleo parece ser puramente físico, relacionado com as cadeias de aminoácidos hidrofóbicos existentes na molécula proteica (LIN, ZAYAS, 1987; ELIZALDE *et al.*, 1988).

Pesquisas realizadas sobre a capacidade de retenção de óleo pelas proteínas indicam, por exemplo, que a proteína da farinha desengordurada do germe de milho sofre com o aumento da temperatura (5-70° C), uma diminuição na capacidade de retenção de óleo. A alta viscosidade do sistema, a baixa temperatura, contribui para maior retenção. No feijão (*Phaseolus acutifolius*), o volume de óleo absorvido - 2,97 ml/g. – supera, com muita diferença, o volume de óleo absorvido pelo isolado proteico de soja (*Glycine max.(L.)Merr.*) (0,96 ml/g.) (LIN, ZAYAS, 1987; IDOURAINE *et al.*, 1991).

Segundo Idouraine *et al.*, (1991), a alta capacidade de absorção de óleo, pela globulina, está relacionada ao grande número de cadeias laterais dessa proteína (resíduos de aminoácidos “apolares”, sem carga), as quais se podem ligar às cadeias laterais hidrocarbônicas do óleo.

3.5.4 Propriedades emulsificantes

As emulsões são sistemas coloidais que contêm gotículas imiscíveis dispersadas em uma fase líquidas e estabilizadas por um composto tensoativo.

Segundo Cheftel *et al.*, 198 e Yao *et al.*, 1990, a propriedade emulsificante das proteínas tem muitas aplicações na indústria de alimentos, assim como em produtos derivados da carne, maionese, leite, pasta de panificação etc.

Os fatores relacionados com a estabilidade de emulsões são os seguintes:

- a) Redução de tensão interfacial entre os líquidos;

- b) Formação de uma barreira resistente na interface, que interfere mecanicamente à coalescência das gotículas de óleo;
- c) Presença de cargas elétricas de mesmo sinal na superfície das gotículas dispersas.

Outros fatores, como: diâmetro uniforme das gotículas emulsionadas, conseguidas custas de agitação intensa; concentração do agente emulsificante e forte viscosidade da fase dispersante são também relacionados à estabilidade de emulsões (ELIZALDE *et al.*, 1988).

Koyoro (1985), Sosulki e Mc Curdy (1987), Sheen (1991) e Idouraine *et al.*, (1991) expressam que a capacidade emulsificante do isolado de amendoim (*Arachis hypogaea*) é de 13,0 mL Óleo/100 mg; a do isolado de ervilha (*Pisium sativum*), 114 mL Óleo/100mg; a globulina de ervilha é de 118 a 188 mL Óleo /100 mg; o isolado de tremoço (*Lupinus albus L.*), de 100,0 a 210,0 mL óleo /100mg.; o isolado de feijão fava (*Aphis fabae*), de 38,6 mL óleo/100mg; a globulina de feijoeiro comum (*Phasolus acutifolius*), de 27,0 mL Óleo /100mg e a do isolado de soja, de 43,3 mL Óleo/100mg.

Araújo (1984) entende que se pode comparar confiavelmente a capacidade de emulsificação de proteínas somente quando a velocidade de agitação, a concentração, a taxa de adição de óleo e o pH para a máxima dissolução de proteínas forem otimizadas para cada amostra. Descrevam a dificuldade de se comparar dados da capacidade emulsificante de diferentes proteínas, em virtude da não padronização das condições praticadas na sua determinação.

3.5.5 Propriedades espumantes

As espumas alimentícias são dispersões de bolhas de gás, em uma fase líquida ou semi-sólida, que contém um surfactante. O agente surfatante, tal como a proteína, baixa a tensão superficial na interface entre o gás e o líquido, proporcionando estabilidade à espuma, por prevenir a coalescência das bolhas de gás dispersas no líquido (SOSULKI, 1987).

As propriedades das proteínas para formar e estabilizar espumas, têm vasta aplicação na indústria de alimentos, como na fabricação de suflês, suspiros, produtos de confeitaria e panificação (TOWNSEND, NAKAI, 1983; CHEFTEL *et al.*, 1989).

Na formação de um sistema espumante com proteínas, estudos relatam que são observados três estágios sequenciais:

- a) Difusão da proteína solúvel para a interface onde se concentra. Nesse estágio, a tensão superficial é reduzida;
- b) Desdobramento do polipeptídeo na interface com reorientações (polar-água, apolar-ar) e;
- d) Interação entre as cadeias polipeptídicas para formar filmes contínuos.

Um agente espumante efetivo deverá apresentar as seguintes características:

- a) Ser capaz de se difundir da solução para a interface. A cinética desse estágio depende, essencialmente, da grandeza de hidratação da molécula;
- b) Ser capaz de vencer a barreira eletrostática para adsorver-se;
- c) Ter uma proporção adequada de resíduos polares e apolares ao longo da cadeia peptídica;
- d) Ser pequena e apresentar flexibilidade molecular. A flexibilidade resultante do deslocamento relativo de proteínas complexas ou de subunidades é uma das características controladoras mais importantes do poder espumante de proteínas;
- e) Apresentar estrutura terciária capaz de formar filmes resistentes na interface;
- f) Poder atuar rapidamente com moléculas adjacentes para formar filmes estáveis (LE MESTE, 1990).

Existem numerosos fatores que influenciam as propriedades espumantes das proteínas, a saber: fonte proteica, método de preparação, composição, solubilidade, concentração, pH, temperatura e duração do aquecimento, presença de sais, açúcar, lipídios e, naturalmente, o método de medição. O efeito desses fatores e suas inter-relações têm sido estudados em vários sistemas, usando-se diferentes proteínas. No entanto, os resultados variam de acordo com as circunstâncias, e isso dificulta a generalização sobre a especialidade desses fatores (DEVI, VENKATARAMAN, 1984).

Os métodos e os critérios empregados na determinação das propriedades espumantes são bastante variados, mas envolvem, essencialmente, a medida da capacidade espumante, a expansão e a estabilidade da espuma. Essas medidas são obtidas do volume da espuma formada e, por sua vez, originadas de uma preparação proteica de volume e de concentração conhecidos, depois de submetida a um dos diferentes métodos, baseados na agitação, no

burbulhamento ou no batimento. Esses métodos têm sido utilizados para determinar os efeitos das condições ambientais, tais como pH e pressão de NaCl, nas propriedades espumantes das proteínas (BRITEN, LAVOIE, 1992; PHILLIPS *et al.*, 2006)

3.6 Modificações químicas de proteínas

As proteínas podem ser modificadas intencionalmente para que se identifiquem e se relacionem sua estrutura e sua função, alguns grupos funcionais em sítios ativos de proteínas, desenvolvimento de novos produtos com propriedades modificadas. Essas modificações podem ser efetuadas por reações químicas, catalizadas ou não por enzimas, podem ser agrupadas nas seguintes classes:

- a) Acilação e reações relacionadas;
- b) Alquilação;
- c) Reduções e oxidações;
- d) Substituições do anel aromático.


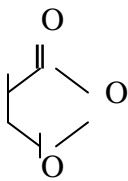
As primeiras pesquisas com proteínas foram realizadas pelo inglês, F. Sanger, nos anos 40, que identificou os aminoácidos N-terminais das duas cadeias polipeptídicas da insulina. A técnica de modificação química é considerada uma tecnologia muito antiga, usada no tratamento para curtir couros, em que as proteínas fibrosas (colágeno e queratina) eram tratadas com pigmentos fenólicos, criando um grande número de ligações cruzadas que faziam a proteína indigerível. Em relação aos alimentos, a reação de modificação química tem sido usada em diferentes casos, como por exemplo, no estudo de novas fontes de enzimas, reações de acetilação de algumas proteínas, enriquecimentos de proteínas com certos aminoácidos limitantes (MET e LYS) e modificações das propriedades de viscosidade e aderência das proteínas mediante tratamento com álcalis (Spun Protein). (FARFÁN, 1994).

As modificações por acilação promovem uma reação do grupo amino desprotonado, que dá origem a derivados de amidas, com propriedades que irão depender do reagente utilizado, entre estas temos as reações de acilação, como a succinilação e acetilação. (SGARBIERI, 1996).

Cheftel *et al.*, (1989) conceberam que as reações com agentes químicos podem ser utilizadas para modificar a carga elétrica das proteínas ou para fixar-se, pela ligação covalente, aos aminoácidos, lipídeos, etc. Os objetivos mais importantes dessas reações

procuram melhorar as propriedades funcionais das proteínas. As principais classes de reações utilizadas para a modificação química das cadeias laterais de aminoácidos são a acilação, a alquilação, a oxidação e a redução (Quadro 4). Em geral, a modificação dos grupos laterais de uma proteína motiva uma modificação da polaridade e, em alguns casos, da carga neta. Quando essas modificações são consideráveis, a proteína pode enrolar-se, desdobrar-se e/ou adicionar-se a outras moléculas de proteínas. Também pode modificar-se o comportamento da proteína em frente à água e outros constituintes, como os lipídeos.

Quadro 4 - Reatividade de grupos funcionais em proteínas.

| Reagente | Estrutura química | Cadeia lateral e outros terminais | | |
|--------------------|--|-----------------------------------|--------------------|--|
| | | -NH ₂ | -SH |  OH |
| Ácido nitroso | HONO | +++ | +++ | ± |
| Acrilonitrila | CH ₂ -CH-C ₂ N | ±± | +++ | |
| Anidrido acético | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 - \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \\ \text{CH}_3 - \text{C} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array}$ | +++ | +++ ^(b) | +++ ^(c) |
| Anidrido succínico |  | +++ | +++ ^(b) | ++ ^(b) |
| Formaldeído | CH ₂ O | +++ | +++ | +++ |
| Sulfitos | NSO ₃ | | ±±± ^(c) | |

Os sinais +, ++ e +++ indicam as reatividades relativas de cada grupo. Sinais ± significa que a reação ocorre sob condições especiais.

^(b) Reações reversíveis espontaneamente ou após diluição;

^(c) Reações reversíveis.

Fonte: FARFÁN *et al.*, (1994)

A introdução de grupos carboxilas ionizáveis pode realizar-se pela acilação com anidridos internos de ácidos bicarboxílicos (succinilação, maleilação) ou pela fosforilação. A presença de cargas negativas adicionais provoca a repulsão eletrostática, o desdobramento e a dissociação. Essa carga negativa suplementaria melhor a solubilidade e/ou a dispersibilidade.

Esse fenômeno pode facilitar a extração de proteínas microbianas ou vegetais assim como a sua separação dos ácidos nucleicos e outros constituintes. Também se comprovou que

a introdução de grupos ionizáveis melhora a capacidade de absorção da água e a sua estabilidade ao calor e aumenta a sensibilidade à precipitação pelo cálcio. Esses efeitos já foram observados nas proteínas do pescado, da soja e do glúten (CHEFTEL *et al.*, 1989).

O grau de reatividade das cadeias laterais depende de vários fatores, como por exemplo:

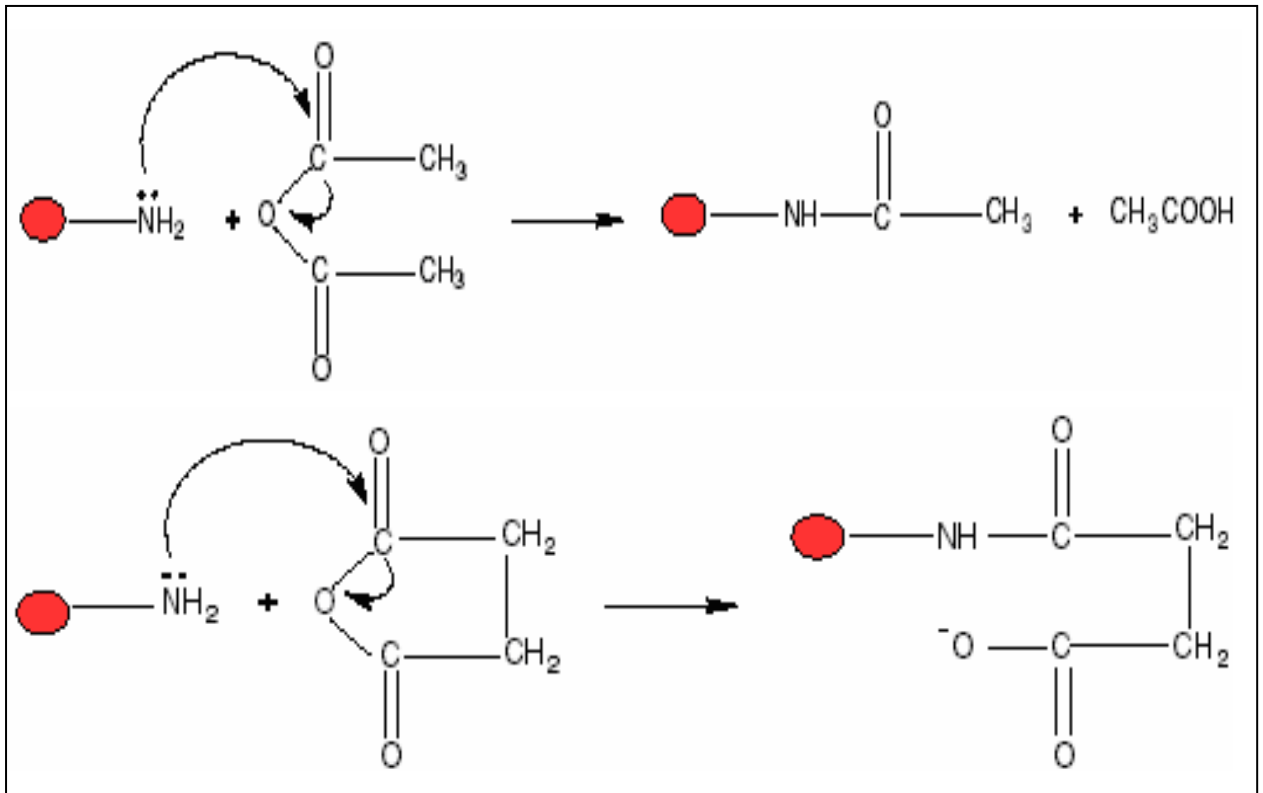
- A natureza química do grupo funcional;
- O Estado de exposição estérica ou a acessibilidade da cadeia lateral;
- O pH do meio.

A importância do pH na reatividade da proteína, frente a esse ou àquele reagente, fica evidente, uma vez reconhecido que o principal fator determinante da reação é o estado de protonação (ou desprotonação) dos grupos funcionais chaves do polímero. No Quadro 4, demonstra-se a reatividade dos diversos grupos funcionais com os reagentes na química de proteínas.

Farfán *et al.*, (1994) indicam que, de todos os reagentes utilizados, poucos têm sido estudados visando a sua possível aplicação direta em proteínas para consumo, como o anidrido acético e o anidrido succínico, que produzem mudanças favoráveis nas propriedades funcionais de certos concentrados e isolados proteicos.

A figura 5 descreve as reações dos grupos amina livre das proteínas com os anidridos acético e succínico. É importante explicar que, à medida que vai sendo substituído o hidrogênio do grupo amina, a proteína perde cargas positivas, sendo necessário acrescentar, gradativamente, uma base forte como hidróxido de sódio para contrabalançar essa perda e neutralizar o ácido formado na reação.

As proteínas modificadas com anidrido acético e succínico (isolado proteico de soja, concentrados proteicos de folhas, glúten de trigo e proteínas da gema do ovo), de modo geral, as propriedades de solubilidade, corpo (volume específico), capacidade emulsificante, estabilidade da emulsão, capacidade espumante e estabilidade da espuma, cor e sabor melhoram após a acilação.



Fonte: LAWAL, ADEBOWALE (2006).

Figura 5 - Esquema da reação de acetilação e succinilação das proteínas.

El-Adawy (2000), indica que as proteínas aciladas podem ser utilizadas na preparação de muitos produtos, como branqueadores de café, agentes flavorizantes para carne assada, bebidas carbonatadas, maioneses e molhos para salada, margarina e sorvetes. A acetilação elevou a solubilidade e a absorção de água e óleo do isolado protéico de algaroba (SILVA, BORA e QUEIROGA NETO, 1997), feijão (LAWAL, ADEBOWALE, 2006). A succinilação aumentou a capacidade de solubilidade, de emulsão e de espumação do isolado protéico da castanha-do-pará (RAMOS e BORA, 2005), assim como Laval (2005) para o feijão bangalô.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi iniciada nos laboratórios da *Facultad de Recursos del Mar* da *Universidad de Antofagasta*, no Chile, e finalizada nos laboratórios do Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos – DTQA - da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. A matéria-prima foi fornecida pelo Departamento de Alimentos da *Universidad de Antofagasta* – Chile.

4.1 Materiais

4.1.1 Cultivo e produção de biomassa da microalga *Spirulina máxima*

A biomassa da microalga *Spirulina maxima* foi obtida nos laboratórios da *Facultad de Recursos del Mar da Universidad de Antofagasta* – Chile.

Inicialmente, a cepa da microalga foi acondicionada nos laboratórios de *Biotechnologia e Cultivos Microalgal* do *Departamento de Aquicultura* da *Universidad de Antofagasta*. O cultivo foi feito mantendo-se a cepa da microalga em erlenmeyer de 250mL de capacidade, contendo 100mL do cultivo da microalga, o qual foi previamente esterilizado, em condições de cultivo controladas a 20°C., iluminação constante, sem aeração, com agitação manual periódica. Quando a biomassa alcançou densidades acima dos 100 mg·L⁻¹, os cultivos foram desdobrados em outros erlenmeyer, logrando-se obter finalmente o inóculo denso e em volume suficiente para iniciar o escalamento, da produção.

O escalamento e a estratégia do cultivo foram feitos a partir dos cultivos anteriores, desenvolvendo-se cultivos massivos em condições controladas, com agitação constante, por meio de borbulho com ar filtrado. A fonte luminosa foram lâmpadas fluorescentes (TDL) de 40 W, dispostos verticalmente sob uma estrutura metálica (Figura 6).



FONTE: Pesquisa própria.

Figura 6 - Sistema de cultivo microalgal da *Spirulina maxima*

O processo de cultivo se realizou sequencialmente, iniciando-se com volumes de 2 L até volumes de 20 L. Estes últimos foram utilizados como inóculo para iniciar o cultivo em condições exteriores. O inóculo obtido no laboratório foi agregado em reatores de 400 L e, posteriormente, em tanques de produção massiva (race-way), visando obter uma concentração inicial em cada race-way de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aproximadamente (Figura 7).



FONTE: Pesquisa própria.

Figura 7 – Sistema de cultivos em race-way da microalga *Spirulina maxima*

Antes da inoculação, o race-way foi enchido com 2.200 L de água potável e nutrientes (bicarbonato de sodio, carbonato de sódio). As concentrações desses compostos e de seus outros componentes foram obtidas das culturas utilizadas na etapa de laboratório.

Posteriormente, foi determinado o crescimento da biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e a sua produtividade durante o verão e o inverno, através da seguinte metodologia: tomou-se um volume conhecido dos cultivos (1L), concentrando-se as células por centrifugação (5000 rpm), filtrando-se a biomassa resultante da centrifugação, medindo-se, finalmente, por gravimetria.

4.2 Métodos

4.2.1 Processo de secagem da matéria-prima

A biomassa obtida dos race-way foi desidratada nos laboratórios do *Departamento de Química* da *Universidad de Antofagasta* – Chile – através do método de liofilização, utilizando-se um aparelho liofilizador de Marca LABCONCO, Modelo Freeze Dryer 5.

A biomassa seca da microalga foi analisada nos laboratórios do Departamento de Tecnologia Química e dso Alimentos (DTQA) junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal da Paraíba.

4.2.2 Obtenção da farinha desengordurada de *Spirulina maxima*

Para obtenção da farinha desengordurada, a partir da farinha integral de *Spirulina maxima* seca, foram seguidas as seguintes etapas: extração de lipídeos em aparelho de Soxhlet, utilizando-se n-hexano como solvente; distribuição da farinha desengordurada em bandejas de alumínio para a dessolventização a temperatura ambiente por um período de 24h; tamisação da farinha com malha de 40 *mesh*; acondicionamento em recipiente plástico e armazenamento sob refrigeração até o uso.

O fluxograma (Figura 8) representa as etapas de obtenção da farinha integral e farinha desengordurada, da microalga spirulina (*Spirulina maxima*).

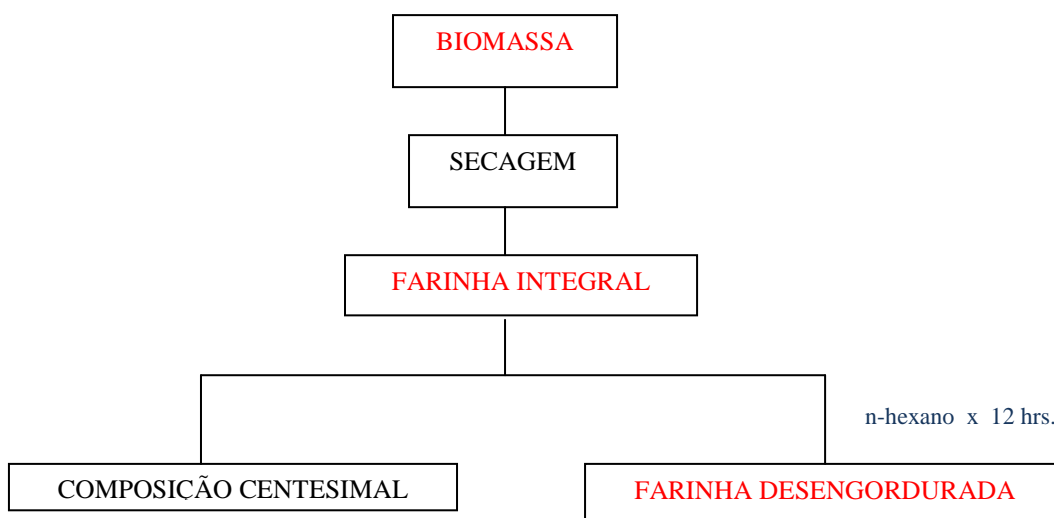


Figura 8 - Fluxograma das etapas de obtenção da farinha desengordurada da microalga spirulina (*Spirulina maxima*).

4.2.3 Composição centesimal

A farinha integral da microalga *Spirulina* foi avaliada em relação à umidade (perda por dissecação em estufa a 105°C, até peso constante), cinzas (resíduo por incineração em forno mufla a 500°C), lipídeos (extração semicontínua com n-hexano em aparelho Soxhlet) e proteínas (pelo método de Kjeldahl), segundo métodos indicados pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985).

O conteúdo de carboidratos totais foi determinado pela diferença de 100,0 com a soma dos percentuais dos demais componentes da composição centesimal.

4.2.4 Preparação do isolado protéico

A obtenção do isolado proteico foi realizado de acordo com o método indicado por Betschart e Saunders (1978), com os seguintes procedimentos: adicionou-se à farinha desengordurada água destilada na proporção de 1:10; a dispersão foi agitada durante 60 minutos e, ocasionalmente, ajustada a pH 10,0 com NaOH 1N; o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 5.000 G, em centrífuga refrigerada (MLW, mod. K 26 D); o resíduo foi extraído por mais duas vezes, nas condições anteriormente mencionadas. Em todas as extrações, foram determinados os volumes dos sobrenadantes e as respectivas concentrações proteicas. Os três

sobrenadantes foram combinados, medindo-se o volume total e a concentração de proteína, ajustando-se o pH a 5,0 com HCl sob agitação, provocando a precipitação das proteínas. Após centrifugação em refrigeração por 20 minutos a 5000 G, o precipitado foi coletado e lavado em água destilada, centrifugado novamente e, em seguida, liofilizado.

A figura 9 descreve o fluxograma dos processos de preparação do isolado proteico a partir da farinha desengordurada de *Spirulina maxima*.

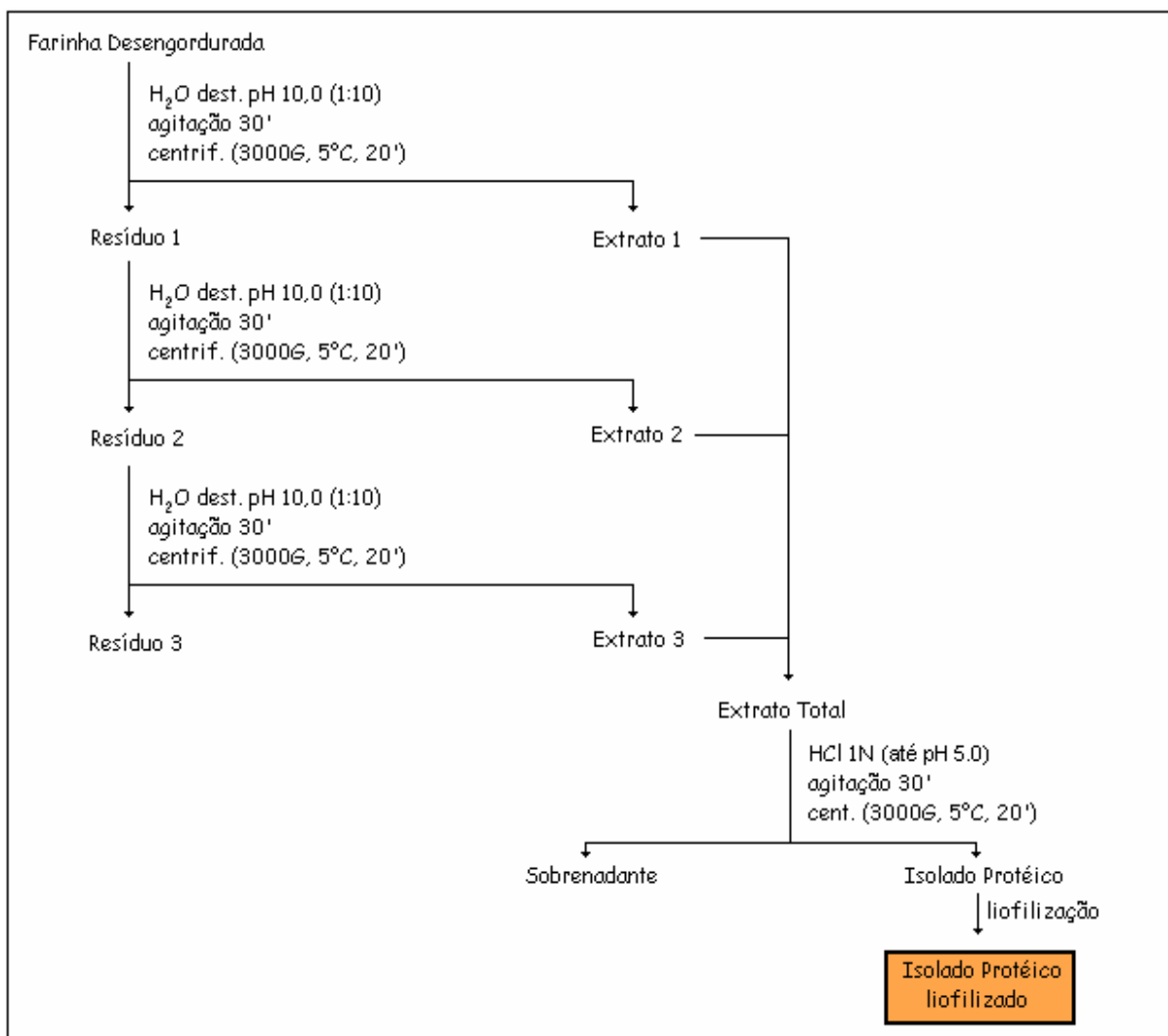


Figura 9 - Fluxograma das etapas de preparação do isolado proteico da microalga spirulina. (*Spirulina maxima*).

4.2.5 Caracterização da fração proteica da microalga *Spirulina maxima*

4.2.5.1 Fracionamento de proteínas

Para identificar e quantificar os diferentes tipos de proteínas que existem na microalga *Spirulina maxima*, foi utilizada a metodologia proposta por Osborne (1924) (Figura 10).

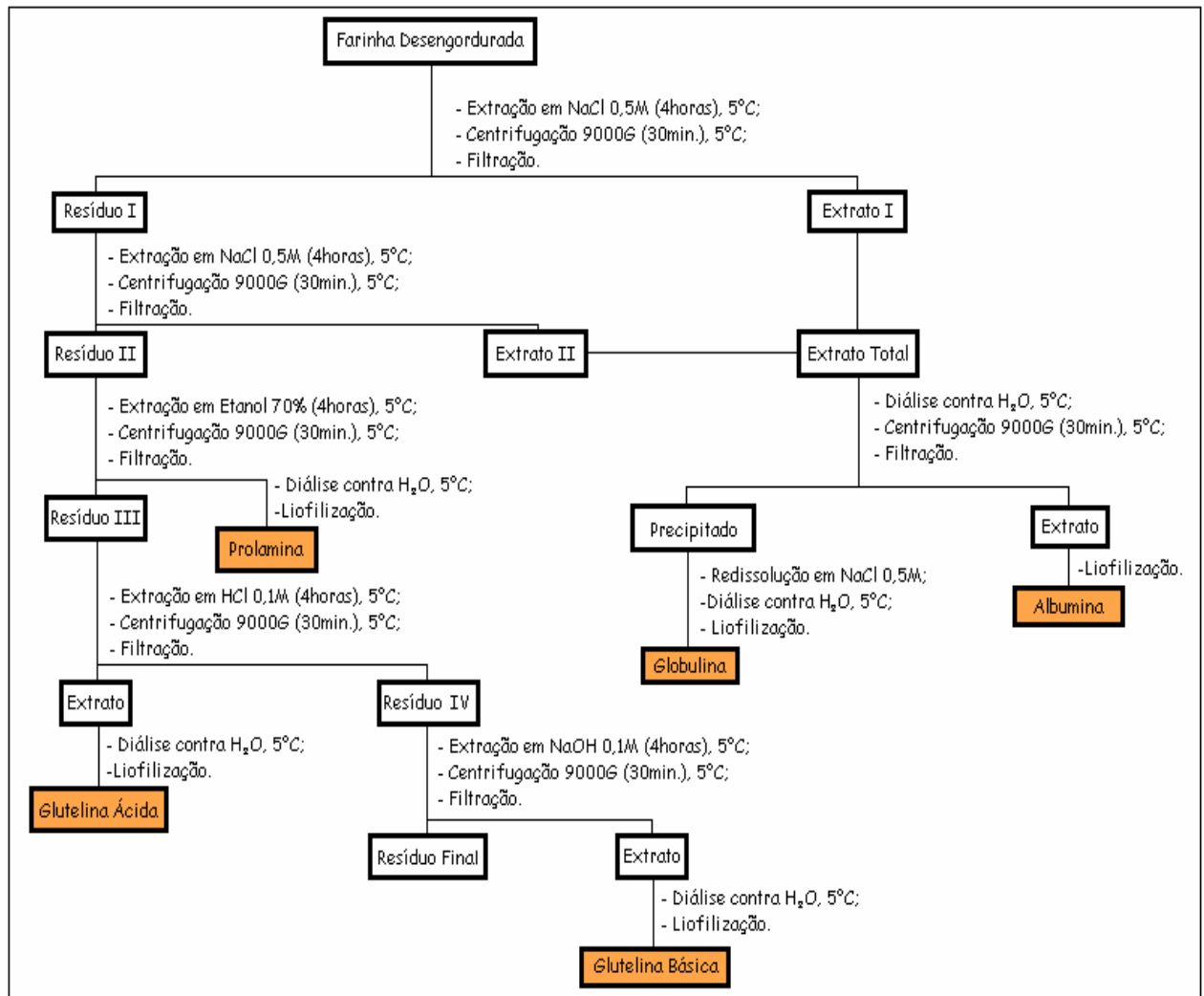


Figura 10 - Fluxograma de fracionamento do isolado proteico da microalga spirulina (*Spirulina maxima*).

Pesaram-se 15,0 g de farinha desengordurada de Spirulina (FDDSp) e dispostas em uma solução salina (cloreto de sódio 0,5 M), na proporção 1:10 (p/v) e agitadas durante 4 horas, à temperatura de 5°C. Após centrifugação, em centrífuga refrigerada (4°C, 5000G, 30 min.), o resíduo 1 foi ressuspenso e reextraído nas mesmas condições com a finalidade de melhorar o rendimento de extração e minimizar a presença das frações proteicas solúveis

nesse solvente e nos demais solventes extratores posteriores. Os extratos obtidos, depois de filtrado em papel de filtro qualitativo, foram reunidos e submetidos a diálise contra água destilada durante 74 horas (5°C) e, logo, foi realizada uma nova centrifugação, nas mesmas condições anteriores. O novo extrato obtido representou o volume contendo a fração de albumina e o precipitado, depois de ressuspensão em 15,0 ml de cloreto de sódio 0,5M e redialisado, representou a fração de globulina. Para a obtenção das demais frações o processo inicial anteriormente descrito foi repetido a partir do resíduo (2), tendo como mudanças o tempo de agitação que passou a ser de 2 horas e as soluções de extração. Para a fração de prolaminas o elemento extrator foi etanol 70% no resíduo (2), e nos resíduos (3) e (4), ácido clorídrico 0,1M para a fração de glutelina ácida e hidróxido de sódio 0,1M para fração de glutelina básica. Cada uma das frações foram submetidas ao processo de liofilização e acondicionadas em recipiente de vidro âmbar até posterior utilização e análises.

4.2.5.2 Análise eletroforética

A determinação do perfil eletroforético das proteínas totais da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Jacob-Lopez *et al.*, (2006) e proposta por Laemmli (1970).

O perfil foi avaliado em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e β -mercaptoetanol. As amostras (0,4% de proteína) foram diluídas em pH 10,0 em presença de SDS, glicerol, β -mercaptoetanol e azul de bromofenol, aquecidas a 95°C por cinco minutos e resfriadas. Alíquotas de 4 μ l de cada amostra foram aplicadas no gel (separador 15% e concentrador 4%). Após a corrida, os géis foram mantidos, por 12 horas, em solução corante de Coomassie Blue brilhante e, posteriormente, em uma solução descorante e fixadora (Metanol/Ácido Acético/Água destilada), até que ficassem apenas as manchas referente às proteínas, cujo peso molecular foi determinado e avaliado utilizando-se o padrão marcador proteico da SIGMA MARKER®, WIDE . RANGE 6.500 – 200,000, SIGMA S8445-TVL da Sigma-Aldrich Biotechnology LP, MW-SDS-200, contendo doze unidades, com os seguintes pesos moleculares: 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14,2 e 6,5 kDa. O gel corado foi fotografado em scanner, e a imagem obtida foi processada através do software *Scion Image*.

4.2.5.3 Análises térmicas

Foram determinadas as propriedades térmicas (temperatura de desnaturação – Td – e entalpia de desnaturação – ΔH –) da farinha desengordurada e do isolado proteico da microalga *Spirulina maxima*, através da calorimetria exploratória diferencial, segundo a metodologia proposta por Meng e Ma (2001).

As amostras foram analisadas por meio de um calorímetro de marca TA Instrument, modelo DSC 2920 Modulated DSC, sob ar sintético, com uma programação de aquecimento na faixa de temperatura entre 30 e 180°C, velocidade de 10°C/minuto e um fluxo de 50 mL/minuto.

As amostras foram dispostas em cadinhos de alumina, com peso equivalente a 1,0 mg de proteína e diluídas em 10 μ l de solução pH 10,0. As panelas foram seladas hermeticamente e dispostas no equipamento, para sua análise. Os termogramas foram realizados através do software Universal Analysis Program, Version 1.9D (TA Instrument).

4.2.6 Caracterização nutricional das proteínas da microalga *Spirulina maxima*

4.2.6.1 Determinação das propriedades antinutricionais

4.2.6.1.1 Taninos

A quantidade de taninos foi determinada na farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima*, de acordo com a metodologia proposta por Rangana (1979), utilizando-se a técnica de colorimetria, baseada na redução do ácido fosfotungstomolibdico a molibdato, fazendo a leitura a $\lambda = 760$ nm no espectrofotômetro marca QUIMIS[®], modelo Q798U2VS. Na preparação da curva-padrão, utilizou-se o ácido tânico (MERCK).

4.2.6.1.2. Inibidor de tripsina

Na determinação de tripsina, empregou-se o método descrito por Kakade *et al.* (1969) (Figura 11), que se baseia no ensaio caseinolítico, em que a concentração de peptídeos

solúveis em ácido tricloroacético resultantes da proteólise da tripsina foi medida no espectrofotômetro a $\lambda = 280 \text{ nm}$.

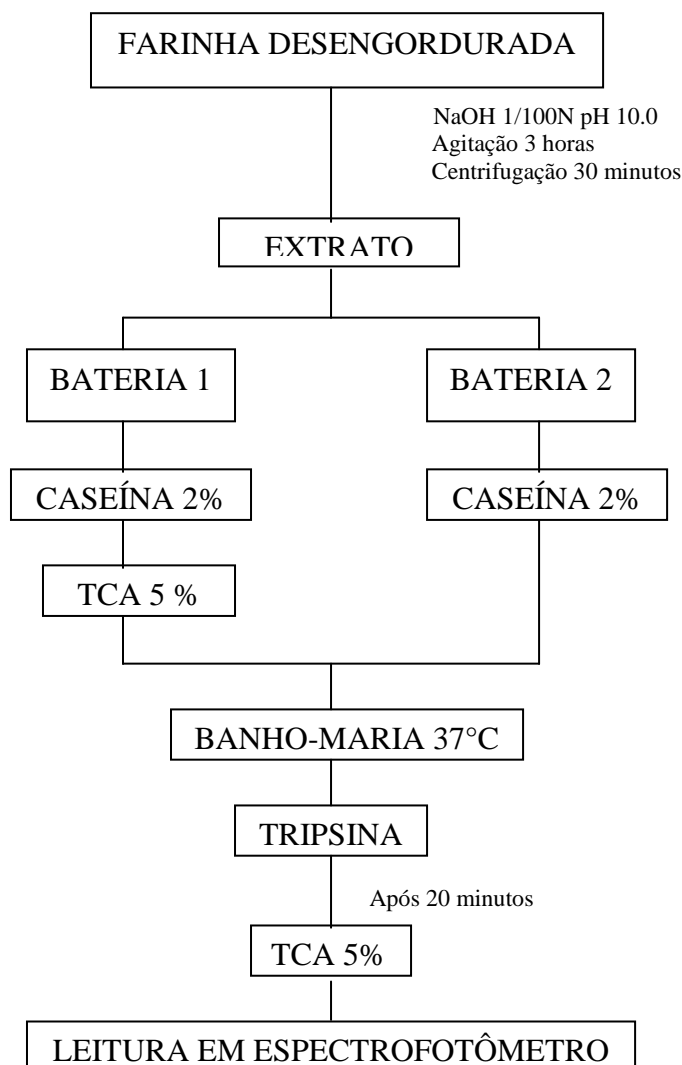


Figura 11 - Fluxograma da metodologia na determinação de inibidor de tripsina

Na preparação das amostras, procedeu-se à extração dos inibidores (farinha desengordurada de *Spirulina maxima*), com solução de NaOH 0,01N, ajustando o pH para 10,0 e determinando o teor proteico através do método de Biureto (GORNALL *et al.*, 1949). Posteriormente, foram preparadas duas baterias de tubos contendo 0,0; 0,2; 0,5 e 1,0 mL dos extratos das amostras (0,2% em solução tampão Tris-hidroximetil amino metano 0,1M pH 8,0). Os volumes foram completados para 2,0 mL com o mesmo tampão. Logo, adicionaram-se 2,0 mL de solução de caseína a 2,0%, previamente preparada em solução tampão Tris 0,1M

pH 8.0, e ajustada a temperatura a 37°C. Nos tubos da primeira bateria, foram adicionados 5.0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5.0%, na reparação dos brancos em cada concentração de proteína. Logo, as duas baterias foram dispostas em banho-maria, a 37°C, sendo adicionado a todos os tubos 1.0 mL de solução de tripsina, 25 ppm. Após 20 minutos, a reação foi interrompida nos tubos da segunda bateria, pela adição de 5.0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5.0%. Em seguida, as baterias foram removidas do banho- maria e deixadas em repouso por 30 minutos. Os conteúdos dos tubos foram filtrados (papel Whatman nº1), medindo-se no espectrofotômetro (QUIMIS[®], modelo Q798U2VS) as absorvâncias a 280 nm. Para efeito de comparação das amostras, foram relacionadas as médias de unidades de tripsina inibida vs mg de proteína.

4.2.6.1.3. Lectinas

A determinação de lectina - ou capacidade hemaglutinante - da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima* foi conduzida segundo a metodologia proposta por Barbosa *et al.*, (2001), baseado na capacidade que esses compostos detêm de aglutinar células sanguíneas.

A farinha da microalga foi submetida a extração, com várias soluções de tampão em diversos valores de pH (Tabela 1), sob agitação constante, durante 30 minutos, a uma temperatura de 25°C. A suspensão obtida foi centrifugada a 5.000G, a 4°C ,por 30 minutos, descartando-se o resíduo. O sobrenadante, denominado de extrato total, foi filtrado em papel de filtro e utilizado para análises de atividade hemaglutinate e dosagem de proteínas. Os índices de pH dos extratos foram baixados para pH 2,0 e centrifugados. O precipitado foi descartado e, no subrenadante, foi ajustado novamente o pH e feita a atividade hemaglutinante.

A atividade hemaglutinante dos diferentes extratos foi determinada por meio de diluições duplo-seriadas, com NaCl 0,15M e, a cada 200 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias nativas de coelhos, a 2% em NaCl 0,15M. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C, durante 30 minutos, e, em seguida, deixados em repouso a uma temperatura de 25°C por 30 minutos. A presença da atividade hemaglutinante foi determinada macroscopicamente.

Tabela 1 - Soluções tampões utilizadas na determinação de lectinas

| Tampão | Concentração | pH | |
|---------------|---------------------|-----------|-----------------|
| Glicina | 0,1 M | 2,6 | com NaCl 0,15 M |
| Glicina | 0,1 M | 9,0 | com NaCl 0,15 M |
| Tris-HCl | 0,1 M | 7,4 | com NaCl 0,15 M |
| NaCl | 0,5 M | --- | |

O teor de proteínas solúveis presentes nos extratos da farinha da *Spirulina* foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976). A cada 100µL de amostra, foram adicionados 2,5 mL de reagente de Bradford. Depois da agitação e do repouso por 10 minutos, procedeu-se à leitura a 595 nm em espectrofotômetro.

4.2.6.2 Composição de aminoácidos

A determinação de aminoácidos da amostra de farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por White, Hart e Fry (1986).

A amostra foi hidrolisada com ácido clorídrico 6 N, a 105°C durante 24 horas. Os aminoácidos liberados durante a hidrólise ácida foram reagidos com fenilisotilcianato (PITC), separados por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), de marca TSP, acoplado a um detetor U.V., em 254 nm, a bombas, misturador de efluentes, sistema de injeção em fase reversa, com coluna para aminoácidos livres (Pico Tag Column – For Free Amino acid analysis – Part N° WAT010950) e quantificados pela absorvidade UV em 254 nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível, com o auxílio do ácido alfa-aminobutírico (AAAB) como padrão interno. A leitura foi feita pelo software – PC 1000.

A determinação da composição de aminoácidos, nas amostras analisadas, foi determinada através da comparação dos tempos de retenção e das áreas dos picos obtidos para cada aminoácido na amostra em estudo, com os tempos de retenção e áreas dos picos correspondentes de um padrão de aminoácidos - (PIERCE – Part. N° 20088 – Amino Acid Standard H – HCl 0,1 – 2,5 umols).

O cálculo do escore ou índice químico de aminoácidos foi obtido através da equação 1.

$$EQ = \frac{\text{g de amino ácido / 100g de proteína}}{\text{g de aminoácido / 100g de proteína no padrão - referência}} \quad (1)$$

O padrão de referência de aminoácido essencial FAO-WHO-UNU (1991) foi utilizado para comparar e calcular o escore químico, a determinação dos aminoácidos limitantes da proteína em estudo e o valor biológico respectivo.

4.2.7 Modificações químicas da proteína da microalga *Spirulina maxima*

4.2.7.1 Acetilação do isolado proteico de *Spirulina maxima*

O processo de modificação por acetilação do isolado proteico da microalga *Spirulina maxima* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Groninger (1973). O isolado proteico foi disperso em água destilada, em uma proporção de 1:10. O pH da solução foi ajustado para 10.0 pela adição de NaOH 1M em baixa temperatura (2 - 4°C). Além disso, adicionou-se nitrado acético à solução em diferentes concentrações (1.0, 2.5, 5, 10 e 15%). O pH da solução foi mantido entre 8,0 e 8,5, com agitação constante. A reação foi considerada completa, quando o pH se manteve estabilizado. O isolado proteico acetilado foi precipitado isoeletricamente (pH 5.0) e, em seguida, centrifugado a 5000G durante 20 minutos. O precipitado foi, então, lavado com água destilada sob agitação, novamente centrifugada a 5000G, por 20 minutos, congelado e, em seguida, liofilizado. A figura 12 descreve o fluxograma dos processos de modificação por acetilação do isolado proteico de farinha de *Spirulina máxima*.

4.2.7.2. Succinilação do isolado proteico de *Spirulina máxima*

A metodologia utilizada para o processo de modificação química por succinilação foi idêntica à que foi empregada na modificação por acetilação, substituindo-se o anidrido acético pelo succínico, nas mesmas condições e concentrações. Na figura 12, está exposto o

fluxograma dos processos de modificação por succinilação do isolado proteico da farinha de *Spirulina maxima*.

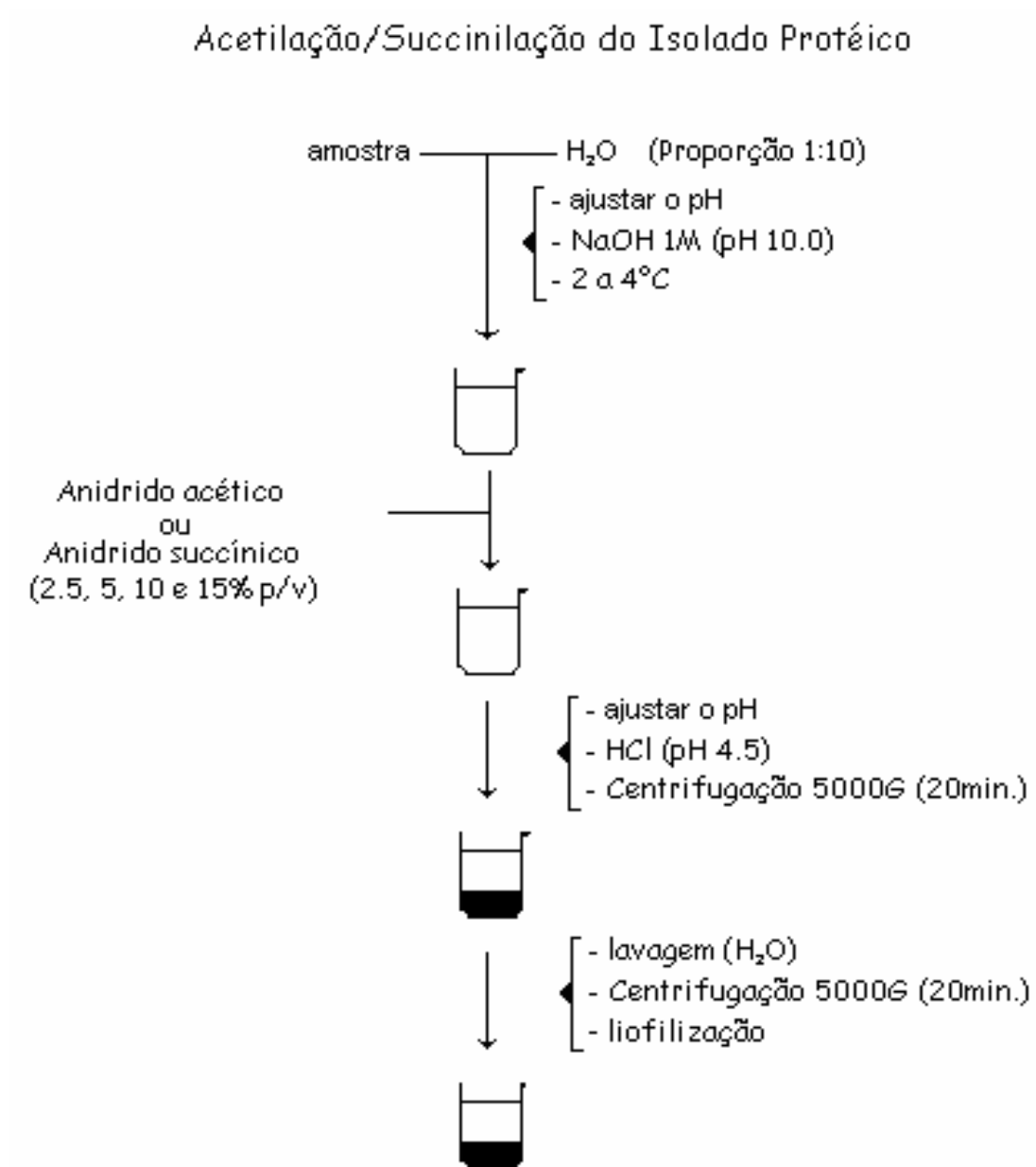


Figura 12 - Fluxograma do processo de modificação química por acetilação e succinilação do isolado proteico de *Spirulina maxima*

4.2.7.3 Grau de modificação

O grau de modificação dos isolados proteicos foi determinado colorimetricamente, de acordo com a metodologia proposta por Beckwitt *et al.*, (1975), pela avaliação da lisina

disponível, formando derivados coloridos da reação com ninidrina, produzidos em um sistema dimetil sulfoxida-DMSO. A absorbância foi medida a 580nm. A diferença entre os derivados DMSO dos isolados proteicos modificados em diferentes níveis e o isolado não modificado foi usada como índice do grau de modificação.

4.2.8 Determinação das propriedades funcionais do isolado não-modificado, do acetilado e do succinilado da microalga *Spirulina maxima*

4.2.8.1 Solubilidade

A solubilidade do isolado proteico não-modificado e modificado por acetilação e succinilação da microalga *Spirulina maxima* foram analisada por meio do método proposto por Dench, Rivas e Caygill (1981). O índice de solubilidade de proteínas foi expresso em porcentagem. As amostras foram diluídas em água destilada, e o pH equilibrado, em agitação constante. As suspensões foram centrifugadas, o volume medido, e as alíquotas foram tomadas para a obtenção das proteínas solúveis por meio do método de Biureto (GORNALL *et al.*, 1949).

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Quantidade de Proteína no Sobrenadante}}{\text{Quantidade de Proteína na amostra}} \times 100 \quad (2)$$

Foram tomadas 125 mg das amostras e dispersos em 25 mL de água destilada, juntando-se os valores de pH das soluções em 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 10.0 e 12.0, empregando-se HCl (0,5M) e NaOH (0,5M), sob agitação constante, feita em um agitador magnético em temperatura ambiente. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 5000G durante 20 minutos a 4°C. A proteína contida no sobrenadante foi determinada pelo método de Biureto. O perfil de solubilidade foi obtido pela relação da quantidade de proteína no sobrenadante e da quantidade de proteína na amostra, segundo a equação 2.

4.2.8.2 Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água do isolado proteico não-modificado e do modificado por acetilação e succinilação da microalga *Spirulina maxima* foi determinada pelo método descrito por Sosulski *et al.*, (1976). Amostras desses isolados não-modificados e modificados, equivalentes a 0,15g em proteínas, foram pesadas em tubos de centrífuga graduados, e um volume de 1,5 mL de água destilada foi acrescentado. Em seguida, procedeu-se a uma agitação por 1 min, em agitador de tubos, até toda a massa ficar em suspensão. Após 30 min, com agitações ocasionais, os tubos foram centrifugados a 3.000G durante 10 min. Além disso, descartaram-se sobrenadantes resultantes, tomando-se os pesos das amostras úmidas. A capacidade de absorção de água foi dada pela diferença entre o peso da amostra úmida e o peso da amostra seca. Os resultados foram expressos em mL de água/g proteína.

4.2.8.3 Capacidade de absorção de óleo

A capacidade de absorção de óleo dos isolados proteicos não-modificados e modificados por acetilação e succinilação da microalga *Spirulina maxima* foi determinada pelo mesmo método descrito para a capacidade de absorção de água (SOSULSKI *et al.*, 1976). As amostras foram pesadas e, logo em seguida, dispostas em tubos de centrífuga graduados. Adicionou-se um volume conhecido de óleo (1,5 mL), depois de agitados após agitação, os tubos foram centrifugados, medindo-se o volume do sobrenadante.

4.2.8.4 Propriedades emulsificantes

4.2.8.4.1 Capacidade de emulsão

A capacidade de emulsão do isolado proteico não-modificado e modificados por acetilação e succinilação da microalga *Spirulina maxima* foi determinada usando-se a metodologia proposta por Hung e Zayas (1991). As amostras foram preparadas utilizando-se quantidades equivalentes a 1,0 mg proteínas/mL de água destilada. Sob agitação contínua, com um agitador magnético, na temperatura ambiente, o pH foi ajustado para valores de 3,0, 5,0, 7,0 e 10,0, com HCl 1,0N e NaOH 1,0N. Depois que o equilíbrio foi atingido em cada

um desses níveis de pH, prorrogou-se o tempo de agitação por 30 min. Volumes de 50 ml das dispersões foram transferidos para o béquer de 250mL, equipado com eletrodos conectados a um multímetro para registro de corrente elétrica (Figura 13). Em seguida, as dispersões foram agitadas a 10.000 rpm, adicionado-se, em fluxo contínuo (22 mL/minutos), óleo de soja (marca SOJA, BUNGE ALIMENTOS S.A.), desde um balão de separação graduado. O tempo necessário para que ocorresse a inversão da emulsão, acusado no registrador por queda brusca na corrente elétrica, foi obtido e utilizado para a determinação da quantidade de óleo necessário para promover a emulsificação e expresso em mL óleo/100 mg proteínas.

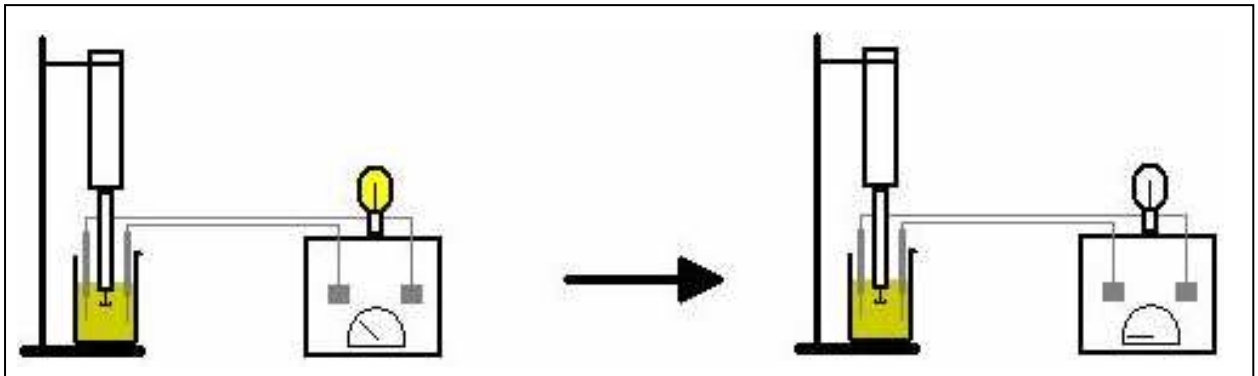


Figura 13 - Diagrama das etapas da análise da capacidade de emulsão dos isolados proteicos de *Spirulina maxima*

4.2.8.4.2. Atividade e estabilidade de emulsão

A atividade e a estabilidade de emulsão dos isolados proteicos não-modificados e modificados por acetilação e succinilação da microalga *Spirulina maxima* foram determinadas através do método descrito por Yasumatsu, Sawada e Morikata (1972). Dispersões dos isolados não-modificado e modificados foram preparadas utilizando-se quantidades equivalentes a 0,5 g de proteínas em 20 mL de água destilada, equilibradas em pH 3; 5; 7 e 10 com ácido clorídrico 1,0N e hidróxido de sódio 1,0N, sob agitação magnética contínua, na temperatura ambiente, durante 30 minutos. As dispersões foram transferidas para o copo de vidro do emulsificador e, em seguida, foram adicionados 20 mL de óleo de soja (marca SOYA, BUNGE ALIMENTOS S.A.). A emulsão formada a 10.000 rpm. (10.733 x g), durante um minuto de agitação, foi transferida rapidamente para tubos de centrífuga e centrifugada a 172 x G durante 15 minutos. O resultado da atividade da emulsão (AE) foi

expresso como percentual de emulsão formada no volume total através da equação 3.

$$\text{A.E. (\%)} = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{altura do conteúdo total}} \times 100 \quad (3)$$

A estabilidade das emulsões foi determinada pelo seu aquecimento a 80°C, durante 30 minutos, seguido de resfriamento em gelo, por 15 minutos e centrifugação a 172 x G por 15 minutos. A altura da camada emulsificada e a do conteúdo total foram medidas, e a estabilidade de emulsão (E.E.) foi calculada através da equação 4.

$$\text{E.E. (\%)} = \frac{\text{altura da camada emulsificada após aquecimento}}{\text{altura do conteúdo total}} \times 100 \quad (4)$$

4.2.8.5 Viscosidade relativa

A viscosidade relativa dos isolados proteicos não-modificados e modificados por acetilação e succinilação da microalga *Spirulina maxima* foi determinada segundo metodologia proposta por Dua, Mahajan e Mahajan (1996). Foram preparadas soluções dos referidos isolados nas concentrações de 1, 2 e 3% (p/v) e solubilizadas em pH 10, durante 30 minutos. A medida da viscosidade foi feita por meio de um aparelho viscosímetro de Ostwald's, em temperatura ambiente (29°C) e, logo após, de aquecimento (90°C) por 15 minutos, seguido de resfriamento a temperatura ambiente. A viscosidade foi expressa como viscosidade relativa.

4.2.8.6 Atividade e estabilidade de espumação.

A atividade e a estabilidade de espumação dos isolados proteicos não-modificados e modificados por acetilação e succinilação da microalga *Spirulina maxima* foram determinadas empregando-se o método descrito por Rahma e Rao (1984). Foram preparadas soluções de proteína, contendo 1% do isolado. O pH foi ajustado para 10 pela adição de NaOH 1N. As soluções foram agitadas com agitador durante cinco minutos, para formação de espuma. O volume de espuma inicial e depois de 5, 10, 30 e 60 minutos foi medido. Para avaliar a

atividade de espumação, utilizou-se o volume no tempo 0 e, para a estabilidade de espumação, o volume da espuma nos demais tempos observados. As análises foram realizadas em triplicata, e o resultado expresso representa a média das três medidas.

4.2.9 Análise estatística

Os dados relativos às propriedades funcionais dos isolados proteicos (solubilidade, capacidade de absorção de água, capacidade de absorção de óleo, capacidade de emulsão, viscosidade, atividade de espuma e estabilidade de espuma) foram inicialmente avaliados por meio da Análise Estatística de Variância (ANOVA), com as diferenças significativas determinadas pelo teste de Tukey. Os dados relativos à diferença de viscosidade da mesma amostra, coletados à temperatura ambiente e depois do aquecimento a 90°C, foram submetidos à análise estatística denominada “*t* de Student”.

Considerou-se o nível de probabilidade de erro (*p*) menor que 5% para determinar a significância em todos os testes, que foram efetuados através do programa SPSS for Windows – 11.0 (SPSS. INC, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo e produção da biomassa da microalga *Spirulina máxima*

A produção massiva de microalgas requer um sistema barato e confiável para o crescimento da biomassa algal. Na prática, o sistema desses desenhos de cultivos representa um compromisso entre os custos de inversão em relação aos retornos esperados. Porém, é necessário estabelecer condições adequadas para obter altas taxas de produção e assegurar um produto de alta qualidade (BECKER, 1986). Na figura 14, apresentam-se os resultados do comportamento cinético e a variação da concentração de biomassa (peso seco) da microalga *Spirulina maxima*, durante o verão e o inverno.

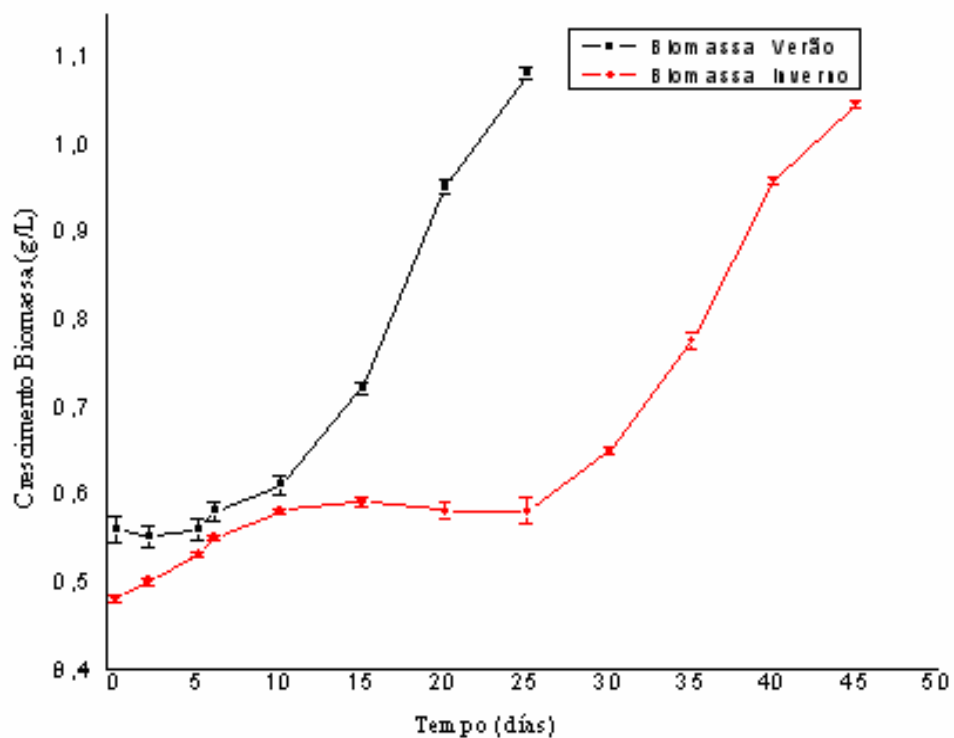


Figura 14 - Variação da concentração da biomassa (peso seco) da microalga *Spirulina maxima* durante o verão e o inverno.

Com base no gráfico e em resultados anteriores, pode-se observar um incremento contínuo na concentração da biomassa. Embora para as condições de verão e inverno se obtenham valores máximos similares ($1,04$ e $1,07 \text{ g.L}^{-1}$), respectivamente, o tempo geracional de crescimento é menor no verão (24 dias) que no inverno (45 dias). Na curva do inverno,

percebe-se uma estabilização no crescimento da biomassa dos dias 15 a 25 produto das variações climáticas próprias do período (temperatura, luminosidade etc) que geralmente são inadequadas para o cultivo. Porém, da perspectiva da produtividade do sistema de cultivo se consegue mais rendimento em biomassa no verão do que no inverno, como se observa na Tabela 2.

Tabela 2 - Taxa de crescimento e rendimento do cultivo da microalga *Spirulina maxima* mantido no raceway.

| Época estival | Biomassa (g.L⁻¹) | Rendimento (%) |
|----------------------|--|---------------------------|
| Verão | 1,07 ^a ± 0,03 | 23,63 |
| Inverno | 1,04 ^a ± 0,02 | 19,36 |

FONTE: Pesquisa própria.

Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão)

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste *t* de Student a 5%

Comparando esses resultados com estudos similares, Volkmann *et al.* (2008) estudaram o cultivo da *Arthrospira (Spirulina) platensis*, em diferentes meios, obtendo resultados superiores de 2,58 e 3,5 g.L⁻¹; Pelizer *et al.* (2003), estudando a *Spirulina platensis*, encontraram resultados de 1,3 g.L⁻¹; Olivera *et. al.*, (1999) analisaram o crescimento da *Spirulina maxima* e constataram um crescimento de 2,4 g.L⁻¹; já Richmond e Becker (1986) e Becker (1994) mostraram resultados similares, em relação ao estudo da *Spirulina* cultivada e produzida em diferentes lugares e em condições de intempérie. Comparando esses resultados com os obtidos neste estudo, constatou-se um menor valor na taxa de crescimento. Esse fato pode ser explicado, principalmente, pelas diferenças nas condições de cultivo, ambientais e na espécie da microalga estudada.

A maior taxa de crescimento e de rendimento do cultivo da microalga *Spirulina maxima* observada no verão pode ser explicada pelo fato de que essa alga é uma cianobactéria fotossintetizante, porém necessita de luz para poder efetuar esse processo bioquímico (fotossíntese), situação que é favorecida nesse período do ano, devido à alta presença de luz solar e ao conseqüente aumento da taxa de crescimento e rendimento da biomassa.

5.2 Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal da farinha integral da microalga *Spirulina maxima* são descritos na tabela 3. Dos diferentes componentes determinados experimentalmente, a fração proteica constitui o componente majoritário, alcançando valores de 54,93 %.

Tabela 3 - Composição centesimal da farinha integral da microalga *Spirulina maxima*

| <i>Constituintes</i> | <i>Teor (%)*</i> |
|----------------------|------------------|
| Umidade | 8,56 ± 0,04 |
| Cinzas | 13,05 ± 0,57 |
| Lipídeos | 6,84 ± 0,94 |
| Proteínas (N x 6,25) | 54,93 ± 0,90 |
| ENN (por diferença) | 16,62 |

FONTE: Pesquisa própria. LEGENDA: (%) - porcentagem.

Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão)

Os resultados apresentados neste estudo, quando comparados com outros estudos similares, mostram que existe uma concordância na caracterização dos diferentes componentes químicos da microalga *Spirulina maxima*. Habib *et al.*, (2008) descrevem que, segundo pesquisas feitas na Siam Algae Co.Ltd. (SAC), na Tailândia, obtiveram-se os seguintes resultados da análise química da *Spirulina*: Umidade, 6%; Cinzas, 6%; Lipídeos, 5%; Proteínas, 55% e ENN, 22%.

Estudos desenvolvidos na Bangladesh Agricultural University (BAU) trazem resultados muito similares aos obtidos neste estudo, a saber: Umidade, 9%; Cinzas, 11%; Lipídeos, 7%; Proteínas, 60% e ENN, 13%. No Institute of Post-Graduate Studies and Research Laboratory na Malásia, obtiveram-se os seguintes resultados: Umidade, 6%; Cinzas, 9%; Lipídeos, 6%; Proteínas, 61% e ENN, 18%. Volkman *et al.*, (2008) estudaram a *Spirulina platensis* cultivada em diferentes meios de cultivo e reportaram um conteúdo de proteína de 56,17 e 48,59% (HABIB *et al.*, 2008).

Rafiqul *et al.*, (2005), descreveram um conteúdo de proteínas na biomassa de *Spirulina* de 58,6 %. Resultado similar obtiveram Pelizer *et al.*, (2003), que descreveram um conteúdo de proteínas de 55,0 e 61,0%, em diferentes espécies de *Spirulina*. Valdívía e Muñoz (2006),

estudando a *Spirulina maxima*, encontraram resultados semelhantes aos deste estudo, quais sejam: Umidade, 9,35%; Cinzas, 13,46%; Lipídeos, 1,58%; Proteínas, 60,02% e ENN, 15,59%. Anusuya Devi *et al.*, (1981) obtiveram um conteúdo de proteína crua, para a *Spirulina platensis* de entre 50-55%, já Anusuya e Venkataraman (1984) encontraram para a *Spirulina platensis* os seguintes resultados: Umidade, 8,0%; Cinzas, 11,0%; Lipídeos, 0,5%; Proteínas, 50,0 % e ENN (carboidratos, fibras e ácidos nucleicos) de 30,0%. Outros estudos feitos com *Spirulina* revelaram valores inferiores em conteúdo de proteínas - 46 e 50 % - em peso seco (RICHMOND, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

A literatura indica que o conhecimento da composição química centesimal dos alimentos é uma importante informação para definir a utilização desses alimentos em dietas balanceadas nutricionalmente (SIKA *et al.*, 1995). Como se pode observar, os resultados obtidos são semelhantes aos que foram encontrados em outras pesquisas, indicando a concordância dos resultados deste estudo. O alto conteúdo de proteínas obtido neste estudo (54,93 %) é característico dessa espécie de microalga (*Spirulina*) e pode ser considerado como um recurso alimentar altamente proteico. Porém as diferenças em alguns nutrientes pode ser devido a diferenças da espécie de microalga estudada, métodos de análises e sistemas de cultivos da microalga.

5.3 Caracterização da fração proteica da microalga *Spirulina maxima*

5.3.1 Fracionamento de proteínas

Na tabela 4, apresenta-se a proporção relativa das frações proteicas da microalga *Spirulina maxima*, separadas de acordo com suas solubilidades em diferentes sistemas de solventes.

A amostra de *Spirulina maxima* apresentou os índices das frações de albumina de 37,03 %; glutelina básica, de 31,65 %, e globulina, 21,27 %, como as predominantes das proteínas analisadas e, em menor índice, as frações de prolamina (4,00%) e glutelina ácida (0,98%), o que difere do perfil das proteínas de reservas vegetais. A literatura consultada não faz referência a fracionamentos proteicos em microalgas.

Tabela 4 - Teor de proteínas das frações proteicas da microalga *Spirulina maxima*, de acordo com sua solubilidade.

| | Índices | |
|-----------------------|--------------|---------|
| | PFD* | PTE (%) |
| Albumina | 36,61 ± 1,46 | 37,03 |
| Globulina | 21,03 ± 0,87 | 21,27 |
| Prolamina | 3,95 ± 0,03 | 4,00 |
| Glutelina básica | 31,29 ± 0,73 | 31,65 |
| Glutelina ácida | 0,29 ± 0,32 | 0,98 |
| Proteína não extraída | 6,83 % | --- |

FONTE: Pesquisa própria.

LEGENDA: PFD – proteína da farinha desengordurada; PTE – proteína total extraída; (%) – porcentagem.

* Resultados das análises com média de três repetições (\pm desvio padrão)

Comparando esses resultados com algumas pesquisas realizadas com proteínas vegetais, Chavan *et al.*, (2001) obtiveram, para a semente de ervilha (*Pisum sativum*), valores superiores em albumina (43 %), globulina (41 %) e prolamina (4,5 %) e valores inferiores para glutelina (6,35 %). Chagas e Santoro (1997), estudando sementes de três variedades de feijão (*Phaseolos*), conseguiram valores superiores em globulina (45,5-57,2 %), valores semelhantes em glutelina (30,3- 40,2 %) e valores inferiores em albumina (9,8-12,2 %) e prolaminas (0,88-1,09 %). Estudos feitos com sementes de caupi obtiveram resultados superiores em globulina (66,6 %) e inferiores em albumina (24,9%), prolamina (0,7%) e glutelina (4,7%) (CHAN, PHILLIPS, 1994). Dhawan *et al.*, (1999) encontraram valores inferiores para as frações de albumina (8,39-12,31%) e glutelina (19,38-24,40%), valores semelhantes para a fração de prolaminas (3,12-6,89%) e valores superiores para a fração de globulina (53,44-60,29%). Nos estudos que realizou sobre a castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa H.B.K.*), Ramos (2002) (Anexo 1) obteve uma fração superior de globulina (72,99%) e quantidades inferiores das frações de albumina (16,89%), glutelina (9,67%) e prolamina (0,40%). Queiroga Neto (2005), estudando as proteínas da fava de morcego (*Dipteryx sp.*), chegou à conclusão de que globulinas (50,5%) e albuminas (24,1%) representaram as frações em quantidades principais, obtendo, como menores, a glutelina ácida (1,9%), a glutelina básica (11,9%) e a prolamina (0,3%). Para diferentes variedades de feijão (*Phaseolos*), Adebowale *et al.*, (2007) obtiveram como fração majoritária a mucuna (*Mucuna sp.*), a

albumina (63,5 – 69,4%), seguida da globulina (18,7 – 24,3%), prolamina (6,2 – 15,4%) e glutelinas (0,12 – 0,25%). Márquez (2008), em seu estudo sobre o fracionamento da castanha-de-caju (*Anacardium occidentale*), obteve os seguintes resultados: globulinas (71,32%); glutelina básica (13,30 %); albumina (9,04%); glutelina ácida (5,89 %) e prolamina (0,45 %). Todos esses dados demonstram a grande diferença entre as frações da proteína de *Spirulina maxima* e as proteínas de vegetais.

O índice de proteína total extraída (PTN) no fracionamento da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima* alcançou o valor de 93,17%, comparando estes resultados com outros estudos pode-se observar que o valor obtido foi superior que no da fava de morcego (*Dipteryx sp*) (88,7%) (QUEIROGA NETO, 2005), na castanha-de-caju (*Anacardium occidentale*), (90,07%) (SATHE, 1994), na faveleira com e sem espinho (*Cnidioscolus phyllacanthus (Mart.) Pax et K. Hoffm.*) (92,73%-92,57%) (CAVALCANTI, 2007), na castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa H.B.K.*) (91,27%) (RAMOS, 2002), no coco (*Cocos nucifera L.*) (83,6%) (KWON, PARK & RHEE, 1996) e no gergelim (*Sesamum indicum*) (84,9%) (DENCH, RIVAS & CAYGILL, 1981).

5.3.2 Rendimento do isolado proteico

Os índices de rendimento na extração e na precipitação de proteínas, verificados no processo de obtenção do isolado proteico da microalga *Spirulina maxima* estão descritos na Tabela 5, a seguir.

Tabela 5 - Extração e recuperação de proteínas na obtenção do isolado proteico de 100g de farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima*.

| | Proteína | |
|--|---------------------------|-------|
| | Massa (g) | % |
| Proteína total na farinha desengordurada | 61,14 ± 0,62 ¹ | 100 |
| Total das três extrações | 54,36 ± 0,91 ² | 88,91 |
| Precipitação isoeletrica | 46,81 ± 0,77 | 76,56 |
| Sobrenadante da precipitação isoeletrica | 7,55 ± 0,69 | 12,34 |
| Proteína não extraída | 6,78 ± 0,23 | 11,09 |
| Proteína total no isolado protéico | 95,44 ± 0,98 ¹ | |

* Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão)

¹ Kjeldahl; ² Biureto

Pode-se observar, na tabela 5, que o teor de proteínas (N x 6,25) da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima* e do isolado proteico foi de 61,14% e 95,44%. Quando comparado o conteúdo de proteínas (%N x 6,25) da farinha integral (54,93%) com a da farinha desengordurada (61,14%), constata-se um aumento do conteúdo, o que é explicado pela perda de lipídeos no processo de desengordurado. Segundo a bibliografia consultada, não existe informação a respeito do rendimento da proteína extraída da farinha em microalgas.

O percentual de proteínas extraídas no sobrenadante total da proteína em estudo (88,91%), quando comparado com tendências de outras fontes proteicas vegetais, apresentou-se inferior ao do tremoço (*Lupinus albus L.*) (91,03 – 91,25%) (EL-ADAWY *et al.*, 2001), do gérmen de trigo (*Triticum aestivum*) (90,20) (HETTIARACHCHY *et al.*, 1996) e da moringa (*Moringa oleifera*) (97,80) (AL-KAHTANI, ABOU-ARAB, 1993) e se apresentou superior ao da castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa H.B.K*) (81,3%) (RAMOS, BORA, 2003), da macadâmia (*Macadâmia integrifolia Maiden & Betch*) (83,00%) (BORA, RIBEIRO, 2004) e da fava de morcego (*Dipteryx lacunifera*) (86,10%) (QUEIROGA NETO, 2005).

Em relação ao rendimento do isolado proteico, o teor de proteínas recuperadas após precipitação isoelétrica foi de 76,56%, o que demonstra que esse resultado foi inferior ao da castanha-de-caju (*Anacardium occidentale*) (80,10%), (MARQUEZ, 2008) e da canola (*Brassica napus L.*) (87,5%) (KLOCKEMAN, TOLEDO, SIMS, 1997), porém superior ao da castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa H.B.K.*) (72,13%) (RAMOS, BORA, 2003), da macadâmia (*Macadâmia integrifolia Maiden & Betch*) (33,70%) (BORA, RIBEIRO, 2004) e da fava de morcego (*Dipteryx sp.*) (68,7 – 78%), (QUEIROGA NETO, 2005).

5.3.3. Análise eletroforética

Na figura 15, apresenta-se o perfil eletroforético no sistema PAGE-SDS-2βMe das proteínas presentes na farinha desengordurada (Fd) da microalga *Spirulina maxima*. A faixa Mp representa o marcador de peso molecular. As bandas das diferentes unidades polipeptídicas reveladas, mais e menos proeminentes, são observadas de acordo a seu peso molecular. Nessa figura, as características de mobilidade eletroforética das proteínas constituintes dos produtos analisados são mais perceptíveis.

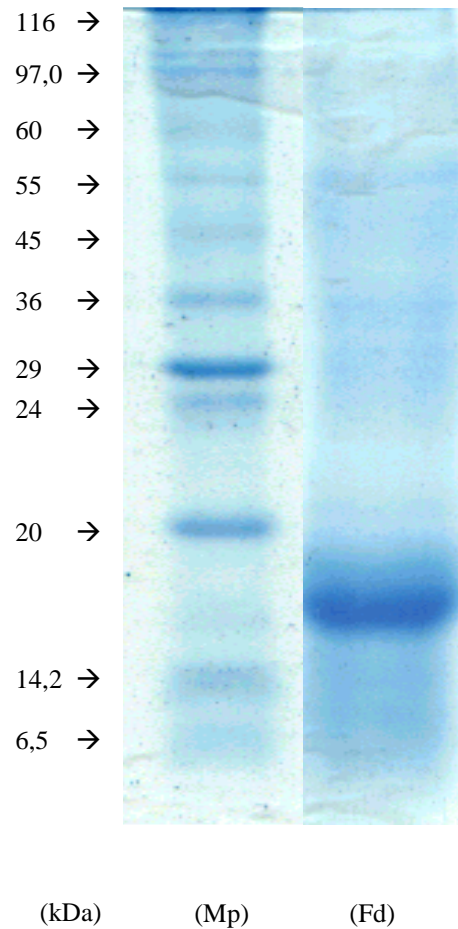


Figura 15 - Imagem da eletroforese em gel de policramida, em presença de SDS e 2 β Me, do marcador molecular (Mp) e farinha desengordurada (Fd) da microalga *Spirulina máxima*.

A farinha desengordurada (Fd) apresentou um total de 13 bandas na faixa de peso molecular entre 73,30 a 9,77 kDa. As subunidades proeminentes apresentaram pesos moleculares de 16,21 kDa e 15,74 kDa respectivamente, e as subunidades de 13,12 kDa, 11,69 kDa, 36,56 kDa, 65,76 kDa, 47,42 kDa, 73,30 kDa, 9,77 kDa, 45,70 kDa, 44,36 kDa, 25,23 kDa e 23,93 kDa foram reveladas sem proeminência.

Jacob-Lopez *et al.*, (2006) estudaram o perfil eletroforético das proteínas desidratadas sob diferentes condições da cianobactéria *Aphanothece microscópica Nägeli*, que se distribuíram em uma faixa de peso molecular entre 15 kDa e 62,5 kDa.

Venkataraman *et al.*, (1992) encontraram para a microalga *Spirulina platensis* um intervalo de peso molecular entre 14,3 e 66,0 kDa. Rouxel *et al.* (2001) pesquisaram a fração proteica das algas *Chondrus crispus*, *Palmaria palmata* e *Porphyra umbicalis*, utilizadas na alimentação humana, e obtiveram perfis semelhantes aos resultados deste estudo.

Jacob-Lopez *et al.* (2006), estudando a microalga *Aphanothece microscópica Nægeli*, observam-se quatro bandas bem definidas, sendo a proteica predominante, de peso molecular de 15 kDa. Outros autores, como Rouxel *et al.*, (2001) e Chronakis *et al.*, (2001), indicam que as variações do perfil eletroforético de microalgas se devem a fatores como: cultivo em diferentes estações do ano, temperatura de crescimento, pH, forma de isolamento, forma de desengordurar e preparação da proteína para análise.

Segundo a distribuição das diferentes unidades, pode-se observar que 53,8 % das bandas se encontram na faixa de peso molecular de 16 kDa, o que denota que, dessa forma, a tendência das proteínas da microalga *Spirulina maxima* é de caracterizar-se em baixos pesos moleculares, situação que é observada na maioria dos pesos moleculares das microalgas.

5.3.4 Análise térmica

Os parâmetros de temperatura de desnaturação (T_d) e variação de entalpia (ΔH) foram examinados para avaliar a estabilidade térmica das proteínas da microalga *Spirulina maxima*, quanto a sua desnaturação. A figura 16 representa o termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da farinha desengordurada de *Spirulina maxima* e a figura 17 representa o termograma de calorimetria exploratória diferencial do isolado proteico da referida espécie.

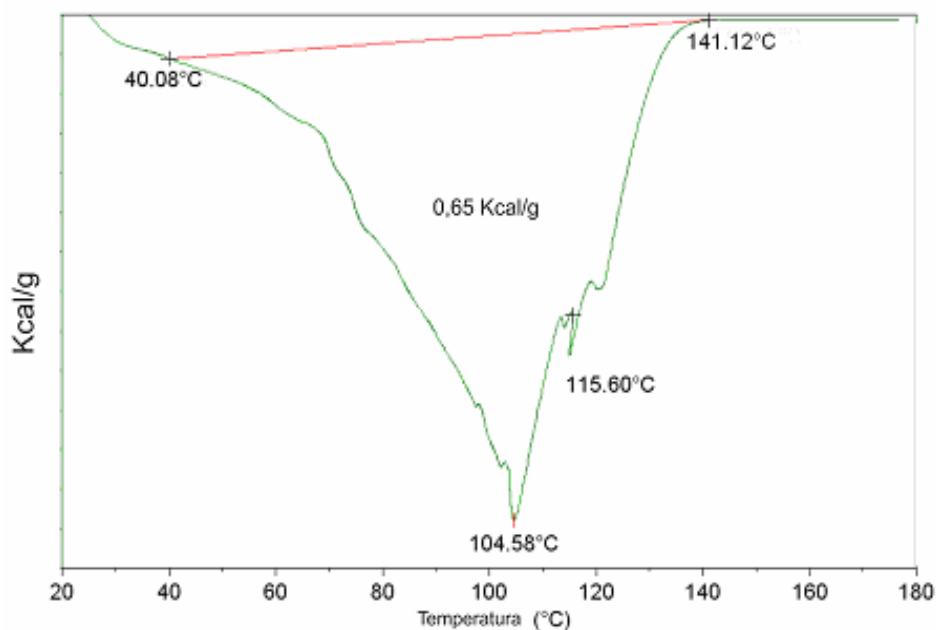


Figura 16 - Termograma e curva da estabilidade térmica da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima*.

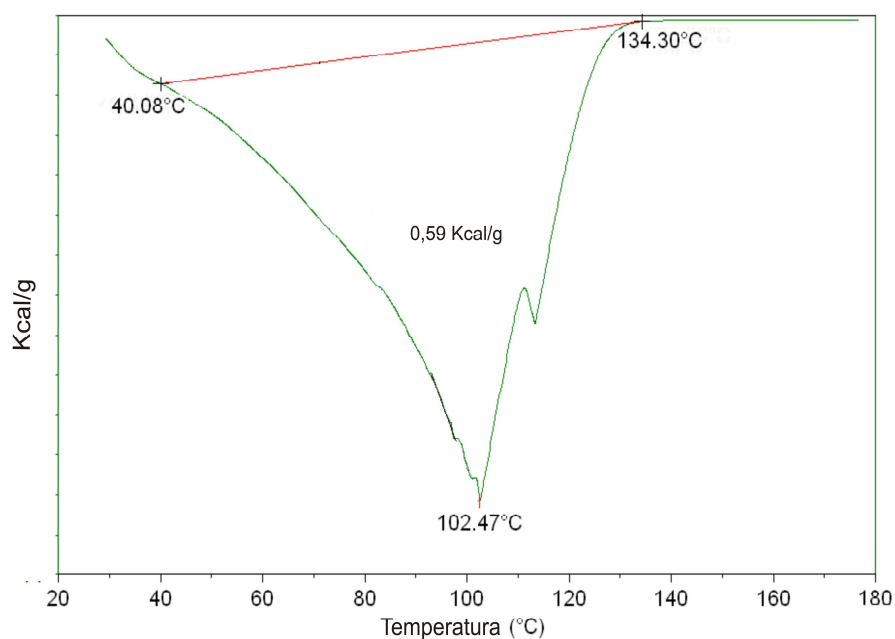


Figura 17 - Termograma e curva da estabilidade térmica do isolado proteico da microalga *Spirulina maxima*

Os gráficos acima indicam uma transição e tendência endotérmica (produto da decomposição) e desnaturação das proteínas. Na farinha desengordurada, há dois picos endotérmicos nas temperaturas de 104,58°C e 115,60°C; no isolado proteico, foram nas temperaturas de 102,47 e 114,3°C. A desnaturação proteica se caracterizou pela quebra das ligações do hidrogênio, expondo os grupos hidrofóbicos que são atraídos para formarem ligações cruzadas do tipo dissulfeto, os quais formam redes capazes de reter água e formar o ponto do gel. Os dois picos endotérmicos (farinha e isolado) foram relacionados à desnaturação de proteínas. Em relação à energia de transição, pode-se afirmar que a farinha desengordurada apresenta uma maior energia de transição (0,65 Kcal/g) que o isolado proteico (0,59 Kcal/g), razão por que se comprova que a farinha desengordurada tem uma temperatura de desnaturação menor que o isolado, principalmente devido a sua concentração. Na tabela 7, encontram-se as entalpias e as temperaturas das transições das amostras de farinha desengordurada e isolado proteico da microalga *Spirulina maxima*.

Tabela 6 - Parâmetros de avaliação da estabilidade térmica da farinha desengordurada e do isolado proteico da microalga *Spirulina maxima*.

| <i>Parâmetro</i> | <i>Amostras</i> | |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | <i>FD</i> | <i>IP</i> |
| Intervalo de temperatura (°C) | 40,08 – 141,12 °C | 41,37 – 134,30 °C |
| Temperatura de pico (Td) (°C) | 104,58 °C | 102,47 °C |
| ΔH (Kcal.g ⁻¹) | 0,65 Kcal.g ⁻¹ | 0,59 Kcal.g ⁻¹ |

FONTE: Pesquisa própria.

LEGENDA: FD – farinha desengordurada; IP – isolado proteico; ΔH – variação de entalpia.

Chronakis (2001), estudando o comportamento do isolado proteico da *Spirulina platensis*, extraído com uma solução tampão Tris-HCl 0,1M., encontrou dois picos endotérmicos com temperaturas de transição de 67 e 109°C. Queiroga Neto, (2005) descreve a presença de dois picos endotérmicos para o isolado proteico de fava de morcego extraído a pH 10,0, com temperaturas de transição de 79,1 e 110,9°C e ΔH de 721,8 e 310,7 cal/g respectivamente.

As diferenças entre os valores de Td e ΔH podem ser atribuídas a diferentes fatores, como por exemplo: ligação com metais e outros grupos prostéticos, composição de aminoácidos, forma de empacotamento na interação proteína-proteína e ligações, interações intramoleculares, fatores ambientais, como o pH e a força iônica, tipo de solvente e preparação da amostra (MARCONE, KAKUDA, YADA, 1998; MENG, MA, 2001).

5.4 Caracterização nutricional das proteínas da microalga *Spirulina maxima*

5.4.1 Propriedades antinutricionais

5.4.1.1 Taninos

A bibliografia consultada não faz referência a estudos realizados com determinação de taninos em *Spirulina*. Neste estudo o teor de taninos presente na farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima* foi de 17,5 mg/g. Esse conteúdo de taninos está relacionado

diretamente com a presença do pigmento antocianina, o qual se encontra na microalga *Spirulina maxima*.

Relacionando esse resultado com outros estudos, pode-se observar que, para as amêndoas de fava de morcego (*Dipteryx laciniifera*), Queiroga Neto, (2005) encontrou um valor superior para a farinha desengordurada com tegumento (18,3 mg/g). No caso da farinha de amêndoa de baru, estudada por Togashi e Sgarbieri (1994), e que foi desengordurada com hexano, não houve índice de tanino. Lourenço (2004) encontrou teores de 4,79 e 4,06 mg/g nas farinhas desengorduradas de canola, das variedades Hyola 60 e 420, sendo inferior ao conteúdo encontrado na farinha de *Spirulina maxima*.

5.4.1.2 Inibidor de tripsina

Segundo a metodologia aplicada para determinar a atividade inibitória de tripsina na farinha da microalga *Spirulina maxima*, não foi detectada essa atividade. A bibliografia consultada não apresenta dados para essa atividade antinutricional em microalgas. Comparando com outros resultados, Oliveira *et al.*, (2000) não encontraram essa atividade presente na amêndoa de chichá (*Sterculia chicha St.Hil.*), já Togashi e Sgarbieri (1994) encontraram para a amêndoa de baru (*Dipterix alata*) um valor de 38,60 UTI/mg de amostra, resultado considerado elevado. Estudos realizados em outras oleaginosas, como a soja (*Glycine max*) (FERNÁNDEZ-QUINTELA *et al.*, 1997; TRUGO *et al.*, 2000), o amendoim (*Arachis hypogaea, L.*) (MNEMBUKA, EGGUM, 1993), a canola (*Brassica napus L.*) (LOURENÇO, 2004) e o gênero tremoço (*Lupinus albus L.*) (HUDSON, 1979; RUIZ-LOPES *et al.*, 2000; RUIZ, SOTELO, 2001), não apresentaram índices para esta atividade.

5.4.1.3 Lectina

A atividade hemaglutinante na farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima*, onde se utilizou uma suspensão de hemácias nativas de coelhos a 2% em NaCl 0,15M, não foi detectada essa atividade nas diferentes soluções tampões utilizadas (glicina 0,1M pH 2,6; glicina 0,1M pH 9,0; Tris-HCl 0,1M pH 7,4 e NaCl 0,5M).

Na bibliografia revisada, não constam dados para essa atividade antinutricional em microalgas. Comparando com outros estudos, Togashi e Sgarbieri (1994) não detectaram

atividade hemaglutinante na farinha de amêndoa de baru e no estudo com chichá (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Esses resultados contrastam com estudos realizados por Fernandez-Quintela *et al.*, (1997), sobre a soja, e por Hudson (1979) e Ruiz-Lopes *et al.*, (2000) sobre o gênero tremoço, em que foi detectada essa atividade hemaglutinante.

5.4.2 Composição de aminoácidos

Na tabela 7, encontram-se descritas a composição de aminoácidos da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima* e uma comparação com a proteína padrão FAO/WHO/UNU (1991).

Pode-se observar que os aminoácidos essenciais da proteína da microalga *Spirulina maxima*, com índices mais pronunciados, foram leucina (3,96 g/100g proteína), fenilalanina (2,92 g/100g proteína); valina (2,71 g/100g proteína); isoleucina (2,21 g/100g proteína) e treonina (2,15 g /100g proteína). Os aminoácidos com índice químico menor foram: lisina (1,99 g/100g proteína), metionina (1,70 g /100g proteína) e triptofano (1,11 g/100g proteína). Esses resultados corroboram estudos realizados por Habib *et al.*, (2008), para a *Spirulina* cultivada na Tailândia e na Malásia, que descreveram a leucina como uns dos aminoácidos com maior índice, e o triptofano e a metionina, como os que apresentam menor índice. Herrera (2002) e Volkmann *et al.*, (2008), estudando a *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) e a *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*, mostram, para cada aminoácido essencial e não essencial, resultados superiores aos encontrados neste estudo.

Segundo dados da tabela 7 de acordo com as recomendações da FAO/WHO/UNU (1991), para as quantidades necessárias de aminoácidos do adulto, e comparando com o conteúdo de aminoácidos essenciais encontrados na amostra em estudo, todos os aminoácidos essenciais se encontram em quantidades maiores às recomendações nutricionais. De modo geral, os resultados mostram uma quantidade de aminoácidos essenciais adequados na farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima*.

Tabela 7 - Composição de aminoácidos essenciais e não essenciais da farinha da microalga *Spirulina maxima*, comparada com a proteína padrão FAO/WHO/UNU.

| Aminoácidos | <i>Spirulina maxima</i> (g/100g proteína) | Padrão FAO/WHO/UNU (g/100g proteína) (adulto) |
|------------------------|--|--|
| Essenciais: | | |
| Leucina | 3,96 | 1,90 |
| Treonina | 2,15 | 0,90 |
| Isoleucina | 2,21 | 1,30 |
| Valina | 2,71 | 1,30 |
| Fenilalanina | 2,92 | 1,90 |
| Triptofano | 1,11 | 0,90 |
| Lisina | 1,99 | 1,60 |
| Metionina | 1,73 | 1,70 |
| Não essenciais: | | |
| Tirosina | 2,74 | |
| Ácido glutâmico | 6,49 | |
| Ácido aspártico | 4,28 | |
| Cistina | 0,48 | |
| Serina | 3,01 | |
| Arginina | 2,79 | |
| Histidina | 0,63 | |
| Prolina | 2,62 | |
| Alanina | 4,29 | |
| Glicina | 2,21 | |

FONTE: Pesquisa própria; FAO-WHO-UNU (1991).

Os escores químicos para cada aminoácido obtido da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima* estão expostos na tabela 8, descrevendo o tipo de aminoácidos limitantes que existem na amostra.

Os dados apresentados na tabela 8 mostram que, para a faixa etária adulta, a amostra em estudo não apresenta aminoácidos limitantes, porém o aminoácido que apresentou o menor escore químico foi a metionina (101,76%) que, segundo a informação bibliográfica, corresponde, estimativamente, ao valor biológico da proteína da microalga *Spirulina maxima* (SGARBIERI, 1996).

Tabela 8 - Escore químico dos aminoácidos da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima*.

| AA Essenciais | Escore Químico (Padrão FAO/WHO) (%) | AA Limitante |
|---------------|-------------------------------------|--------------|
| Leucina | 208,42 | --- |
| Treonina | 238,88 | --- |
| Isoleucina | 170,00 | --- |
| Valina | 208,46 | --- |
| Fenilalanina | 153,68 | --- |
| Triptofano | 123,33 | --- |
| Lisina | 124,38 | --- |
| Metionina | 101,76 | --- |

FONTE: Pesquisa própria.

Segundo a bibliografia, proteínas deficientes em um ou mais aminoácidos são consideradas de baixa qualidade nutricional, como a maioria das farinhas de origem vegetal. No caso da farinha desengordurada da microalga *Spirulina maxima*, pode-se sugerir que, segundo a composição de aminoácidos se apresentou apropriada para atender às exigências nutricionais de adultos, podendo ser utilizada como uma matéria-prima adequada para a alimentação. Mesmo assim, para o atendimento dessas necessidades nutricionais, é possível ser utilizada como suplemento ou complemento alimentício, visando misturar-se com outras matérias-primas que aportem os outros nutrientes.

5.5 Modificações químicas da proteína da microalga *Spirulina maxima*

5.5.1 Grau de modificação

O grau de da modificação do isolado proteico de farinha de microalga *Spirulina maxima* está baseada na estimativa da quantidade de ϵ -amino grupos da lisina que sofreu acetilação ou succinilação. O grau de acetilação e succinilação dos isolados proteicos da microalga *Spirulina maxima* está descrito na tabela 10 (Apêndice 1).

Segundo os resultados obtidos, a modificação com anidrido acético foi superior à modificação química com anidrido succínico para todos os níveis empregados. No nível mais alto da concentração de anidrido acético (15%), foram modificados 97,03% da lisina,

enquanto houve 95,41% de modificação da lisina quando se utilizou o anidrido succínico na mesma concentração. Essa maior eficiência na extensão da modificação do anidrido acético pode ser devida ao fato de que o anidrido acético é líquido, porém tem mais solubilidade e capacidade de misturar-se com a amostra (EL-ADAWY, 2000). Estatisticamente, pode-se constatar, que para o teste de tukey, existe uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para cada nível de modificação e para o teste t de students também existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre os reagentes de acilação na extensão da modificação, sendo que a extensão da modificação é provocada pelo anidrido acético superior ao anidrido succínico.

Tabela 9 - Grau de modificação do isolado proteico da *Spirulina maxima*, tratado com anidrido acético e succínico.

| <i>Concentração de anidrido (%)</i> | <i>Grau de acetilação (%)*</i> | <i>Grau de succinilação (%)*</i> |
|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 % | 45,96 ± 0,089 ^{eA} | 34,34 ± 0,051 ^{eB} |
| 2,5 % | 66,25 ± 0,051 ^{dA} | 60,71 ± 0,089 ^{dB} |
| 5 % | 89,27 ± 0,103 ^{cA} | 80,30 ± 0,136 ^{cB} |
| 10 % | 93,60 ± 0,051 ^{bA} | 91,91 ± 0,089 ^{bB} |
| 15% | 97,03 ± 0,051 ^{aA} | 95,41 ± 0,136 ^{aB} |

FONTE: Pesquisa própria.

LEGENDA: * Resultados das análises com média de três repetições (\pm desvio padrão)

Letras (na coluna) minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Letras (na linha) maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t de student.

A bibliografia consultada não menciona estudos de grau de modificação química de proteínas em microalgas. Porém, contrastando-se esses dados com estudos similares em vegetais, pode-se indicar que Dua *et al.*, (1996); Wanasundara e Shahidi (1997); El-Adawy (2000); Ramos e Bora (2002) e Lawal e Adebawale (2006), encontraram que o anidrido acético foi mais reativo que o anidrido succínico para a granola (*sogronis inxiridus*) (89,7% e 83,0%); a fibra de linho (*Linum usitatissimum*) (84,5% e 56,9%); o feijão mungo (*Phaseolus aureus*) (91% e 78%); a castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) (75,28% e 71,99%) e o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) (89% e 79%), respectivamente.

5.6 Propriedades funcionais do isolado não modificado, acetilado e succinilado da microalga *Spirulina maxima*

5.6.1 Solubilidade

A solubilidade é uma propriedade físico-química das proteínas, também classificada como funcional, por causa da importância que exerce sobre a funcionalidade das proteínas no alimento (SGARBIERI, 1996). Pesquisas revelam que fatores como concentração, peso molecular, pH, força iônica e a presença de outras substâncias influenciam na solubilidade da proteína (ADEBOWALE *et al.*, 2007). Farfán (1994) indica que o fenômeno da solubilidade deve ser observado como a capacidade de um número considerável de grupos polares de se solvatar na água através de pontes de hidrogênio.

As curvas de solubilidade do isolado proteico não modificado, do acetilado e do succinilado da microalga *Spirulina maxima* são descritas nas figuras 18 e 19.

Vê-se que o perfil de solubilidade apresentado pelo isolado proteico não-modificado da microalga *Spirulina maxima* demonstrou ser dependente do pH e com um comportamento típico de proteínas vegetais e animais, com uma solubilidade mínima no pH 5,0 (5,70%), o que corresponde ao seu ponto isoelétrico. Outro ponto a destacar é a solubilidade nos valores de pH 2,0 (47,50%) e pH 8,0 (81,28%), 10,0 (96,18%) e 12,0 (92,67%). Isso se deve a que em pH's extremos (ácidos e alcalinos) a proteína adquire cargas líquidas positivas e negativas, que favorecem a repulsão eletrostática das moléculas de proteínas com a água e, portanto, aumenta a solubilidade das mesmas (KINSELLA, 1979; SEENA, SRIDHAR, JUNG, 2005). Mahajan e Dua (1995) explicam que a alta solubilidade a pH's extremos pode ocorrer pelo fato de o número de interações de repulsão eletrostática ser maior que o número de interações hidrofóbicas sobre as moléculas. Portanto, as proteínas permanecem em solução.

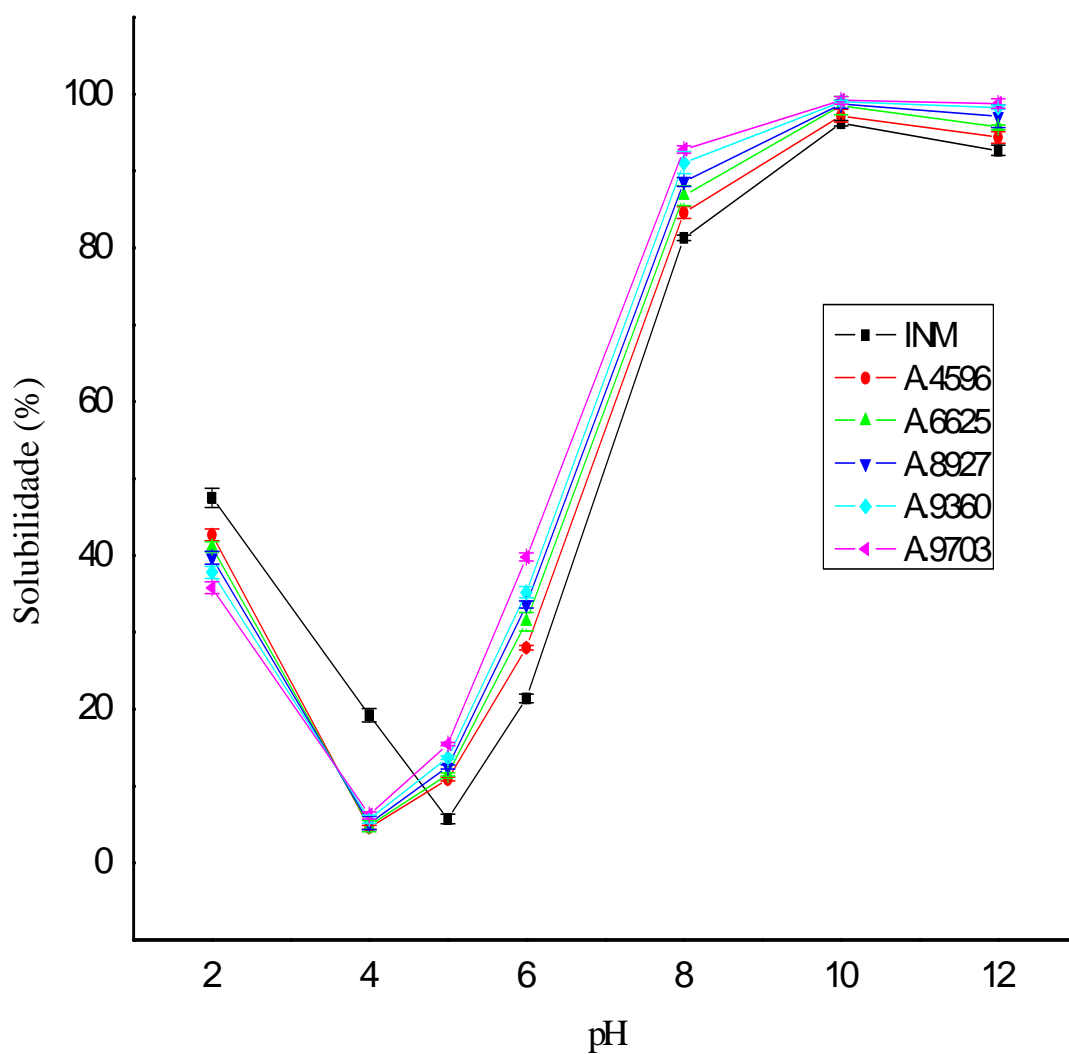


Figura 18 - Percentual de proteínas solúveis dos isolados protéicos não modificado e acetilados da microalga *Spirulina máxima*, em níveis de pH 2.0; 4.0; 5.0; 6.0; 8.0; 10.0 e 12.0

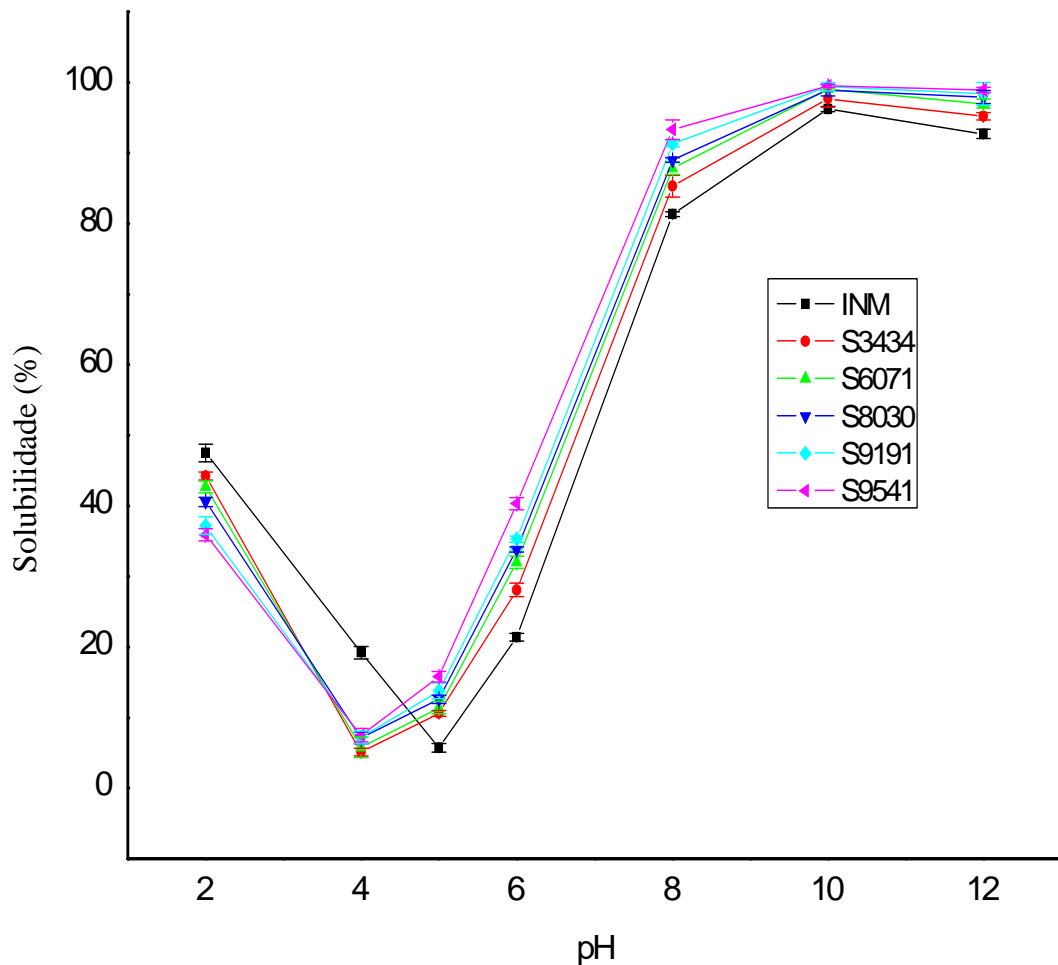


Figura 19 - Percentual de proteínas solúveis dos isolados proteicos da microalga *Spirulina maxima* não-modificado e succinilados em níveis de pH 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0 e 12.0.

Segundo Farfan (1994), toda proteína tem um ponto isoelétrico, ou seja, um ponto em que a somatória das cargas positivas seja igual à das cargas negativas. Assim, o fenômeno da solubilidade é entendido como a capacidade de um número substancial de grupos polares localizados na superfície da sua estrutura se solvatar na água através de pontes de H.

Observando o gráfico pelo lado alcalino, pode-se perceber que, à medida que nos aproximamos do ponto isoelétrico, deveria existir um número cada vez maior de cargas se neutralizando intra e intermolecularmente, formando grandes complexos eletrostáticos, eliminando a água do microambiente e, gradativamente, as pontes de H dos grupos polares que estão sendo neutralizados. Quando o número de cargas positivas e negativas atinge o

máximo, a carga líquida da proteína será zero, chegando ao ponto de solubilidade mínima. Quando o pH é aumentado acima do ponto isoelétrico, existe um número maior de cargas negativas que garantem a manutenção de pontes de H e o estiramento da cadeia polipeptídica, o que possibilita a solubilidade da proteína. O mesmo ocorre quando o pH é diminuído por baixo do ponto isoelétrico, ocorrem dois eventos contrapostos: aparecimento de novos sítios da macromolécula para pontes de H e a quebra de pontes pela inacceptabilidade dos H (FARFAN, 1994).

Anusuya, *et al.*, (1981), indica um índice mínima solubilidade ou ponto isoelétrico para a *Spirulina platensis* entre pH 3,0 e 4,0 ponto menor ao encontrado neste estudo com 30% de solubilidade em pH 2,0, tendo sua máxima solubilidade a pH's 8,9 e 9,0. Jacob-Lopez, *et al.*, (2006), estudando a cianobactéria *Aphanothece Microscopica Nägeli*, concluíram que há um ponto isoelétrico ou menor solubilidade na faixa de pH 3,0-4,0 e uma máxima solubilidade a pH alcalinos (10,0), com 48,6%. Outros autores obtiveram para outro tipo de espécies de microalgas valores semelhantes aos apontados neste estudo, com 50% de solubilidade proteica na mesma faixa de pH's alcalinos (NIRMALA, PRAKASH, VENKATARAMAN, 1992; DUA *et al.*, 1993; GUIL-GUERRERO *et al.*, 2004;).

Comparando a solubilidade do isolado proteico não modificado com os isolados modificados por acetilação e succinilação, observa-se, através das figuras 18 e 19 que o ponto isoelétrico, ou mínima solubilidade, sofre um deslocamento negativo (pH 4,0). Esse fato pode ser atribuído ao desdobramento das moléculas proteicas e à dissociação por causa da modificação (WANASUNDARA, SHAHIDI, 1997). Lawal e Adebowale (2006) referem que o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas minimizou a repulsão eletrostática entre as moléculas, diminuindo a solubilidade dos isolados acilados.

Observando o lado ácido do pH, é possível inferir que a solubilidade dos isolados acetilado e succinilado sofre um decréscimo progressivo abaixo do ponto isoelétrico, em função do grau de modificação. Esse fato pode ser atribuído ao bloqueio dos grupos amino após da modificação química (KRAUSE, 2002). Outros estudos indicam que a diminuição da solubilidade na região ácida das proteínas aciladas se deve, provavelmente, à substituição de grupos amônios catiônicos da lisina depois da acilação, provocando um número insuficiente de grupos catiônicos hidrófilos adequados para exceder as forças agregadas resultantes da interação hidrofóbica entre grupos alquil e aromático dos resíduos de aminoácidos (FRANZEN, KINSELLA, 1976).

O comportamento dos índices de solubilidade para o isolado proteico não modificado e modificado da microalga *Spirulina maxima* foi semelhante a outros estudos feitos em vegetais. Krause (2002), estudando as proteínas de canola, El-Adawy (2000), do feijão mungo (*Phaseolus aureus*), e Wanasundara e Shahidi (1997), da fibra de linho (*Linum usitatissimum*), apresentaram melhoria de solubilidade tanto na acetilação quanto na succinilação. Silva, Bora e Queiroga Neto (1997) obtiveram resultados similares para o isolado proteico acetilado de algaroba (*Prosopis juliflora*), assim como Ramos e Bora (2004), para a globulina da castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) acetilada. Em relação à succinilação, Lawal (2005), para feijão mangalô (*Lablab purpureus*), e Bora (2002), para lentilha (*Lens esculenta*). Ramos e Bora (2005), analisando a globulina da castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*), obtiveram melhoria da solubilidade a partir do pH 4.0.

Analisando os gráficos anteriores e a tendência seguida pelas curvas sobre o ponto isoelétrico (pH alcalino), pode-se concluir que, a partir do pH 6,0 a solubilidade nos isolados modificados (acetilado e succinilado) é maior em todos os graus de modificação. Segundo Gruener e Ismond (1997), o aumento da solubilidade é devido ao aumento das cargas negativas como resultado da substituição dos ϵ -amino grupos da lisina carregados positivamente. Em relação à acetilação, a substituição se fez por grupos acetil hidrofóbicos neutros. Na succinilação, a substituição ocorreu inserindo-se grupos carboxil carregados negativamente.

Pode-se perceber, através das figuras 19 e 20, que o efeito positivo sobre a solubilidade do isolado da microalga *Spirulina maxima* foi mais acentuado na modificação por succinilação que na acetilação, para todos os valores de pH e em todos os graus de modificação. Porém, pela análise estatística (Apêndice 4), pode-se observar que essa diferença não é estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Contrastando esses resultados com outras pesquisas, Ramos (2002), estudando a castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*), El-Adaway (2000), o feijão mungo (*Phaseolus aureus*); Wanasundara e Shahidi (1997), a fibra de linho (*Linum usitatissimum*), apresentaram maior solubilidade após tratamento com anidrido succinico que com anidrido acético.

5.6.2 Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água das proteínas é função de vários parâmetros, incluindo tamanho, configuração, fatores estéricos, características conformacionais, balanço

hidrofílico-hidrofóbico de aminoácidos nas moléculas proteicas e interação das proteínas com lipídeos, carboidratos e taninos (CHAVAN, McKENZIE, SHAHIDI, 2001).

Os resultados da capacidade de absorção de água dos isolados proteicos não modificados, dos acetilados e dos succinilados da microalga *Spirulina maxima*, posterior ao cálculo de correção das proteínas solúvel, estão expostos na tabela 11 (Apêndice 2).

O resultado da capacidade de absorção de água do isolado não-modificado (1,71 mL de H₂O/g de proteína) da microalga *Spirulina maxima* foi superior ao encontrado por Anusuya Devi e Venkataraman (1984) que, estudando a microalga *Spirulina platensis*, concluíram que há uma capacidade de absorção de água do concentrado proteico de 1,45mL/g de proteína. Essa diferença pode ter ocorrido devido ao método diferente de extração das proteínas, do teor de proteínas no isolado proteico e ao processo de secagem utilizado pelos diferentes autores.

Tabela 10 - Capacidade de absorção de água dos isolados proteicos não-modificado, acetilados e succinilados da microalga *Spirulina maxima*.

| Tipo de modificação | Grau de modificação (%) | Capacidade de absorção de água (mL de H₂O/g de proteína)* |
|----------------------------|--------------------------------|---|
| Proteína não modificada | ---- | 1,71 ± 0,13 ^g |
| Proteína acetilada | 45,96 | 2,69 ± 0,05 ^{cd} |
| | 66,25 | 2,76 ± 0,10 ^c |
| | 89,27 | 3,54 ± 0,08 ^b |
| | 93,60 | 3,83 ± 0,09 ^a |
| | 97,03 | 3,91 ± 0,07 ^a |
| Proteína succinilada | 34,34 | 1,74 ± 0,19 ^{fg} |
| | 60,71 | 2,11 ± 0,13 ^{ef} |
| | 80,30 | 2,24 ± 0,14 ^{de} |
| | 91,91 | 2,34 ± 0,09 ^{de} |
| | 95,41 | 2,48 ± 0,10 ^{def} |

* Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão)

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

FONTE: Pesquisa própria.

Comparando esses resultados com outros estudos em vegetais, alguns autores apresentaram capacidade de absorção de água superiores ao isolado proteico em estudo, como o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) (3,86 mL de H₂O/g de proteína) (LAWAL, ADEBOWALE, 2006), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (2,34 – 3,5 mL de H₂O/g de

proteína) (KAUR, SINGH, 2007), o feijão (*Phaseolus vulgaris*) (2,63 mL de H₂O/g de proteína) (MORALES-DE LÉON *et al.*, 2007), o farelo de aveia (*Avena sativa L.*) (1,94 - 2,04 mL de H₂O/g de proteína) (GUAN *et al.*, 2006), o cupuaçu (*Theobromagrandeflora*) (2,22 mL de H₂O/g de proteína) (CARVALHO, GARCIA, AMAYA-FARFAN, 2006), a fava de morcego (*Dipteryx sp.*) (2,04 - 2,32 mL de H₂O/g de proteína) (QUEIROGA NETO, 2005), o tremoço (*Lupinus albus L.*) (2,09 - 2,25 mL de H₂O/g de proteína) (EL-ADAWY *et al.*, 2001) e o feijão mungo (*Phaseolus aureus*) (2,2 mL de H₂O/g de proteína) (EL-ADAWY, 2000). Outros autores encontraram valores inferiores, como no estudo do feno grego (*Trigonella foenum graecum*) (1,68 mL de H₂O/g de proteína) (EL NASRI, EL TINAY, 2007); do amendoim (*Arachis hypogaea*) (1,67 mL de H₂O/g de proteína) (YU; AHMEDNA, GOKTEPE, 2007).

Comparando-se a capacidade de absorção de água do isolado proteico não modificado da microalga *Spirulina maxima* com os modificados por acetilação e succinilação, pode-se observar que o índice de absorção de água foi superior nos modificados em todos os níveis de modificação. Na acetilação, observa-se maior aumento, com índice de capacidade de absorção de água de 2,69; 2,76; 3,54 ; 3,83 e 3,91 mL de água/g de proteína. Na succinilação, constata-se um aumento da capacidade de absorção de água para todos os níveis de modificação em relação ao isolado não modificado. No entanto, comparando-se com a acetilação, percebe-se que há uma diminuição da capacidade, com índices de 1,74; 2,11; 2,24; 2,34 e 2,48 mL de água /g de proteína.

A bibliografia consultada não menciona estudos de modificações químicas em proteínas de microalgas. Porém, comparando-se esse resultado com estudos realizados em vegetais, vê-se que os resultados são semelhantes ao estudo obtido por Lawal (2005), em cujo estudo sobre o concentrado proteico de feijão mangalô (*Lablab purpureus*) relata que a capacidade de absorção de água diminui após a succinilação. Dua, Mahajan e Mahajan (1996) também expressam que há um decréscimo na capacidade de absorção de água em altas concentrações de anidrido succínico no isolado proteico da semente de canola.

O fenômeno do aumento da capacidade de absorção de água pode ser explicado porque a acilação causa desdobraimento na cadeia da proteína, expondo mais grupos hidrofílicos que hidrofóbicos, aumentando, assim, a parte hidrofílica ligante (EL-ADAWY, 2000). Uma conformação desdobrada induzida pela acilação pode permitir que a proteína ligue mais água do que é possível à forma globular (SILVA, BORA, QUEIROGA NETO, 1997). A menor capacidade de absorção de água dos isolados proteicos succinilados, em

relação aos acetilados, pode ser devido à alta solubilidade da proteína succinilada. Foi relatado que proteínas altamente solúveis apresentam baixo índice de absorção de água (EL-ADAWY, 2000).

5.6.3 Capacidade de absorção de óleo

A capacidade de absorção de óleo tem grande importância do ponto de vista industrial, pois reflete a capacidade de emulsificação, uma característica altamente desejável em produtos como maionese (ESCAMILLA-SILVA *et al.*, 2003). Essa propriedade é afetada por muitos fatores, como o conteúdo de proteínas, a área de superfície, a hidrofobicidade, a liquidez do óleo e a metodologia. A capacidade de absorção de óleo também é dependente da capacidade de a proteína atrair o óleo (EL-ADAWY, 2000).

Os resultados da capacidade de absorção de óleo do isolado proteico não modificado, acetilado e succinilado da microalga *Spirulina maxima* estão expostos na tabela 12 (Apêndice 3).

Como se pode observar na tabela 12, a capacidade de absorção de óleo do isolado proteico não-modificado da microalga *Spirulina maxima* foi de 2,15 mL de óleo/g de proteína. Esse resultado foi inferior ao encontrado por Anusuya Devi e Venkataraman (1984), que estudaram a microalga *Spirulina platensis* e reportaram um valor de 3,73 g de óleo/g de proteína. As diferenças na capacidade de absorção de óleo podem estar relacionadas à espécie de microalga estudada.

Comparado esses resultados com outros estudos com fontes proteicas vegetais, a capacidade de absorção de óleo do isolado em estudo se mostrou superior à da macadâmia (*Macadâmia integrifolia* Maiden & Betch) (1,12 mL de óleo/g de proteína) (BORA, RIBEIRO, 2004) e da castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), em que Ramos e Bora (2003) obtiveram 1,39 mL de óleo/g de proteína, e Glória e Regitano-d'Arce (2000) obtiveram 0,79 mL de óleo/g de proteína e feijão mungo (*Phaseolus aureus*) (1,4 mL de óleo/g de proteína) (EL-ADAWY, 2000).

Alguns autores apresentaram capacidade de absorção de óleo superiores ao isolado proteico em estudos como o do grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (3,9 mL de óleo/g de proteína) (KAUR, SINGH, 2007), do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (2,67 mL de óleo/g de proteína) (YU; AHMEDNA, GOKTEPE, 2007), do feijão (*Phaseolus vulgaris*) (3,26 mL de óleo/g de proteína) (MORALES-DE LÉON *et al.*, 2007), do farelo de aveia (*Avena sativa*) (2,96 mL de

óleo/g de proteína) (GUAN *et al.*, 2006) e do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) (4,9 mL de óleo/g de proteína) (LAWAL, ADEBOWALE, 2006). Lawal (2005), estudando o isolado proteico de feijão mangalô (*Lablab purpureus*), obteve uma capacidade de absorção de óleo de 2,8 mL de óleo/g de proteína, enquanto Queiroga Neto (2005) obteve 2,00 mL de óleo/g de proteína para o isolado de fava de morcego (*Dipteryx sp.*).

Tabela 11 - Capacidade de absorção de óleo dos isolados proteicos não-modificado, acetilados e succinilados da microalga *Spirulina maxima*.

| Tipo de modificação | Grau de modificação (%) | Capacidade de absorção de óleo (mL de óleo/g de proteína)* |
|-------------------------|-------------------------|--|
| Proteína não-modificada | - | 2,15 ± 0,07 ^f |
| Acetilação | 45,96 | 2,68 ± 0,10 ^c |
| | 66,25 | 2,83 ± 0,03 ^c |
| | 89,27 | 3,02 ± 0,24 ^b |
| | 93,60 | 3,31 ± 0,07 ^{ab} |
| | 97,03 | 3,48 ± 0,04 ^a |
| Succinilação | 34,34 | 2,32 ± 0,03 ^f |
| | 60,71 | 2,44 ± 0,02 ^e |
| | 80,30 | 2,53 ± 0,05 ^{de} |
| | 91,91 | 2,52 ± 0,06 ^{de} |
| | 95,41 | 2,50 ± 0,04 ^{cd} |

*Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão).

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

A capacidade de absorção de óleo dos isolados proteicos da microalga *Spirulina maxima* modificados por acetilação e succinilação foi superior ao índice apresentado pelo isolado nativo em todos os níveis de modificação. Os resultados dos isolados proteicos acetilados se mostraram mais pronunciados com índices de 2,68 (45,96%), 2,83 (66,25%), 3,02 (89,27%), 3,31 (92,03%) e 3,48 (97,03%) mL de óleo/g de proteína. Entanto, na succinilação, mostra índices menores de absorção de óleo para todos os graus de modificação. Essa diminuição pode ser explicada pelo fato de que esse agente alquilante aumenta a rede de cargas negativas na proteína, diminuindo, então, sua hidrofobicidade, o que leva a uma diminuição da absorção de óleo (LAWAL, 2005).

5.6.4 Propriedades emulsificantes

A capacidade emulsificante das proteínas está relacionada à correlação existente entre as propriedades emulsificantes e a superfície hidrofóbica das proteínas, as quais influenciam na estabilidade da emulsão. Porém a formação da emulsão também é facilitada pela redução da tensão interfacial entre a água e o óleo (DUA, MAHAJAN, MAHAJAN, 1996; ELIZALDE *et al.*, 1988).

5.6.4.1 Capacidade de emulsão

A capacidade de emulsão dos isolados proteicos não-modificados e modificados da microalga *Spirulina maxima*, em função do pH, está descritas nas figuras 20 e 21 (Apêndice 6).

Os resultados obtidos para a capacidade de emulsão do isolado não-modificado mostraram grande variação em todos os valores de pH analisados. O maior resultado foi obtido em pH 10,0 (180,67 mL de óleo/100mg de proteína). Esse pH coincide com o pH de máxima solubilidade da proteína da microalga *Spirulina maxima* (figuras 18 e 19). A menor capacidade de emulsão foi obtida em pH 5,0 (40,33 mL de óleo/100mg de proteína). Esse índice de mínima capacidade de emulsão é semelhante ao ponto isoelétrico do isolado da microalga *Spirulina maxima*. Anusuya Devi e Venkataraman (1984), estudando o efeito do pH na capacidade de emulsão na *Spirulina platensis*, descrevem um comportamento similar com uma mínima capacidade de emulsão a pH 3,5. Observa-se, também, uma maior capacidade de emulsão a pH's alcalinos (6,0 a 8,0). Esses resultados confirmam que a capacidade de emulsão é dependente da solubilidade. El-Adawy e Khalil (1994), estudando o hibisco (*Hibiscus sabdariffa*), e Dua, Mahajan e Mahajan (1996), a canola (*Brassica napus L.*), também observaram a relação direta entre as propriedades emulsificantes e a solubilidade.

Comparando esses resultados com estudos realizados em vegetais, conclui-se que a capacidade emulsificante das proteínas, em função do pH, da microalga *Spirulina maxima* se apresentou superior à da castanha-do-pará (38,50 a 94,48 mL de óleo/100mg de proteína) (RAMOS, BORA, 2005), do feno grego (*Trigonella foenum graecum*) (14,60 a 135,00 mL óleo/0,1g proteína) (EL NASRI, EL TINAY, 2007), do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (40,00 a 150,00 mL óleo/0,1g proteína) (RAGAB, BABIKER, EL TINAY, 2004) e da macadâmia (*Macadâmia integrifolia Maiden & Betch*) (86,55 a 153,33 mL óleo/0,1g proteína) (BORA, RIBEIRO, 2003).

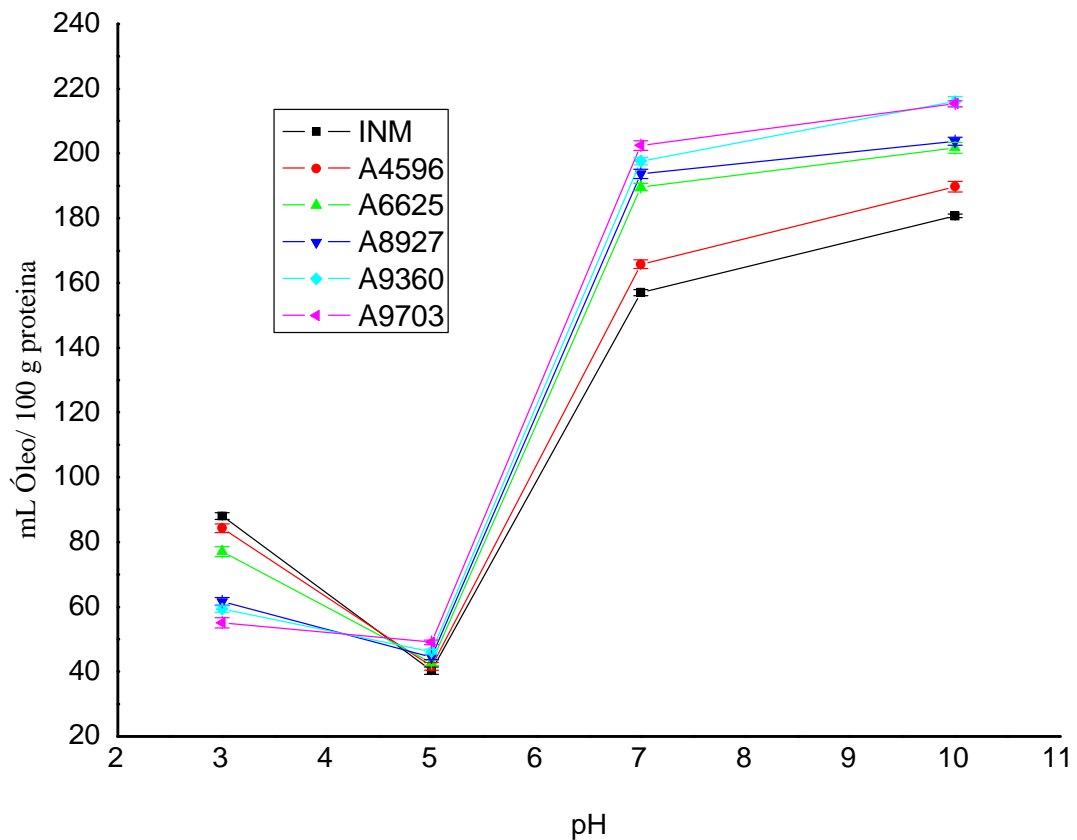


Figura 20 - Capacidade de emulsão dos isolados proteicos não-modificados e acetilados da microalga *Spirulina maxima*.

Conforme análise das figuras 20 e 21, a modificação química melhorou a capacidade de emulsão das proteínas da microalga *Spirulina maxima*, em quase todos os seus graus de modificação, com exceção da que ocorre no pH 3,0. Percebe-se, também, através da observação dos gráficos, que o aumento da capacidade de emulsificação é dependente do grau de modificação, e a acetilação se mostrou levemente menos eficaz do que a succinilação para esse parâmetro.

O máximo de óleo emulsificado (215,9 mL de óleo/100mg de proteína) pelo isolado da microalga *Spirulina maxima* acetilado correspondeu a um aumento de 19,50%, em comparação ao isolado não-modificado (180,67 mL de óleo/100mg de proteína), enquanto que o máximo de óleo emulsificado pelo isolado succinilado (314,57 mL de óleo/100mg de proteína) correspondeu a um acréscimo de 74,11%. A globulina da castanha-do-pará

(*Bertholletia excelsa* H.B.K.) (RAMOS, BORA, 2004, 2005) registrou um acréscimo de 105 e 115% depois da acetilação e da succinilação. Silva, Bora e Queiroga Neto (1997) identificaram um aumento de 160% na capacidade emulsificante de proteínas de algaroba (*Prosopis juliflora*) acetiladas, enquanto Sheen (1991) e Monteiro e Prakash (1996) detectaram aumentos de 120 e 16% para as proteínas de folhas de tabaco (*Nicotina tabacum*) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.) succiniladas, respectivamente.

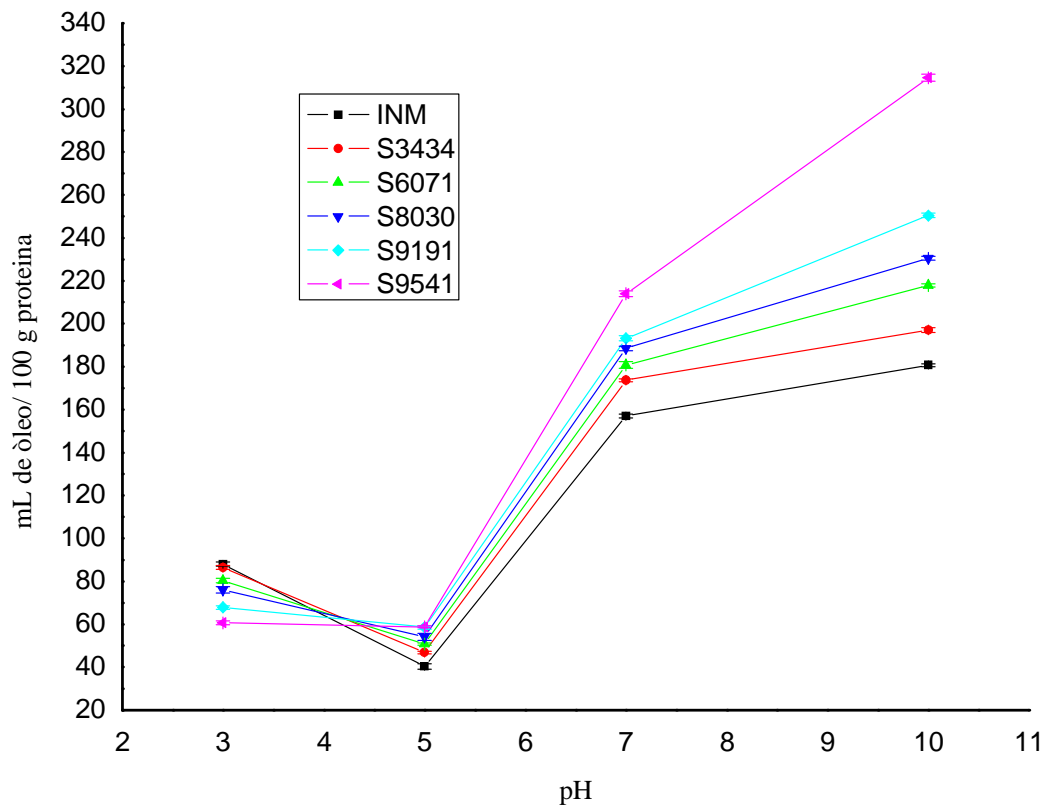


Figura 21 - Capacidade de emulsão dos isolados proteicos não-modificados e succinilados da microalga *Spirulina maxima*.

O aumento da capacidade de emulsão dos isolados proteicos acilados, comparado ao isolado não-modificado, decorre do fato de a acilação tender a causar o desdobramento das cadeias proteicas, resultando na exposição de resíduos hidrofílicos de peptídeos. Esse aumento também se deve à adição de grupos neutros acetil na molécula, devido à acetilação, que promove a interação com a fase oleosa, e à adição de grupos carboxil. A succinilação mostra um maior índice na capacidade de emulsão, porquanto auxilia no aumento da interação entre as moléculas proteicas e a fase aquosa das emulsões (EL-ADAWY, 2000).

O aumento na capacidade de emulsão é devido a uma maior solubilidade da proteína modificada e ao esticamento da estrutura, que permite a exposição de maior número de resíduos não polares e polares. Quando esse aumento é de grupos não polares sobre a superfície da proteína, resulta em um aumento na capacidade de recepção de lipídeos (FARFÁN, 1994).

5.6.4.2 Atividade e estabilidade de emulsão

A atividade e a estabilidade de emulsão do isolado proteico da microalga *Spirulina maxima* são apresentados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 12 - Atividade de emulsão de isolados proteicos não-modificados, acetilados e succinilados da microalga *Spirulina maxima* em função do pH.

| Isolado protéico | Atividade de emulsão (%) | | | |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | pH 3 | pH5 | pH7 | pH10 |
| Não Modificado | 32,11 ± 0,69 ^a | 9,67 ± 0,33 ^g | 34,89 ± 0,84 ^f | 42,89 ± 0,69 ^d |
| Acetilado 45,96% | 31,00 ± 0,88 ^{ab} | 12,33 ± 0,33 ^f | 35,67 ± 0,58 ^{ef} | 43,00 ± 1,00 ^d |
| Acetilado 66,25% | 30,78 ± 0,96 ^{ab} | 14,22 ± 0,69 ^{def} | 37,67 ± 0,88 ^{bcd} | 46,33 ± 0,88 ^{bc} |
| Acetilado 89,27% | 29,67 ± 0,67 ^{bc} | 15,67 ± 0,88 ^{cd} | 38,78 ± 0,51 ^{abc} | 46,67 ± 0,58 ^{bc} |
| Acetilado 92,03% | 28,44 ± 0,51 ^c | 16,11 ± 0,51 ^{bcd} | 39,33 ± 0,33 ^{ab} | 47,56 ± 0,69 ^{abc} |
| Acetilado 97,03% | 25,22 ± 0,84 ^d | 16,67 ± 0,88 ^{abc} | 39,78 ± 0,51 ^a | 48,22 ± 0,77 ^{ab} |
| Succinilado 34,34% | 32,67 ± 0,33 ^a | 13,22 ± 0,88 ^{ef} | 36,33 ± 0,88 ^{def} | 45,56 ± 0,69 ^c |
| Succinilado 60,71% | 30,83 ± 0,76 ^{ab} | 14,33 ± 0,29 ^{de} | 37,17 ± 0,76 ^{cde} | 46,50 ± 0,87 ^{bc} |
| Succinilado 80,30% | 29,56 ± 0,51 ^{bc} | 15,67 ± 0,58 ^{cd} | 38,33 ± 0,33 ^{abc} | 47,22 ± 0,69 ^{abc} |
| Succinilado 91,91% | 29,50 ± 0,50 ^{bc} | 17,67 ± 0,50 ^{ab} | 38,17 ± 0,76 ^{abcd} | 48,50 ± 0,87 ^{ab} |
| Succinilado 95,41% | 28,00 ± 0,88 ^c | 18,33 ± 0,33 ^a | 39,11 ± 0,51 ^{ab} | 49,44 ± 0,84 ^a |

*Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão).

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Pode-se afirmar, que a atividade de emulsão do isolado não-modificado da microalga *Spirulina maxima* apresentou uma variação de 9,67% a pH 5,0, até 42,89%, em pH 10,0 e uma variação na estabilidade da emulsão de 9,44% a pH 5,0 até 41,67 a pH 10,0.

Comparando-se os dados entre atividade e estabilidade da emulsão do isolado não - modificado e a solubilidade proteica, pode-se observar que existe uma semelhança na tendência dos resultados, porquanto há uma menor atividade e estabilidade da emulsão em pH 5,0, mesmo pH da solubilidade mínima ou ponto isoelétrico, indicando que a atividade de emulsão pode depender da quantidade de proteínas solúveis (CHAU, CHEUNG, 1998).

Tabela 13 - Estabilidade de emulsão de isolados proteicos não-modificados, acetilados e succinilados da microalga *Spirulina maxima* em função do pH.

| Isolado protéico | Estabilidade de emulsão (%) | | | |
|------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | pH 3 | pH5 | pH7 | pH10 |
| Não Modificado | 31,67 ± 0,33 ^{ab} | 9,44 ± 0,77 ^f | 33,89 ± 0,51 ^e | 41,67 ± 0,67 ^e |
| Acetilado 1,0% | 30,11 ± 0,19 ^{bcd} | 12,44 ± 0,51 ^e | 35,11 ± 0,38 ^{de} | 42,78 ± 0,19 ^e |
| Acetilado 2,5% | 29,11 ± 0,51 ^{cde} | 14,00 ± 0,58 ^{de} | 36,89 ± 0,51 ^{bc} | 45,33 ± 0,67 ^d |
| Acetilado 5,0% | 28,56 ± 0,51 ^{de} | 15,33 ± 0,67 ^{cd} | 37,78 ± 0,51 ^{ab} | 46,22 ± 0,51 ^{cd} |
| Acetilado 10% | 28,22 ± 0,69 ^e | 16,11 ± 0,51 ^{bc} | 38,89 ± 0,51 ^a | 47,56 ± 0,84 ^{abc} |
| Acetilado 15% | 25,11 ± 0,84 ^f | 16,33 ± 0,33 ^{bc} | 39,33 ± 0,33 ^a | 48,22 ± 0,19 ^{ab} |
| Succinilado 1,0% | 32,22 ± 0,69 ^a | 13,11 ± 0,51 ^e | 36,11 ± 0,38 ^{cd} | 45,22 ± 0,51 ^d |
| Succinilado 2,5% | 30,50 ± 0,87 ^{abc} | 14,00 ± 0,50 ^{de} | 36,83 ± 0,76 ^{bc} | 46,33 ± 0,76 ^{cd} |
| Succinilado 5,0% | 29,44 ± 0,84 ^{cde} | 15,56 ± 0,51 ^{cd} | 37,78 ± 0,51 ^{ab} | 47,11 ± 0,19 ^{bc} |
| Succinilado 10% | 29,17 ± 0,29 ^{cde} | 17,33 ± 0,76 ^{ab} | 38,00 ± 0,87 ^{ab} | 48,17 ± 0,58 ^{ab} |
| Succinilado 15% | 27,78 ± 0,69 ^e | 18,11 ± 0,51 ^a | 38,89 ± 0,69 ^a | 49,22 ± 0,69 ^a |

*Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão).

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

5.6.5 Viscosidade relativa

Os dados da viscosidade relativa dos isolados proteicos da microalga *Spirulina maxima* não-modificados, acetilados e succinilados estão expostos na tabela 15.

A viscosidade relativa do isolado proteico não-modificado da microalga *Spirulina maxima* mostrou uma variação acentuada em relação às três concentrações estudadas, tanto em relação à temperatura ambiente quanto depois do aquecimento a 90°C. Porém, quando se compara a mesma concentração antes e depois do aquecimento, percebe-se que há uma pequena variação para os valores obtidos. Esse aumento de viscosidade depois do aquecimento pode ser explicado pelas mudanças conformacionais da molécula de proteína seguida pela sua desnaturação posteriormente ao tratamento térmico.

Convém ressaltar que a bibliografia consultada não traz informação sobre estudos feitos com a determinação da viscosidade de isolados não-modificados e modificados quimicamente em microalgas. Todavia, comparando com estudos feitos em vegetais, pode-se inferir que esses resultados são semelhantes.

Ramos e Bora (2004), analisando a viscosidade relativa da globulina da castanha-do-pará, observou grande variação de viscosidade relativa com o aumento da concentração da solução de proteína e com o aquecimento da solução de proteína. Sze-Tao e Sathe (2000), analisando a viscosidade da amêndoa (*Prunus dulcis*) e da soja (*Glycine Max L.*), também encontraram uma relação de dependência positiva da viscosidade com a concentração da solução de proteína.

Os dados da tabela 15 mostram que a viscosidade relativa dos isolados proteicos modificados aumentou com a concentração da solução de proteína, com a temperatura ambiente e com o aquecimento (90°C). No caso particular da acetilação, observa-se que a viscosidade relativa à temperatura ambiente, nos diferentes graus de modificação, aumenta em relação à viscosidade do isolado não-modificado. Entretanto, à medida que aumenta o grau de modificação, também aumenta a viscosidade, cujo menor valor, a temperatura ambiente, ocorreu no isolado não-modificado em todas as suas concentrações (1, 2 e 3%). O maior índice de viscosidade a temperatura ambiente na acetilação foi obtido na extensão da modificação 97,03% com valores de 1,510; 1,752 e 1,775 e em todas as concentrações.

No que concerne à acetilação depois do aquecimento, os índices de viscosidade nos diferentes graus de modificação são superiores ao apresentado no isolado não-modificado depois do aquecimento.

Tabela 14 - Viscosidade relativa dos isolados proteicos não-modificado, acetilados e succinilados da microalga *Spirulina maxima*.

| Isolado protéico | Concentração | Viscosidade relativa | |
|--------------------|--------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | | Temperatura ambiente | Após aquecimento |
| Não Modificado | 1 | 1,350 ± 0,043 ⁿ | 1,399 ± 0,045 ^l |
| | 2 | 1,489 ± 0,024 ^{pq} | 1,498 ± 0,036 ^{ijkl} |
| | 3 | 1,545 ± 0,019 ^{lmnop} | 1,595 ± 0,031 ^{hijk} |
| Acetilado 45,96% | 1 | 1,372 ± 0,028 ^s | 1,389 ± 0,028 ^l |
| | 2 | 1,530 ± 0,032 ^{nop} | 1,545 ± 0,030 ^{ijkl} |
| | 3 | 1,625 ± 0,039 ^{ijklm} | 1,661 ± 0,027 ^{efghij} |
| Acetilado 66,25% | 1 | 1,384 ± 0,045 ^{rs} | 1,410 ± 0,032 ^l |
| | 2 | 1,605 ± 0,013 ^{ijklmn} | 1,619 ± 0,030 ^{fghijk} |
| | 3 | 1,646 ± 0,013 ^{hijk} | 1,681 ± 0,063 ^{defghi} |
| Acetilado 89,27% | 1 | 1,416 ± 0,025 ^{qrs} | 1,459 ± 0,035 ^{kl} |
| | 2 | 1,677 ± 0,028 ^{ghijk} | 1,693 ± 0,017 ^{defghi} |
| | 3 | 1,684 ± 0,014 ^{ghij} | 1,692 ± 0,026 ^{defghi} |
| Acetilado 92,02% | 1 | 1,466 ± 0,027 ^{pqr} | 1,491 ± 0,024 ^{ijkl} |
| | 2 | 1,720 ± 0,021 ^{fghi} | 1,740 ± 0,035 ^{cdefgh} |
| | 3 | 1,734 ± 0,022 ^{efgh} | 1,758 ± 0,031 ^{bcdefgh} |
| Acetilado 97,03% | 1 | 1,510 ± 0,010 ^{op} | 1,552 ± 0,016 ^{ijkl} |
| | 2 | 1,752 ± 0,035 ^{defg} | 1,774 ± 0,011 ^{bcdefg} |
| | 3 | 1,786 ± 0,018 ^{def} | 1,804 ± 0,039 ^{abcde} |
| Succinilado 34,34% | 1 | 1,404 ± 0,025 ^{qrs} | 1,417 ± 0,055 ^l |
| | 2 | 1,604 ± 0,040 ^{ijklmn} | 1,614 ± 0,035 ^{ghijk} |
| | 3 | 1,775 ± 0,035 ^{def} | 1,791 ± 0,034 ^{abcdef} |
| Succinilado 60,71% | 1 | 1,494 ± 0,022 ^{pq} | 1,504 ± 0,075 ^{ijkl} |
| | 2 | 1,674 ± 0,039 ^{hij} | 1,698 ± 0,071 ^{defghi} |
| | 3 | 1,833 ± 0,023 ^{bcd} | 1,845 ± 0,044 ^{abcd} |
| Succinilado 80,30% | 1 | 1,536 ± 0,024 ^{mnop} | 1,547 ± 0,056 ^{ijkl} |
| | 2 | 1,729 ± 0,014 ^{efgh} | 1,738 ± 0,023 ^{cdefgh} |
| | 3 | 1,878 ± 0,028 ^{abc} | 1,892 ± 0,058 ^{abc} |
| Succinilado 91,91% | 1 | 1,591 ± 0,025 ^{klmno} | 1,605 ± 0,013 ^{ghijk} |
| | 2 | 1,758 ± 0,019 ^{defg} | 1,792 ± 0,068 ^{abcdef} |
| | 3 | 1,911 ± 0,024 ^{ab} | 1,923 ± 0,034 ^{ab} |
| Succinilado 95,41% | 1 | 1,634 ± 0,031 ^{ijkl} | 1,645 ± 0,051 ^{efghij} |
| | 2 | 1,812 ± 0,020 ^{cde} | 1,886 ± 0,022 ^{abc} |
| | 3 | 1,934 ± 0,031 ^a | 1,959 ± 0,057 ^a |

FONTE: Pesquisa própria.

Resultados das análises com media de três repetições (± desvio padrão). Letras minúsculas diferentes (na coluna) apresentam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Na succinilação, acontece um fenômeno semelhante, visto que a viscosidade a temperatura ambiente, em todas as concentrações de solução de proteínas e nas extensões da modificação, é maior em relação ao valor do isolado não-modificado. Para medir a viscosidade relativa à temperatura ambiente, conforme dados da tabela 15, todos os índices dos diferentes graus de modificação e de concentração de proteínas da solução são maiores do que no isolado não-modificado. Entretanto, à medida que crescia o grau de modificação, a viscosidade aumentava. Seu maior valor foi observado no isolado modificado por succinilação, quando da extensão de modificação 95,41% com valores de 1,634; 1,812 e 1,934 para as diferentes concentrações de proteínas na solução.

Na Tabela 15, está expresso que o comportamento da viscosidade, depois do aquecimento, foi semelhante, e que, para todas as concentrações de proteínas na solução e diferentes graus de modificação, o valor aumenta em relação ao valor da viscosidade do isolado não-modificado. Pode-se observar que o menor valor foi obtido no isolado não-modificado para as diferentes concentrações de proteínas na solução (1, 2 e 3%), e o maior valor é observado para o isolado modificado a 95,41%, com valores de 1,645; 1,886 e 1,959 para as diferentes concentrações de proteínas na solução.

Convém enfatizar que, devido à acilação, o aumento da viscosidade tem sido atribuído ao desdobramento das cadeias peptídicas (SCHWENKE *et al.*, 1990) e às mudanças na molécula proteica, como decorrência do aumento ou da diminuição das transições conformacionais (DUA, MAHAJAN, MAHAJAN, 1996).

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos que foram confirmados por Ramos e Bora (2004), quando analisaram a globulina da castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) acetilada. Nesse estudo, os autores demonstraram que a viscosidade relativa na concentração de 3% passou de 1,17 na solução de globulina não-modificada, para 1,84 na solução de globulina acetilada a 25%. Esses mesmos autores (2005), analisando a mesma matéria-prima depois da succinilação, encontraram uma viscosidade relativa, na concentração de 5%, de 1,32, na solução de globulina não-modificada. Esse valor subiu para 1,99 na solução de globulina succinilada a 25%.

Krause, Bagger e Schwenke (2001) também constataram um aumento significativo na viscosidade das proteínas do tremoço (*Lupinus albus*), depois da succinilação, passando de 99 mPas para 515 mPas.

Pode-se observar, ainda, pela análise dos dados da tabela 15, que a viscosidade relativa dos isolados proteicos modificados aumentou com a concentração da solução de proteína, com o aquecimento (90°C) e com o grau de acilação. Em relação ao tipo de modificação,

constata-se que a succinilação apresenta um efeito positivo, na viscosidade relativa, mais acentuado do que a acetilação.

5.6.6 Capacidade e estabilidade de espumação

A capacidade de espumação dos isolados proteicos da microalga *Spirulina maxima* não modificados, acetilados e succinilados está representada na figura 22 (Apêndice 5).

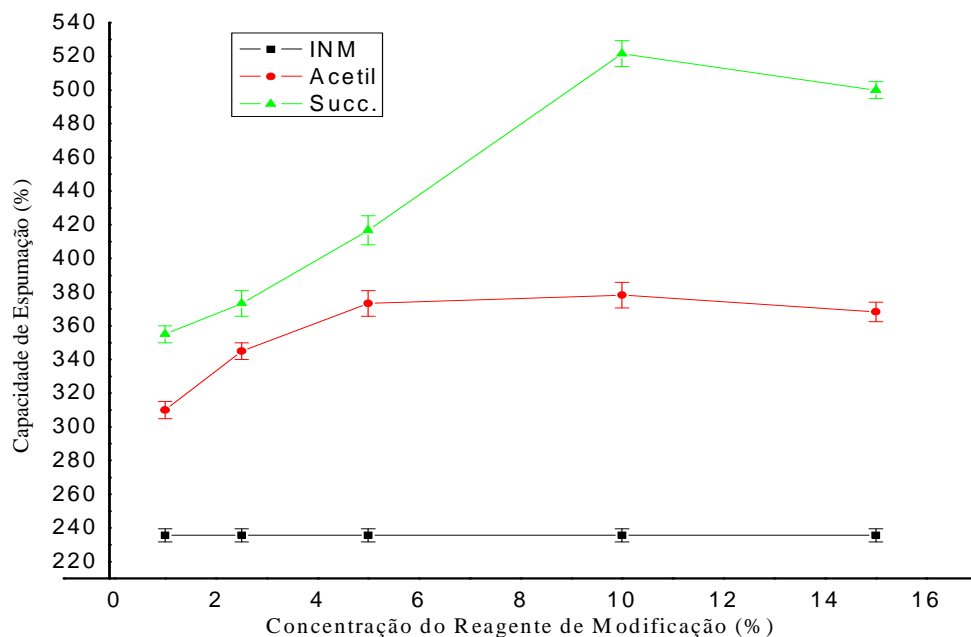


Figura 22 - Capacidade de espumação dos isolados proteicos não modificados, acetilados e succinilados da microalga *Spirulina maxima*.

O isolado proteico não modificado demonstrou um índice de capacidade de espumação de 235,5%. Esse alto índice se encontra diretamente relacionado com a alta solubilidade proteica da proteína, Anusuya Devi e Venkataraman (1984) aponta um índice de 190,0% na capacidade de espumação para o concentrado proteico de *Spirulina platensis* e descreve que essa capacidade depende da solubilidade proteica.

Na figura anterior, vê-se que ocorreu um aumento na capacidade de espumação depois da modificação química, para todas as extensões da modificação. Nos isolados acetilados, a capacidade de espumação variou de 310,0% (acetilado 45,96%); 345,0% (acetilado 66,25%); 373,33% (acetilado 89,27%); 378,33% (acetilado 93,60%) e 368,33% (acetilado 97,03%). Em relação aos isolados succinilados, a diminuição da capacidade de

espumação variou de 355,0% (succinilado 34,34%); 373,30% (succinilado 60,71%); 416,70% (succinilado 80,30%); 521,70% (succinilado 91,91%) e 500,00% (succinilado 95,41%).

O aumento da capacidade de espumação das proteínas aciladas pode ser explicado devido aos seguintes fatores: principalmente, à solubilidade da proteína, cuja contribuição foi sobremaneira importante no seu comportamento frente à espumação (GRUENER, ISMOND, 1997), à acilação, que provoca um aumento da solubilidade da proteína e leva a um acréscimo na capacidade de espumação e pode causar um desdobramento da proteína, o que aumenta a interação proteína-água (LAWAL, 2005).

Quando comparadas as modificações aplicadas, percebe-se uma maior eficiência da capacidade de espumação da modificação por succinilação frente à acetilação. Essa eficiência é provocada pelo aumento de cargas negativas na rede, que promove uma interação proteína-água de forma especial, facilitando a formação de espuma (LAWAL, ADEBOWALE, 2006). Segundo Farfan (1994), o aumento da capacidade espumante da proteína succinilada é facilmente previsível, devido a que, com o aumento da solubilidade da proteína, seus grupos hidrofóbicos estão mais expostos, e ela pode adquirir forma hidrofóbica-hidrofílica ainda mais polarizada do que a proteína nativa.

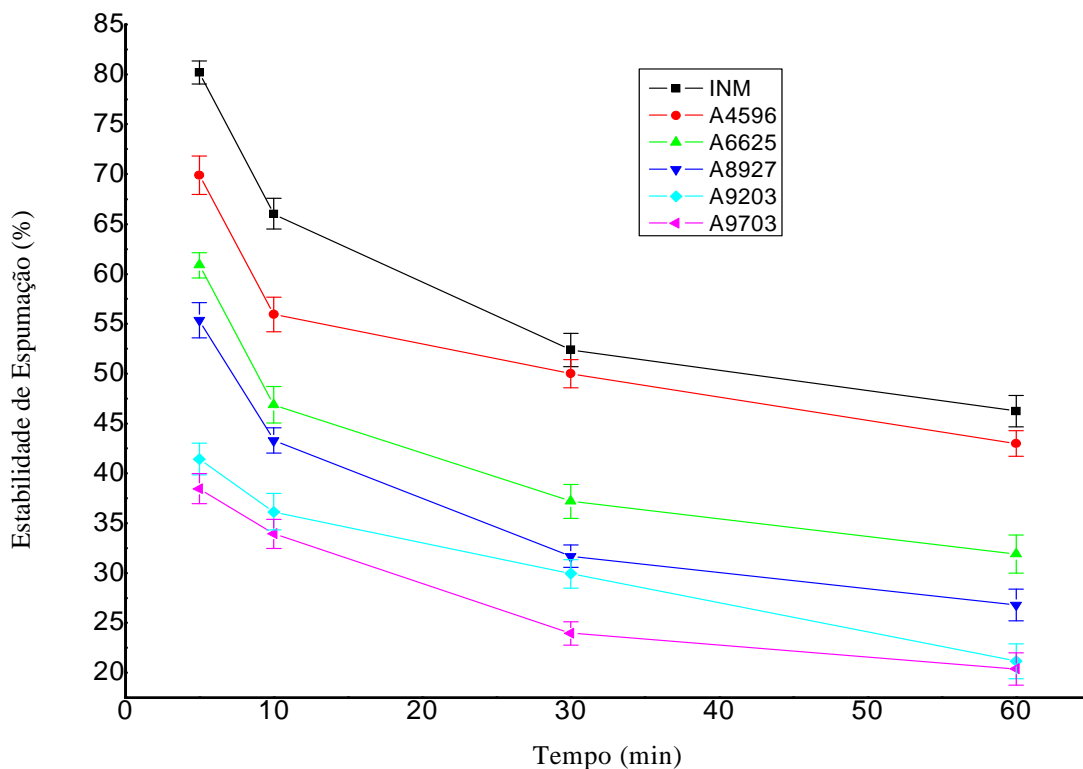
Em relação à estabilidade da espuma, as figuras 23 e 24 mostram que a modificação química provoca uma diminuição da estabilidade quando comparada à proteína não modificada, em todas as extensões da modificação. A estabilidade de espuma do isolado proteico da proteína não modificada variou de 80,20%, depois de cinco minutos, até 46,24%, depois de 60 minutos da agitação inicial.

Na modificação por acetilação, o maior índice de estabilidade foi observado para o isolado acetilado a 45,96%, aos cinco minutos, com 69,89% de estabilidade. O menor valor foi observado a um grau de modificação de 97,03%, com índice de 20,38%, com 60 minutos de repouso.

Em relação aos isolados succinilados, o maior índice de estabilidade foi observado no modificado 34,34% aos cinco minutos, com 77,93% de estabilidade; o isolado succinilado apresentou o menor índice a 95,41%, depois de 60 minutos de repouso, com 22,34% de estabilidade.

De acordo com El-Adawy (2002), a estabilidade de espumação é reduzida após a acilação porque essa modificação leva a um desmembramento da molécula de proteína. Se a modificação for excessiva, leva a um aumento da densidade de carga, que impede a interação

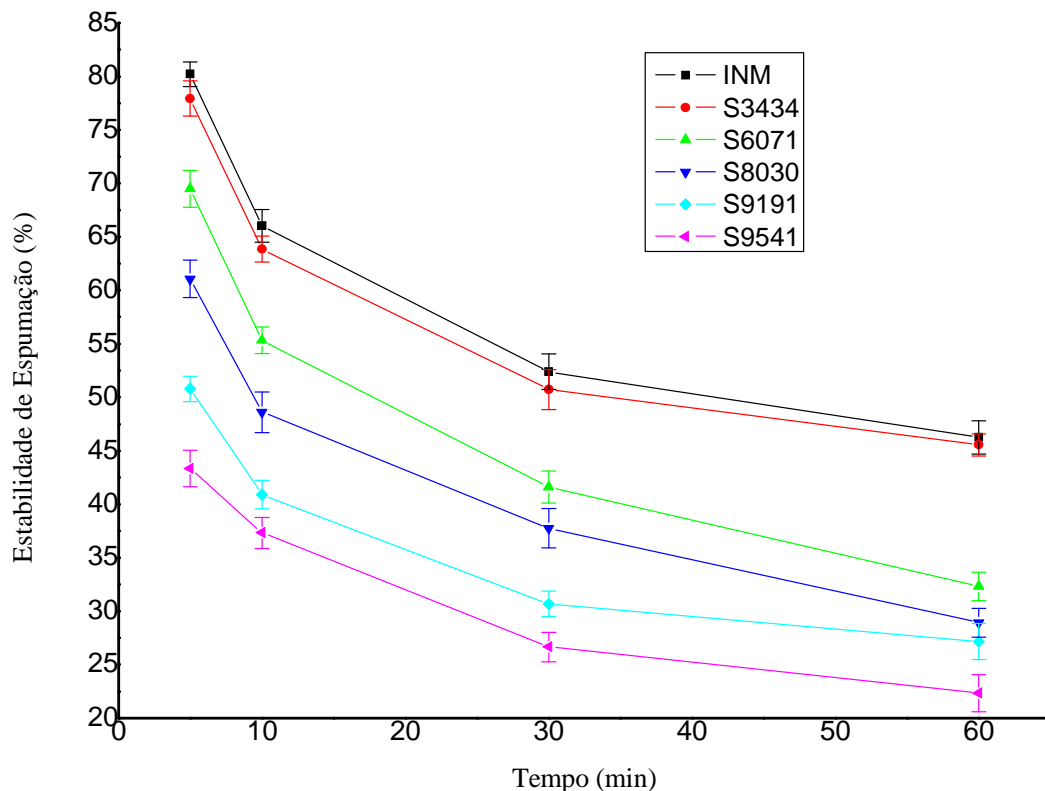
proteína-proteína na lâmina de espuma, causando uma desestabilização da espuma e uma baixa estabilidade.



Legenda: INM – Isolado não modificado; IA45,96% – Isolado acetilado 45,96%; IA66,25% – Isolado acetilado 66,25%; IA89,27% – Isolado acetilado 89,27%; IA92,03% – Isolado acetilado 92,03%; IA97,03% – Isolado acetilado 97,03%.

Figura 23 - Estabilidade de espumação dos isolados proteicos não modificados e acetilados da microalga *Spirulina maxima* nos intervalos de tempo de 5, 10, 30 e 60 minutos.

Quando comparado os tipos de acilações, percebe-se que o decréscimo na estabilidade foi menos acentuado na acetilação do que na succinilação, em todos os tempos analisados e todos os graus de modificação testados. Esse decréscimo resulta do aumento da densidade de cargas negativas da proteína succinilada, que inibe fortemente a interação proteína-proteína (LAWAL, ADEBOWALE, 2006).



Legenda: INM – Isolado não modificado; IS34,34% – Isolado succinilado 34,34%; IS60,71% – Isolado succinilado 60,71%; IS80,30% – Isolado succinilado 80,30%; IS91,91% – Isolado succinilado 91,91%; IS95,41% - Isolado succinilado 95,41%.

Figura 24 - Estabilidade de espumação dos isolados proteicos não modificado e succinilados da microalga *Spirulina maxima* nos intervalos de tempo de 5, 10, 30 e 60 minutos.

A bibliografia consultada não traz informação sobre a capacidade e a estabilidade de espumação em microalgas, porém, comparando-se com estudos feitos em vegetais, é possível informar que os estudos feitos por Gruener e Ismond (1997), em que eles analisaram globulina de canola (*Brassica napus L.*), também demonstraram diminuição da atividade de espuma após acilação, sendo que a proteína succinilada apresentou menor estabilidade que a acetilada. Os mesmos resultados foram obtidos por El-Adawy (2000), com feijão mungo (*Phaseolus aureus*), e por Lawal e Adebawale (2006), que analisaram o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Lawal (2005), estudando a estabilidade de espuma do isolado proteico do feijão mangalô (*Lablab purpureus*) nativo e do succinilado, observou um decréscimo na estabilidade da espuma do isolado proteico succinilado em comparação com o nativo.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- ✓ Os resultados do crescimento de biomassa são concordantes descrevendo índices maiores de rendimento no cultivo da microalga no verão com 1,07 g/L e um 23,63% de rendimento, situação característica desse tipo de microalgas.
- ✓ Nas condições do trabalho, recomenda-se o cultivo da microalga spirulina (*Spirulina maxima*) no verão, apesar de não ter havido diferenças significativas com o período de inverno.
- ✓ A composição centesimal da microalga *Spirulina maxima* demonstrou que o conteúdo de proteína (54,93%) foi a fração predominante dos diferentes nutrientes analisados. Esta quantidade de proteínas na farinha determina a microalga *Spirulina maxima* como uma fonte alimentar altamente proteica.
- ✓ O modelo de classificação de proteínas verificou que as albuminas, glutelina básica e globulinas se encontram em proporções maiores em relação às prolaminas e à glutelina ácida.
- ✓ A análise eletroforética em PAGE-SDS-2 β -Me revelou um perfil qualitativo das diferentes unidades analisadas, uma predominância em baixos pesos moleculares, característico da espécie de microalgas denominadas cianobactérias.
- ✓ A alta estabilidade térmica e a menor proporção de proteínas desnaturadas credenciam a proteína da microalga *Spirulina maxima* como apta para ser usada em produtos industrializados.
- ✓ As propriedades antinutricionais da farinha integral da microalga *Spirulina maxima* revelaram um baixo índice de taninos e ausência das atividades hemaglutinante e de inibidores de tripsina, indicando essa microalga como uma alternativa na alimentação humana.
- ✓ A quantidade de aminoácidos essenciais na farinha da microalga *Spirulina maxima* revelou índices superiores para todos eles, indicando que esta proteína es

completa, segundo comparação com a proteína padrão FAO-OMS-WHO, podendo compensar dieteticamente sua falta em formulações de alimentos.

- ✓ Na extensão da modificação, verificou-se um índice maior no uso do anidrido acético, comparado-se com o anidrido succínico, porém essa relação não tem correlação com a melhora das propriedades funcionais.
- ✓ O melhor índice de solubilidade em pH, na região alcalina do pI, apresentado pelos isolados modificados da proteína da microalga *Spirulina maxima*, especialmente o anidrido succinico, mostra-se apropriado para uso em produtos de panificação, massas em geral e alimentos semissólidos.
- ✓ A capacidade de absorção de água e de óleo dos isolados modificados é superior ao isolado não-modificado, fato que favorece sua aplicação em subprodutos de carnes (salsichas, linguiças, patês), massas e bolos.
- ✓ A capacidade, a atividade e a estabilidade de emulsão dos isolados proteicos modificados da microalga *Spirulina maxima* favorecem o uso dessa proteína na elaboração e no processamento de produtos cárnicos (salsichas, linguiças), emulsões (maionese) e sorvetes.
- ✓ Comparando-se os índices de viscosidade dos isolados modificados e não-modificado, pode-se concluir que essa propriedade não sofre alteração, considerando-se a concentração da proteína, o aquecimento e a acilação.
- ✓ A capacidade de espumação dos isolados modificados foi superior à do não-modificado, o que favorece o uso dessa proteína em produtos de panificação.
- ✓ A microalga *Spirulina maxima*, pode ser considerado como um potencial recurso alimentar, na elaboração de alimentos e como excelente complemento em alimentos formulados.

7 REFERÊNCIAS

ADEBOWALE, K. O.; LAWAL, O. S. Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. **Food Chemistry**, 83, 237-246, 2003.

ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, I. A.; OSHODI, A. A.; NIRANJAN, K. Isolation, fractionation and characterisation of proteins from Mucuna bean. **Food Chemistry**. 104, 287–299, 2007.

ALBERTOSA, M., PEREZ-CAMCHO, A., LABARTA, V., BEIRAS, R., FERNANDEZ-REIRIZ, M. J. Nutricional value of algal dietz to clam spat *Venerupis pullastra*. **Mar. Ecol. Progr. Ser.** 97:261-269, 1993.

AL-KAHTANI, H. A.; ABOU-ARAB, A. A. Comparison of physical, chemical, and functional properties of Moringa peregrina (Al-Yassar or Al-Ban) and soybean proteins. **Cereal chemistry**, v. 70, n. 6, p. 619-625, 1993.

ANUSUYA DEVI, M.; SUBBULAKAHMI, K.; MADHAVÍ DEVI, K. E.; VENKATARAMAN, L. V. Studies on the Proteins of Mass-Cultivated, Blue-Green Alga (*Spirulina platensis*). **J. Agric. Food Chem.** v. 29, n. 3, p. 522-525, 1981.

ANUSUYA DEVI, M.; VENKATARAMAN, L. V. Functional Properties of Proteins Products of Mass Cultivated Blue-Green Alga *Spirulina Platensis*. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 24-27, 1984.

ARAÚJO, J. A. P.; SILVA, V. V. (organizadores). **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1995.

ARGOLO, A. C. C. M. **Produção de lectina em culturas de tecidos de Bauhinia monandra (calos, raízes convencionais e transformadas por Agrobacterium rhizogenes); avaliação de extratos das folhas da planta como fonte de compostos antioxidantes e hipoglicemiantes**. 119 fls. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2003.

ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. **Canadian Institute Food Science Technology Journal**, v.14, n.4, p. 289-294, 1981.

ARREDONDO, B.; CORDERO, C. **Manual de técnicas bioquímicas aplicadas a ficologia Em: curso avances del cultivo de microalgas para acuicultura y biotecnología**. Centro de Investigación científica y de Educación Superior. Ensenada Baja California Mexico. 1997.

BARBOSA, T. , ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L. A. R. E.; BARRAL-NETTO, M. In **Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe**. Memória do Instituto Oswaldo Cruz. 2001.

BARTOLOMÉ, B.; MENDEZ, J. D.; ARMENTIA, A.; VALLVERD, A.; PALACIOS, R. Allergens from Brazil nut: immunochemical characterization. *Allergology et Immunopathology*, 25 (3), 135-144, 1997

BECKER,E.W.; VENKATAMARAN, L.V. **Biotechnology and Explotation of algae the Indian Approach**. Deutche gerellschaft fur Technishe Zusammenar-beit Gmbh, Eschborn, Germany. p. 216, 1982.

BECKER,E.W.; VENKATAMARAN, L.V. Production and utilization of the blue-green alga spirulina in India. *Biomass*. 4, p. 105-125, 1984.

BECKER, E.W. **Biotechnology and microbiology**. Cambridge University Press, Cambridge. p .293, 1994.

BECKER, E.W. **Nutritional properties of microalgae**: Potential and constraints. En. Handbook of microalgal mass culture. Richmond, A.(ed). CRC Press Inc. Boca Raton , Florida. p. 339-419, 1986.

BERTOLA, N.C.; BEVILACQUA, A.E.; ZARITZKI, N.E. Heat treatment effect on texture changes and thermal denaturation of proteins in beef muscle. **Journal of Food Processing and Preservation**. v.18, p. 31-46, 1994.

BETSCHART, A. A.; SAUNDERS, R. M. Saflower protein isolate: influence of recovery conditions upon composition, yeld and protein quality. **Journal of Food Science**. 43, p. 964-968, 1978

BOBBIO, P.; BOBBIO, F. **Química do Processamento de Alimentos**. 3. ed. São Paulo : Varela, 2001. 143p.

BORA, P. S. Functional properties of native and succinylated lentil (*Lens culinaris*) globulins. **Food Chemistry**, 77, p. 171–176, 2002.

BORA, P. S.; RIBEIRO, D. Note: Influence of pH on the Extraction Yield and Functional Properties of Macadamia (*Macadamia integrofolia*) Protein Isolates. **Food Science and Technology International**, 10, p. 263-267, 2004

BOROWISTZKA, M. A.; BOROWISTZKA, I. J. (a) **Vitamins and fine chemicals from micro-algae**. En: Micro-algal Biotechnology. Borowistzka, M.A and Borowistzka, L. J. (eds), Cambridge University Press. Cambridge. p. 85-118, 257-287. 1988.

_____. (b) **Fast oils and hidrocarbons**. En: Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge. p. 257-287, 1988.

BOROWISTZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. 70 (1-3), p.313-321, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, p. 248-254, 1976.

BRITTEN, M.; LAVOIE, L. Foaming properties of proteins as affected by concentration. **Journal Food Science.**, v.57, n.5, p.1219-1241, 1992.

BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; GARLAND, C.D. **Nutritional aspects as microalgae used in mariculture: a literature review**. CSIRO Marine reports, n°206. 1989.

BURLEW, J. S. 1983 **Current Status of the large-scale culture of algae**. En: Algal culture from laboratory to pilot plant. Burlew.J.S. Carnegie Institution of Washington. (ed) N° 600 Washington D.C. p. 3-23, 1983.

CABRAL, L.C.; MODESTA, R.C. **Soja na alimentação humana**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CTAA. (Documento n°1) p.32, 1982.

CARCIOFI, B. A. M.; FAISTEL, J.; ARAGÃO, G.M.F.; LAURINDO, J.B. Determination of thermal diffusivity of mortadella using actual cooking process data. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 89-94, 2002.

CAVALCANTI, M. T. **Caracterização lipídica e protéica das amêndoas das variedades da faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus* (mart.) pax et k. hoffm.) com e sem espinhos**. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; AMAYA-FARFÁN J. Physico-Chemical Properties of the Flour, Protein Concentrate, and Protein Isolate of the Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum) Seed. **Journal of Food Science**, 71 (8), 573-578, 2006.

CHAVAN, U. D.; McKENZIE, D. B.; SHAHIDI, F. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). **Food Chemistry**, 75, 145–153, 2001.

CHAGAS, E. P.; SANTORO, L. G. Globulin and albumin proteins in dehulled seeds of three *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, p. 17-26, 1997.

CHAN, C. F.; CHEUNG, P. C. K. Functional properties of flours prepared from three Chinese indigenous legume seeds. **Food Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 429-433, 1998.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteins alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas**. Zaragoza: Acribia, p. 49-102, 1989.

CHEL-GUERRERO, L.; PEREZ-FLORES, V.; BENTACUR-ANCONA, D.; DAVILA-ORTIZ, G. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 584–591, 2002.

CHRONAKIS, I. Gelation of Edible Blue-Green Algae Protein Isolate (Spirulina platensis Strain Pacifica): Thermal Transition, Rheological Properties, and Molecular Forces Involved. **J. Agric. Food Chem.** v.49, n.2. p.888-898, 2001.

COHEN, Z. **Products from microalgae**. En Handbook of microalgal mass culture. Richmond.A. CRC Press Inc.Boca Raton, Florida (es), p. 421-454, 1986.

DATTA, K.; USHA, R.; DUTTA, S. K.; SINGH, M. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interactions with proteases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, n.11,p. 949-959, 2001.

DHAWAN, F.; MALHOTRA, S.; DAHIYA, B. B.; SING, D. Seed protein fraction and amino acid composition in gram (*Cicer arietinum*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v.41, p. 225-232, 1991.

DEVI, M. A.; VENKATARAMAN, L. V. Functional properties of protein products of mass cultivated blue-green alga spirulina platensis. **Journal Food Science.**, v.49, p.24-27, 1984

DENCH, J. E.; RIVAS, N. R.; CAYGILL, J. C. Selected functional properties of sesame (*Sesamun indicum*l.) flour and two protein isolates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.32, n.6, p.557-564, 1981.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Food elgumes: chemical and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, v.10, p. 147-241,1990.

DUA, S.; MAHAJAN, A.; MAHAJAN, A. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* Var. Toria) preparations by chemical modification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 706–710, 1996

DUA, S.; KAUR, M.; AHLUWALIA, A. S. Functional properties of two pollutant grown green algae. **Journal Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p.25-28, 1993.

DURANTI, M.; GIUS, C. **Legume seeds**: protein content and nutritional value. Field Crops Research. 53, 31-45, 1997

EGAN, A.; KIRK, R. S.; SAWYER, R. **Pearson's chemical análisis of foods**. 18. ed. London: CHURCHILL LIVINGSTONE, p. 591, 1981.

EL-ADAWY, T. A. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. **Food Chemistry**, 70, 83-91, 2000.

EL-ADAWY, T. A.; KHALIL, A. H. Characteristics of roselle seeds as a new source of rotein and lipid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42, 1896-1900, 1994

EL-ADAWY, T. A.; RAHMA, E. H.; EL-BEDAWEY, A. A.; GAFAR, A. F. Nutricional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. **Food Chemistry**, 74, 455–462, 2001.

EL NASRI, N. A.; EL TINAY, A. H. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. **Food Chemistry**, 103, 582–589, 2007.

ELIZALDE, B. E.; KANTEREWICZ, R. J.; EL-BEDAWEY, A. A.; GAFAR, A. F. Physicochemical properties of food proteins related to their ability to stabilize oil-in-water emulsions. **Journal of Food Science**, v.53, n.3, p.845-848, 1988.

ENRIGHT, C. T., NEWKIRK, G. F., GRAIGIE, J. S.; CASTELL, J. D. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile ostrea edulis. **L.J. Exp.Mar.Biol.Ecol.** 96, p. 1-13, 1986.

ESCAMILLA-SILVA, E. M.; GUZMAN-MALDONADO, S. H.; CANO-MEDINAL, A.; GONZALEZ-ALATORRE, G. Simplified process for the production of sesame protein concentrate. Differential scanning calorimetry and nutritional, physicochemical and functional properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 83, 972–979, 2003.

FARFAN, J.A. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia dos alimentos**. Ed. Da UNICAMP, 2. ed., 1994.

FAO/WHO/UNU. **Protein Quality Evaluation**. Roma: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 66p, 1991.

FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; MACARULLA, M. T.; BARRIO A. S.; MARTINEZ; J. A. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 331-342, 1997.

FOOD AGRICULTURE ORGANITATION (FAO) **Fisheries Departament, Fishery Information, Data and Statiddtics Unit. Fishstat Plus: Universal software for statistical time series**. Aquaculture production: quantities 1950-2004, Aquaculture production: values 1984-2004; Capture production: 1950-2004; Commodities production and trade: 1950-2004; Total production: 1970-2004, Vers. 2.30 (available at www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp). 2006.

FRANSEN, K. L.; KINSELLA, J. E. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 788-795, 1976.

GARCIA, F. T.; GAGLEAZZI, U. A.; SOBRAL, P. J. A. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante a secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 151-158, 2000.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha-do pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 20 (2), 1-13, 2000

GNAIGER, E.; BITTERLICH, G. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a Stoichiometric concept. **Ecologia**, 62, p. 289-298, 1984.

GORNALL, A. G.; BORDAWILL, C. S.; DAVID, M. M. The determination of peotin by the biuret reaction. **Journal Biology Chemistry**, v. 177, p. 751-780, 1949.

GRUENER, L.; ISMOND, M. A. H. Effect of acetylation and succinylation on functional properties of the canola 12S globulin. **Food Chemistry**, 60, p. 513-520, 1997.

GUAN, X.; YAO, H.; CHEN, Z.; SHAN, L.; ZHANG, M. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. **Food Chemistry**, available online at www.sciencedirect.com., 2006

GUIL-GUERRERO, J. L.; NAVARRO-JUÁREZ, R.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C.; CAMBRA-MADRID, P.; REBOLLOSO-FUENTES, M^a. M. Functional properties of the biomass of three microalgal species. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 511-517, 2004.

GUVEN, K. C., GUVENER, B.; GULER, E. **Pharmacological Activities of marine algae. En: Introduction to applied Phycology**. Akatsuka, I. (ed) SPB Academic Publishing bv, the Hague. p. 67-92, 1990.

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**. N° 1034. Rome, FAO. 33pp. 2008

HETTIARACHCHY, N. S.; GRIFFIN, V.K.; GNANASAMBANDAM, R. Preparation and functional properties of a pretein isolata from defatted wheat germ. **Cereal Chemistry**, v. 73, n.3, p.363-367, 1996.

HERRERA, M. A.; HIDALGO, Y. **Determinación de la calidad de la microalga *Arthrospira maxima* (Spirulina) mediante análisis químico, físico y microbiológico**. Seminario de Título (Carrera de Ingeniería em Alimentos), Universidad de Antofagasta, 2002.

HOFF, J. I.; ARMSTRONG, G. S.; HOFF, L. A. A hydrophobic interaction in tannin – protein complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 394-399, 1980.

HORAX, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; CHEN, P. & JALALUDDIN M. Functional Properties of Protein Isolate from Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) **Journal of Food Science**. 69 (2), 119-121, 2004.

HORTON, R.; MORAN, L.; OCHS, R.; RAWN; SCRIMGEOUR, K. **Bioquímica**. Edición, Neil patterson publishers prentice hall. Inc. Primera Edición. D.F. Mexico. 1995. p. 4, 4-1, 16, 16-1, 16-3, 1995.

HUDSON, B. J. F. The nutritional quality of lupinseed. **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition**, v. 29, (1), p. 245-251, 1979.

HUNG, S. C.; ZAYAS, J. F. Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p.1216-1219, 1991.

IDOURAINE, A.; YENSEN, S.B.; WEBER, C.W. Terapy bean flour, albumin and globulin fraction functional properties compared with soy protein isolated. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p. 1316-1319, 1991.

ISMOND, M^a. H.; WELSH, W. D. Application of new methodology of canola protein isolation. **Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 125-127, 1992.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKRA, L.; QUEIROZ, M.; NETTO, F. M. Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece Microscópica Nägeli* cultivada no efluente da parbilização do arroz. **Ciên. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26 (2), p. 482-488, 2006.

JOHNSON, E. A. **Functional properties of acylated peo protein isolates**. 1982 (Dissertação de Mestrado), Washington, Washington State University, p.47.

KAKADE, M. L.; SIMONS, N.; LIENER, I. E. An evolution of natural vs. syntetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry**, v. 46, p. 518-526, 1969.

KATO, A. Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. **Journal of Food Science**, v.50, n.1, p.50-62, 1985.

KAUR, M.; SINGH, N. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. **Food Chemistry**. 102, 366–374, 2007.

KEBEDE, E.; AHLGREN, G. Optimum growth condition and light utilization efficiency of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) (Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. **Hydrobiol.**, 332, p. 99-109, 1996.

KHALIL, M.; RAGAB, M.; ABD EL-AAL, M.H. Foaming properties of oilseed proteins. **Die Nahrung**, v.29, n.2, p.201-207, 1985 a.

_____. Some functional properties of oilseed. **Die Nahrung**, v.29, n.3, p.275-282, 1985 b.

KINSELLA, J. E. Functional properties of proteins in food: a survey. **CRC Critical Review Food Science Nutrition**, v. 7, n. 3, p.219-280, 1976.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of American Oil Chem. Soc.**, v.56, n.3, p.242-258, 1979.

KINSELLA, J. E.; FOX, P. F. Water sorption by proteins: milk and whey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 91-156, 1986.

KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins: possible relationships between structure and functions in foams. **Food Chemistry**, v.7, n.4, p.273-288, 1891.

KLOCKEMAN, D. M.; TOLEDO, R.; SIMS, K. A. Isolation and characterization of defatted canola meal protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, p.3867-3870, 1997.

KOYORO, H. **Functional properties of pea globulins**. 1985. Dissertação (Master of Science). Department of Food Science and Human Nutrition, Washington State University, p.53.

KOSHIYAMA, I.; HEMANO.; FUKUSHIMA, D. A heat denaturation study of the 11S globulin in soybean seeds. **Food Chemistry**, v. 6, p. 309-312, 1981.

KRAUSE J. P. Comparison of the effect of acylation and phosphorylation on surface pressure, surface potential and foaming properties of protein isolates from rapeseed (*Brassica napus*). **Industrial Crops and Products**, 15, p.221-228, 2002.

KRAUSE, J. P.; BAGGER, C.; SCHWENKE, K. D. Rheological properties of modified lupin proteins. **Die Nahrung**, 45 (6), p.412-415, 2001.

KWONN, K.; PARK, K. H.; RHEE, K. C. Fractionation and characterization of proteins from cocnut (*Cocos nicifera* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, (7), p. 1741-1745, 1996.

LAWAL, O. S. Functionality of native and succinylated Lablab bean (*Lablab purpureus*) protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, 19, p.63-72, 2005.

LAWAL, O. S.; ADEBOWALE, K. O. The acylated protein derivatives of *Canavalia ensiformis* (jack bean): A study of functional characteristics. **LWT**, 39, p.918-929, 2006

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage. **Nature**. v. 277, p.680-685, 1970.

LE MESTE, M. et al. Contribution of protein flexibility to the foaming properties of casein. **Journal of Food Science**, v.55, n.5, p.1445-1447, 1990.

LIENER, J.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. **The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine**. New York, Academic Press, p 600, 1986.

LIN, C.S. & ZAYAS, J.F. Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. **Journal of Food Science**, v.52, n.5, p.1308-1311, 1987.

LIU, Y.F.; XU, L.Z.; CHENG, N.; LIN, L.J. & ZHANG, C.W. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. **J.Appl. Phycol.**, 12, p. 125-130, 2000.

LOURENÇO, K. D. S. **Estudo comparativo parcial das características lipídica e protéicas, determinação de fatores antinutricionais em sementes de duas cultivares de canola (*Brassica napus*, L).** 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas Princípios e Aplicações.** São Carlos. São Paulo: Ed. RiMa, p. 47-51, 2006.

LOWRY, O.H., RARENBROUGH, N.J., FARR, A.I. AND RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, p.265-275, 1951.

MACHUKA, J. Characterization of the seed proteins of velvet bean (*Mucuna pruriens*) from Nigeria. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 421-427, 2000.

MAHAJAN, A.; DUA, S. Functional properties of rapessed protein isolated. **Journal of Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 162-165, 1995.

MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y.; YADA, R. Y. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plant II. Structure characterization. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 265-274, 1998.

MARQUEZ, S. **Funcionalidade do Isolado Protéico da Castanha de Caju (*Anacardium occidentale* L.) Modificado Quimicamente.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, 2008.

MENG, G.T. e MA, C.T. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. **Food Chemistry**. v. 73, p. 453-460, 2001.

MNEMBUKA, B. V.; EGGUM, B. O. The nutritive value of some selected Tanzanian plant food sources. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 1993.

MONTEIRO, P. V.; PRAKASH, V. Alteration of functional properties of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein fractions by chemical and enzymatic modifications. **Journal of Food Science and Technology**, 33 (1), 16-19, 1996.

MORALES-DE LEÓN, J. C.; VÁZQUEZ-MATA, N.; TORRES, N.; GIL-ZENTENO, L.; BRESSANI, R. Preparation and Characterization of Protein Isolate from Fresh and Hardened Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, 72 (2), 96-102, 2007.

NACZK, M.; AMAROWICZ, R.; ZADERNOWSKI, R.; SHAHIDI, F. Protein precipitating capacity of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose and faba bean. **Food Chemistry**, v. 73, p. 467-471, 2001.

NIRMALA, C.; PRAKASH, V.; VENKATARAMAN, L.V. Physico-chemical and functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*). **Journal of Food Biochemistry**. v. 36, p. 569-577, 1992.

OLIVERA, M.A.C.L.; MONTEIRO, M.P.C.; ROBBS, P.G.; LEITE, S.G.F. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquac. Int.**, 7, p.261-275. 1999.

OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; BEZARRA, L. C. N. M.; SILVEIRA, S. B.; MONTEIRO, A. C. O.; MOREIRA, R. A. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* St Hil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. **Food Chemistry**, v. 70, p. 185-191, 2000.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. 2. ed. London: Longsman-Green, 1924.

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

PATEL, P.D.; FRY, J.C. The search for standardized methods for assessing protein functionality. **Develop.Food Prot.**, v.5, cap.7, p.299-333, 1987.

PELIZER, L.H.; DANESI, E.D.G.A.; RANGEL, C.O.A.; SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **J. Food Eng.**, 56, p. 371-375, 2003.

PESANDO, D. **Antibacterial and antifungal activities of marine algae**. In: Introduction to Applied Phycology. Akatsuka, 1^a (ed).SPB Academic Publishing bv, The Hague. p. 3-26. 1990.

PHANG, S.M.; MIAH, M.S.; CHUU, W.L. & HASHIM, M. *Spirulina* culture in digested sago starch factory waste water. **J. Appl. Phycol.**, 12, p 395-400, 2000.

PHILLIPS, L.G.; SCHULMAN, W.; KINSELLA, J.E. Ph and heat treatment effects on foaming of whey protein isolate. **Journal Food Science**, v.55, n.4. p.1116-1119, 2006.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Science Technology**, v. 7, n. 4, p. 132-138, 1996.

POOLE, S.; WEST, S.I.; WALTERS, C. Protein-protein interactions: their importance in the foaming of heterogeneous protein system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.35, n.6, p.701-711. 1984

QUEIROGA NETO, V. **Caracterização físico-química e nutricional do óleo e proteínas de amêndoas de fava de morcego (*Dipteryx lacinifera*)**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, 2005.

QUEIROGA NETO, V.; NARAIN, N.; SILVA, J. B.; BORA, P. S. Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anacardium Occidentale* L.) kernel protein isolate. **Die Nahrung**, 45, 258-262, 2001.

QUINN, J.R.; PATTON, D. Method for water hydration capacity of plant protein materials. **Food world/page**, v.28, n.6, p.291-293, 1981.

RAFIQUL, I. M.; JALAL, K. C. A.; ALAM, M. Z. Enviromental factors for optimisation of Spirulina biomass in laboratory culture. **Biotechnology**, v.4, n. 1, p. 19-22, 2005.

RAGAB, D. M.; BABIKER, E. E.; EL TINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. **Food Chemistry**, 84, p. 207–212, 2004

RAMOS, C. M. P. **Caracterização funcional das globulinas da castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) não modificadas e modificadas por acetilação e succinilação**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, 2002.

RAMOS. C. M. P.; BORA, P. S. B. Extraction and characteristics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) globulin. **Food Science Technology International**, 9 (4), p. 265-270, 2003.

RAMOS. C. M. P.; BORA, P. S. B. Functional characterization of acetylated brazil nut (*bertholletia excelsa* hbk) kernel globulin. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24 (1), p.134-138, 2004.

RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S. B. Functionality of succinylated Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* HBK) Kernel Globulin. **Plant Foods for Human Nutrition**, 60, p.1-6, 2005

RANGANA, S. **Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products**. 2. ed. New Dellhi: Tata McGraw-Hill, 1979.

RANGEL, A.; SARAIVA, K.; SCHWENGBER, P.; NARCISO, M. S.; DOMONT, G. B.; FERREIRA, S. T.; PEDROSA, C. Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Food Chemistry**, 87, p.491–499, 2004.

RIBEIRO, D. **Caracterização dos lipídios e de proteínas das amêndoas de macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden e Betche)**. 2003. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2003

RIBEIRO, E.; SERAVALLI, E. **Química de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, p.184, 2007.

RICHMOND, A. Phototrophic microalgae. In: **Biothechnology**. Dellweg, h (ed). Verlag Chemic. Florida, v.3, 1983. p.107-143,1983.

RICHMOND, A. **Handboock of microalgal mass culture**. CRC Press, Boston. 1990.

RICHMOND, A.; BECKER, E.W. Cell response enviromental factors. In: **Handbook of microalgal mass culture**. Richmond, A. (ed) CRC press Inc. Boca raton, Florida, p. 69-99, 1986.

RODRIGUEZ, H.; GUERRERO, M.G. 1992. Products and used of Cyanobacteria (blue-green algae). In: **Profile on biotechnology**. Villa, T.G. and Abalde, J. (ed) Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. p. 247-260, 1992.

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

RUIZ-LOPES, M. A.; GARCÍA- LOPES, P. M.; CASTANEDA VAZQUEZ, H. ZAMORA, N. J. F.; GARZON DE LA MORA, P. Chemical composition and nutrient content of three Lupinus species from Jalisco, Mexico. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 3, p. 193-199, 2000.

RUIZ-LOPES, M. A.; SOTELO, A. Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican wild lupins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.11, p. 5336- 5339, 2001.

SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. **Journal of Food Science**, v.47, (2), p. 491-497, 1982.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R., CLEMENTE, A., VIOQUE, J., BAUTISTA, J. & MILLÁN, F. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, 64, p.237-243, 1999.

SÃO PAULO. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. 1985

SASSON, A. **MicroBiotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries**. BIOTEC Publication 1/2542. Place de Fontenoy, Paris, France. United Nations Educatinal, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), p. 11-31, 1997.

SCHWENKE, K. D.; KNOPFE, C.; SEIFERT, A.; GÖRNITZ, E.; ZIRWER, D. Acylation of faba bean legumin: conformational changes and aggregation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81, p.126-134, 2000.

SCRAGG, A. **Biotecnologia para Ingenieros**. Editorial Limusa Mexico, D.F., p. 59-60, 1996.

SEENA, S.; SRIDHAR, K. R.; JUNG, K. Nutritional and antinutritional evaluation of raw and processed seeds of a wild legume, *Canavalia cathartica* of coastal sand dunes of India. **Food Chemistry**, 92, p.465-472, 2005.

SEYMOUR, E.A. The effects and control of algal blooms in fish ponds. **Aquaculture**. v.19, p.55-74, 1980.

SGARBIERI, V. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. . São Paulo: Livraria Varela Ltda. 1996.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins- a large family of homologous proteins. **Journal FASEB**, v. 4, p. 3198-208, 1990.

SHEEN, S. J. Comparison of chemical and functional properties of soluble leaf proteins from four plant species. **Journal Agric. Food Chem.**, v.39, p.681-685. 1991.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **Journal Biochemistry**, 267, 1-12, 1990.

SHIFRIN, N. S.; CHISHOLM, S. W. **Phytoplankton lipido: inviromental influences on production and passible commercial aplications**. In: Algae biomass. Production and use. Shelef, and Soedes, C.J. (eds). Elseiver North Holland Biomedical Press. Amsterdam. p. 627-646, 1980.

SHIMAMATSU, H. Mass production of Spirulina, an edible microalga. **Hydrobiol**. v. 512, p.39-44, 2004.

SIKA, M.; TERRAB, A.; SWAN, P. B.; HEGARTY, V. J. Composition of selected moroccan cereals and legumes: Comparison with the FAO Table for use in Africa. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 8, p. 62-70, 1995.

SILVA J. B.; BORA P. S.; QUEIROGA NETO, V. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de semente de algaroba (*Prosopis juliflora*) modificado por acetilação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 17, p.263-269, 1997

SILVA, M. R., SILVA, M. A. .A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**. v.13, (1), p.21-32, 1999.

SILVA, M. R., SILVA, M. A.A. P. Antinutritional factors: protease inhibitors and lectins. **Revista de Nutrição**., v.13, (1), p 3-9, 2000.

SIQUEIRA, A. J. S.; REMIÃO, J. O. R.; AZEVEDO, A. M. P. **Bioquímica, um guia de estudos: quadros sinópticos e metabologramas**. Porto Alegre: SULINA, 1990. p.164.

SOSULKI, F.; McCURDY, A. R. Functionality of flours, protein fractions and isolats from field peas and faba bean. **Journal Food Science**, v.52, n.4, p.1010-1014, 1987.

STALEY, J. T., BRYANT, M. P., PFENNING, N.; HOLT, J. G. **Bergeys Manual on systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins, Baltimore, v.3, p.1710-1806, 1987.

STROMGREN, T.; CARY, C. Growth in length of mytilus edulis L. Fed, on different algal diets. **J. Exp. Biol.Ecol.** v. 76, p.23-34,1984.

SZE-TAO, K. W. C.; SATHE, S. K. Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate. **Food Chemistry**, v.69, p.153-160, 2000.

TAYLOR, F. Biological features of phytoplankton cells. In: **The Physiological Ecology of Phytoplankton**. Morris. Blackwell Scientific Publ. Oxford., p. 3-56, 1980.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Proximate chemical characterization of the baru (*Dipteryx alata* Vog) fruit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 14, n.1, p.85-95, 1994.

TOWNSEND, A.; NAKAI, S. Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics on food proteins. **Journal of Food Science**, v.48, n.2, p.588-594,1983.

TOKUSOGLU, O.; UNAL M. K. Biomass nutrient profiles of three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v.68, n.4, p.1144-1148, 2003.

TRUGO, L. C.; DONANGELO, C. M.; TRUGO N. M. F.; BACH KNUDSEN, K. E. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2082-2086, 2000.

VALDIVIA, V.; MUÑOZ, L. **Desarrollo de Pasta tipo Tallarín de espinaca fortificada con microalga *Arthrospira Máxima* (Spirulina)**. Seminario de Titulo (Carrera de Ingenieria en Alimentos) Universidad de Antofagasta – Chile. 2006.

VENKATARAMAN, V.; PRAKASH, V.; NIRMALA, C. Physico-chemical and functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*). **Die Nahrung**. v.36, p. 569-577, 1992.

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E.S. Cultivation of *Arthrospira (spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. **Braz. J. Microbiol.** v. 39, n.1, p. 98-101, 2008.

VONSHAK, A., CHANAWONGSE, L., BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M. Light acclimation and photoinhibition in three *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) isolates. **J.Appl. Phycol.**, 8, p 35-40, 1996.

YASUMATSU, K.; SAWADA, K.; MORITAKA, S. Whippings and emulsifying properties of soy bean products. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, n. 5, p.719-727, 1972.

YAO, J. J.; TANTEERATARM, K.; WEL, L. S. Effects of maturation and storage on solubility, emulsion stability and gelation properties of isolated soy proteins. **Journal of the American Oil Chemist Society**, v.67, n.12, p.974-979, 1990.

YU, J.; AHMENDNA, M.; GOKTEPE, I. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. **Food Chemistry**, 103, p.121-129, 2007

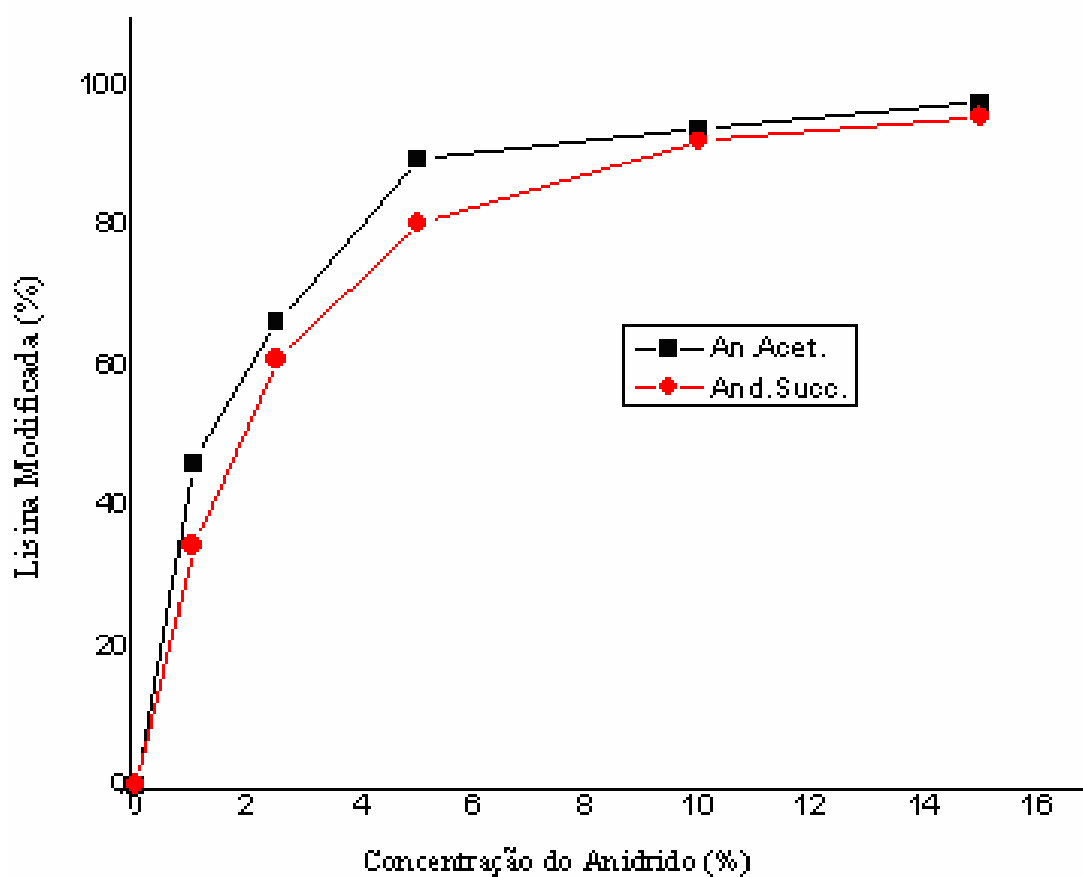
WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI F. Functional properties of acylated flax protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45, p.2431-2441, 1997.

WEBB, K. L.; CHU, F. L. E. Phytoplankton as a food sources for bivalve larvae. In: **Proceeding of 2^a International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and physiological approach to shell fish nutrition**. Pruder, G.D. , Langdon, C and Conklin, D.(eds). Louisiana State University, Baton Rouge, L.A. p. 272- 291, 1982.

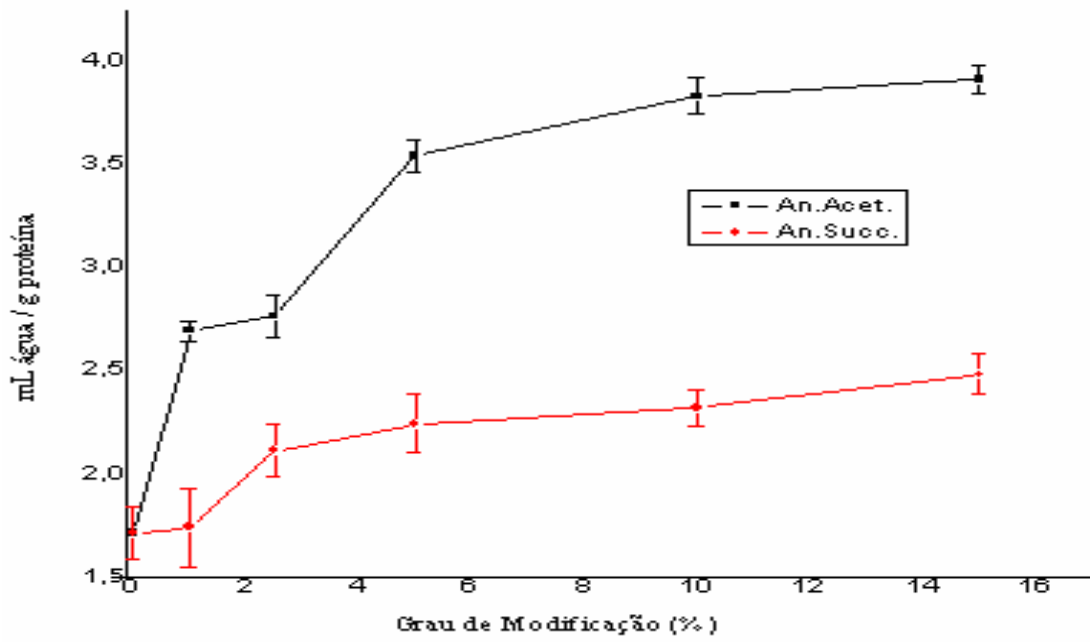
WHITE J. A.; HART R. J.; FRY J. C. An evaluation of the Waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry** 8, (4), p.170-177, 1986.

WILDING, P.; LILLFORD, P. J.; REGENSTEIN, J. M. Functional properties of proteins in foods. **Journal Chem. Technol. Biotechnol.**, v.34b, n.3, p.182-189, 1984

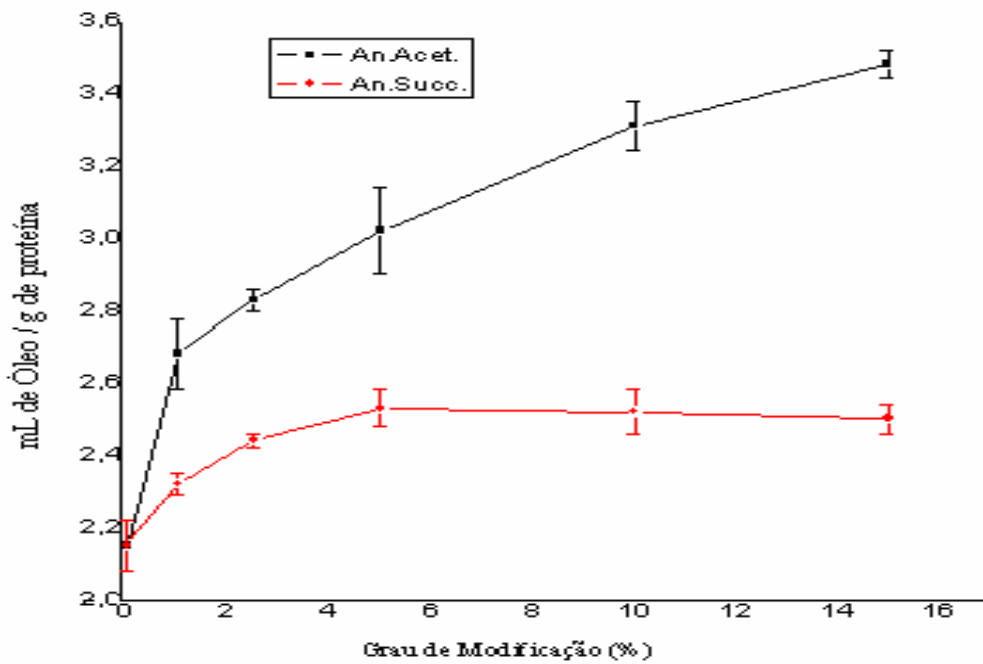
APÊNDICES



Apêndice 1 - Efeito da concentração de anidrido acético e anidrido succínico sobre o percentual de lisina modificada do isolado protéico da microalga *Spirulina máxima*.



Apêndice 2 - Capacidade de Absorção de Água dos isolados protéicos acetilado e succinilado da microalga *Spirulina máxima*.



Apêndice 3 - Capacidade de Absorção de óleo dos isolados protéicos acetilados e succinilados da microalga *Spirulina máxima*.

Apêndice 4 - Índice de solubilidade (%) dos isolados protéicos da microalga *Spirulina maxima* não modificado e modificados por acetilação e succinilação.

| Amostra | Solubilidade (%) | | | | | | |
|-----------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | pH2.0 | pH4.0 | pH5.0 | pH6.0 | pH8.0 | pH10.0 | pH12.0 |
| INM | 47,50 ± 1,25 ^a | 19,17 ± 0,86 ^a | 5,70 ± 0,63 ^e | 21,37 ± 0,55 ^f | 81,28 ± 0,36 ^h | 96,18 ± 0,36 ^c | 92,67 ± 0,65 ^e |
| IA45,92% | 42,66 ± 0,78 ^{bc} | 4,62 ± 0,29 ^c | 10,90 ± 0,26 ^{cd} | 27,99 ± 0,28 ^e | 84,63 ± 0,61 ^g | 97,24 ± 0,83 ^{bc} | 94,40 ± 0,73 ^{de} |
| IA66,25% | 41,07 ± 0,67 ^{cd} | 4,65 ± 0,74 ^c | 11,48 ± 0,20 ^{cd} | 31,42 ± 1,22 ^d | 86,75 ± 1,27 ^{efg} | 98,54 ± 1,17 ^{ab} | 96,65 ± 0,29 ^{bcd} |
| IA89,27% | 39,67 ± 0,85 ^{de} | 5,18 ± 0,87 ^{bc} | 12,48 ± 0,27 ^{bc} | 33,55 ± 0,43 ^{bc} | 88,56 ± 0,62 ^{cde} | 98,69 ± 0,51 ^{ab} | 97,12 ± 1,46 ^{abc} |
| IA92,03% | 37,78 ± 0,81 ^{ef} | 5,69 ± 0,55 ^{bc} | 13,72 ± 0,21 ^b | 35,18 ± 0,72 ^b | 91,05 ± 1,40 ^{abc} | 98,96 ± 0,21 ^{ab} | 98,34 ± 0,29 ^a |
| IA97,03% | 35,82 ± 0,77 ^f | 6,25 ± 0,45 ^{bc} | 15,54 ± 0,21 ^a | 39,83 ± 0,51 ^a | 92,86 ± 1,94 ^{ab} | 99,23 ± 0,48 ^{ab} | 98,78 ± 0,62 ^a |
| IS 34,34% | 44,23 ± 0,56 ^b | 5,15 ± 0,57 ^{bc} | 10,60 ± 0,41 ^d | 28,10 ± 0,96 ^e | 85,29 ± 1,55 ^{fg} | 97,68 ± 1,18 ^{abc} | 95,21 ± 0,53 ^{cd} |
| IS 60,71% | 42,69 ± 0,83 ^{bc} | 5,79 ± 1,46 ^{bc} | 11,39 ± 0,86 ^{cd} | 31,95 ± 0,86 ^{cd} | 87,80 ± 0,85 ^{def} | 98,95 ± 0,24 ^{ab} | 97,03 ± 0,63 ^{abc} |
| IS 80,30% | 40,61 ± 0,66 ^{cd} | 7,06 ± 0,83 ^{bc} | 12,56 ± 0,57 ^{bc} | 33,80 ± 0,38 ^{bc} | 90,54 ± 0,30 ^{bcd} | 98,90 ± 0,82 ^{ab} | 97,93 ± 0,93 ^{ab} |
| IS 91,91% | 37,19 ± 1,24 ^{ef} | 7,24 ± 0,93 ^b | 13,85 ± 1,12 ^b | 35,29 ± 0,45 ^b | 91,28 ± 0,46 ^{abc} | 99,43 ± 0,58 ^a | 98,42 ± 1,60 ^a |
| IS 95,41% | 35,92 ± 0,88 ^f | 7,48 ± 0,94 ^b | 15,79 ± 0,73 ^a | 40,30 ± 0,86 ^a | 93,35 ± 1,37 ^a | 99,51 ± 0,23 ^a | 98,86 ± 0,39 ^a |

FONTE: pesquisa própria.

Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão). Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

LEGENDA: INM – Isolado Não Modificado; IA45,92% – Isolado Acetilado 45,92%; IA66,25% – Isolado Acetilado 66,25%; IA89,27% – Isolado Acetilado 89,27%; IA92,03% – Isolado Acetilado 92,03%; IA97,03% - Isolado Acetilado 97,03%; IS34,34% - Isolado Succinilado 34,34 %; IS60,71% – Isolado Succinilado 60,71 %; IS80,30% – Isolado Succinilado 80,30 %; IS91,91% – Isolado Succinilado 91,91 % e IS95,41% – Isolado Succinilado 95,41 %.

Apêndice 5 - Atividade e Estabilidade de Espumação (%) dos isolados protéicos não modificado e modificados por acetilação e succinilação.

| Amostra | Atividade de Espumação (%) | Estabilidade de Espumação (%) | | | |
|----------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 5 min. | 10 min. | 30 min. | 60 min. |
| INM | 235,56 ± 3,85 ^h | 80,20 ± 1,14 ^{aA} | 66,03 ± 1,53 ^{aB} | 52,37 ± 1,66 ^{aC} | 46,24 ± 1,56 ^{aD} |
| IA45,96% | 310,00 ± 5,00 ^g | 69,89 ± 1,92 ^{bA} | 55,93 ± 1,76 ^{bB} | 50,00 ± 1,40 ^{aC} | 43,00 ± 1,30 ^{aD} |
| IA66,25% | 345,00 ± 5,00 ^f | 60,87 ± 1,27 ^{cA} | 46,87 ± 1,82 ^{cdB} | 37,18 ± 1,69 ^{cC} | 31,90 ± 1,91 ^{bD} |
| IA89,27% | 373,33 ± 7,64 ^{de} | 55,36 ± 1,77 ^{dA} | 43,29 ± 1,26 ^{deB} | 31,69 ± 1,13 ^{dC} | 26,80 ± 1,59 ^{cdD} |
| IA93,60% | 378,33 ± 7,64 ^d | 41,43 ± 1,59 ^{efA} | 36,14 ± 1,82 ^{gB} | 29,94 ± 1,42 ^{deC} | 21,17 ± 1,75 ^{eD} |
| IA97,03% | 368,33 ± 5,77 ^{de} | 38,45 ± 1,51 ^{fA} | 33,94 ± 1,47 ^{gB} | 23,97 ± 1,18 ^{fC} | 20,38 ± 1,63 ^{eC} |
| IS34,34% | 355,00 ± 5,00 ^{ef} | 77,93 ± 1,65 ^{aA} | 63,86 ± 1,20 ^{aB} | 50,72 ± 1,86 ^{aC} | 45,55 ± 1,03 ^{aD} |
| IS60,71% | 373,30 ± 7,64 ^d | 69,49 ± 1,71 ^{bA} | 55,32 ± 1,24 ^{bB} | 41,61 ± 1,51 ^{bC} | 32,32 ± 1,34 ^{bD} |
| IS80,30% | 416,70 ± 8,66 ^c | 61,07 ± 1,75 ^{cA} | 48,60 ± 1,91 ^{cB} | 37,76 ± 1,84 ^{bcC} | 28,92 ± 1,34 ^{bcD} |
| IS91,91% | 521,70 ± 7,64 ^a | 50,79 ± 1,20 ^{dA} | 40,90 ± 1,35 ^{efB} | 30,68 ± 1,19 ^{deC} | 27,17 ± 1,69 ^{cC} |
| IS95,41% | 500,00 ± 5,00 ^b | 43,34 ± 1,71 ^{eA} | 37,33 ± 1,45 ^{fgB} | 26,66 ± 1,38 ^{efC} | 22,34 ± 1,75 ^{deD} |

Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão). Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna, maiúscula na linha) não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Legenda: INM – Isolado Não Modificado; IA33,87% – Isolado Acetilado 33,87%; IA68,55% – Isolado Acetilado 68,55%; IA90,90% – Isolado Acetilado 90,90%; IA95,29% – Isolado Acetilado 95,29%.

Apêndice 6 - Capacidade de Emulsão (mL de óleo/100mg de proteína) dos isolados protéicos não modificado e modificados por acetilação e succinilação.

| Amostra | Capacidade de Emulsão (mL de óleo/100mg de proteína) | | | |
|-----------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | pH3.0 | pH5.0 | pH7.0 | pH10.0 |
| INM | 88,00 ± 1,00 ^{aC} | 40,33 ± 1,15 ^{gD} | 157,00 ± 1,00 ^{iB} | 180,67 ± 0,58 ^{hA} |
| IA45,92% | 84,28 ± 1,33 ^{bC} | 41,65 ± 1,24 ^{gD} | 165,80 ± 1,38 ^{hB} | 189,72 ± 1,72 ^{gA} |
| IA66,25% | 76,96 ± 1,53 ^{cdC} | 42,73 ± 0,92 ^{fgD} | 189,61 ± 1,15 ^{eB} | 201,73 ± 1,65 ^{eA} |
| IA89,27% | 61,61 ± 1,23 ^{fC} | 44,48 ± 0,79 ^{efD} | 193,68 ± 1,36 ^{dB} | 203,77 ± 1,30 ^{eA} |
| IA92,03% | 59,33 ± 1,03 ^{fC} | 46,12 ± 0,76 ^{eD} | 197,61 ± 1,13 ^{cB} | 215,95 ± 1,59 ^{dA} |
| IA97,03% | 55,08 ± 1,59 ^{gAC} | 49,08 ± 0,70 ^{cdD} | 202,42 ± 1,48 ^{bB} | 215,34 ± 0,94 ^{dA} |
| IS 34,34% | 86,38 ± 0,93 ^{abC} | 46,83 ± 0,73 ^{deD} | 173,62 ± 0,65 ^{gB} | 197,06 ± 1,12 ^{fA} |
| IS 60,71% | 80,39 ± 1,06 ^{cC} | 50,79 ± 0,61 ^{cD} | 180,76 ± 1,59 ^{fB} | 217,91 ± 0,76 ^{dA} |
| IS 80,30% | 76,09 ± 1,51 ^{dC} | 54,15 ± 1,72 ^{bD} | 188,48 ± 1,07 ^{dB} | 230,49 ± 1,00 ^{eA} |
| IS 91,91% | 67,82 ± 0,77 ^{eC} | 58,55 ± 0,81 ^{aD} | 193,25 ± 1,17 ^{dB} | 250,40 ± 0,97 ^{bA} |
| IS 95,41% | 60,31 ± 0,88 ^{fC} | 61,49 ± 0,51 ^{aC} | 212,64 ± 1,31 ^{aB} | 314,30 ± 1,76 ^{aA} |

Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão). Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na coluna, maiúscula na linha) não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

LEGENDA: INM – Isolado Não Modificado; IA45,92% – Isolado Acetilado 45,92%; IA66,25% – Isolado Acetilado 66,25%; IA89,27% – Isolado Acetilado 89,27%; IA92,03% – Isolado Acetilado 92,03%; IA97,03% - Isolado Acetilado 97,03%; IS34,34% - Isolado Succinilado 34,34 %; IS60,71% – Isolado Succinilado 60,71 %; IS80,30% – Isolado Succinilado 80,30 %; IS91,91% – Isolado Succinilado 91,91 % e IS95,41% – Isolado Succinilado 95,41 %.

ANEXO

ANEXO 1 - Índices das frações albumínica, globulínica, prolamínica e glutelínica de fontes vegetais oleaginosas.

| Material | Índices (%) | | | |
|--|--|---|---------------------------------------|---|
| | Albuminas | Globulinas | Prolaminas | Glutelinas |
| Canola (var. Hyola 60 ¹ e 420 ²) ¹ | 9,65 ¹ e 10,64 ² | 32,16 ¹ e 30,66 ² | 5,33 ¹ e 4,54 ² | 30,04 ¹ e 30,22 ² |
| Coco ² | 21,0 | 40,1 | 3,3 | 19,2 |
| Gergelim ³ | 8,59 | 65,25 | 1,35 | 6,9 |
| Macadâmia ⁴ | 14,32 | 68,67 | 2,15 | 13,63 |
| Castanha-do-pará ⁵ | 16,89 | 72,99 | 0,4 | 9,97 |
| Fava de morcego ⁶ | | | | |
| Faveleira com e sem espinho ⁷ | 16,46-16,05 | 63,37-63,91 | 1,23-1,27 | 11,67- 11,34 |
| Castanha de Caju ⁸ | 8,15 | 64,24 | 0,41 | 17,28 |

FONTE - Lourenço (2004)¹; Kwon, Park & Rhee (1996)²; Dench, Rivas & Caygill (1981)³; Ribeiro (2003)⁴; Ramos (2002)⁵; Queiroga (2005)⁶; Cavalcanti (2007)⁷; Márquez (2008)⁸

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)