

MONIQUE ELLEN TORRES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E TOXIDAZ DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus* E PROPRIEDADES TÉCNICO-FUNCIONAIS DE SUAS PROTEÍNAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra

Coorientadores: Márcio Arêdes Martins
Hércia Stampini Duarte Martino
Maurício de Oliveira Leite
André Fernando de Oliveira

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586c
2020
Silva, Monique Ellen Torres da, 1992-
Caracterização nutricional e toxidez da microalga
Scenedesmus obliquus e propriedades técnico-funcionais de suas
proteínas / Monique Ellen Torres da Silva. – Viçosa, MG, 2020.
128 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Algas verdes. 2. Hipoglicemia. 3. Sustentabilidade.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 664.07


MONIQUE ELLEN TORRES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E TOXIDEX DA MICROALGA *Scenedesmus obliquus* E PROPRIEDADES TÉCNICO-FUNCIONAIS DE SUAS PROTEÍNAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2020.

Assentimento:


Monique Ellen Torres da Silva
Autora


Jane Sélia dos Reis Coimbra
Orientadora

À minha família e a todos que torceram por mim,
DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por me guiar durante toda a trajetória da minha vida, conduzindo-me ao caminho certo;

À minha mãe Maria Torres e minha irmã Denise Ellen, pelo grande incentivo e apoio em todas as etapas de minha vida, dando as instruções de cidadania, educação e afeto, encorajando-me a buscar melhorias e a superar desafios que possibilitaram o meu crescimento;

Aos meus irmãos Diêgo Halison, Diogo Torres e Murilo Henrique, por sempre acreditarem em mim;

Às minhas tias Justina e Cleide, por mesmo longe, me apoiam nos momentos difíceis e por sempre acreditarem em mim. Pela educação por elas prestada, princípios e valores transmitidos e por terem feito de mim o que sou hoje, serei eternamente grata;

À minha orientadora professora Jane Coimbra, por todas as oportunidades, desafios, orientação, esclarecimentos, por ter acreditado e confiado em meu trabalho, agradeço imensamente;

Ao meu coorientador professor Marcio Arêdes, pela atenção, disponibilidade e ensinamentos e por me fornecer “os muitos kg de microalga” necessários para o desenvolvimento da tese;

À minha coorientadora professora Hércia Stampini, por toda ajuda e ensinamentos na parte *in vivo* do experimento;

A todos os meus professores, que tive oportunidade de aprender durante essa trajetória do doutorado, pelo incentivo, pelas sugestões, correções, esclarecimentos e por todo conhecimento transmitido;

Aos bolsistas de iniciação científica, Nayane Nascimento, Vanessa Lasneau, Matheus Franciole, Rafael Freire, Krissia Veloso e Amanda Martins por toda colaboração, apoio e torcida. Por estarem sempre presentes nos laboratórios com total presteza, foram de imensa ajuda;

À minha amiga Mithyzi Leal, “rainha da microalga *Chlorella*” por ter entrado de cabeça no mundo das microalgas comigo. Todas as dúvidas, discussões, reflexões juntas me fez crescer muito nessa área, fazendo com que tivéssemos um verdadeiro trabalho em equipe;

À minha amiga “Rap”, Kely Correa, pela parceria, por todo companheirismo, conversas, ajudas, por me escutar, chorar as “pitangas”, pelas fofocas, por me salvar inúmeras vezes e claro, pelas inúmeras risadas;

As minhas amigas Michele Harumi e Ana Paula, pelo companheirismo, ansiedades em conjunto, compartilhamento de conhecimentos nas propriedades técnico funcionais das proteínas, e por toda ajuda nessa trajetória;

A todos os meus membros do LOP/LEMA e colaboradores que passaram pelo laboratório ao longo desses 4 anos, por toda ajuda e companheirismo;

Às minhas amigas do Ceará, que mesmo distantes, estão sempre torcendo por mim;

À Petrobras por me permitir fazer parte de um projeto tão interessante, apoio financeiro à pesquisa, e por todas as oportunidades de troca de conhecimento dada;

Ao CNPq pelo apoio financeiro e a UFV pelo espaço concedido.

Enfim, a todos que, de alguma forma, participaram, torceram, acreditaram e me incentivaram a lutar por meus objetivos.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

BIOGRAFIA

Monique Ellen Torres da Silva, filha de Benunes Moreira da Silva e Maria José Torres da Silva, nasceu em Quixadá, Ceará, em 01 de abril de 1992.

Aos 16 anos, no início de 2009, iniciou a graduação em Tecnologia de Alimentos, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - Campus Limoeiro do Norte, concluída em março de 2013.

Em agosto de 2013 ingressou no Curso de Especialização em Segurança Alimentar na mesma instituição de ensino, tendo a defesa da pós-graduação lato sensu em julho de 2015.

Em agosto de 2013, ingressou também no Mestrado do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, no IFCE, submetendo-se à defesa de sua dissertação em julho de 2015.

Em agosto de 2015, ingressou no doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 28 de fevereiro de 2020.

Em novembro de 2019, entrou em exercício no cargo de Técnico em Alimentos e Laticínios no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares.

RESUMO

SILVA, Monique Ellen Torres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Caracterização nutricional e toxidez da microalga *Scenedesmus obliquus* e propriedades técnico-funcionais de suas proteínas.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Coorientadores: Márcio Arêdes Martins, Hércia Stampini Duarte Martino, Maurício de Oliveira Leite e André Fernando de Oliveira.

A necessidade por novas fontes de alimentos com produção sustentável é um dos maiores desafios e interesse de pesquisa na área de alimentos e nutrição. A microalga *Scenedesmus obliquus* possui resistência a diferentes condições climáticas e mudança de pH, sendo uma espécie robusta, capaz de se adaptar em diferentes condições, e possui alta quantidade de proteínas e outros biocompostos. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a ingestão de *S. obliquus*, como fonte de proteína na dieta de ratos Wistar machos, para determinar: (i) a ingestão segura da microalga em altas doses (11,6 g de microalga / 100 g de dieta e 23,2 g de microalga / 100 g de dieta), (ii) a influência da ingestão de microalgas no perfil bioquímico do sangue, (iii) o efeito do consumo da microalga nos aspectos morfofuncionais no fígado e nos rins; e (iv) qualidade *in vivo* da proteína da microalga; integrar a extração de proteína com a extração de outros compostos da microalga *S. obliquus* além de analisar a capacidade técnico funcional dessa proteína quanto a formação de espuma e emulsão e avaliar a capacidade e estabilidade de formação de emulsão destas proteínas, bem como a resistência destas emulsões a variação de pH e alta força iônica, afim de simular o que ocorre no processamento de alimentos emulsionados. As dietas contendo microalga *S. obliquus* nas concentrações de 11,6 % e 23,2 %, que correspondem a 50 % e 100 % da proteína da dieta, foram bem toleradas pelos ratos no período de alimentação de 28 dias. A ingestão de microalga *S. obliquus* reduziu o teor de triglicerídeos (70 %), índice aterogênico (80 %) e concentração sérica de glicose (42 %), mesmo em uma dieta balanceada. Além disso, não foi observada alteração nos órgãos analisados (fígado, baço e rim), sugerindo o uso da microalga como alimento potencialmente seguro. A inclusão da etapa de separação de proteínas antes da extração de lipídeos é uma alternativa para a produção de óleo com menor teor de pigmentos e interferentes, visto que a maior parte dos pigmentos é separada junto com as proteínas solúveis. O uso da rota proposta gerou um concentrado de proteína solúvel da microalga *S. obliquus*, livre de cor intensa, e com alta capacidade e estabilidade de formação de espuma e emulsão. As proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* podem ser úteis como ingredientes em formulações alimentares pela semelhança nos valores de estabilidade da emulsão em comparação com proteína isolada do

soro de leite e pela maior capacidade e estabilidade da espuma comparada com a proteína de soja. Além disso, as proteínas da microalga apresentaram alta estabilidade da emulsão, mesmo utilizando baixas concentrações (0,3 e 0,5 % de concentrado proteico contendo 63 % de proteína). Emulsões formadas com 0,5 % de proteína em pH 7,0 e 10,0 apresentaram estabilidade ao longo de 30 dias de armazenamento. As emulsões formadas a partir da microalga apresentaram resistência a mudança de pH (exceto próximo ao pI), e resistiram a altas concentrações de NaCl (≤ 500 mM), enquanto as proteínas de soja e soro de leite desestabilizaram em pH 4 a 6 e em concentrações acima de 100 mM de NaCl. Portanto, as proteínas da microalga *S. obliquus* possuem boa capacidade para formar emulsões estáveis, resistentes a variação de pH e à presença de sais, sendo assim, uma alternativa de agente emulsificante para uso na indústria de alimentos e aplicação em sistemas alimentares, mesmo em baixas concentrações.

Palavras-chave: Microalga. Hipoglicemiante. Hipolipidêmico. Emulsão. Extração de proteínas. Pigmentos. Carotenoides. Perfil ácido graxo. Ômega.

ABSTRACT

SILVA, Monique Ellen Torres, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Nutritional characterization and toxicity of microalga *Scenedesmus obliquus* and technical-functional properties of its proteins.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisers: Márcio Arêdes Martins, Hércia Stampini Duarte Martino, Maurício de Oliveira Leite and André Fernando de Oliveira.

The need for new sources of food with sustainable production is one of the greatest challenges and research interests in the area of food and nutrition. The microalgae *Scenedesmus obliquus* has resistance to different climatic conditions and pH changes, being a robust species, capable of adapting to different conditions, and has a high amount of proteins and other biocomposites. The objectives of this work were to evaluate the intake of *S. obliquus*, as a source of protein in the diet of male Wistar rats, to determine: (i) the safe intake of microalgae in high doses (11.6 g of microalgae / 100 g of diet) and 23.2 g of microalga / 100 g of diet), (ii) the influence of microalgae ingestion on the biochemical profile of the blood, (iii) the effect of microalgae consumption on the morphofunctional aspects in the liver and kidneys; and (iv) in vivo quality of the microalgae protein; integrate protein extraction with the extraction of other compounds from the microalgae *S. obliquus* in addition to analyzing the technical functional capacity of this protein in terms of foaming and emulsion and evaluating the emulsion formation capacity and stability of these proteins, as well as their resistance emulsions with varying pH and high ionic strength, in order to simulate what occurs in the processing of emulsified foods. Diets containing microalga *S. obliquus* in concentrations of 11.6% and 23.2%, which correspond to 50% and 100% of the dietary protein, were well tolerated by the rats in the 28-day feeding period. The good digestibility of the microalgal protein was also observed. Ingestion of microalga *S. obliquus* reduced the content of triglycerides (70 %), atherogenic index (80 %) and serum glucose concentration (42 %), even in a balanced diet. In addition, there was no change in the organs analyzed (liver, spleen, and kidney), suggesting the use of microalgae as a potentially safe food. The inclusion of the protein separation step before lipid extraction is an alternative for the production of oil with a lower content of pigments and interferents since most pigments are separated together with soluble proteins. The use of the proposed route generated a concentrate of soluble protein from the microalga *S. obliquus*, free of intense color, with high capacity and stability of foaming and emulsion. The microalgae proteins from microalga *S. obliquus* can be useful as ingredients in food formulations due to the similarity in the values of

the emulsion stability compared to whey protein alone and by the greater capacity and stability of the foam compared to the soy protein. In addition, the microalgae proteins showed high emulsion stability, even using low concentrations (0.3 and 0.5% protein concentrate containing 63% protein). Emulsions formed with 0.5% protein at pH 7.0 and 10.0 showed stability over 30 days of storage. The emulsions formed from the microalgae showed resistance to pH changes (except close to pI), and resisted high concentrations of NaCl (<500 mM), while soy and whey proteins destabilized at pH 4 to 6 and in concentrations above 100 mM NaCl. Therefore, the proteins of the microalga *S. obliquus* have a good capacity to form stable emulsions, resistant to pH variation and the presence of salts, being, therefore, an alternative of emulsifying agent for use in the food industry and application in food systems, even low concentrations.

Keywords: Microalgae. Hypoglycemic. Hypolipidemic. Emulsion. Protein extraction. Pigments. Carotenoids. Fatty acid profile. Omega.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO 1	18
Revisão de literatura	18
1 Microalgas e sua importância.....	19
2 <i>Scenedesmus</i> spp.	20
3 Composição química das microalgas	22
4 Estudo <i>in vivo</i> de microalgas e seus efeitos nutracêuticos.....	23
5 Extração de proteínas de microalga	26
6 Aplicações alimentares das microalgasc27	
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2.....	34
Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and <i>in vivo</i> protein quality of microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> in Wistar rats	34
ABSTRACT.....	36
1. INTRODUCTION.....	37
2. MATERIALS AND METHODS.....	38
2.1. Production and composition of the microalga	39
2.1.1 Centesimal composition of the microalga.....	39
2.1.2 Extraction, quantification and antioxidant activity of carotenoids and phenolic compounds.....	39
2.1.3 Unsaturated fatty acid profile	41
2.2 Diets	42
2.3 Animals and experimental design	43
2.4 <i>In vivo</i> protein quality (FER, PER, NPR, and digestibility)	44
2.5 Blood biochemistry and histological analyses	45
2.6. Statistical analysis.....	46
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	46
3.1. Composition of the microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	47

3.2 Survival, food consumption, body weights and <i>in vivo</i> protein quality (FER, PER, NPR, and digestibility)	49
3.3. Feces production and true and relative digestibility	52
3.4. Effects of microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> on biochemical blood parameters	53
3.5. Histological analysis	57
Conflict of interest	61
Acknowledgments.....	61
References.....	61

CAPÍTULO 3.....67

Extração integrada de proteínas, lipídeos e pigmentos da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> e propriedades técnico-funcionais de suas proteínas	67
Resumo:	68
1 INTRODUÇÃO.....	68
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1. Cultivo e crescimento das microalgas.....	70
2.2. Separação da biomassa microalgal	70
2.3. Composição centesimal das microalgas.....	71
2.4. Rompimento das células.....	71
2.5 Otimização de extração de proteínas	72
2.5.1 Influência do pH na extração de proteínas solúveis no rompimento celular .	72
2.5.2 Efeito do pH do meio sobre a solubilidade da proteína microalgal	72
2.5.3 Otimização das condições operacionais para extração da proteína insolúvel	73
2.5.4 Ponto isoelétrico para isolamento da proteína microalgal	73
2.6. Extração integrada de proteínas, pigmentos e lipídeos.....	73
2.10. Análise de cor	75
2.11. Quantificação de pigmentos e lipídeos.....	75
2.12. Perfil de ácidos graxos antes e após a extração de proteínas.....	75
2.13. Propriedades técnico funcionais do concentrado de proteínas da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	76
2.13.1. Capacidade de formação de espuma (FC) e estabilidade da espuma (FS)..	76
2.13.2. Propriedades emulsionantes	76
2.14 Análise estatística.....	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1. Composição centesimal da microalga <i>S. obliquus</i>	77
3.2 Solubilidade e otimização da extração da proteína	78

3.3. Extração de co-produtos e precipitação de proteínas	80
3.4 Perfil ácido graxo do óleo da microalga <i>Scenedemus obliquus</i> antes e após a extração da proteína	88
3.5. Propriedades técnico-funcionais das proteínas.....	90
3.5.1. Capacidade e estabilidade de formação de espuma	90
3.4.2. Capacidade e estabilidade da emulsão	92
4 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS.....	93
CAPÍTULO 4.....	99
Propriedades emulsificantes do concentrado proteico extraído da microalga <i>Scenedemus obliquus</i> visando a aplicação em sistemas alimentares	99
Resumo:	100
1 INTRODUÇÃO.....	100
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	102
2.1 Obtenção de proteínas da microalga <i>Scenedemus obliquus</i>	103
2.2 Influência da concentração da proteína e do pH sobre a formação da emulsão.....	103
2.3 Avaliação da estabilidade da emulsão ao longo do tempo	104
2.4 Medição de tamanho de partícula	104
2.5 Índice de polidispersidade (PDI)	105
2.6 Índice de cremeação (CI)	105
2.7 Teste de estabilidade da emulsão ao estresse por mudança de pH	106
2.8 Teste de estabilidade da emulsão ao estresse por aumento de salinidade	106
2.9 Análise estatística.....	107
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
3.1 Composição do concentrado proteico da microalga <i>Scenedemus obliquus</i> ...	107
3.2 Teste de estabilidade da emulsão ao estresse por mudança de pH	115
3.3 Teste de estabilidade da emulsão ao estresse por alta salinidade	119
4 CONCLUSÃO.....	124
REFERÊNCIAS.....	124
CONCLUSÕES GERAIS.....	128

1 INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas, em geral, têm atraído a atenção de diferentes campos de pesquisa por conterem biocompostos valiosos que podem ser utilizadas nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, ração animal, biodiesel. O maior interesse nas microalgas está na grande eficiência desses microrganismos na conversão de energia solar em biomassa e estes possuem taxas de crescimento maiores do que as plantas. Conseqüentemente, mais biocompostos de interesse são produzidos em um curto período de tempo em comparação com as fontes tradicionais. Além disso, as microalgas possuem o apelo de sustentabilidade por possuírem uma grande capacidade de sequestro de gás carbônico (CO₂) sem demandar grandes áreas de cultivo, em comparação com as plantas. Assim, este cultivo pode ser aplicado em áreas não adequadas para as culturas tradicionais, não competindo com os locais de produção de alimentos.

As microalgas possuem alta quantidade de proteínas, carboidratos, lipídeos, pigmentos e outros biocompostos. A necessidade por novas fontes de alimentos com produção sustentável é um dos maiores desafios e interesse de pesquisa na área de alimentos e nutrição. Deste modo, a biomassa concentrada de microalgas, rica em proteínas de alta qualidade nutricional e em micronutrientes, pode ser uma forma de combate à fome e à “fome oculta”, sendo uma forma de redução de risco de agravos crônicos não transmissíveis e carências nutricionais. Além disso, existem algumas espécies de microalgas que possuem atividades benéficas a saúde, como atividade hipolipidêmicas, hipoglicemiantes, nutritivas, entre outras atividades funcionais.

A microalga *Scenedesmus obliquus* tem atraído bastante a atenção de pesquisadores por possuir resistência a diferentes condições climáticas e mudança de pH, sendo uma espécie robusta, capaz de se adaptar em diferentes condições, e por possuir alta quantidade de proteínas e outros biocompostos funcionais. Dados na literatura da influência da ingestão de outras espécies de microalgas demonstram efeitos benéficos na saúde. Entretanto, quando se propõe novas espécies de microalgas como alimento ou ingrediente alimentar para o consumo humano, existe a necessidade de estabelecer o nível de toxicidade. Deste modo, se faz necessário avaliar a ingestão de *Scenedesmus obliquus*, para determinar a ingestão segura desta microalga em altas doses, a influência da ingestão no perfil bioquímico do sangue, o efeito do consumo da microalga nos aspectos morfofuncionais do fígado e dos rins; e a qualidade *in vivo* da proteína da microalga.

Além da produção de microalgas para alimentação, a exploração de biocompostos extraídos destas tem sido o foco de diferentes ramos de pesquisa. A extração de vários

biocompostos da microalga é um desafio a ser superado, pois estas possuem moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, e para a extração de ambas são necessárias solventes de diferentes naturezas. Portanto, a valorização completa da biomassa de microalgas requer o uso de etapas de separação moderadas, e métodos combinados que forneça curto tempo de processamento e alta eficiência de extração, além da preservação da qualidade e atividade dos biocompostos. A extração de lipídeos de microalgas para posterior conversão em biodiesel vem sendo um desafio mundial das indústrias de biocombustíveis e entidades de pesquisas. A microalga *S. obliquus* possui alta quantidade de biocompostos, incluindo proteínas (35 – 56 %), carboidratos, pigmentos dentre outros. A extração total das proteínas de microalga utilizando somente variação de pH possui baixa eficiência de extração, ocorrendo assim a necessidade de integrar outros processos. Embora as microalgas contenham vários biocompostos de interesse, os processos de separação atualmente aplicados valorizam apenas um produto específico, sendo assim necessário o desenvolvimento de processos e métodos eficientes, de custo acessível e escalonáveis, capazes de fracionar diferentes biomoléculas de microalgas. Dessa forma, a integração de processos para extração de proteínas, lipídeos e pigmentos da microalga *S. obliquus* é uma realidade a ser superada, além de verificar a qualidade desses biocompostos extraídos. Dentre estes biocompostos, o que está presente em maior quantidade é a proteína.

Proteínas de diferentes espécies de microalgas foram testadas quanto a formação de emulsão e apresentaram atividades superiores as proteínas alimentares comuns, como soja e soro de leite. Existem alguns dados na literatura sobre a microalga *S. obliquus* e suas proteínas, porém não existem dados sobre as propriedades técnico-funcionais e emulsificantes destas. Dessa forma, além da extração da proteína, é necessário avaliar a capacidade de formação e estabilidade da emulsão das proteínas extraídas da microalga *S. obliquus*, bem como a resistência destas emulsões a variação de pH e alta concentração de sal, afim de simular o que ocorre no processamento de alimentos emulsionados, podendo assim, compará-las a outras proteínas alimentares.

2 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo geral

Analisar e caracterizar a qualidade nutricional e toxidez da microalga *Scenedesmus obliquus* bem como extrair seus compostos e avaliar a qualidade dos mesmos

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a microalga *Scenedesmus obliquus* quanto a sua composição centesimal em termos da umidade, cinzas, lipídeos, carboidratos, fibra e proteínas;
- Avaliar a ingestão segura da microalga *Scenedesmus obliquus* em altas doses (11,6 g de microalga / 100 g de dieta e 23,2 g de microalga / 100 g de dieta) em ratos Wistar;
- Avaliar a ingestão da microalga como fonte de proteínas (50 e 100 %) e sua eficiência proteica *in vivo* em ratos Wistar por meio dos índices biológicos: Coeficiente de Eficiência Alimentar CEA, Razão de Eficiência Proteica (PER), Razão Proteica Líquida (NPR) e digestibilidade;
- Avaliar a influência da ingestão de microalgas no perfil bioquímico do sangue de ratos Wistar;
- Avaliar o efeito consumo da microalga nos aspectos morfofuncionais do fígado e dos rins de ratos Wistar;
- Elaborar a curva de solubilidade das proteínas e identificar os pontos de maior solubilidade e ponto isoelétrico;
- Identificar o ponto isoelétrico do concentrado proteico da microalga em zetasizer;
- Otimizar a extração de proteínas da microalga quanto ao pH e tempo;
- Integrar a extração de proteínas com a extração de pigmentos e lipídeos da microalga utilizando diferentes solventes;
- Avaliar a capacidade técnico funcional dessa proteína quanto a capacidade de formação de espuma sua estabilidade;
- Caracterizar o concentrado proteico produzido da biomassa microalgal;
- Avaliar a capacidade de formação e estabilidade da emulsão das proteínas extraídas da microalga *S. obliquus* em diferentes concentrações e pH;
- Verificar a resistência destas emulsões a variação de pH e alta concentração de sal após formadas, afim de simular o que ocorre no processamento de alimentos emulsionados.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

1 Microalgas e sua importância

As microalgas constituem um grupo de microrganismos fotossintéticos que crescem muito rápido devido a sua estrutura simples, são organismos predominantemente aquáticos e geralmente são seres unicelulares, capazes de formar colônias; e possuem semelhanças ou poucas diferenciações celulares. No seu metabolismo, combinam dióxido de carbono, água e luz solar para produzirem diferentes formas de energia para formar biomassa, que pode ser utilizada na produção de alimentos, fertilizantes, ingredientes alimentares, ração animal, biocombustíveis e captura de CO₂. Apresentam sustentáveis sendo assim uma opção viável como fonte para uso na produção de bioenergia (RAVEN et al., 2005; CHISTI, 2007; ANDRADE et al., 2008; CHISTI, 2008; SOBCZUK; CHISTI 2010). As microalgas, em geral, produzem significativamente mais oxigênio em relação plantas, sendo assim, responsáveis pela produção primária de aproximadamente 60 % do oxigênio da Terra (CHISTI, 2004).

O termo “microalgas” não possui valor taxonômico, por englobar microrganismos algais que possuam clorofila e outros pigmentos fotossintéticos que são capazes de realizar a fotossíntese de forma oxigenada (PÉREZ, 2007). As microalgas podem utilizar diferentes vias metabólicas energéticas para manutenção de suas estruturas, como fixação/assimilação de nitrogênio, respiração e fotossíntese, tornando algumas espécies opções para aplicação tecnológica de amplo espectro (BOROWITZKA, 1990; QUEIROZ, et al., 2007). As microalgas possuem potencial promissor para produzir diversos bioprodutos de alto valor, aplicando condições de estresse e estimulando assim a produção do composto de interesse (LIANG et al., 2018). Dependendo da cepa, as microalgas podem conter diferentes tipos de pigmentos, como carotenoides (vermelho, laranja e amarelo), clorofilas (verde), e ficobiliproteínas (vermelho e azul). Além disso, suas proteínas são reconhecidas por alta qualidade, mostrando excelentes propriedades funcionais, nutricionais, e tecno-funcionais que são, em alguns casos, superiores aos concentrados proteicos convencionais (AFIFY et al., 2018; SUAREZ GARCIA et al., 2018; SCHWENZFEIER et al., 2013).

Nos últimos anos, as microalgas têm sido consideradas como uma das matérias-primas mais promissoras para a produção de biocombustíveis. O cultivo destes microrganismos ganhou interesse devido à sua maior eficiência na conversão de energia solar em biomassa (3% *versus* 0,5% nas plantas vasculares), resultando em elevadas taxas de crescimento (1-3 duplicações por dia). Possuem uma capacidade superior de sequestro e conversão do CO₂ em O₂ e matéria orgânica, além de um potencial para crescimento rápido, podendo ser aplicado em áreas não adequadas para as culturas tradicionais, inadequadas para fins agrícolas, não competindo com

os locais de produção de alimentos (WAGHMARE et al., 2016; GONG; JIANG, 2011; ASSUNÇÃO, 2014; PEREIRA et al., 2012).

O seu crescimento em meio líquido possibilita a utilização de águas salobras ou residuárias reduzindo-se desta forma a utilização de água doce, e com a vantagem de as culturas poderem ser induzidas a produzir elevadas concentrações do metabólito desejado com cultivo sem necessidade de utilização de fertilizantes e/ou pesticidas. Além disso, a produção de biomassa de microalgas também pode ser realizada em meios de cultura alternativos, entre os quais é possível destacar: esgoto doméstico esterilizado, efluentes de biodigestores, lodo digerido, vinhaça de cana-de-açúcar, águas residuais da produção de azeite de oliva e resíduos da suinocultura. Estes microrganismos podem ser cultivados de diferentes formas e em sistemas de produção, que podem variar o volume de pequenas quantidades até bilhões de litros (BERTOLDI, 2008; ANDRADE; COSTA, 2008; BAUMGARTNER et al., 2013; ASSUNÇÃO, 2014).

A biomassa de microalgas contém três componentes principais: proteínas, lipídeos e carboidratos, entre outros polissacarídeos, pigmentos e enzimas (GRESSLER et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Metabólitos são os produtos finais ou intermediários do metabolismo (PEREIRA et al., 2012). Os metabólitos primários estão envolvidos diretamente no crescimento, desenvolvimento e reprodução, enquanto os metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos nestes processos, possuindo essencialmente funções ecológicas importantes (MOSTAFA, 2012; SASSO et al., 2012). A indução do metabolismo secundário está relacionada com condições ambientais e/ou estágios de desenvolvimento (MOSTAFA, 2012).

2 *Scenedesmus* spp.

Uma variedade de microalgas aquáticas, incluindo a microalga verde *Scenedesmus*, têm sido estudados quanto a sua eventual eficácia como recursos biológicos para aplicações como alimentos para peixes, alimento humano, nutrientes humanos suplementares e produtos farmacêuticos (BELAY et al., 1993), como também aditivo da tecnologia de purificação de águas residuais secundárias para atender a critérios de descarga de efluentes mais rigorosos (WANG et al., 2016).

Águas residuais contendo os resíduos biológicos dos animais, que abriga nitrogênio inorgânico abundante e fosfato, é uma das mais importantes causas de eutrofização em cursos de água. Microalgas, incluindo *Scenedesmus*, têm sido utilizados como agentes

biorremediadores na remoção de nutrientes inorgânicos da água poluída para melhorar a qualidade de curto prazo (MARTINEZ et al., 2000). Este tipo de águas residuais, também tem sido utilizada como um meio de cultura de microalgas (OLGUIN et al., 2001, OLGUIN et al., 2003 e AN et al., 2003).

Scenedesmus spp. é uma microalga verde simples, facilmente colhida e o mais importante é a sua capacidade de acumular biocompostos de interesse para as indústrias. O conteúdo de lipídeos e amido dentro da célula são compostos valiosos para biodiesel e bioetanol, respectivamente. Além de características típicas, como alta eficiência fotossintética, a simples estrutura de *Scenedesmus*, simplifica o processamento de biocombustíveis subsequentes em comparação com outras plantas complexas. Processamento de biocombustíveis da biomassa é crucial para determinar o custo e a sustentabilidade energética de microalgas como uma forma de substituição de recursos na agricultura convencional (LIEW et al., 2014; CHNG et al., 2016).

Em estudo realizado por CHNG et al. (2016) o bioetanol foi produzido com sucesso a partir da biomassa extraída de *Scenedesmus* com o rendimento máximo de bioetanol de 0,26 g de bioetanol / g de microalgas equivalente a 7,34 g / L em 2 h. Em outro estudo, uma cepa de *Scenedesmus komarekii*, rica em carotenoides, foi relatado anteriormente por alguns autores, produzindo o principal carotenoide, Cantaxantina. Outra espécie, *Scenedesmus almeriensis*, foi encontrada por acumular até 0,55% de luteína; a vantagem desta é a sua alta temperatura ideal (35 ° C) e tolerância a altas irradiações (SANCHEZ et al., 2008). Přibyl et al. (2015) extraíram carotenoides de *Scenedesmus* spp. e afirmaram que a facilidade de cultivo e robustez de algumas cepas de *Scenedesmus* torna-os mais adequados para uma produção de larga escala sustentável, sendo propensas à produção de carotenoides e outros compostos. A espécie *Scenedesmus obliquus* possui alta tolerância a variações climáticas e de pH, é nativa do Brasil, exibe uma elevada taxa de crescimento, um potencial grande de exploração, e uma alta quantidade de luteína, um carotenoide de alto valor biológico (CHAN, et al., 2013; SOARES et al., 2018). Há vários anos, outras espécies de *Scenedesmus* isolados foram propostos como um potencial produtor de carotenoides, e sua acumulação de carotenoides secundários foi descrito (PIRASTRU et al., 2012).

A microalga *Scenedesmus obliquus* apresenta alta taxa de crescimento e alta tolerância a variações climáticas, além de apresentar facilidade de serem cultivadas, sendo assim, promissoras para a produção sustentável em larga escala de vários biocompostos (CHAN et al., 2013; AFIFY et al., 2018). Silva et al. (2020) analisaram a toxicidade dessa espécie de microalga em ratos Wistar e não foi observada alteração nos órgãos analisados (fígado, baço e

rim), sugerindo o uso dessa microalga como alimento potencialmente seguro, mesmo utilizando ingestão de altas concentrações desta (23,2 %). Além disso, o consumo dessa microalga reduziu o teor de triglicerídeos (70 %), índice aterogênico (80 %) e concentração sérica de glicose (42 %), em ratos Wistar, mesmo em uma dieta balanceada (SILVA et al., 2020). Esta espécie possui de 30 a 56 % de proteínas (AFIFY et al., 2018, BECKER, 2007; SILVA et al., 2020), dependendo do cultivo, e é fonte de aminoácidos essenciais (Thr, Val, Met, Ile, Leu, His) e não essenciais (Arg, Ala, Pro, Asp) (AFIFY et al., 2018). Além disso, as proteínas dessa microalga apresentaram atividades (i) *in vitro* como atividades antioxidantes e antivirais com efeito inibitório contra o vírus Coxsackie B3 (AFIFY et al., 2018), e (ii) *in vivo*, como alta digestibilidade, e alta eficiência para o desenvolvimento e crescimento de órgãos e tecidos animais em ratos Wistar, apresentando-se como um potencial candidato a ser utilizado na alimentação humana em diferentes estágios de crescimento (SILVA et al., 2020).

3 Composição química das microalgas

Desde o início dos anos 50, intensos esforços foram feitos para explorar novas fontes alternativas de proteínas como suplementos alimentares, principalmente em antecipação de uma prévia insuficiência de proteínas no futuro. Para estes, leveduras, fungos, bactérias e microalgas, foram testadas na tentativa da produção de proteínas a partir da biomassa de diferentes fontes microbianas. No caso da alga, deve-se ressaltar que, devido a razões técnicas e econômicas, não é intenção de isolar e utilizar unicamente a proteína, por que a microalga é definitivamente mais do que apenas proteína (BECKER, 2007).

Além das proteínas, as algas e microalgas possuem à capacidade de produzir as vitaminas necessárias como: A (Retinol), B1 (Tiamina), B2 (Riboflavina), B3 (Niacina), B6 (Piridoxina), B9 (ácido fólico), B12 (Cobalamina), C (ácido L-ascórbico), D, E (Tocoferol) e H (Biotina), além de produzirem elementos essenciais, incluindo: potássio, zinco, iodo, selênio, ferro, Manganês, Cobre, Fósforo, Sódio, Nitrogênio, Magnésio, Cobalto, Molibdênio, Enxofre e Cálcio. As algas também são altas produtoras de aminoácidos essenciais e ômega 6 e ômega 3 (SIMOONS, 1991; BECKER, 2007; BISHOP; ZUBECK, 2012). O Quadro 1 mostra a composição química de algumas microalgas quanto ao teor de proteínas, lipídeos e carboidratos.

As algas podem fornecer uma fonte significativa de um número diversificado de nutrientes críticos para apoiar a saúde humana. As algas são onipresentes em todo o mundo e persistiram e prosperaram em vários tipos de ambientes. As adaptações que desenvolveram e propagaram são acompanhadas por benefícios para os organismos acima da cadeia alimentar.

Muitos desses carotenoides, acúmulo de minerais, aminoácidos e etc. levaram a uma extensa base de compostos que são críticos em saúde humana. Além disso, possuem uma variedade incomum de qualidade nutricional quando comparado a plantas convencionais em nossa dieta e consiste, ao lado da proteína, de um amplo espectro de outros nutrientes, como peptídeos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, pigmentos, minerais e outros vestígios de elementos valiosos (BECKER, 2007; BISHOP; ZUBECK, 2012).

Quadro 1 - Composição geral de diferentes algas (% de matéria seca)

Alga	Proteína	Carboidratos	Lipídeos
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Arthrospira máxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Fonte: BECKER, 2007

4 Estudo *in vivo* de microalgas e seus efeitos nutracêuticos

Monteiro et al. (2004) em seus estudos, relata sobre a influência dos fatores anti-nutricionais sobre a qualidade proteica de alguns produtos que pode levar a diminuição no

ganho de peso e crescimento de pessoas e animais. Em se tratando da qualidade nutricional, muitos estudos prestam ênfase à composição de aminoácidos de microalgas, porém, é escasso o número de trabalhos que avaliam a qualidade dessa proteína, sua capacidade de gerar crescimento, de atuar como fator nutricional positivo e em que magnitude, quando comparado a proteínas padrão. Tais estudos estão no domínio da nutrição experimental, que se utiliza de modelos animais para mimetizar o comportamento dos nutrientes no trato gastrointestinal. A avaliação da qualidade proteica permite classificar as proteínas de acordo com o seu potencial nutritivo, detectar mudanças no valor nutritivo devido ao processamento e/ou estocagem, contribuindo para avaliar as necessidades de nitrogênio e aminoácidos para o crescimento e a manutenção da vida (SCHAAFSMA, 2005; MOREIRA et al., 2013).

A escolha do método de avaliação da qualidade proteica depende da precisão do método, da reprodutibilidade, rapidez e custos. O rato é o modelo animal frequentemente escolhido para ensaios em que se pretende avaliar nutrientes em termos de nutrição humana. Porém, esse modelo experimental pode levar à subestimação da qualidade proteica para o homem, pois este requer menor quantidade de proteína para o crescimento e maior para a sua manutenção quando comparado ao rato. Os principais métodos de avaliação da qualidade proteica *in vivo* incluem: Razão da Eficiência Proteica (PER) e a Razão Proteica Líquida (NPR) (MARTINO et al., 2013).

Ensaio utilizando esses métodos são geralmente conduzidos em ratos, com dieta-padrão apropriada para esses animais. A dieta AIN93-G, proposta por Reeves et al. (1993), preconiza 20% (pelo menos 17% de proteína) de caseína para garantir o crescimento ótimo dos animais. No entanto, nos ensaios de qualidade proteica, esta dieta é modificada para 9,5% de proteína, o que permite diferenciar a qualidade das proteínas dos alimentos a serem testados.

Silva et al. (2020) verificaram que dietas contendo microalga *Scenedesmus obliquus* nas concentrações de 11,6 % e 23,2 %, que correspondem a 50 % e 100 % da proteína da dieta, foram bem toleradas pelos ratos no período de alimentação de 28 dias. A dieta formulada com 50 % de microalgas e 50 % de caseína promoveu crescimento, ganho de peso e manutenção dos tecidos dos animais. Também foi observada boa digestibilidade da proteína microalgal. A ingestão de microalga *S. obliquus* reduziu o teor de triglicérides (70%), índice aterogênico (80%) e concentração sérica de glicose (42%), mesmo em uma dieta balanceada. Além disso, não verificaram alteração nos órgãos analisados (fígado, baço e rim), sugerindo o uso da microalga como alimento potencialmente seguro.

Moreira et al. (2013) avaliaram o uso de *Spirulina platensis* na alimentação de ratos, nas proporções de 50 e 100 %, e encontraram valores de, respectivamente, 0,25 e 0,17 para FER e

2,75 e 1,60 para PER. Janczyk et al. (2007) relataram valores de PER (1.4) e digestibilidade verdadeira (~ 53 %) em experimentos com ratos com dietas M100 de *Chlorella vulgaris* secas por pulverização. Os autores relataram o aumento da digestibilidade verdadeira (63 %) e PER (2,1) com o M100 de *Chlorella vulgaris* aplicando ultra-som à biomassa.

Silva et al. (2020) analisaram a influência da ingestão microalga *S. obliquus* nas dietas de ratos Wistar e verificaram que esta microalga promoveu redução dos triglicerídeos sanguíneos em até 70 %, aumento da razão entre HDL e colesterol total e não influenciou os níveis normais de colesterol total e HDL. Portanto, o consumo de *S. obliquus* exerceu um efeito positivo na homeostase lipídica. A atividade hipolipidêmica das microalgas *Arthrospira maxima* e *Arthrospira platensis* foi relatada na literatura em dietas pró-aterogênicas de alto risco induzidas hipercolesterolemia e em uma dieta bem equilibrada contendo essas microalgas (BIGAGLI et al., 2017, COLLA et al., 2008, KIM et al., 2010, RISS et al., 2007, SENGUPTA et al., 2018; SERBAN et al., 2016).

Alguns autores verificaram uma redução significativa em níveis séricos de glicose à medida que a concentração de microalgas na dieta aumentava influenciando positivamente a homeostase da glicose e observou-se redução da glicemia, mesmo com dietas isocalóricas e animais saudáveis. Esse efeito das microalgas na homeostase de glicose foi verificado para diferentes espécies de microalgas, como *Scenedesmus obliquus* (Silva et al., 2020), *Chlorella vulgaris* (EBRAHIMI-MAMEGHANI et al., 2017, JONG-YUH E MEI-FEN, 2005); *Isochrysis galbana* (NUÑO et al., 2013); *Spirulina fusiformis* (SETYANINGSIH, BINTANG & MADINA, 2015), para o qual a redução da glicose sérica foi verificada ao usar uma dieta balanceada para animais saudáveis e diabéticos.

Cepas de microalgas cultivadas comercialmente, como *Aphanizomenon flosaquae*, *Chlorella sp.* e *Arthrospira sp.*, contêm grandes quantidades de proteínas, carotenóides e compostos fenólicos que possuem ações farmacológicas benéficas (SOLETTO et al., 2005), como atividades anti-hiperglicêmicas e anti-hiperlipidêmicas. Essas funcionalidades biológicas atuam no nível sérico de glicose, sendo úteis no controle do diabetes e da obesidade (HUSSEIN et al., 2019). Hussein et al. (2019) estudaram o consumo de dois níveis de dose de *Microcystis aeruginosa* seca (200 e 400 mg / kg) por ratos diabéticos e descobriram que o nível de glicose de ratos diabéticos era dependente da dose quando comparado com ratos controle diabético e ratos tratados com glimepirida. *Spirulina platensis* também demonstrou atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica em ratos diabéticos, segundo Joventino et al. (2012).

5 Extração de proteínas de microalga

A fim de aumentar a viabilidade de microalgas como matéria-prima para biocombustíveis, é necessário agregar co-produtos da extração de lipídeos (GERDE et al., 2013). A biomassa tanto integral como livre de lipídeos pode ser utilizada para recuperar componentes de proteínas e paredes celulares para aplicações como ingredientes alimentares (CARVAJAL, 2009), cosméticos e matérias-primas para a preparação de antioxidantes (STOLZ et al., 2005; SPOLAORE et al., 2006; SHEIH et al., 2009).

Para a extração de proteínas de microalgas, os autores se baseiam na forma de extração e produção de isolado proteico de soja. A produção do isolado de proteína de soja é baseado na solubilização de proteínas em condições de pH elevado e precipitação das proteínas nos seus pontos isoelétricos, da farinha de soja livre de lipídeos (DEAK et al., 2008). Gerde et al. (2013) isolaram proteína a partir da biomassa livre de lipídeos e integral da microalga *Nannochloropsis* spp. possuindo como base a solubilidade e precipitação de ponto isoelétrico das proteínas, otimizando o isolamento sob pH elevado e condições de temperatura elevada.

Schwenzfeier et al. (2011) em estudo de isolamento e caracterização de proteína de algas *Tetraselmis* sp. verificaram que um processo de isolamento suave, foi possível para produzir um isolado de proteínas de algas *Tetraselmis* sp. Eles verificaram que o isolado obtido mostrou comportamento de solubilidade independente da força iônica. As semelhanças na composição de aminoácidos e na composição de proteína do isolado de várias microalgas verdes sugerem que outras algas também podem ser úteis para aplicações alimentares que requerem adições de proteínas.

Schwenzfeier et al. (2013) obtiveram 21 % de proteína da microalga de *Tetraselmis* sp. usando a extração de proteínas pelo método de moagem de esferas. Gerde et al. (2013) extraíram cerca de 12 % de proteínas da microalga *Nannochloropsis* spp., usando pH 11 e 60 °C, e cerca de 15 % quando acrescentaram 1 min de sonicação. O tempo de extração foi de 5 h para ambos os experimentos. Wang e Zhang (2012) obtiveram 48,7 % de proteína da microalga *C. pyrenoidosa*, utilizando alta pressão para rompimento celular e baixa temperatura na extração da proteína. Ursu et al. (2014), obtiveram 52 % de proteína da microalga *Chlorella vulgaris* combinando rompimento por alta pressão e condições alcalinas para a extração da proteína. Grossman et al. (2018) obtiveram 4,61 % de proteínas da microalga *Chlorella protothecoides* utilizando homogeneização a alta pressão (150 MPa, 6 passagens) para rompimento de células. Zhang et al. (2018), obtiveram 72,41 % de proteínas *C. pyrenoidosa* usando uma combinação de técnicas, em que, a microalga foi embebida em metanol por 67 h,

com proporção líquido/sólido de 27:1, depois foi hidrolisada por celulase por 3 h em pH 5,0, foi levada ao ultrassom (1000 W, ciclo de 26 min) e centrifugada (8000 rpm, 10 min). Apesar de um alto rendimento, essa combinação de métodos para extração tem um custo elevado. A maioria dos métodos citados anteriormente exibem uma taxa de extração inferior ao valor reportado por Zhang et al. (2018), porém o tempo de extração é menor; provavelmente, o custo também seja inferior.

6 Aplicações alimentares das microalgas

A biomassa de microalgas e seus compostos derivados têm um grande potencial de utilização na alimentação animal, na aquicultura e nutrição humana, bem como em produtos para a saúde (LI et al., 2007), conservação de alimentos e na indústria de cosméticos (VIDAL et al., 2001). O cultivo de microalgas tem sido realizado objetivando a produção de biomassa visando a alimentação humana e animal bem como a extração de compostos naturais que possuam alto valor agregado no mercado mundial (DENER et al., 2006). Dentre estes compostos, destacam-se ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides, ficobiliproteínas, polissacarídeos, esteróis, vitaminas e vários biocompostos bioativos, sendo que assim, as microalgas apresentam potencial de uso na produção de alimentos funcionais, por possuírem s propriedades específicas a exemplo da elevada atividade antioxidante (MORAIS; COSTA, 2008; MIRANDA et al., 1998; RAYMUNDO et al., 2004). Além disso, as microalgas são expressivamente empregadas na aquicultura como fonte de alimento, especialmente para larvas de moluscos, crustáceos em estágios juvenis e peixes marinhos (MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2004).

Em geral, as microalgas são promissoras na produção de diversos compostos para diversas indústrias incluindo a indústria de alimentos. Proteínas de diferentes espécies de microalgas, como *Spirulina platensis*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella prototecoides*, *Phaeodactylum tricornutum* entre outras, foram testadas quanto a formação de emulsão e apresentaram atividades superiores as proteínas alimentares comuns, como soja e soro de leite (GROSSMANN et al., 2019; EBERT et al., 2019; LUPATINI MENEGOTTO et al., 2019). Grossman et al. (2019) relataram que emulsões formadas com a proteína da microalga *C. protothecoides* suportam mais variação de pH do que a proteína do soro de leite. Estes autores, relatam ainda que, o carboidrato presente no extrato de microalgas desempenha um papel importante na estabilização das gotículas de óleo.

Grossman et al. (2018) também verificaram resistência das emulsões, formadas por proteínas da *C. protothecoides*, à altas concentrações de NaCl (500 mM), utilizando concentrações de 2,5 % de proteínas em peso.

Ebert et al. (2019) verificaram resistência das proteínas das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Phaeodactylum tricorutum* a altas concentrações de NaCl (500 mM). Porém estes autores utilizaram concentração de proteínas (não concentração do extrato) muito maior do que utilizados no presente trabalho para proteína de microalga, onde utilizaram 1,0 % de proteína, em peso, para *C. sorokiniana* e 3,7 % de proteína em peso para *P. tricorutum*.

REFERÊNCIAS

- AN, J.Y., SIM, S.J., LEE, J.S., KIM, B.W. Hydrocarbon production from secondarily treated piggyery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. **J. Appl. Phycol.** v. 15, p. 185–191. 2003.
- AFIFY, Abd El Moneim M.R.; EL BAROTY, Gamal S.; EL BAZ, Farouk K.; et al. *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.002>>.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciênc. Agrotec.**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556. 2008.
- ASSUNÇÃO, M. F. G. **Pesquisa de compostos bioativos em microalgas da Algoteca de Coimbra (ACOI)**. 2014.137 f. Dissertação (Mestrado em Biologia). Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade de Coimbra, Portugal. 2014.
- BAUMGARTNER, T. R. S. BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**. p. 250–255, 2013.
- BECKER, E W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 207–210, 2007.
- BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. **Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina***. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, 1993, p. 235–241.
- BERTOLDI, F. C.; LUIZ, J.; OLIVEIRA, B.. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.54-58, 2008.
- BIGAGLI, Elisabetta; CINCI, Lorenzo; NICCOLAI, Alberto; et al. Safety evaluations and lipid-lowering activity of an *Arthrospira platensis* enriched diet: A 1-month study in rats. **Food**

Research International, v. 102, n. May, p. 380–386, 2017.

BISHOP, W. M.; ZUBECK, H. M. Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. **Journal Nutrition Food Science** v. 2, n. 5, 2012

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. 1999, v. 70, p. 313 - 321.

CARVAJAL, J. C. L. **Caracterização e Modificações Químicas da Proteína da Microalga *Spirulina* (*Spirulina maxima*)**. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. 2009.

CHAN, M.; HO, S.; LEE, D.; CHEN, C.; HUANG, C.; CHANG, J. Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Biochemical Engineering Journal**, 78, 24–31, 2013.

CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae**. v. 25, p. 294–306, 2007.

CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae beats bioethanol**. n. January, 2008.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.

CHNG, L. M.; CHAN, D. J. C.; LEE, K. T. Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. **Journal of Cleaner Production**, 130, 68–73, 2016.

COLLA, Luciane Maria; MUCCILLO-BAISCH, Ana Luiza; COSTA, Jorge Alberto Vieira. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 405–411, 2008.

DEAK, N.A.; JOHNSON, L.A.; LUSAS, E.W.; RHEE, K.C. **Soy protein products, processing, and utilization**, in: L.A. Johnson, P.J. White, R. Galloway (Eds.), *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, AOCS Press, Urbana, IL, 2008, pp. 661–724

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.

EBERT, Sandra; GROSSMANN, Lutz; HINRICHS, Jörg; et al. Emulsifying properties of water-soluble proteins extracted from the microalgae: *Chlorella sorokiniana* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 754–764, 2019.

EBRAHIMI-MAMEGHANI, Mehrangiz; SADEGHI, Zahra; ABBASALIZAD FARHANGI, Mahdiah; et al. Glucose homeostasis, insulin resistance and inflammatory biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Beneficial effects of supplementation with microalgae *Chlorella vulgaris*: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 4, p. 1001–1006, 2017.

GERDE, J. A.; WANG, T.; YAO, L.; JUNG, S.; JOHNSON, L. A.; LAMSAL, B. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. **Algal**

Research, v. 2, n. 2, p. 145–153, 2013.

GONG, Y., JIANG, M., 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnol.** v. 33, p. 1269–1284. 2011.

GRESSLER, V.; YOKOYA, N. S.; FUJII, M. T.; COLEPICOLO, P.; MANCINI, J. F.; TORRES, R. P.; PINTO, E. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**. v. 120, n. 2, p. 585–590. 2010.

GROSSMANN, Lutz; EBERT, Sandra; HINRICHS, Jörg; et al. Formation and Stability of Emulsions Prepared with a Water-Soluble Extract from the Microalga *Chlorella protothecoides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 23, p. 6551–6558, 2019.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Prog. Lipid Res.** v. 45, n. 2, p. 86-160, 2006.

JANCZYK, P.; FRANKE, H.; SOUFFRANT, W. B. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 1–2, p. 163–169, 2007.

JONG-YUH, Cherng; MEI-FEN, Shih. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. **Life Sciences**, v. 77, n. 9, p. 980–990, 2005.

KIM, Mi Yeon; KIM, Min Ji; SOK, Dai-eun; et al. Spirulina Improves Antioxidant Status by Reducing Oxidative Stress in Rabbits Fed a High-Cholesterol Diet. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 420–426, 2010.

LI, H., CHENG, K., WONG, C., FAN, K., CHEN, F.; JIANG. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. **Food Chem**, v.102, p. 771-776. 2007.

LIANG, Ming-Hua; WANG, Ling; WANG, Qiming; et al. High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, p. 1–19, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>>.

LUPATINI MENEGOTTO, Anne Luize; SOUZA, Lizana Emanuele Silva de; COLLA, Luciane Maria; et al. Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. **LWT**, v. 114, p. 108267, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819306073#!>>. Acesso em: 3 fev. 2020.

MARTÍNEZ, M.E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J.M.; EL YOUSFI, F.; MUNOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresour. Technol.** v. 73, p. 263–272, 2004.

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Bioresource Technology Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, 104, 342–348, 2012.

- MOREIRA, L.M., BEHLING, B. D. S., RODRIGUES, R. D. S., COSTA, J. A. V. AND SOARES, L. A. D.S. *Spirulina* as a protein source in the nutritional recovery of *Wistar* rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 3, p.447-456, 2013.
- MOSTAFA, A. S. M. **Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications** In: Plant Science, N.K. Dhal and S.C. Sahu (Eds.). InTech. p. 275-314. 2012.
- OLGUIN, E.J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HEMANEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on pig waste. **Bioresource Technol.** v.77, p. 19–24, 2001.
- PEREIRA, C.M.P.; HOBUSS, C.B.; MACIEL, J.V.; FERREIRA, L.R. DEL PINO, F.B.; MESKO, M.F.; JACOB-LOPES, E.; NETO, P.C. Biodiesel Renovável Derivado de Microalgas: Avanços e Perspectivas Tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water research**, v. 45, p. 11-36. 2011.
- PŘIBYL, P., CEPÁK, V., KAŠTÁNEK, P., & ZACHLEDER, V. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp. **Algal Research**, 11, 22–27, 2015.
- QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R. G.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresour. Technol.** v. 98, p. 2163-2169, 2007.
- RAVEN, J. A.; FINKEL, Z. V.; IRWIN, A. J. Picophytoplankton: bottom-up and top-down controls on ecology and evolution. **J Geophys Res.** v. 55, p. 209–205, 2005.
- REEVES, Philip G.; NIELSEN, Forrest H.; FAHEY, George C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/123/11/1939/4722783>>.
- RISS, Jérôme; DÉCORDÉ, Kelly; SUTRA, Thibault; et al. Phycobiliprotein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7962–7967, 2007.
- SASSO, S.; POHNERT, G.; LOHR, M.; MITTAG, M.; HRTWECK, C. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 761-785. 2012.
- SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS): a concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. **J AOAC Intern.** 2005; 88(3):988-94.
- SCHULZE, C.; REINHARDT, J.; WURSTER, M.; ORTIZ-TENA, J. G.; SIEBER, V.; MUNDT, S. A one-stage cultivation process for lipid- and carbohydrate-rich biomass of *Scenedesmus obtusiusculus* based on artificial and natural water sources. **Bioresource Technology**, 218, 498–504., 2016.

SCHWENZFEIER, Anja; HELBIG, Anne; WIERENGA, Peter Alexander; et al. Food Hydrocolloids Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis* sp. **Food hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 258–263, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.002>>.

SCHWENZFEIER, Anja; WIERENGA, Peter Alexander; GRUPPEN, Harry. Bioresource Technology Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9121–9127, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046>>.

SENGUPTA, Samadrita; KOLEY, Hemanta; DUTTA, Shanta; et al. Hypocholesterolemic effect of *Spirulina platensis* (SP) fortified functional soy yogurts on diet-induced hypercholesterolemia. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 54–64, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464618303438>>. Acesso em: 7 ago. 2019.

SERBAN, Maria Corina; SAHEBKAR, Amirhossein; DRAGAN, Simona; et al. A systematic review and meta-analysis of the impact of *Spirulina* supplementation on plasma lipid concentrations. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 4, p. 842–851, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.09.007>>.

SETYANINGSIH, Iriani; BINTANG, Maria; MADINA, Nur. Potentially Antihyperglycemic from Biomass and Phycocyanin of *Spirulina Fusiformis* Voronikhin by in Vivo Test. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 211–215, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876619615000315>>.

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

SILVA, Monique Ellen Torres da; CORREA, Kely de Paula; MARTINS, Marcio Arêdes; et al. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103711, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619306358>>. Acesso em: 31 jan. 2020.

SIMOONS, F. J. **Food in China: A cultural and historical inquiry**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1991.

SOARES, Jimmy; KRIIGER LOTERIO, Robson; ROSA, Rinamara Martins; et al. *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 35–45, 2018.

SOBCZUK, T. M.; CHISTI Y. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 85, p. 100–108, 2010.

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.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101, 87–96, 2006.

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

SUAREZ GARCIA, E.; VAN LEEUWEN, J.; SAFI, C.; et al. Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications. **Bioresource Technology**, v. 268, n. June, p. 197–203, 2018.

URSU, Alina-Violeta; MARCATI, Alain; SAYD, Thierry; et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414000960>>. Acesso em: 5 set. 2019.

WANG, Pengtao; LI, Zhengyan; BAI, Jie; et al. Optimization of microalgal bead preparation with *Scenedesmus obliquus* for both nutrient removal and lipid production. **Ecological Engineering**, v. 92, p. 236–242, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.04.009>>.

WANG, Xiaoqin; ZHANG, Xuewu. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 307–313, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412014046>>. Acesso em: 25 dez. 2019.

ZHANG, Ruilin; CHEN, Jian; ZHANG, Xuewu. Extraction of intracellular protein from *Chlorella pyrenoidosa* using a combination of ethanol soaking, enzyme digest, ultrasonication and homogenization techniques. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 267–272, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417316528>>. Acesso em: 5 set. 2019.

VIDAL, A., MOTIDOME, J., MANCINI-FILHO, A., FALLARERO, M., MIDORI, L., BRANDAO, A. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 37, n.3, p. 373-382, 2001.

WAGHMARE, A. G.; SALVE, M. K.; LEBLANC, J. G.; ARYA, S. S. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresources and Bioprocessing**, 2016.

WANG, P.; LI, Y.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Optimization of microalgal bead preparation with *Scenedesmus obliquus* for both nutrient removal and lipid production. **Ecological Engineering**, v. 92, p. 236–242, 2016.

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.

CAPÍTULO 2

Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and *in vivo* protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats

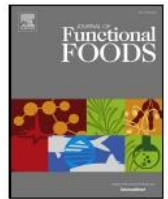
Article published in the journal of *Functional Foods*

Journal of Functional Foods 65 (2020) 103711

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Functional Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff



Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and *in vivo* protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats



Monique Ellen Torres da Silva^a, Kely de Paula Correa^a, Marcio Arêdes Martins^b, Sérgio Luis Pinto da Matta^c, Hércia Stampini Duarte Martino^d, Jane Sélia dos Reis Coimbra^{a,*}

^a Department of Food Technology, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa 36570-900, Brazil

^b Department of Agricultural Engineering, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa 36570-900, Brazil

^c Department of General Biology (UFV), Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa 36570-900, Brazil

^d Department of Nutrition, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa 36570-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Carotenoids
Omega-3
Dietary fiber
Atherogenic index
HDL
Protein efficiency

ABSTRACT

The present study evaluated the safety of dietary administration of the microalga *Scenedesmus obliquus* at high doses, the influence on blood biochemical profile, and *in vivo* protein quality in male Wistar rats. The microalga exhibited a high amount of fibers, carotenoids, phenolic compounds, linolenic and linoleic acid, and great antioxidant activity. The diet containing *Scenedesmus obliquus* was well tolerated, with good protein digestibility and maintenance of growth and weight of the animals. The intake of the microalga reduced triglycerides of up to 70%, atherogenic index of up to 80%, and serum glucose of up to 42% concentrations as compared with the standard diet. No alterations were observed in the analyzed organs by histology, suggesting that the microalga *Scenedesmus obliquus* can be used as potential safe food and may represent a sustainable source of food.

Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and *in vivo* protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats

Monique Ellen Torres da SILVA^a; Kely de Paula CORREA^a; Marcio Arêdes MARTINS^b; Sérgio Luis Pinto da MATTA^c; Hércia Stampini Duarte MARTINO^d; Jane Sélia dos Reis COIMBRA^{a*}

^a*Department of Food Technology, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, Brazil, 36570-977*

^b*Department of Agricultural Engineering, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, Brazil, 36570-977*

^c*Department of Nutrition, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, Brazil, 36570-977*

^d*Department of General Biology (UFV), Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, Brazil, 36570-977*

*Author for correspondence: jcoimbra@ufv.br

ABSTRACT

The present study evaluated the safety of dietary administration of the microalga *Scenedesmus obliquus* at high doses, the influence on blood biochemical profile and in vivo protein quality in male Wistar rats. The microalga exhibited a high amount of fibers, carotenoids, phenolic compounds, linolenic and linoleic acid, and great antioxidant activity. The diet containing *Scenedesmus obliquus* was well tolerated, with good protein digestibility and maintenance of growth and weight of the animals. The intake of the microalga reduced triglycerides of up to 70 %, atherogenic index of up to 80 %, and serum glucose of up to 42 % concentrations as compared with the standard diet. No alterations were observed in the analyzed organs by histology, suggesting that the microalga *Scenedesmus obliquus* can be used as potential safe food and may represent a sustainable source of food.

Keywords: carotenoids; omega-3; dietary fiber; atherogenic index; HDL; protein efficiency.

1. INTRODUCTION

There are over one billion people undernourished in the world due to the shortage of protein according to the Food and Agriculture Organization (FAO) (2010). This event is a consequence of diverse factors such as the inefficient use of fertilizers, agricultural poor-quality land, an exponential increase in world population, and climate changes. To reduce the hidden hunger in the world the alternative sources of proteins and other nutrients are a necessity to incorporate Food and Nutrition Security the quality dimensions, such as composition and nutritional value (Goulão, 2016). Thus, the food security policies have focused on giving nations the ability to produce food in quantity and with the quality to meet the nutritional requirements of the population (Goulão, 2016).

The new food sources with sustainable production and nutritional value is one of the greatest challenges and interests in food research. Microalgae have been researched as a source of bio compounds that can be used in the cosmetic, fertilizer, animal feed, food, pharmaceutical industries as well as in the biofuel production (El-Naggar, Samhan, Salama, Hamdy, & Ali, 2018; Kothari et al., 2017; Chen et al., 2018). New species of microalgae can contribute to increment the offer of value-added co-products of aquatic biomasses such as proteins, carbohydrates, and pigments, concomitant with the oil production (Kothari et al., 2017; Chen et al., 2018). In addition, microalga is an alternative source of protein, that is prone to grow in any area and region (Waghmare, Salve, Leblanc, & Arya, 2016; Chen et al., 2018). Chen et al. (2018) with high efficiency in the conversion of solar energy to biomass, resulting in high growth rates (10 to 50 times faster than plants). Moreover, they have superior capabilities of sequestration and conversion of CO₂ and potential for rapid growth even in areas not suitable for traditional crops like marginal sites for cultivation. Therefore, they do not compete with the soil for food production (Waghmare et al., 2016).

Among several types of microalgae species, the genus *Scenedesmus* has been recently studied. The genus *Scenedesmus* is composed of around 120 species and presents a wide morphological variation within each species. The species *Scenedesmus obliquus* is abundant in several countries, presents high tolerance at climatic variations and different values of pH, a high growth rate, and 40 to 56 % of protein (dry mass) (Rocha et al., 2019; Afify, El Baroty, El Baz, Abd El Baky, & Murad, 2018; Soares et al., 2018; Benemann, 2013; Chan et al., 2013; Becker, 2007). This species has promising qualities to act as a new source of lutein as well as other valuable compounds (Chan, Ho, Chen, & Huang, 2013). According to Přibyl et al. (2015), the ease of cultivation and robustness of some strains of *Scenedesmus* makes them more suitable for sustainable large-scale production and are prone to the generation of several compounds.

Afify et al. (2018) evaluated the suitability of *Scenedesmus obliquus* to be a source of essential (Thr, Val, Met, Ile, Leu, His) and non-essential (Arg, Ala, Pro, Asp) amino acids. Thus, *S. obliquus* presents itself as a promising source of food, but studies of its toxicity and protein quality in vivo are required.

One of the concerns when proposing microalgae as a food or food ingredient for human consumption is to establish the dose safe for consumption. Short and long term feeding trials have been showed that some microalgae are safe to consumption. (Bigagli et al., 2017; Marles et al., 2011; Niccolai et al., 2017; Borowitzka, 2013; Sengupta, Koley, Dutta, & Bhowal, 2018; Serban et al., 2016; Nuño et al., 2013; Jong-Yuh & Mei-Fen, 2005). Some authors report the safety recommended intake of 1 to 5 g / person / day of Spirulina (*Arthrospira platensis*), with historical reports of spirulina consumption of 10 to 40 g (Marles et al., 2011; Lorenz, 2002; FDA, 2003; Gilroy, Kauffman, Hall, Huang, & Chu, 2000) and clinical studies indicating that an intake of about 10 g of spirulina per day for 6 months does not induce adverse effects (Marles et al., 2011; Yamani, Gresenguet, Kaba-Mebri, Mouala, & Rey, 2009).

The potential effect of microalgae in human nutrition is due to the biological action (Vaz et al., 2016; Raposo & De Moraes, 2015; Jong-Yuh & Mei-Fen, 2005) of some species already reported in the literature, such as *Arthrospira / Spirulina platensis*, *Chlorella* spp., *Isochrysis galbana* in the hypoglycemic and hypolipidemic activity, with a reduction in the glycemic and plasma concentration of total cholesterol, LDL, HDL, and triglycerides (Sengupta, Koley, Dutta, & Bhowal, 2018; Bigagli et al., 2017; Serban et al., 2016; Nuño et al., 2013; Jong-Yuh & Mei-Fen, 2005). *Scenedesmus obliquus* exhibits the potential to be used in food, due to the robustness of the cells, with high productivity and low costs of production. However, there are no data in the literature on the efficacy and food safety of the intake of this microalga in high doses. Thus, some challenges must be fulfilled, among them to evaluate the toxicity and food quality in vivo, looking forward metabolic, biochemistry analyses and histological tests on kidneys and the liver organs. In this context, the objective of the present work was to evaluate the safety of microalga *Scenedesmus obliquus* in high doses (g microalga/100 g diet; 11.6 % and 23.2 %), as a source of protein (g protein microalga/ 100 g total protein in diet; 50 and 100 %) in the diet, and its effect on blood biochemical profile, morphofunctional effects in the liver and kidney, and protein quality in the male Wistar rats.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Production and composition of the microalga

The microalga *Scenedesmus obliquus* was cultivated in a raceway tank (4.000 L of cultivation capacity, density of stationary phase of 0.5 g / L, 12 days of cultivation), with sunlight incidence and in semi-discontinuous mode, in a medium rich in potassium chloride (173.9 mg·L⁻¹) and urea (180 mg·L⁻¹). The microalga growth curve was determined by optical density using absorbance (spectrophotometer Thermo Scientific, Multiskan GO, Germany) at 620 nm, and the biomass was separated by flocculation in the stationary growth phase. Cells were washed with distilled water and concentrated to a solids content of 10 to 15 % (w / w) by using a centrifuge (Thermo Scientific, Heraeus multifuge X3R, EUA), at 3000g for 10 min., The biomass was then frozen at - 40 °C, freeze-dried (Terroni, LS 3000, Brazil), and stored at 8 °C in sterilized containers.

2.1.1 Centesimal composition of the microalga

The dry biomass of the microalga was characterized in terms of its chemical composition for the quantification of: moisture (925.09), ashes (923.03), lipids (920.85), protein (920.87) with a conversion factor of 4.5, and fibers (total, soluble, and insoluble) (AOAC, 2005). Soluble dietary fiber (SDF) and insoluble dietary fiber (IDF) were quantified according to the enzymatic-gravimetric method (985.29)(AOAC, 2005). The carbohydrate content was obtained by simple difference [Carbohydrate (%) = 100 % - Protein (%) – Lipids (%) – Ash (%) – Water (%)] (AOAC, 2005).

2.1.2 Extraction, quantification and antioxidant activity of carotenoids and phenolic compounds

The extraction and quantification of pigments and phenolic compounds were carried out after the disruption of the cells of the microalga (1:10 biomass:water) by using ultrasound at 20 kHz frequency, 90 % amplitude, and 5 min. Next, the biomass was frozen at -40 °C, freeze-dried, and stored in sterilized containers. The extraction and quantification of pigments including carotenoids were based on the methodology proposed by Wellburn, (1994) for acetone extract. The extraction was started by adding pure acetone in the proportion of 30 mL for each 100 mg of microalga. The extracts were centrifuged for 10 min., at 7100·g, after 30

min. For quantification of chlorophyll a, chlorophyll b, and total carotenoids, it was used equations 1, 2, and 3, respectively, proposed by Wellburn (1994) for acetone 80 % extract.

$$Ca = 12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8} \quad (1)$$

$$Cb = 21.5 \times A_{646.8} - 5.1 \times A_{663.2} \quad (2)$$

$$Cc = (1000A_{470} - 1.82Ca - 85.02Cb)/198 \quad (3)$$

In which Ca is the concentration of chlorophyll a ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), Cb is the concentration of chlorophyll b ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), Cc is the concentration of total carotenoids ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

After extracting and quantifying the extract, the concentration was converted to % [mg of pigment \cdot (100 mg of microalgae) $^{-1}$] using the total extract volume and the extracted biomass mass, from the following equation 4:

$$\% (\text{mg} \cdot (100 \text{ mg}^{-1})) = 100 \frac{C \cdot V \cdot 10^{-3}}{m} \quad (4)$$

In which C is the concentration of chlorophyll a, b, or total carotenoids ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), V is the total volume of the extract (mL), and m is the microalgae mass (mg).

The antioxidant activity of carotenoid was determined after removing the interferents, according to the methodology proposed by Howe and Tanumihardjo (2006). The acetone extract was conducted to additional extraction with hexane in the ratio of 2:3 (hexane: acetone). Deionized water was added, and the aqueous phase was separated from the organic phase. The organic phase, containing the carotenoids and interferents, such as chlorophyll and lipid, was saponified with a solution of 10 % w/v KOH in ethanol (Soares, Júnior, Lopes, Derner, & Filho, 2016). After 12 h, the solution was washed with deionized water until complete separation in two phases: the greenish aqueous phase, and the yellow organic phase containing the carotenoids

The extraction and quantification of the phenolic compounds were performed according to Singleton and Rossi (1965), with some modifications. Ethanol was utilized as the extraction solvent (1:10 biomass:ethanol), in which the mixture was left under stirring for 30 min. Next, the sample was centrifuged for 10 min. at 7100g. The total content of phenolic compounds in the extract was determined from linear regression by using an analytical curve of gallic acid (GAE), at concentrations between 0 and 1000 mg · mL⁻¹ of gallic acid. The results were represented in (mg of GAE·mL⁻¹ of extract and g of phenolic compounds)·(100 g⁻¹ of microalga).

The method used to assess the antioxidant activity is based on the reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH, by the action of a radical species or an antioxidant, to form diphenyl-picrylhydrazine. The percent inhibition of DPPH was obtained following the method of Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995) with modifications. Briefly, a solution of 60 µmol·L⁻¹ DPPH in methanol was prepared. Then, aliquots of 2.9 mL of DPPH were added of 100 µL of the carotenoid extract (185.6 µg·mL⁻¹), or 100 µL of phenolic compounds extract (CF) (496.80 µg AGE·mL⁻¹ extract). The solvent methanol was used as the control system. After stirring, the mixture was left in the dark at room temperature for 30 min.

The absorbance of the samples was read after 30 min of reaction, in a spectrophotometer (Varian, Cary 50, Japan) at 517 nm, in order to obtain the percentage of inhibition, expressed by Equation 5.

$$AA (\%) = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times 100}{A_{\text{control}}} \quad (5)$$

in which, A_{control} is the absorbance of the DPPH solution with methanol as the control, A_{sample} is the absorbance of the DPPH solution with the test sample, and A_{blank} is the absorbance of the sample without the DPPH solution.

2.1.3 Unsaturated fatty acid profile

The *S. obliquus* oil was extracted following the Bligh and Dyer (1959) method. The microalgal oil was converted to fatty acid methyl esters (FAMES) to obtain the fatty acid profile of *S. obliquus*, according to Ichihara and Fukubayashi (2010). Samples of the microalga oil were diluted in chloroform: methanol solution (2:1) and the lipids were transesterified with the addition of 8 M HCl solution in methanol, followed by incubation at 100 °C for 1 h. The FAMES

were extracted using hexane, which was collected from the upper phase after centrifugation. The supernatant (solvent phase) was injected into a gas chromatograph equipped with a Flame Ionization Detector (GC-FID) (Shimadzu, GC-2010, Japan) and a capillary column of 100 m x 0.25 mm (SP-2560, Sigma-Aldrich, USA). The analysis was performed by direct injection of 1 μL of the sample. Helium gas was used as the dragging gas and maintained at a constant flow rate of 363 kPa. The FAMES were separated using a linear heating ramp from 60 $^{\circ}\text{C}$ to 330 $^{\circ}\text{C}$, at a heating rate of 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and high linear velocity for better peak resolution. Peak identification was confirmed by comparison with the standard FAME mix (SupelCo 37 FAME mix, Sigma-Aldrich, USA).

2.2 Diets

The four diets used (Table 1) were calculated based on the rodent growth formulation (AIN93G) (Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993) adapted to provide 9.5 % protein. Calculations for formulations of the diets containing *Scenedesmus obliquus* were based on the centesimal biomass composition and the daily amount of rodent ingestion (20 g / rat / day). The amount of added protein was calculated from the centesimal composition of commercial casein and microalgae, performed by the Kjeldahl method (920.87) (AOAC, 2005). After the formulation of the diets, the proteins of the finished diets were again quantified, in order to calculate the PER, NPR, and true digestibility, based on the actual protein consumption, and not only on the calculated theoretical protein. The values of 9.99 %, 9.54 %, and 9.02 % are the corrected final protein quantities of the respective diet.

It was proposed in the diets formulation high amounts of *S. obliquus*, with daily intake of 17.4 and 34.8 g/kg/day, which correspond respectively, 11.6 and 23.2% g microalgae/100 g diet or 50 % and 100% of protein of the diet, considering a minimum daily intake of 8 g for weanling rats. The other ingredients of the diet (casein, maltodextrin, sucrose and soybean oil) were adjusted to provide isocaloric diets with or without microalgae addition.

The diets containing the *Scenedesmus obliquus* were (g / 100 g diet): (a) M50, diet with 50 % of protein from the microalga and 50 % of casein (11.6 % of *S. obliquus*); (b) M100, diet with 100 % of protein from the microalga (23.2 % of *S. obliquus*).

2.3 Animals and experimental design

The experiment followed the guidelines of the European Union Regulation on Care and Use of Laboratory Animals (OJ L 358; 18.12.1986) conjointly Directive 86/609/EEC of November 24, 1986, in compliance with the regulations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) on the protection of animals utilized for experimental purposes and other scientific knowledge. The Ethics Committee on Animal Use (CEUA / UFV) of the Federal University of Viçosa, MG, Brazil approved the project (Process No. 67/2017).

Wistar rats (*Rattus norvegicus*) males, weaned (21 days old; n=32) were used. The animals were acclimatized in plastic cages, for 1 week, under controlled environmental conditions of photoperiod of 12 h light, 12 h dark, and an average temperature of 23 ± 1 °C. The animals were weighed and randomly distributed so that they were identified in individual stainless-steel cages. Thirty-two rats (n = 8 / group) were randomized into 4 groups, with both diet and water *ad libitum*. The 32 animals were schematized in 4 groups (2 control and 2 test groups). One control group received a diet without protein (negative control), whereas the other group received a diet with casein as a standard protein (positive control). The rats of the test groups were fed with diets of 50 and 100 % of the protein from *S. obliquus*, as observed in Table 1. After consumption diet, the animals were visually inspected, individually, during the first 12 h in the period of 15, 30, 60 min, and then at every 3 h. After 12h, the animals were inspected daily (at least once a day) until the end of the experiment (28 days). The observation was focused on mortality, behavioral change, and motor activity.

Table 1- Composition (g) of the diets used: aproteic (negative control), casein (positive control), and with microalgal biomass of *Scenedesmus obliquus*, the M50, and M100.

Diet (g / 100 g diet)				
Ingredients	Aproteic	Casein	M50	M100
Casein (g)	-	11.46	5.73	0
Microalga (g)	-	-	11.6	23.2
Dextrinized starch (g)	13.2	13.2	13.2	13.2
Sucrose (g)	10	10	10	10
Soybean oil (g)	7	7	6.5	6
Fiber (microcristalin cellulose) (g)	5	5	3.14	1.28
Mineral mix (g)	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin blend (g)	1	1	1	1
L-cysteine (g)	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate (g)	0.25	0.25	0.25	0.25
Corn starch (g)	59.75	48.29	44.78	41.27
Total (g)	100	100	100	100
Caloric density (cal/g)	3.95	4.39	3.82	3.77
Protein (g/100 g)	-	9.99	9.54	9.00

2.4 *In vivo* protein quality (FER, PER, NPR, and digestibility)

Individual dietary intake was recorded weekly during the experimental period (28 days). The animals' body weight was recorded before administration of the first diet (day 1) and once a week until the conclusion of the study (day 28).

These data were used to calculate the Feed Efficiency Ratio (FER), which is the relationship between animal weight gain (WG) and food intake (FI): $FER = WG (g) / FI (g)$.

In order to evaluate the protein quality of the diets, the biological methods of Protein Efficiency Ratio (PER) and Net Protein Ratio (NPR) were used.

The PER calculation method (Osborne, Mendel, & Ferry, 1919) measures the ratio between the weight gain (g) and the protein intake (PI): $PER = WG (g) / PI (g)$. The NPR was determined in the 14th day of the experiment, taking the weight gain of the test group plus the weight loss of the group with aproteic diet (WLNC), in relation to protein intake of the test

group (PI), following the method of Bender and Doell (1957): $NPR = [WG (g) + WLNC (g)] / PI (g)$.

The true digestibility (TD) was evaluated between 15th and 18th day of the experiment, which normal diets were withdrawn and replaced by diet stained with 0.2% indigo carmine dye, according to Moraes et al. (2012). Unmarked feces were discarded. Marked feces were collected, stored in separate containers under refrigeration (8 °C), and oven-dried with forced air circulation (105 °C, 24 h; Toth, Model 510, Brazil). Subsequently, Afterward, the feces were put in the desiccator, weighed (Shimadzu, AUY22, Japan), and ground for the determination, in triplicate, the nitrogen content by the micro Kjeldahl method (Tecnal, TE 0363, Brazil) (920.87) (AOAC, 2005). The nitrogen content of the feces of the experimental groups was used to calculate the true digestibility, which was possible due to implementation of a group of eight animals with aproteic diet (FAO/WHO, 1991). The calculation was made according to the following formula:

$$TD = \frac{I - (F - FK) \times 100}{I}$$

Where TD = True digestibility; I = amount of nitrogen ingested; F= amount of nitrogen excreted in feces; FK= nitrogen fecal loss of the protein-free diet group.

The relative digestibility (RD) was calculated by the ratio between TD (TD_T) of the test group and TD of the positive control (TD_C): $RD = 100 (TD_T / TD_C)$. Thus, the result of the true digestibility of positive control is used to estimate the relative digestibility of the other groups.

At the day 28, after 12 h fasting, the animals were anesthetized with isoflurane (Isoforine, Cristália®, Brazil) and euthanized by cardiac puncture. The liver, spleen, and kidney were washed, weighed (Shimadzu, AUY22, Japan), and placed in formalin solution (formaldeide 10 % m/v) to be histologically analyzed. Besides, blood was collected for biochemical serum analysis.

2.5 Blood biochemistry and histological analyses

The blood of the euthanized animals by cardiac puncture was collected in appropriate tubes (13 × 100 mm; BD Vacutainer®, USA) and centrifuged at 4 °C for 600 s (Fanem-204, São Paulo, Brazil) and the plasma was stored at -80 °C.

The analyzed biochemical parameters were: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine, uric acid, glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL), and triglycerides. Atherogenic index (AI) was calculated by applying the formula $AI = \log (TGL/HDL)$.

Levels were measured by colorimetric methods using commercially available kits (Bioclin®, Belo Horizonte, Brazil). Analyses were conducted on a BS-200 Chemistry Analyzer (Bioclin®).

Macroscopic and histopathological examinations were conducted after the rat's euthanasia. The liver, spleen, and kidney organs were cleaned in sodium phosphate buffer solution (10 mM; Vetec, Brazil), and weighed (Shimadzu, AUY22, Japan) individually. Samples of these organs were fixed in Carson's Formalin Solution buffer solution (Carson, Martin, & Lynn, 1973) and, then, transferred to tubes (15 mL) containing an aqueous solution of ethyl alcohol (70 % v/v; Vetec, Brazil) for further histopathological analysis.

The dehydration of the organs was performed in an aqueous solution of ethyl alcohol, with increasing concentration (70 %, 80 %, 90 %, and 95 %) of the alcohol, until using absolute ethyl alcohol. The organs samples remained in each alcoholic solution for 30 min. After the dehydration with absolute alcohol, the organs were included in resins (Historesin®, Leica, Germany), fixed in woodblocks to perform the microtomy. Sixteen sections of 3 µm thickness were obtained using a rotary microtome (RM 2045, Leica, Germany) and glass razors. The sections were stained with hematoxylin and eosin (Fischer, Jacobson, Rose, & Zeller, 2008) for further histological analysis. The lamina was assembled with Entellan® (Merck, Germany). The cuts were done semi-serially at regular intervals of 12 µm to avoid repeating the analyses in the same cells. The preparations were analyzed with a light microscope (Olympus BX-60®, Japan) and the images captured using a photomicroscope (Olympus AX 70 TRF, Japan) in the objectives of 10 and 20x.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed applying the statistical software SAS (Statistical Analysis System, 1999) version 9.2, licensed by the Federal University of Viçosa. For the results referring to the biochemical data and evaluation of the protein quality, the normality of the data was verified by the Kolmogorov-Smirnov test, using a 5 % significance level ($p < 0.05$). As normality was confirmed, the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test at 5 % probability ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Composition of the microalga *Scenedesmus obliquus*

The results of the composition of microalga *S. obliquus* are shown in Table 2. It should be highlighted the large amount of nutrients and bioactive compounds present in this microalga species, such as proteins (40.42 %), insoluble fibers (16.23 %), soluble fibers (3.14 %), phenolic compounds (1.96 %), carotenoids (1.10 %), Oleic (C18: 1) 1.38 %, linoleic (C18: 2) 0.95 % and linolenic (C18: 3) 0.28 % acids. These compounds concentrations investigated are in accordance with other findings for cultured *S. obliquus*. The protein concentration was predicted, as observed by Afify et al. (2018). The C18: 1, C18: 2 and C18: 3 observed by Rocha et al. (2019) were the main fatty acids as founded in our study, which is usually accumulated at high levels by several microalgae. Wiltshire, Boersma, Möller, & Buhtz, (2000) quantified about 1.1% C18: 3, 0.75% C18: 2 and 0.4% 18: 1, in oil extracted from microalga *S. obliquus* by the Bligh & Dyer method in association with ultrasound. In microalga *Scenedesmus* sp., the carotenoid concentration may change depending on the number of days of culture in the laboratory and stress, which our results were high to observed by Pribyl et al. (2015), 0.68 % of carotenoids in a 7-day culture in the laboratory, and lower in a 14-day culture with saline stress, 2.08 % of carotenoids. In addition, some authors point out that the major carotenoid found in this species is lutein (Chan et al., 2013; Wiltshire et al., 2000).

Carotenoid extracts and phenolic compounds showed a high percentage of inhibition of DPPH oxidation, 93.53 % and 96.09 % using concentrations of 185.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 496.80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ extract, respectively. The results indicate the higher the inhibition percentage of, the higher the DPPH consumption by the sample, and the higher the antioxidant activity (Maadane et al., 2015). Under stress conditions in some species of microalgae, the synthesis of lipids and pigments occurs in a coordinated way, that is, most lipids are produced in response to stress and are accumulated in cytoplasmic oily bodies, where some carotenoids, such as β -carotene, are also deposited and may play antioxidant activity in the protection of unsaturated lipids against peroxidation (Kim, Choi, Park, & Lee, 2014)(KIM et al., 2014).

Table 2. Composition of microalga *Scenedesmus obliquus*

Components	g·100 g ⁻¹
Moisture	10.37
Protein (factor of 4.5)	40.42
Lipids	05.57
C16: 1 (Palmitoleic)	0.29
C18: 1n9c (Oleic)	1.38
C18: 2n6t (Linolelaidic)	0.24
C18: 2n6c (linoleic)	0.28
C18: 3n3c (Linolenic)	0.95
Unidentified	0.12
Saturated	2.31
Monounsaturated	1.67
Polyunsaturated	1.47
Ashes	15.64
Carbohydrates	28.00
Total fibers	19.37
Soluble fibers	03.14
Insoluble fibers	16.23
Chlorophyll a	1.03 ± 0.11
Chlorophyll b	0.32 ± 0.09
Carotenoids	1.10 ± 0.13
Phenolic compounds	1.96 ± 0.17

Other species reported in the literature also presented antioxidant potential, such as a study by Maadane et al. (2015), in which they found high antioxidant potential in several microalgae strains, with higher DPPH inhibition capacities (> 80%) *Dunalliella* sp. *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis gaditana*. These microalgae showed high total polyphenols, carotenoids, and PUFA content, indicating that these strains may be a potential new source of natural antioxidants.

In this way, it is noticeable that the carotenoids and phenolic compounds extracted from the microalga *Scenedesmus obliquus* present high antioxidant activity even when using low concentrations. The consumption of phenolic compounds and carotenoids can help the human body to reduce the damage oxidative diseases related to aging and diseases such as

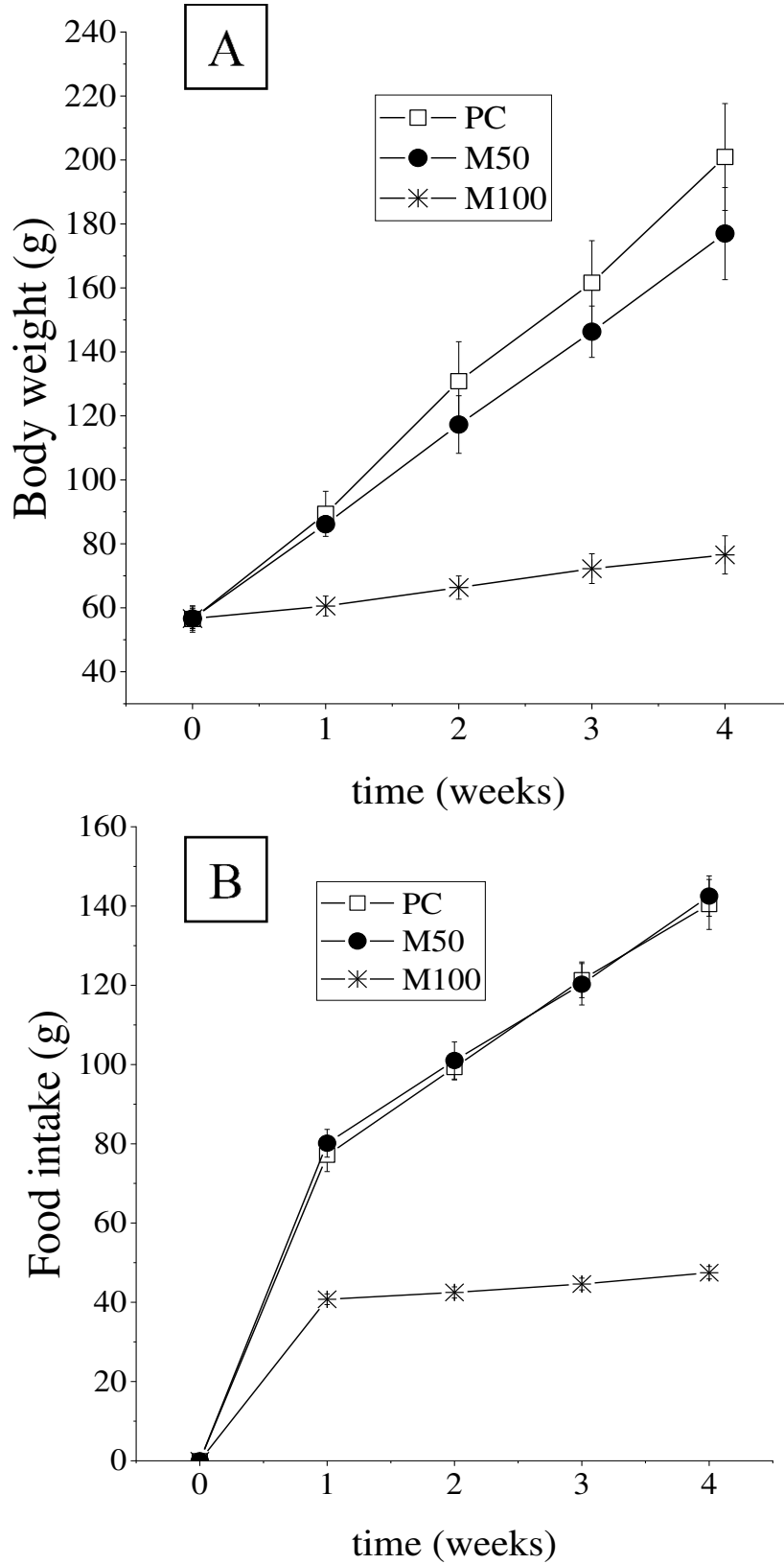
arteriosclerosis, ulcer, diabetes, and cancer (Kazui et al., 2018; Devi et al., 2009). Furthermore, the food industry is seeking the use of natural antioxidants, isolated from plants and seaweed, to replace synthetic food additives, since these non-natural additives may have harmful effects on health (Sengupta et al., 2018; Devi et al., 2009).

3.2 Survival, food consumption, body weights and *in vivo* protein quality (FER, PER, NPR, and digestibility)

In order to collaborate with new alternative and sustainable protein sources, and to contribute data for future regulatory evaluations for microalga *Scenedesmus obliquus* (GRAS, Novel Foods), this study tested the use of this species in high amounts in Wistar rats. The percentage was based on amounts already used for the FDA-recognized microalga *Athrospira platensis* where it has a percentage between 1 and 3.5% Spirulina in various products, such as biscuits, paste, and energy bars, and may reach 10% in medical foods or energy drinks (FDA, 2003; Marles et al., 2011; Bigagli et al., 2017). The average consumption of microalgae in g /kg/day was performed based on the curves shown in figure 1 resulting in a daily dose of 14.16 and 22.80 g / kg respectively for diets containing 11.6 and 23.2 % g microalga/ 100 g diet. Under these experimental conditions, the human equivalent dose (HED) calculation described to Nair and Jacob (2016) was used for rats with 100 (M100) and 150 (M50) g body weight, with the following calculations, $HED (M50) = 14.16 \text{ g / kg} \times (6/37) = 2.3 \text{ g / kg}$; $HED (M100) = 22.80 \text{ g / kg} \times (5.2 / 37) = 3.2 \text{ g / kg}$ where for a 60- kg adult this results in a daily dose of 137 g and 192 g respectively for M50 and M100. These doses are higher than those of *Athrospira platensis* tested by Bigagli et al. 2017, (tested daily dose of 132 g in 60 kg human) and reported as historical use as food (10 to 40 g daily Dih'e in Africa) (Marles et al., 2011).

All the animals showed typical behavior and survived until the end of the experiment. Figure 1 shows weekly body weight and weekly food intake. Concerning to the diet ingesting, the animals from the M100 diet group (23.2 % of microalga) did not present a suitable feed intake (Fig. 1), probably because of the excessive amount of microalga affected the palatability, thus the results of this group differs from both groups, the PC and diet M50.

Figure 1- Effect of diets containing 11.6 % (M50) and 23.2 % (M100) of microalga *S. obliquus* in Bodyweight and Food intake weekly on newly weaned rats (Wistar) as compared with the positive control (PC). (A) Body weight. (B) Food intake.



The growth curves (Fig. 1) of the animals from the diet groups of positive control and M50 were consistent with the standard growth charts (<https://www.taconic.com/rat-model/wistar-hannover-galas>). Since the dietary intake of M100 diet group was different from the control and M50, the body weight and weight gain differed significantly (Table 2).

Table 3 reveals that the value of FER decreased with the increase of the microalga content in the diet. FER values showed that: (a) a substantial amount of *S. obliquus* (11.6 %) (M50) contributed for the animal growth and weight gain; (b) high amount of *S. obliquus* (23.2 %) (M100) was not as efficient at converting feed consumed to live weight. This behavior of the M100 diet may be associated with the higher consumption of soluble fibers compared to the control, and the high amount of phenolic compounds and other phytochemicals consumed, that directly contribute to the increase of fecal volume and consequently gastric emptying (Table 3). These results corroborate with other studies of microalgae and other plant proteins (Moreira, Behling, Rodrigues, Costa, & Soares, 2013; Janczyk, Franke, & Souffrant, 2007).

The values of PER and NPR are necessary to determine the protein quality of a material. Results of PER for the M100 diet suggest that the *S. obliquus* protein presents quality inferior to the control protein (casein), but the NPR values point out to the effectivity of the microalga protein for animal weight maintenance (Table 3). NPR values are corrected to the endogenous losses protein. Values of PER and NPR of M50 group indicate that the mixture of *S. obliquus* protein with another protein source was suitable to promote growth, development, and maintenance of animal tissues.

The FER and PER values found in the present research for *S. obliquus* (Table 3) are in agreement with those results reported for other species of microalgae consumed by humans. Moreira et al. (2013) evaluated the use of *Spirulina platensis* in rat feed, in proportions of 50 and 100 %, and found values of, respectively, 0.25 and 0.17 for FER and 2.75 and 1.60 for PER. Janczyk et al. (2007) obtained a PER value of 1.4 and true digestibility lower than the present study (about 53 %) for the M100 diet containing *Chlorella vulgaris* spray dried. These authors improved the true digestibility (63 %) and PER (2.1) of *Chlorella vulgaris* by applying ultrasound to the biomass and report that the physical ultrasound treatment was able to damage the microalgae walls, thus permeating the cell wall, improving the value. of this, and increasing the growth of mice by 1.5 times. However, digestibility was still lower than that found for *S. obliquus*.

Table 3. Effect of ingestion of *Scenedesmus obliquus* on total food intake, weight gain, FER, PER, NPR, feces production, feces moisture, and true and relative digestibility on newly weaned rats (Wistar) ($n = 8$).

Parameters	PC	M50	M100
Total food intake (28 days)(g)	438 ± 26 a	443 ± 14 a	174 ± 9b
Weight gain (g)	144 ± 15 a	120 ± 14 a	21 ± 3b
FER	0.35 ± 0.02 a	0.27 ± 0.02 b	0.13 ± 0.01 c
PER	3.49 ± 0.16 a	2.84 ± 0.20 b	1.47 ± 0.23 c
NPR	3.86 ± 0.10 a	3.20 ± 0.15 a	2.32 ± 0.13 b
Feces moisture (%)	14.23 ± 1.97 a	16.53 ± 1.99 a	18.13 ± 1.85 a
Feces production by diet consumption (%)	4.80 ± 0.97 c	7.49 ± 0.97 b	14.99 ± 0.97 a
True digestibility (%)	93.28 ± 5.93 a	83.41 ± 3.85 b	78.18 ± 4.91 b
Relative digestibility (%)	100.00 a	89.42 b	83.81 b

Means followed by the same letter in the lines do not differ by the Tukey test, at the 5 % level of significance. PC: positive control. M50: diet with 50 % of protein from microalga and 50 % of casein. M100: diet with 100 % of protein from microalga.

The results of the present work on protein quality demonstrated that the *S. obliquus* associated with a different protein source (M50 diet) showed a good conversion of the ingested food and was able to promote the growth, development, and tissue maintenance of the animals. Values of PER and NPR greater than 2.0 and 3.0 respectively, indicated the high-quality of the protein (Friedman, 1996). In fact, besides the good digestibility, *S. obliquus* mixed with other food sources of protein contributes to the growth and development of organs and tissues of animals, presenting itself as a potential candidate to be used in human food in different stages of growth.

3.3. Feces production and true and relative digestibility

The animals fed with diets containing *S. obliquus* presented higher production of feces as compared with the control (Table 3). This increase is directly proportional to the rise in the amount of microalga in the diet. The excretion of feces in larger quantities in rats fed by *S. obliquus* is due to the high amount of soluble fiber and phenolic compounds in the microalgae biomass. The true digestibility and relative digestibility of diets containing microalga were good (> 75 %) but smaller than the control (Table 3).

The protein quality of the diet is represented by the digestibility, which can be influenced by several compounds such as inhibitors of digestive enzymes, hemagglutinins, and polyphenols, among others (García-rebollar, Cámara, Lázaro, Dapoza, & Pérez-maldonado, 2016)(García-rebollar, Cámara, Lázaro, Dapoza, & Pérez-maldonado, 2016). The presence of these compounds in the biomass of *S. obliquus*, can form a complex with proteins, making more difficult the protein digestion and the subsequent absorption. These results corroborate with other studies of microalgae and other plant proteins These results corroborate with other studies of microalgae and other plant proteins (Moreira, Behling, Rodrigues, Costa, & Soares, 2013; Janczyk, Franke, & Souffrant, 2007). Generally, the proteins of animal origin, such as casein, for example, have a digestibility higher than 95 % and those of vegetable origin below 80 % (Friedman, 1996).

3.4. Effects of microalga *Scenedesmus obliquus* on biochemical blood parameters

The intake of *S. obliquus* had no adverse effect on the liver and kidney of the animals. The damages in the hepatic and renal functions were evaluated by the level of AST, ALT, uric acid, and creatinine in the rat's blood. Such parameters for M50 and M100 diet groups showed no significant difference regarding the control (Figure 2). Concerning the serum glucose levels, all groups showed a significant difference between them, with the values being inversely proportional to the amount of *S. obliquus* in the diet (Figure 2A). The control diet showed the highest concentration of serum glucose ($223.38 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) and the M100 diet the lowest value ($128.75 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) (Figure 2A). Therefore, a decrease of 42 % of the serum glucose level was observed after microalgae consumption. Significant reduction in the atherogenic index (up to 80 %) (Figure 2B) with increasing consumption of microalgae was observed, demonstrating the influence of microalgae on lipid and cholesterol metabolism.

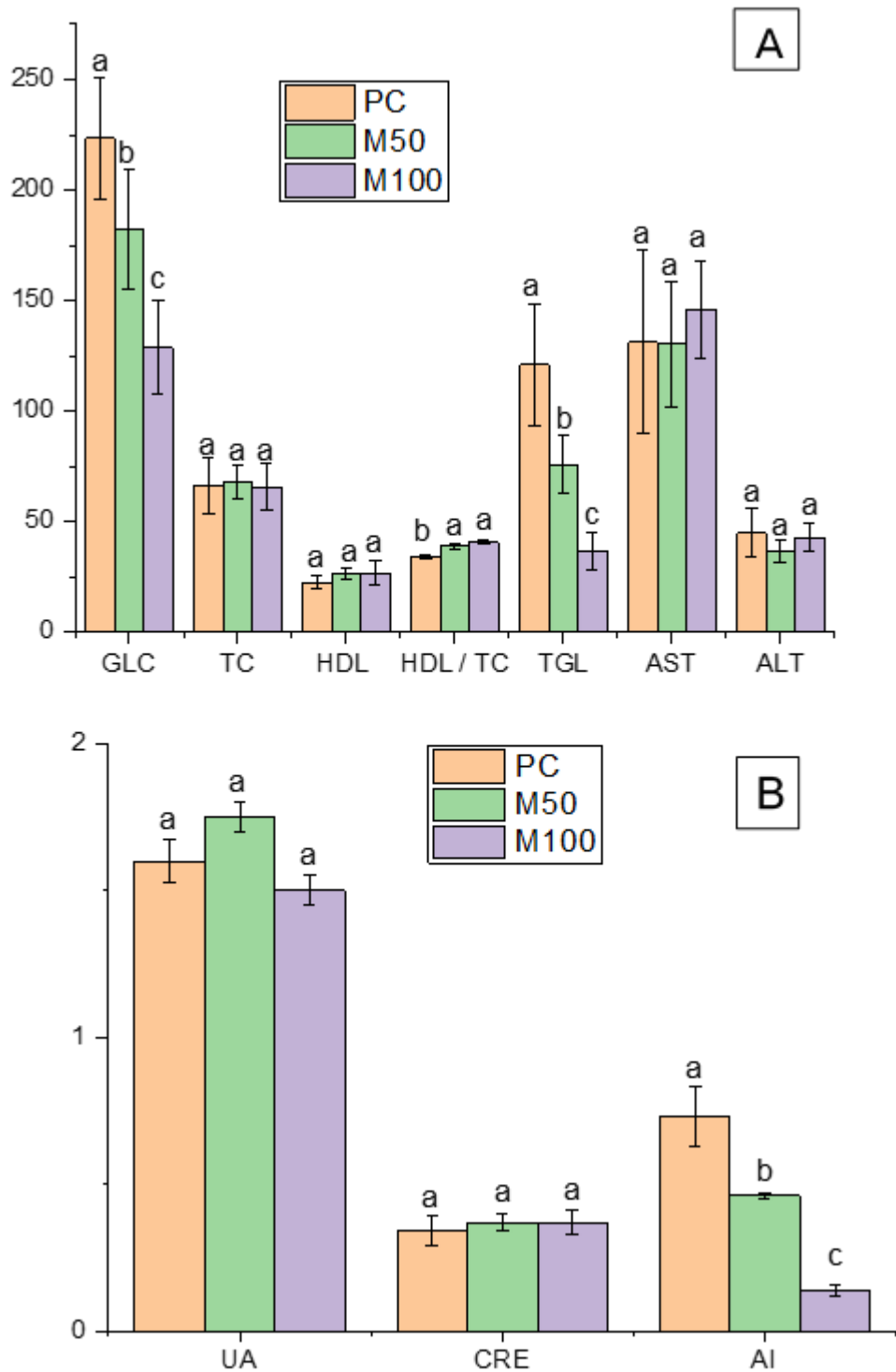
Blood triglyceride levels of the animals were reduced proportionally as the concentration of microalgae in the diet increased and all treatments presented a significant difference ($p < 0.05$) (Figure 2A). The M50 diet led to a lower triglyceride value ($75.87 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) compared to the control ($120.88 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) (Figure 2A). Thus, a reduction of 70 % of the triglyceride level was observed after the microalgae ingestion. The levels of total cholesterol and HDL did not present a significant difference among the microalga and control diets, but the ratio between the HDL and total cholesterol increased for the animals treated with the *S. obliquus* diets (M50 and M100). The increase in HDL ratio concerning the total cholesterol

may have been due to the presence of significant amounts of linolenic, linoleic and oleic acid (omega 3 and omega 6) in the microalga composition.

The literature reported the high amounts of nucleic acids (4 to 6 %) in the microalgal biomasses and a possible increment of the uric acid level in the body with the high intake of nucleic acid, which is due to biochemical degradation of purines (Bigagli et al., 2017; Morist, Montesinos, Cusidó, & Gòdia, 2001). Diseases such as gout attacks and urinary stones may be developed if the uric acid content increases in the human organism because of the body is unsuitable for metabolizing uric acid. Therefore, the World Health Organization recommends that the total daily consumption of nucleic acid in humans does not exceed 4 g (Gutiérrez-Salmeán, Fabila-Castillo, & Chamorro-Cevallos, 2015), which would be equivalent to approximately 100 g of *Arthrospira platensis* biomass (Bigagli et al., 2017). In the present work, the concentrations of uric acid for the diet with *S. obliquus* was normal (Figure 2B) and resembled the quantities found in studies with other species of microalgae, such as *Arthrospira platensis*, known as Spirulina (Bigagli et al., 2017), *Isochrysis galbana*, and *Nannochloropsis oculata* (Nuño et al., 2013).

Decreases or increases in renal function parameters (uric acid and creatinine) (Figure 2B) and liver enzymes (AST, ALT) (Figure 2A) may indicate damage to the kidneys and liver (Sasmaz, Ozkan, Ferit, & Sasmaz, 2017). As it can be seen in the consumption of microalga *S. obliquus* did not present any significant effect on these parameters, showing no difference between them and the control. In addition, this biochemical result, in association with the liver and kidney histology analysis, confirms that *S. obliquus* did not exhibit any negative and pathological damage in renal and hepatic functions.

Figure 2 - Effect of ingestion of the microalga *S. obliquus* on the biochemical variables in Wistar rats (n = 8). (A) GLC: Glucose ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$); TC: Total cholesterol ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$); HDL: HDL cholesterol ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$); HDL/Total cholesterol (%); TGL: triglycerides ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$); AST: aspartate aminotransferase ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$); ALT: alanine aminotransferase ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$). (B) UA: Uric acid ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$); CRE: Creatinine ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$); AI: Atherogenic index. PC: positive control. M50: diet with 50 % of protein from microalga and 50 % of casein. M100: diet with 100 % of protein from microalga. Means followed by the same letter in each parameter do not differ by the Tukey test at the 5 % level of significance.



The intake of the *S. obliquus* diets promoted a reduction in the blood triglycerides, an increase in the ratio between the HDL and total cholesterol, and did not influence the normal levels of the total cholesterol and HDL. Therefore, the consumption of *S. obliquus* exerts a positive effect in lipid homeostasis. The hypolipidemic activity of the microalgae *Arthrospira*

maxima and *Arthrospira platensis* was reported in the literature in high-risk pro-atherogenic diets induced hypercholesterolemia, and in a well-balanced diet containing those microalgae (Sengupta et al., 2018; Bigagli et al., 2017; Serban et al., 2016; Colla, Muccillo-Baisch, & Costa, 2008; Kim et al., 2010; Riss et al., 2007). It should be emphasized the effect of the ingestion of *S. obliquus*, through isocaloric diets, on the reduction of triglycerides levels in healthy animals, which demonstrates the potentiality of using microalga *S. obliquus* as a nutraceutical food.

Significant reduction in serum glucose level was verified as the concentration of microalgae in the diet increased (Figure 2A). Ingestion of *S. obliquus* had a positive influence on glucose homeostasis, and blood glucose reduction was observed, even with isocaloric diets and healthy animals. These data corroborate the results described for other species of microalgae, such as *Chlorella vulgaris* (Jong-Yuh & Mei-Fen, 2005, Ebrahimi-Mameghani, Sadeghi, Abbasalizad Farhangi, Vaghef-Mehrabany, & Aliashrafi, 2017); *Isochrysis galbana* (Nuño et al., 2013); *Spirulina fusiformis* (Setyaningsih, Bintang, & Madina, 2015), for which the serum glucose reduction was verified when using a balanced diet for both healthy and diabetic animals.

The high concentration of microalgae in the diet (23.2 %) interfered with palatability and reduced food intake and this may have influenced a greater reduction in blood glucose and triglycerides. But this effect cannot be attributed solely to food intake, since the 11.6 % microalgae group did not interfere with weight gain and food intake and significantly reduced serum glucose and triglyceride concentrations.

Improvement in the total cholesterol, triglyceride and atherogenic index profile may be associated with the hypolipidemic and antioxidant properties of phytochemicals and peptides that reduce the micellar solubilization of cholesterol, probably by hydrophobic interaction (Hayat, Ahmad, Masud, Ahmed, & Bashir, 2014).

The positive effect of microalga *S. obliquus* on lipid and glycemic homeostasis may be associated with the set of bioactive compounds present in it like carotenoids, pigments, chlorophyll, phenolic compounds, polysaccharides, dietary fibers, phycobiliprotein, and unsaturated fatty acids (Hussein, Salama, El Naggar, & Ali, 2019; Hussein, El-Banna, Razik, & El-Naggar, 2018; Bigagli et al., 2017; Jong-Yuh & Mei-Fen, 2005; Shalaby, 2011). Natural microalgae products generally have variable biological activities such as antioxidant activity, hypolipidemic activity, anticancer activity, hypoglycemic activity, and antimicrobial activity (Hussein, Salama, El Naggar, & Ali, 2019; Hussein, El-Banna, Razik, & El-Naggar, 2018; Bigagli et al., 2017; Jong-Yuh & Mei-Fen, 2005; Shalaby, 2011).

Many microalgae strains, such as *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chlorella* sp. and *Arthrospira* sp., contain high protein, carotenoid and phenolic compounds that have beneficial health activities and are grown on a commercial scale (Soletto, Binaghi, Lodi, Carvalho, & Converti, 2005).

These substances have important pharmacological actions, such as antihyperglycemic and antihyperlipidemic, which are useful in controlling diabetes and obesity because they affect elevated serum glucose (Hussein et al., 2019). Hussein et al. (2019) tested treatment with two dry biomass dose levels with a predominance of *Microcystis aeruginosa* (200 and 400 mg/kg) in diabetic rats and found that the glucose level of diabetic rats was dose-dependent when compared to diabetic control rats and glimepiride-treated rats. Joventino et al. (2012) found that *Spirulina platensis* also demonstrated hypoglycemic and hypolipidemic activity in diabetic rats.

Taku et al. (2007) showed that soy isoflavones decreased serum total cholesterol and LDL significantly, but did not alter triacylglycerol and HDL cholesterol in humans. They concluded that when isoflavones were supplied simultaneously with soy protein, these would have synergistic effects or cholesterol-lowering additives.

There are numerous beneficial physiological effects attributed to linoleic acids, such as anti-atherogenic effect, decreased fat accumulation, anticancer, decreased inflammation, improved immune function, and increased muscle mass (Miranda, Arias, Fernández-Quintela, & del Puy Portillo, 2014). Oleic acid is also considered health-friendly because diets with high amounts of monounsaturated fatty acid reduced LDL-cholesterol, plasma cholesterol, and triacylglycerol concentrations, and the replacement of saturated fatty acids with cis-unsaturated fatty acids reduced the risk of coronary artery disease (Mensink, Zock, Kester, & Katan, 2003; Haug, Høstmark, & Harstad, 2007).

In addition, Afify et al. (2018) analyzed the antioxidant and antiviral activity of microalgae proteins *Scenedesmus obliquus* and found an inhibitory effect against the Coxsackie B virus 3.

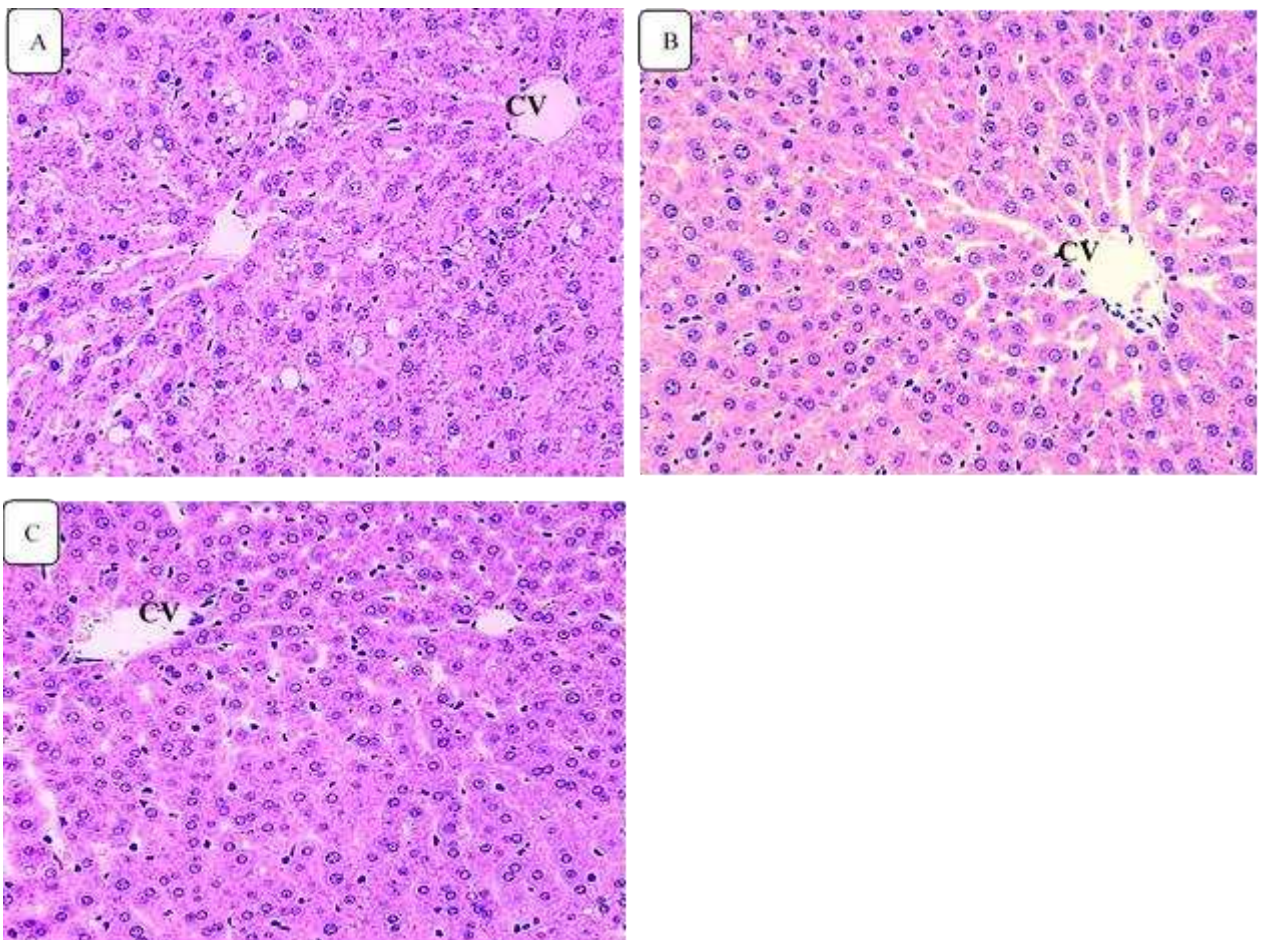
Therefore, the positive effect of microalga *S. obliquus* on the blood biochemical profile of newly weaned Wistar rats may be associated with the set of compounds present in the microalgae, and their effects together, as other authors suggest for other microalgae (Hussein, Salama, El Naggar, & Ali, 2019; Hussein, El-Banna, Razik, & El-Naggar, 2018; Bigagli et al., 2017; Jong-Yuh & Mei-Fen, 2005; Shalaby, 2011).

3.5. Histological analysis

No alterations were observed in the architecture of liver, spleen, and kidney tissues after ingestion of *S. obliquus*. The organs images can be observed in Figures 3 to 5.

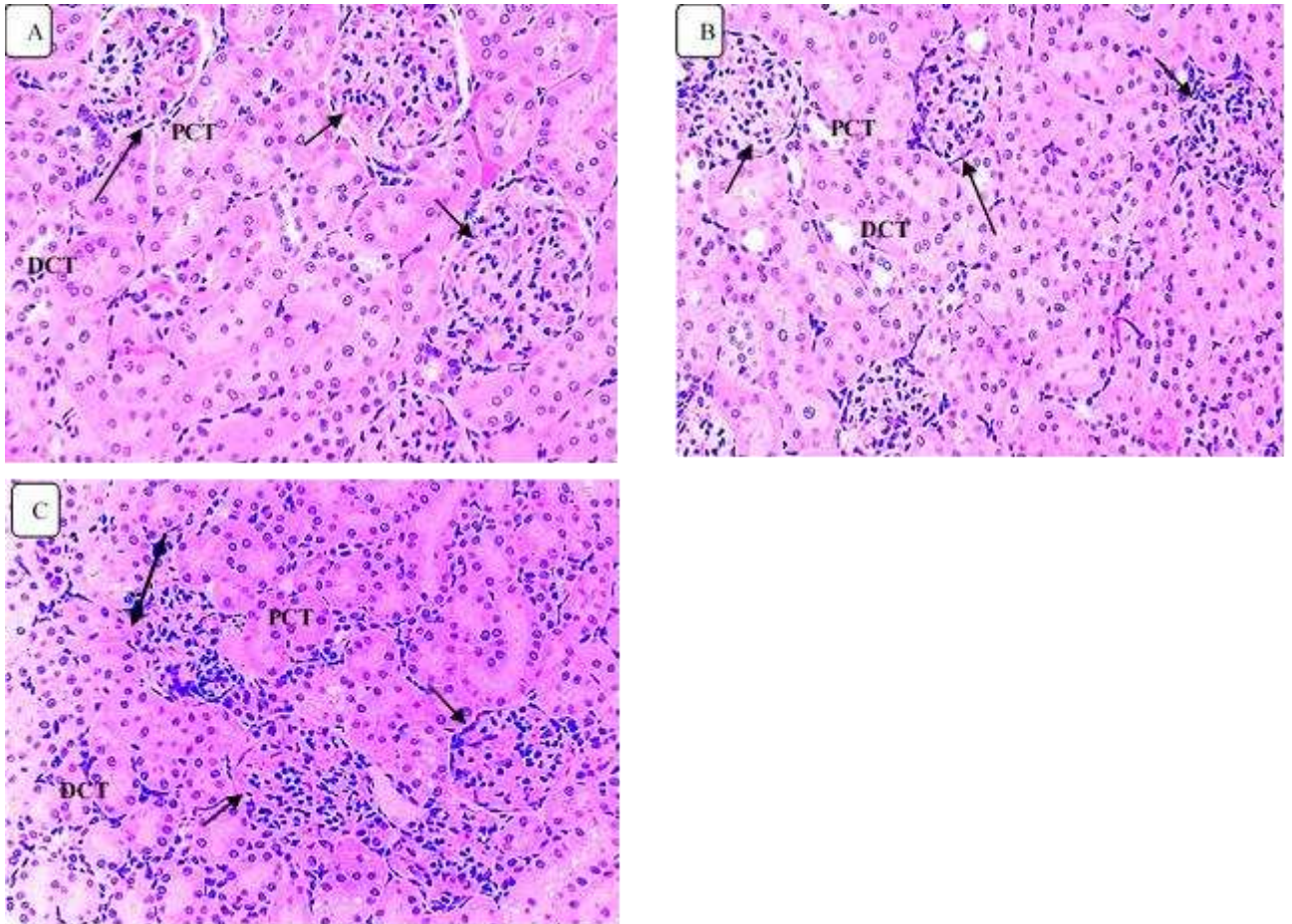
The results for liver histology did not show degeneration, hepatic inflammation, and necrosis for any of the evaluated groups. They also confirmed normal physiology with hepatocyte plaques separated by sinusoids, with well-defined nuclei of hepatocytes and observable Kupffer cells (Figure 3).

Figure 3. Effect of microalga *S. obliquus* ingestion on hepatic tissue architecture compared to the control group. (A) Control; (B) M50; (C) M100. Central vein (CV).



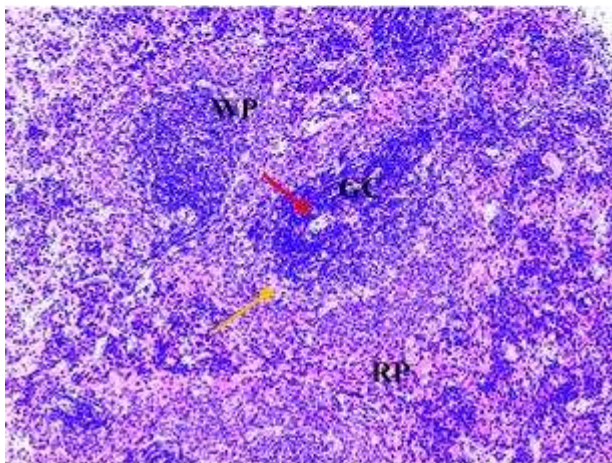
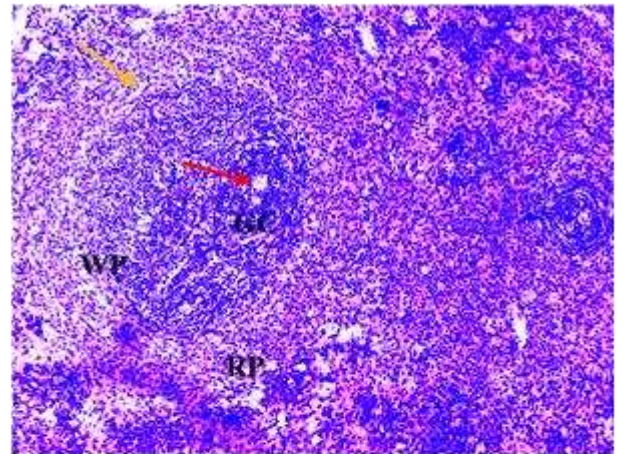
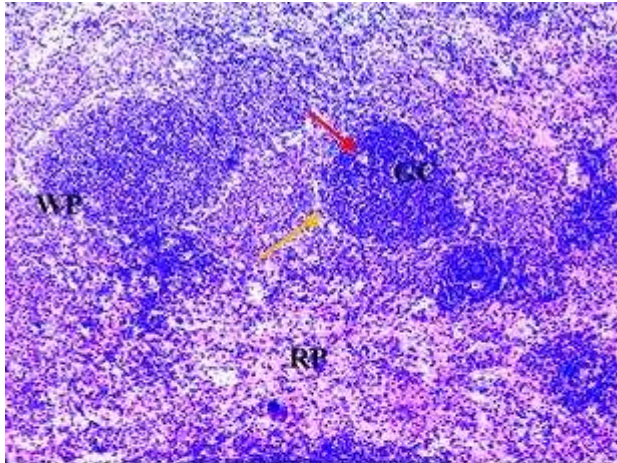
The groups treated with microalga showed no toxic effect on renal tissues, presenting normal and healthy histological structures (Figure 4). Cortical structures, especially the glomerulus as a whole, reflected well-defined constituent elements. The renal tubules, both proximal and distally convoluted, were observable and presented typical architecture.

Figure 4. Effect of ingestion of microalga *S. obliquus* on renal histological architecture compared to the control group. (A) Control; (B) M50; (C) M100. Photomicrograph of the kidney, showing normal glomerulus architecture (arrow); proximal convoluted tubule (PCT) and distal convoluted tubule (DCT).



The spleens of the groups treated with *S. obliquus* compared to the control also had typical structure and tissues (Figure 5). The red pulps (RP) and white pulps (WP) were visible.

Figure 5. Effect of microalga *S. obliquus* on the histological architecture of the spleen compared to the control group. (A) Control; (B) M50; (C) M100. Photomicrography in splenic tissue showing normal tissue architecture, white pulp (WP); red pulp (RP); white pulp areas are usually represented by the germinal center (GC), arteriole (red arrow), and marginal zone (yellow arrow).



Histological analysis showed that the analyzed organs had typical structure and tissues. The central vein presented a normal aspect. In general, the livers of the animals that received *S. obliquus* presented healthy appearance and normal physiology compared to the control. According to EL-Hak, Moustafa, & Mansour, (2018) the architecture of the white pulps of the spleen should display normal rounded scattered follicles with a one-sided arteriole, called the central arterioles, in which the cells are arranged around the arteriole and classified into four zones: thymus-dependent zone; the germinal center; follicular zone, and marginal zones. All these zones were observed in the organs of the animals for all groups tested.

The diets containing microalga *Scenedesmus obliquus* at concentrations of 11.6 % and 23.2 %, which correspond to 50 % and 100 % of the dietary protein, were well tolerated by the rats in a feeding period of 28 days. The formulated diet with 50 % of microalga and 50 % of casein promoted growth, weight gain, and tissue maintenance of the animals. Good digestibility of the microalgal protein was also observed. The intake of microalga *S. obliquus* reduces the triglycerides content (70 %), atherogenic index (80 %), and serum glucose (42 %) concentration, even in a balanced diet. Furthermore, no alteration was observed in the analyzed

organs (liver, spleen, and kidney), suggesting the use of the microalga as potential safe food. Therefore, *Scenedesmus obliquus* may represent a promising sustainable source of functional and nutraceutical foods for possible prevention and treatment of diabetes and dyslipidemias.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES), and PETROBRAS for the financial support.

References

- Afify, A. E. M. M. R., El Baroty, G. S., El Baz, F. K., Abd El Baky, H. H., & Murad, S. A. (2018). *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
<http://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.002>
- AOAC. (2005). AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., 18th.*
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein, 25, 207–210.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Benemann, J. (2013). Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies*, 6(11), 5869–5886.
<http://doi.org/10.3390/en6115869>
- Bigagli, E., Cinci, L., Niccolai, A., Tredici, M. R., Biondi, N., Rodolfi, L., ... Luceri, C. (2017). Safety evaluations and lipid-lowering activity of an *Arthrospira platensis* enriched diet: A 1-month study in rats. *Food Research International*, 102(May), 380–386.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.011>
- Bligh, E.G. and Dyer, W. J. (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8).
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743–756.
<http://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
[http://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Carson, F. L., Martin, J. H., & Lynn, J. A. (1973). Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *The American Journal of Pathology*, (April), 365–373.
- Chan, M., Ho, S., Lee, D., Chen, C., Huang, C., & Chang, J. (2013). Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 24–31. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2012.11.017>
- Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R. D., Drogui, P., & Surampalli, R. Y. (2018). The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(April), 336–346. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.073>
- Colla, L. M., Muccillo-Baisch, A. L., & Costa, J. A. V. (2008). *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(2), 405–411. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132008000200022>
- Devi, M. K. A., Gondi, M., Sakthivelu, G., Giridhar, P., Rajasekaran, T., & Ravishankar, G. A. (2009). Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114(3), 771–776. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.10.011>
- Ebrahimi-Mameghani, M., Sadeghi, Z., Abbasalizad Farhangi, M., Vaghef-Mehrabany, E., & Aliashrafi, S. (2017). Glucose homeostasis, insulin resistance and inflammatory biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Beneficial effects of supplementation with microalgae *Chlorella vulgaris*: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 36(4), 1001–1006. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.07.004>
- EL-Hak, H. N. G., Moustafa, A. R. A., & Mansour, S. R. (2018). Toxic effect of *Moringa peregrina* seeds on histological and biochemical analyses of adult male Albino rats. *Toxicology Reports*, 5(December 2017), 38–45. <http://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.012>
- El-Naggar, M. E., Samhan, F. A., Salama, A. A. A., Hamdy, R. M., & Ali, G. H. (2018). Cationic starch: Safe and economic harvesting flocculant for microalgal biomass and inhibiting *E. coli* growth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 1296–1303. <http://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.05.105>
- FDA. (2003). United States-Grown *Spirulina* Completes FDA Generally Recognized As Safe (GRAS) Notification Process. *Food Drug Administration*.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(5), 4986–4988. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Friedman, M. (1996). Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6–29. <http://doi.org/10.1021/jf9400167>
- García-rebollar, P., Cámara, L., Lázaro, R. P., Dapoza, C., & Pérez-maldonado, R. (2016). Influence of the origin of the beans on the chemical composition and nutritive value of commercial soybean meals. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 245–261. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.007>

- Gilroy, D. J., Kauffman, K. W., Hall, R. A., Huang, X., & Chu, F. S. (2000). Assessing Potential Health Risks from Microcystin Toxins in Blue-Green Algae Dietary Supplements, *108*(51), 435–439.
- Goulão, L. F. (2016). Interventions in agriculture to benefit nutrition and health in Portuguese-Speaking Countries. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, *13*, 55–68.
- Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo, L., & Chamorro-Cevallos, G. (2015). Aspectos nutricionales y toxicológicos de Spirulina (Arthrospira). *Nutrición Hospitalaria*, *32*(1), 34–40. <http://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.9001>
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review, *16*, 1–16. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S. (2014). Nutritional and Health Perspectives of Beans Nutritional and Health Perspectives of Beans (Phaseolus vulgaris L.): *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.596639>
- Howe, J., & Tanumihardjo, S. (2006). Evaluation of Analytical Methods for Carotenoid Extraction from Biofortified Maize (Zea mays sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(21), 7992–7997. <http://doi.org/10.1021/jf062256f>
- Hussein, J., El-Banna, M., Razik, T. A., & El-Naggar, M. E. (2018). Biocompatible zinc oxide nanocrystals stabilized via hydroxyethyl cellulose for mitigation of diabetic complications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 748–754. <http://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.056>
- Hussein, R. A., Salama, A. A. A., El Naggar, M. E., & Ali, G. H. (2019). Medicinal impact of microalgae collected from high rate algal ponds; phytochemical and pharmacological studies of microalgae and its application in medicated bandages. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *20*, 101237. <http://doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.101237>
- Ichihara, K., & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, *51*(3), 635–640. <http://doi.org/10.1194/jlr.d001065>
- Janczyk, P., Franke, H., & Souffrant, W. B. (2007). Nutritional value of Chlorella vulgaris: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Animal Feed Science and Technology*, *132*(1–2), 163–169. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.007>
- Jong-Yuh, C., & Mei-Fen, S. (2005). Potential hypoglycemic effects of Chlorella in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences*, *77*(9), 980–990. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.036>
- Joventino, I. P., Alves, H. G. R., Neves, L. C., Pinheiro-Joventino, F., Leal, L. K. A. M., Neves, S. A., ... Brito, G. A. C. (2012). The Microalga Spirulina platensis Presents Anti-inflammatory Action as well as Hypoglycemic and Hypolipidemic Properties in Diabetic Rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, *9*(1). <http://doi.org/10.1515/1553-3840.1534>
- Kazui, Y., Fujii, S., Yamada, A., Ishigami-Yuasa, M., Kagechika, H., & Tanatani, A. (2018).

Structure-activity relationship of novel (benzoylaminophenoxy)phenol derivatives as anti-prostate cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(18), 5118–5127. <http://doi.org/10.1016/J.BMC.2018.09.008>

Kim, M. Y., Kim, M. J., Sok, D., Kim, M. R., Cheong, S. H., & Lee, J. H. (2010). Spirulina Improves Antioxidant Status by Reducing Oxidative Stress in Rabbits Fed a High-Cholesterol Diet. *Journal of Medicinal Food*, 13(2), 420–426. <http://doi.org/10.1089/jmf.2009.1215>

Kim, Y.-H., Choi, S.-J., Park, H.-J., & Lee, J.-H. (2014). Electron beam-induced mutants of microalgae *Arthrospira platensis* increased antioxidant activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 1834–1840. <http://doi.org/10.1016/J.JIEC.2013.08.039>

Kothari, R., Pandey, A., Ahmad, S., Kumar, A., Pathak, V. V., & Tyagi, V. V. (2017). Microalgal cultivation for value-added products: a critical enviro-economical assessment. *3 Biotech*, 7(4). <http://doi.org/10.1007/s13205-017-0812-8>

Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., ... Wahby, I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, 215, 13–19. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>

Marles, R. J., Barrett, M. L., Barnes, J., Chavez, M. L., Gardiner, P., Ko, R., ... Griffiths, J. (2011). United states pharmacopeia safety evaluation of spirulina. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 593–604. <http://doi.org/10.1080/10408391003721719>

Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. M., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins : a meta-analysis of 60 controlled trials 1 – 3, 1146–1155.

Miranda, J., Arias, N., Fernández-Quintela, A., & del Puy Portillo, M. (2014). Are conjugated linolenic acid isomers an alternative to conjugated linoleic acid isomers in obesity prevention? *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 61(4), 209–219. <http://doi.org/10.1016/J.ENDOEN.2014.03.002>

Moreira, L. M., Behling, B. del S., Rodrigues, R. da S., Costa, J. A. V., & Soares, L. A. de S. (2013). Spirulina as a protein source in the nutritional recovery of Wistar Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 447–456. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300013>

Morist, A., Montesinos, J. L., Cusidó, J. A., & Gòdia, F. (2001). Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 37(5), 535–547. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00230-8](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00230-8)

Niccolai, A., Bigagli, E., Biondi, N., Rodolfi, L., Cinci, L., Luceri, C., & Tredici, M. R. (2017). In vitro toxicity of microalgal and cyanobacterial strains of interest as food source. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 199–209. <http://doi.org/10.1007/s10811-016-0924-2>

Nuño, K., Villarruel-López, A., Puebla-Pérez, A. M., Romero-Velarde, E., Puebla-Mora, A. G., & Ascencio, F. (2013). Effects of the marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 106–115. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.011>

- Osborne, T. B., Mendel, L. B., & Ferry, E. L. (1919). A Method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *37*(2), 223–229. Retrieved from <http://www.jbc.org/cgi/content/short/37/2/223>
- Příbyl, P., Cepák, V., Kaštánek, P., & Zachleder, V. (2015). Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp. *Algal Research*, *11*, 22–27. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.020>
- Raposo, M. F. D. J., & De Moraes, A. M. M. B. (2015). Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sciences*, *125*, 32–41. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.018>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, *123*(11), 1939–1951. <http://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Riss, J., Décordé, K., Sutra, T., Delage, M., Baccou, J. C., Jouy, N., ... Rouanet, J. M. (2007). Phycobiliprotein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(19), 7962–7967. <http://doi.org/10.1021/jf070529g>
- Rocha, D. N., Martins, M. A., Soares, J., Vaz, M. G. M. V., de Oliveira Leite, M., Covell, L., & Mendes, L. B. B. (2019). Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. *Bioresource Technology*, *289*, 121644. <http://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121644>
- Sasmaz, A., Ozkan, S., Ferit, M., & Sasmaz, M. (2017). The hematological and biochemical changes in rats exposed to britholite mineral. *Applied Radiation and Isotopes*, *129*(April), 185–188. <http://doi.org/10.1016/j.apradiso.2017.07.060>
- Sengupta, S., Koley, H., Dutta, S., & Bhowal, J. (2018). Hypocholesterolemic effect of *Spirulina platensis* (SP) fortified functional soy yogurts on diet-induced hypercholesterolemia. *Journal of Functional Foods*, *48*, 54–64. <http://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.07.007>
- Serban, M. C., Sahebkar, A., Dragan, S., Stoichescu-Hogea, G., Ursoniu, S., Andrica, F., & Banach, M. (2016). A systematic review and meta-analysis of the impact of *Spirulina* supplementation on plasma lipid concentrations. *Clinical Nutrition*, *35*(4), 842–851. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.09.007>
- Setyaningsih, I., Bintang, M., & Madina, N. (2015). Potentially Antihyperglycemic from Biomass and Phycocyanin of *Spirulina Fusiformis* Voronikhin by in Vivo Test. *Procedia Chemistry*, *14*, 211–215. <http://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.030>
- Shalaby, E. A. (2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(9), 1338–1350. <http://doi.org/10.4161/psb.6.9.16779>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.

- Soares, A. T., Júnior, J. G. M., Lopes, R. G., Derner, R. B., & Filho, N. R. A. (2016). Improvement of the extraction process for high commercial value pigments from *desmodesmus* sp. microalgae. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(6), 1083–1093. <http://doi.org/10.5935/0103-5053.20160004>
- Soares, J., Krieger Loterio, R., Rosa, R. M., Santos, M. O., Nascimento, A. G., Santos, N. T., ... Arêdes Martins, M. (2018). *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. *Annals of Microbiology*, 68(1), 35–45. <http://doi.org/10.1007/s13213-017-1315-x>
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M., & Converti, A. (2005). Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243(1–4), 217–224. <http://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.10.005>
- Taku, K., Umegaki, K., Sato, Y., Taki, Y., Endoh, K., & Watanabe, S. (2007). Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(4), 1148–1156. <http://doi.org/10.1093/ajcn/85.4.1148>
- Vaz, B. S., Moreira, J. B., Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, 73–77. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>
- Waghmare, A. G., Salve, M. K., Leblanc, J. G., & Arya, S. S. (2016). Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*. <http://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b , as well as Total Carotenoids , Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution *. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [http://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wiltshire, K. H., Boersma, M., Möller, A., & Buhtz, H. (2000). Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology*, 34(2), 119–126. <http://doi.org/10.1023/A:1009911418606>
- Yamani, E., Gresenguet, G., Kaba-Mebri, J., Mouala, C., & Rey, J. L. (2009). Use of spirulina supplement for nutritional management of HIV-infected patients: study in Bangui, Central African Republic. *Medecine Tropicale*, 69(1), 66–70.

CAPÍTULO 3

Extração integrada de proteínas, lipídeos e pigmentos da microalga *Scenedesmus obliquus* e propriedades técnico-funcionais de suas proteínas

Manuscript formatted according to Bioresource Technology

Extração integrada de proteínas, lipídeos e pigmentos da microalga *Scenedesmus obliquus* e propriedades técnico-funcionais de suas proteínas

Resumo: A necessidade de biorrefinaria de múltiplos produtos a partir de microalgas tornou-se uma abordagem promissora para a comercialização de produtos à base de microalgas. O objetivo deste trabalho foi integrar a extração de proteínas com a extração de pigmentos e lipídeos da microalga *Scenedesmus obliquus*. O pH 10 é adequado para a extração de proteínas, que podem extrair até 41% da proteína total da microalga com 3 h de extração, enquanto que em pH 12 o teor extraído pode chegar a 49 %. A inclusão da etapa de separação de proteínas antes da extração lipídica é uma alternativa para a produção de óleo com menor teor de pigmentos e interferentes, uma vez que a maioria dos pigmentos são separados junto com proteínas solúveis. O perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *S. obliquus*, desproteínizado, pouco se alterou em relação ao óleo extraído da microalga integral. O uso da rota proposta gerou um concentrado de proteína solúvel da microalga *S. obliquus*, livre de cor intensa, com alta capacidade e estabilidade de formação de espuma e emulsão superior às proteínas de soja e soro de leite.

Palavras-chave: alimentos; extração de proteínas; capacidade de espuma; propriedades emulsificantes; pigmentos; óleo de microalga.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são matéria-prima promissora para muitas indústrias, incluindo biofarmacêuticos, nutracêuticos, bioenergia, biomateriais, agricultura, tratamento de resíduos, saúde animal, cosméticos e cuidados pessoais. Estudos de viabilidade demonstram que um foco de biorrefinaria em um único produto não é economicamente viável e que vários componentes de microalgas devem ser extraídos para abastecer mercados diferentes e, assim, aumentar o valor geral da biomassa de microalgas (Cheng et al., 2020; Wang et al., 2019; Khetkorn et al., 2017; Suarez Ruiz et al., 2018; Ruiz et al., 2016; Wijffels et al., 2010).

Uma parcela das pesquisas envolvendo microalgas destina-se a produção de biocombustíveis, porém o custo do processo ainda é bastante elevado. Deste modo, é necessária a extração de outros produtos da biomassa de microalga, de modo a valorar a cadeia de produção de lipídeos para conversão em (Chen et al., 2018; Gupta et al., 2016).

As microalgas têm atraído a atenção do setor de alimentos e nutrição por serem uma fonte de proteínas propensas ao crescimento em qualquer área e região. Este interesse reside nas vantagens que estes microrganismos exibem quando comparados com outras fontes vegetais de obtenção de proteínas, como as plantas. As microalgas possuem maior eficiência na conversão de energia solar em biomassa, resultando em elevadas taxas de crescimento (10 a 50 vezes mais rápidos do que as plantas) e uma capacidade superior de sequestro e conversão do CO₂. Além disso, esses microrganismos podem crescer em áreas não adequadas para as culturas tradicionais e não competem com os locais para a produção de alimentos (Cheng et al., 2020; Waghmare et al., 2016; Gong and Jiang, 2011; Chen et al., 2011; Ho et al., 2013).

As microalgas possuem potencial promissor para produzir diversos bioprodutos de alto valor, aplicando condições de estresse e estimulando assim a produção do composto de interesse (Liang et al., 2018). Dependendo da cepa, as microalgas podem conter diferentes tipos de pigmentos, como carotenoides (vermelho, laranja e amarelo), clorofilas (verde), e ficobiliproteínas (vermelho e azul). Além disso, suas proteínas são reconhecidas por alta qualidade, mostrando excelentes propriedades funcionais, nutricionais, e tecno-funcionais que são, em alguns casos, superiores aos concentrados proteicos convencionais (Afify et al., 2018; Suarez Garcia et al., 2018; Schwenzfeier et al., 2013).

A literatura (Afify et al., 2018; Soares et al., 2018; Becker, 2007) reporta que as microalgas do gênero *Scenedesmus* spp. são as mais abundantes encontradas nos ambientes aquáticos e apresentam uma vasta variação morfológica dentro de cada espécie. *Scenedesmus* spp. possuem alta tolerância em variações climáticas e de pH, elevada taxa de crescimento e 40 a 56 % de proteína em relação a sua massa seca (Silva et al., 2020; Afify et al., 2018; Chan et al., 2013; Becker, 2007). Příbyl et al. (2015) afirmaram que a robustez e facilidade de cultivo de cepas de *Scenedesmus* as tornam mais adequadas à produção sustentável em larga escala, sendo propensas à geração de vários compostos. Afify et al. (2018) avaliaram a adequação de *Scenedesmus obliquus* como fonte de aminoácidos essenciais (Thr, Val, Met, Ile, Leu) e não essenciais (His, Arg, Ala, Pro, Asp) e indicaram que esta cepa apresenta qualidades promissoras para atuar como uma nova fonte de proteína, além de outros compostos valiosos (Chan et al., 2013).

A extração de vários biocompostos da microalga é um desafio a ser superado, pois para a extração de moléculas hidrofóbicas, como pigmentos e lipídios, são frequentemente usados solventes orgânicos, enquanto componentes solúveis em água, como proteínas e carboidratos, são descartados, desnaturados ou subestimados. As proteínas são moléculas que tendem a desnaturar durante a extração usando solventes orgânicos ou outras condições adversas e mais

severas. Portanto, a valorização completa da biomassa de microalgas requer o uso de técnicas de separação moderadas, e combinações de métodos que forneça curto tempo de processamento e alta eficiência de extração, além da preservação da qualidade e atividade das biomoléculas (Wu and Chang, 2019; Kumar et al., 2018; Rasala and Mayfield, 2015; Castro-Puyana et al., 2013). Além disso, os resíduos orgânicos gerados após extração desses compostos devem ser processados e direcionados afim de aproveitamento, seja em ração animal, biofertilizantes e/ou energia elétrica, de modo a evitar riscos de contaminação ambiental (Sharma et al., 2020; Lamminen et al., 2019).

Embora as microalgas contenham vários biocompostos de interesse, os processos de separação atualmente aplicados valorizam apenas um produto específico (por exemplo, astaxantina, lipídeos, proteínas e ficobiliproteínas). Mediante isso, é necessário o desenvolvimento de processos e métodos eficientes, de custo acessível e escalonáveis, capazes de fracionar diferentes biomoléculas de microalgas. Portanto, a necessidade de biorrefinaria de múltiplos produtos a partir de microalgas tornou-se uma abordagem promissora para a comercialização de produtos à base de microalgas. Mediante o exposto, o objetivo desse trabalho foi otimizar a extração de proteínas e integrar com a extração de pigmentos e lipídeos da microalga *Scenedesmus obliquus*, além de avaliar a capacidade técnico funcional dessa proteína quanto a formação de espuma e emulsão

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo e crescimento das microalgas

A microalga *Scenedesmus obliquus* foi cultivada em um tanque (4.000 L de capacidade de cultivo, densidade de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), com incidência solar e em modo semi-descontínuo, em meio rico em cloreto de potássio ($173,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e uréia ($180 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). A curva de crescimento da microalga foi determinada por densidade ótica usando a absorbância (espectrofotômetro Thermo Scientific, Multiskan GO, Alemanha) a 620 nm.

2.2. Separação da biomassa microalgal

A biomassa foi separada por floculação na fase de crescimento estacionário. As células foram lavadas com água e concentradas até um conteúdo de sólidos de 10 a 15 % (p / p) usando

uma centrífuga (Thermo Scientific, Heraeus multifuge X3R, EUA), a 3000g por 10 min. A biomassa foi então congelada a -40 °C, liofilizada (Terroni, LS 3000, Brasil) e armazenada a 8 °C em recipientes esterilizados.

2.3. Composição centesimal das microalgas

A composição química da biomassa microalgal seca foi caracterizada em termos do teor de:

- Umidade: determinada em estufa (105 ± 1 °C), por aproximadamente 6 h, até massa constante (AOAC 925.09, 2005).
- Cinzas: determinadas após submeter a amostra em forno mufla (550 °C), por cerca de 6 h, até produção de cinzas claras e massa constante (AOAC 923.03, 2005).
- Lipídeos: determinados por Soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente de extração (AOAC 920.85, 2005).
- Proteína: determinada por Kjeldahl (AOAC 920.87, 2005), com a quantificação do conteúdo de nitrogênio total, cujo fundamento é o deslocamento do nitrogênio presente na amostra, a sua conversão em sal amoniacal (sulfato de amônio, por meio de H₂SO₄), o deslocamento do íon amônio do sal e a captura do amônio em solução ácida (ácido bórico). Por titulação determina-se a quantidade de nitrogênio que originou o amônio. O fator de conversão de nitrogênio em proteína de microalga depende de muitos fatores e varia espécie para espécie. É afetado também pela etapa de processamento, por causa da variedade de compostos celulares que contém nitrogênio, como nucleotídeos, glicosamina, nitrogênio inorgânico, e aminoácidos livres. O fator de conversão utilizado neste trabalho foi de 5,8, calculado e relatado em trabalho utilizando a microalga *S. obliquus* (Afify et al., 2018).
- Carboidrato: obtido por diferença [carboidrato (%) = 100 - proteína (%) - lipídios (%) - cinzas (%) - água (%)] (AOAC, 2005).

2.4. Rompimento das células

Para os testes de otimização de extração de proteínas e outros compostos biológicos das células da microalga, as células da microalga foram previamente rompidas. A ruptura celular foi realizada com auxílio de um ultrassom de ponta (Sonics, VCX 750, EUA) nas condições de frequência de 20 kHz, amplitude de 90 %, 5 min, sob banho de gelo para evitar o

superaquecimento do sistema. A concentração de microalga para a ruptura celular foi de 10 % (m/v) de sólidos.

2.5 Otimização de extração de proteínas

2.5.1 Influência do pH na extração de proteínas solúveis no rompimento celular

Antes do rompimento das células, o pH da suspensão de biomassa foi ajustado para 7, 8, 9 e 10 para verificar a influência do pH na extração das proteínas solúveis. O objetivo desse teste foi verificar a combinação de pH e ultrassom para romper as células e extrair proteínas solúveis. As suspensões da biomassa rompida foram centrifugadas (7500g, 10 min., 20 °C), os sobrenadantes foram separados e o teor proteico dos sobrenadantes foi quantificado pela metodologia de Bradford. Os resultados de conteúdo proteico solúvel (CPS) foram expressos em termos percentuais [% CPS = % de proteína solúvel (PS)/ % de proteína total (PT)] x 100 (CPS = PS/PT x 100). Os teores proteicos no sobrenadante e total foram quantificados por Bradford (Bradford, 1976) e Kjeldahl (AOAC, 2005), respectivamente.

2.5.2 Efeito do pH do meio sobre a solubilidade da proteína microalgal

Após o rompimento celular, as suspensões da biomassa foram centrifugadas e ocorreu a separação dos sobrenadantes contendo as proteínas solúveis. O pH inicial do meio foi medido e, em seguida, ajustado ($2 < \text{pH} < 13$), aumentado ou reduzido com soluções de NaOH (1 M) ou HCl (1 M), e agitados por 30 min, para estabilização dos sistemas. Para determinar o efeito do pH sobre a solubilidade das proteínas solúveis, alíquotas (1 mL) foram retiradas dos sistemas e centrifugadas (10000g, 10 min., 20 °C). Os sobrenadantes foram recolhidos e quantificados quanto ao teor proteico pelo método de Bradford (1976). Foram determinados os pontos de maior e menor solubilidade proteica.

O método de Bradford se baseia na interação entre o corante azul brilhante de Coomassie (BG-250) e as macromoléculas proteicas com máxima absorção em 595 nm. A proteína albumina do soro bovino (BSA) foi usada como padrão para a construção da curva analítica. Os resultados foram calculados em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e convertidos em % ($\text{g proteína} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ de microalga).

2.5.3 Otimização das condições operacionais para extração da proteína insolúvel

Após o rompimento celular e a separação da proteína solúvel, a biomassa foi submetida a diferentes valores de pH e tempos de extração para verificar a influência destes fatores na separação da proteína.

Segundo modificações da metodologia de Gerde et al. (2013), a separação das proteínas insolúveis, sob agitação constante (100 rpm), seguiu um planejamento experimental com a combinação de 6 níveis de pH e 5 níveis de tempo. Os tempos de extração estudados foram 15, 30, 60, 120 e 180 min e os valores de pH avaliados foram 7, 8, 9, 10, 11, 12. Suspensões de 5 % de biomassa foram preparadas em água destilada, o pH foi ajustado com soluções de NaOH (1 M e 0,1 M) para o valor desejado e os sistemas foram centrifugados (10 min, 10.000g, 20 °C). Os volumes dos sobrenadantes, a massa inicial da amostra e as suas respectivas concentrações proteicas foram determinados em todas as condições de extração.

2.5.4 Ponto isoelétrico para isolamento da proteína microalgal

O ponto isoelétrico (pI) da proteína solúvel foi determinado a partir da medida do potencial ζ em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra). Uma alíquota de 1 mL da dispersão da proteína microalgal (diluição 1:50) foi colocada em uma cubeta, apropriada para a análise. Após a cubeta foi colocada no interior do equipamento e foi submetida a um campo elétrico constante. Dessa forma, a velocidade e a direção do movimento da partícula, determinados pelo campo elétrico aplicado, permitiram o cálculo da mobilidade eletroforética das partículas pelo equipamento utilizando o modelo de Smoluchowski (Brothers, 2002). O ponto isoelétrico corresponde ao valor cujo pH exibe potencial ζ igual a zero, pois o pI pode ser definido como o valor de pH para o qual a carga líquida ou o potencial ζ é nulo. A faixa de pH analisada foi de 2 a 13, sendo a variação do pH feita em uma escala de 1 unidade. Entre os valores de pH 2,0 e 3,0, a escala de variação foi de 0,1 unidade utilizando soluções de HCl (0,05, 0,1 e 1,0 M) e NaOH (0,05, 0,1 e 1,0 M). As análises foram feitas a 25 °C em três repetições.

2.6. Extração integrada de proteínas, pigmentos e lipídeos

A extração integrada de compostos ocorreu da seguinte forma: quantidades de 40 g da biomassa microalgal, caracterizada quanto a composição centesimal (Amostra integral) e seca por liofilização, foram pesadas, diluídas para 10 % de sólidos e rompidas em ultrassom (20 kHz, 90 % amplitude, 5 min) no pH 10. O sistema foi centrifugado (7500g, 10 min, 20 °C) e o sobrenadante contendo proteína solúvel foi separado da primeira biomassa residual (centrifugado). Essa biomassa residual teve o seu pH ajustado para 10 com NaOH 1 M, agitada por 1 h, centrifugada (7500g, 10 min, 20 °C) e o sobrenadante contendo a proteína solúvel residual foi separada da segunda biomassa microalgal. A proteína foi separada da biomassa, foi precipitada no ponto isoelétrico, e seca por liofilização (Proteína 1). A biomassa residual da extração das proteínas nesta etapa, foi chamada de Controle. A biomassa microalgal residual da extração de proteínas, foi a utilizada para a extração de lipídeos e pigmentos.

Assim, após a centrifugação e separação das proteínas solúveis no sobrenadante, a biomassa residual (pellet) foi utilizada para os testes com os solventes. A proporção de solvente:pellet usada foi de 6:1 (v m) (Grossmann et al., 2018), com a biomassa residual na concentração de 10 %. Os diferentes solventes foram adicionados ao pellet, agitados por 30 min, e centrifugados (7500g, 10 min, 20 °C). Os sobrenadantes foram armazenados para posterior quantificação de pigmentos em espectrofotômetro. As biomassas tratadas com solvente foram congeladas, liofilizadas, pesadas e analisadas quanto a cor ($L^* a^* b^*$), proteínas, cinzas e lipídeos. Adicionalmente, o solvente (1) com a maior capacidade para extração de pigmentos do pellet e (2) que levou ao maior teor de proteína no pellet (insolúvel), foi utilizado para lavar a amostra de proteína solúvel precipitada no pI, para retirar o teor de pigmentos da proteína e aumentar sua concentração. Dessa forma, a proteína foi lavada duas vezes, resultando nas proteínas 2 e 3.

A influência da polaridade do solvente sobre a precipitação das proteínas e a extração de pigmentos e lipídeos foi avaliada seguindo a metodologia de Grossman et al. (2018), com modificações. Para isso, 5 solventes com polaridades decrescentes foram escolhidos e testados de acordo com a permissividade relativa (ϵ_r): etanol ($\epsilon_r = 25,3$), acetona ($\epsilon_r = 21,0$) e acetato de etila ($\epsilon_r = 6,1$) como solventes puros; etanol: acetona (1:1 v/v, $\epsilon_r = 23,2$) e acetato de etila:hexano (1:1 v/v, $\epsilon_r = 3,91$) como uma mistura de solventes com polaridades intermediária e baixa, respectivamente. Quantidades pré-definidas (7 g) da biomassa residual, ou controle, foram dispersas em cada um dos 5 solventes utilizando uma razão solvente:biomassa de 6:1 (v / p). Os sistemas formados foram agitados por 30 min e centrifugados (7.000 g por 5 minutos). Os centrifugados, contendo a biomassa residual 2, foram lavados com o solvente, secos por liofilização e foram macerados.

O sobrenadante de cada tratamento foi colocado em frasco âmbar e armazenado em refrigeração para posterior quantificação de pigmentos. Cada precipitado foi caracterizado quanto ao seu teor de proteínas, cinzas, lipídeos (AOAC, 2005) e cor.

2.10. Análise de cor

Medições de cor das amostras de microalga e proteínas, antes e após a lavagem com solventes, foram realizadas para gerar um indicador da solubilização do pigmento. Os valores L^* a^* b^* foram obtidos usando um espectrofotômetro ColorQuest XE Hunterlab. O dispositivo fornece valores de L^* no intervalo de 0 (preto) a 100 (branco), de a^* no intervalo de -170 (verde) a +100 (vermelho) e de b^* no intervalo de -100 (azul) para +150 (amarelo). O iluminante padrão foi o D65.

2.11. Quantificação de pigmentos e lipídeos

Cada sobrenadante dos experimentos com os solventes foram quantificados quanto ao teor de pigmentos (Clorofila a, b e carotenoides) seguindo a metodologia proposta por Wellburn (1994) e usando as equações para seus respectivos solventes.

2.12. Perfil de ácidos graxos antes e após a extração de proteínas

O óleo da microalga *S. obliquus* foi extraído, pelo método de Bligh and Dyer (1959), antes e após a separação das proteínas para verificar se a extração da proteína influencia o perfil de ácidos graxos. O óleo foi convertido em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) segundo Ichihara and Fukubayashi (2010), para obter o perfil de ácidos graxos de *S. obliquus*. As amostras do óleo de microalga foram diluídas em solução de clorofórmio: metanol (2: 1) e os lipídios foram transesterificados com a adição de solução de HCl 8 M em metanol, seguido de incubação a 100 °C por 1 h. Os FAMES foram extraídos com hexano, que foi coletado da fase superior após a centrifugação. O sobrenadante (fase solvente) foi injetado em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID) (Shimadzu, GC-2010, Japão) e uma coluna capilar de 100 mx 0,25 mm (SP-2560, Sigma-Aldrich, EUA). A análise foi realizada por injeção direta de 1 µL da amostra. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste e mantido a uma vazão constante de 363 kPa. Os FAMES foram separados usando

uma rampa de aquecimento linear (60 °C a 330 °C), a uma taxa de aquecimento de 20 °C·min⁻¹ e alta velocidade linear para melhor resolução do pico. A identificação do pico foi confirmada por comparação com o mix FAME padrão (SupelCo 37 FAME mix, Sigma-Aldrich, USA) (Silva et al., 2020).

2.13. Propriedades técnico funcionais do concentrado de proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus*

2.13.1. Capacidade de formação de espuma (FC) e estabilidade da espuma (FS)

A capacidade de formação de espuma (FC) e a estabilidade da espuma (FS) das amostras de proteínas foram determinadas conforme Mohanty et al., (1988), com modificações. Um volume de 15 mL de solução de proteína da microalga na concentração de 0,1 % (p/v), 0,3 e 0,5 % foram homogeneizados em Ultra-turrax (Ika I25, Alemanha), a 14.000 rpm, a 25 °C, por 2 min, para incorporar ar. Os sistemas foram colocados dentro de tubos cilíndricos graduados. Após a homogeneização, o volume total foi lido imediatamente. A expansão da espuma foi calculada (equação 6) pela porcentagem do incremento de volume após a homogeneização em 0 min. A estabilidade da espuma foi calculada (equação 7) pelo volume de espuma remanescente após 0,17, 0,5, 1 e 24 h.

$$FC (\%) = [(V_0 - V_b) / V_b] \times 100 \quad (6)$$

$$FS (\%) = [(V_t - V_0) / V_0] \times 100 \quad (7)$$

Em que, V_b é o volume total antes da homogeneização (mL), V_0 é o volume exatamente após a homogeneização (mL) e V_t é o volume após tempo t (mL), mantendo o sistema à temperatura ambiente.

2.13.2. Propriedades emulsionantes

O índice de atividade emulsificante (EAI) e o índice de estabilidade emulsionante (ESI) das misturas proteicas foram medidos de acordo com Pearce e Kinsella (1978), com

modificações. Um volume de 6 mL de dispersão de proteína (0,5 %) em água e 2 mL de óleo de soja foram homogeneizados em sonificador por 3 min. Uma amostra de emulsão de 50 µL foi retirada do fundo do tubo, aos 0 e 10 min após a homogeneização, e diluída em 10 mL de solução de dodecilsulfato de sódio a 0,1 %. A absorvância da emulsão foi medida a 500 nm com espectrofotômetro UV / visível usando cubetas de plástico (comprimento do caminho de 1 cm).

EAI e ESI foram calculados usando as equações 8 e 9:

$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = 2 \times 2,303 \times A_0 \times \text{DF} / c \times \varphi \times 10000 \quad (8)$$

$$\text{ESI (min)} = (A_0 / \Delta A) \times t \quad (9)$$

Em que, A_0 é a absorvância da emulsão diluída imediatamente após homogeneização, DF é o fator de diluição ($\times 200$), c é a concentração de proteína ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em fase aquosa antes da formação da emulsão, φ é a fração de volume de óleo da emulsão, ΔA é a mudança na absorvância entre 0 e 10 min, e t é o período de tempo (10 min).

2.14 Análise estatística

Os resultados de cor e composição centesimal foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de médias Tukey a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). Os resultados foram demonstrados em médias \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico SAS, SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1999) versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição centesimal da microalga *S. obliquus*

A microalga analisada apresentou média de % ($\text{g}\cdot(100\text{g})^{-1}$) 6,40 de umidade; 40,10 de proteínas; 8,66 de lipídios; 10,37 de cinzas e 34,47 de carboidratos. Esses valores estão de acordo com outros estudos relatados na literatura utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus*,

nos quais os autores verificaram maior quantidade de proteínas e carboidratos (Silva et al., 2020; Afify et al., 2018).

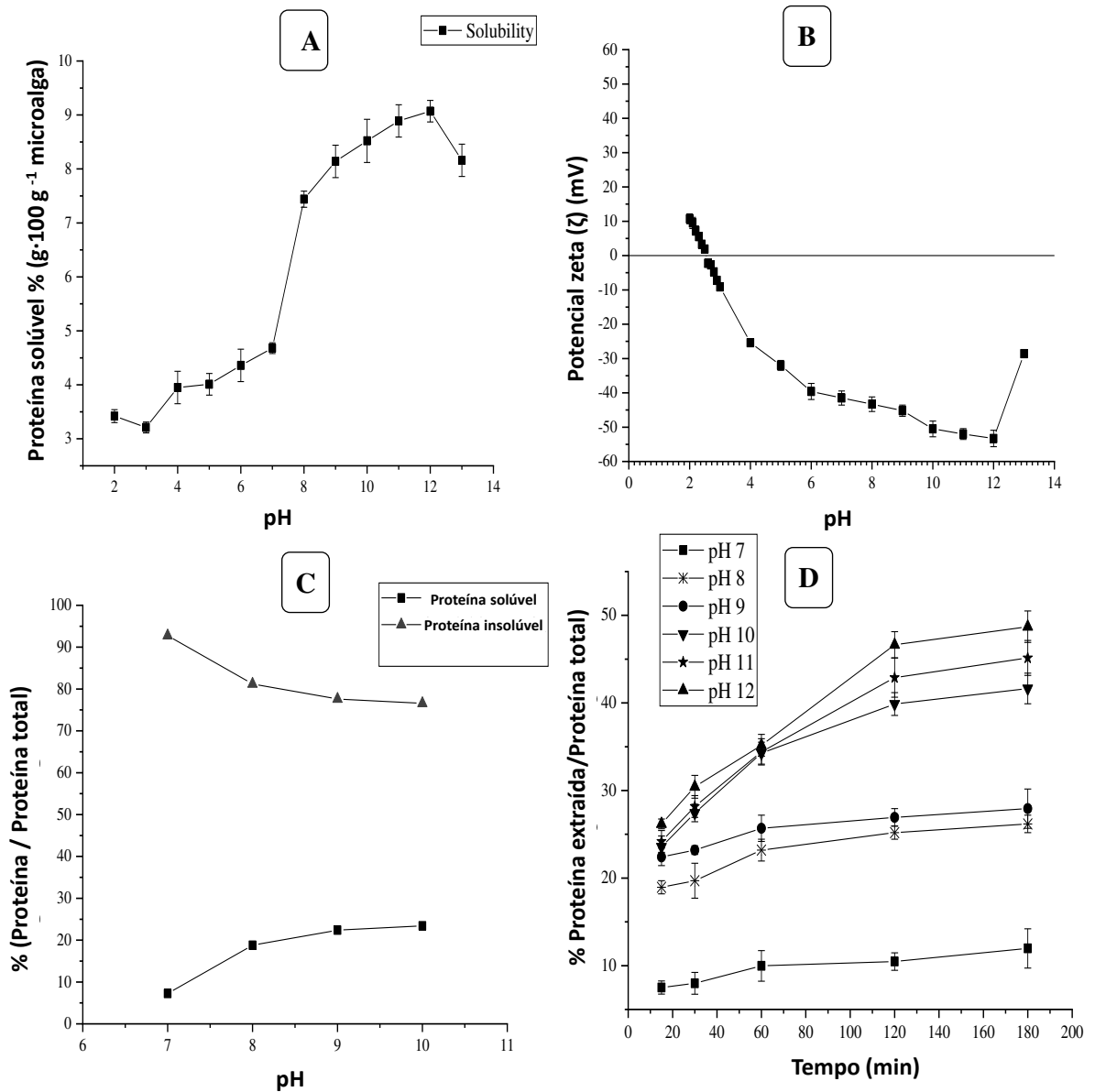
3.2 Solubilidade e otimização da extração da proteína

A influência do pH sobre a extração de proteínas solúvel em água a partir da biomassa de *S. obliquus* pode ser observada na figura 1A. A solubilidade da proteína aumenta com o aumento do pH (4 a 12), com o valor máximo do pH 12 e uma queda no pH 13. A solubilidade mínima foi verificada entre pH 2 e 3, e, por isso foi realizado uma varredura (com incremento de 0,1 no valor do pH) do ponto isoelétrico, no potencial ζ dessa faixa no pH (Fig. 1B). O ponto isoelétrico encontrado foi de 2,55 com mudança do potencial de negativo para positivo entre o 2,5 e o 2,6 (Fig. 1B). Uma diminuição do potencial também foi verificada em pH 13. Este comportamento pode estar associado a uma redução de funcionalidade das proteínas de microalgas, em que um valor de pH muito extremo pode levar a degradação, desnaturação e hidrólise de parte dessa proteína.

Os resultados da influência do pH no momento do rompimento celular para a extração de proteínas são observados na Fig. 1C. Cerca de 23 % das proteínas migram para fase aquosa quando o rompimento celular acontece em pH 10, enquanto que somente cerca de 7 % é solubilizada em água quando o rompimento acontece em pH 7.

Para otimizar a extração das proteínas, diferentes valores de pH e tempos de extração foram testados. Os resultados demonstram que quanto maior o pH (máximo 12) e o tempo de extração (máx.: 3 h), maior quantidade de proteína é extraída (Fig. 1D). Porém, verifica-se que as quantidades extraídas nos valores de pH 10, 11 e 12, são próximas. O pH 10 é adequado para extrair as proteínas em até 41 % da proteína total do conteúdo proteico da microalga com 3 h de extração, enquanto que no pH 12 o conteúdo extraído pode chegar a 49 %.

Figura 1. (A) Curva de solubilidade de proteínas de *S. obliquus* em função do pH. (B) Potencial ζ da proteína extraída de *S. obliquus* para determinação do ponto isoelétrico. (C) Influência do pH sobre a solubilidade das proteínas no rompimento celular. (D) Otimização da extração de proteínas em função do pH e tempo, após o rompimento celular.



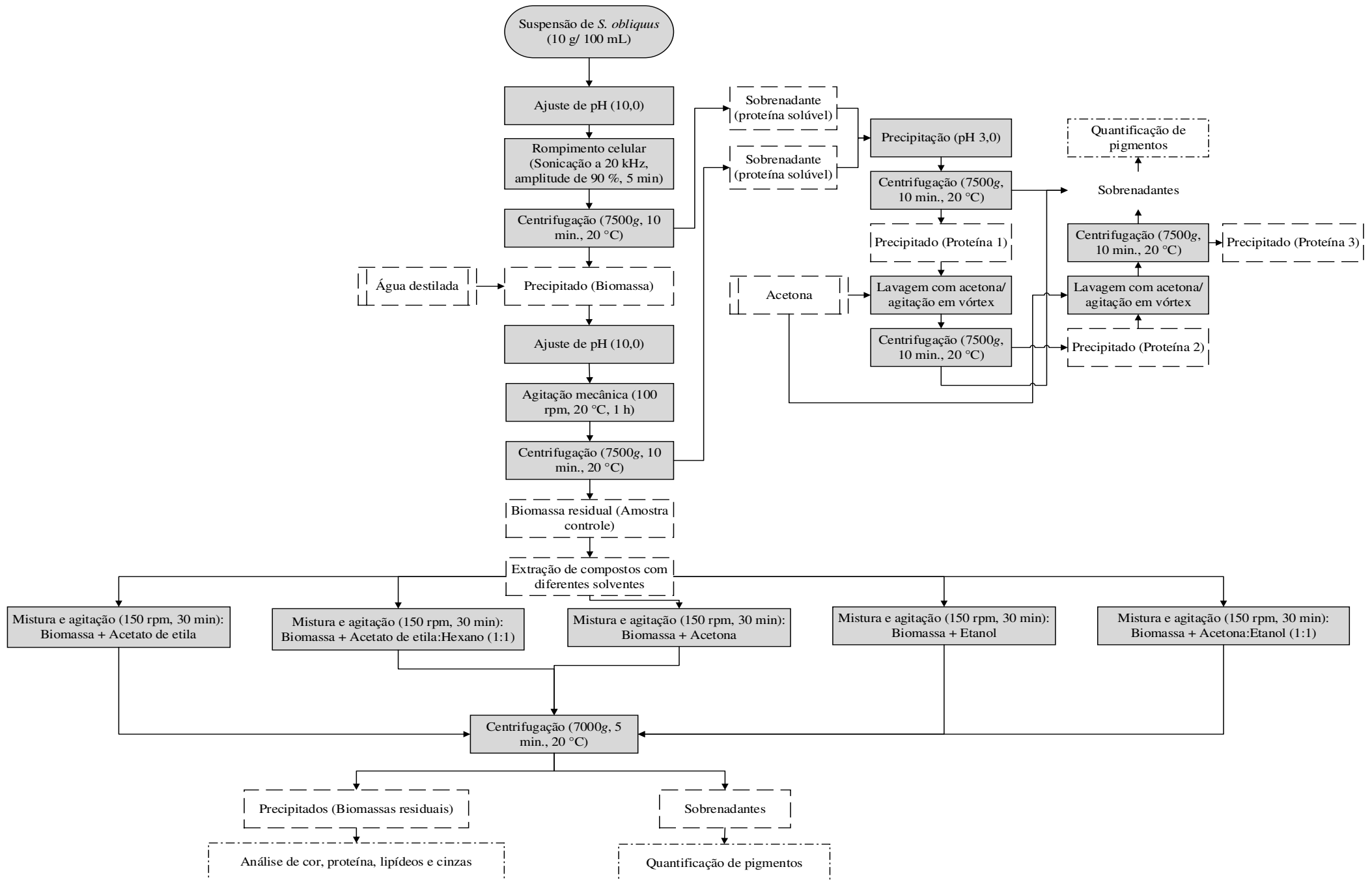
Outras formas de extração de proteínas de microalgas são relatadas na literatura. Schwenzfeier et al. (2011) obtiveram 21 % de proteína da microalga de *Tetraselmis* sp. usando a extração de proteínas pelo método de moagem de esferas. Gerde et al. (2013) extraíram cerca de 12 % de proteínas da microalga *Nannochloropsis* spp., usando pH 11 e 60 °C, e cerca de 15

% quando acrescentaram 1 min de sonicação. O tempo de extração foi de 5 h para ambos os experimentos. Wang e Zhang, (2012) obtiveram 48,7 % de proteína da microalga *C. pyrenoidosa*, utilizando alta pressão para rompimento celular e baixa temperatura na extração da proteína. Ursu et al. (2014), obtiveram 52 % de proteína da microalga *Chlorella vulgaris* combinando rompimento por alta pressão e condições alcalinas para a extração da proteína. Grossmann et al. (2018) obtiveram 4,61 % de proteínas da microalga *Chlorella protothecoides* utilizando homogeneização a alta pressão (150 MPa, 6 passagens) para rompimento de células. Zhang et al. (2018), obtiveram 72,41 % de proteínas *C. pyrenoidosa* usando uma combinação de técnicas, em que, a microalga foi embebida em metanol por 67 h, com proporção líquido/sólido de 27:1, depois foi hidrolisada por celulase por 3 h em pH 5,0, foi levada ao ultrassom (1000 W, ciclo de 26 min) e centrifugada (8000 rpm, 10 min). Apesar de um alto rendimento, essa combinação de métodos para extração pode possuir um custo elevado. A maioria dos métodos citados anteriormente exibem uma taxa de extração inferior ao valor reportado por Zhang et al. (2018), porém o tempo de extração e quantidade de operações unitárias foram menores, podendo gerar um produto de menor custo para produção.

3.3. Extração de co-produtos e precipitação de proteínas

A extração de co-produtos da biomassa microalgal é uma alternativa para valorar a cadeia produtiva do biodiesel (Chen et al., 2018). Gerde et al. (2013) verificaram que a capacidade de extração de proteínas da microalga *Nannochloropsis* spp é menor para a biomassa da microalga desengordurada quando comparada à biomassa contendo óleo. Provavelmente: (1) as proteínas foram desnaturadas pelos solventes orgânicos utilizados na extração dos lipídeos, de uma forma irreversível, não sendo facilmente solubilizadas, mesmo em valores pH altos (Gerde et al., 2013; Grossman et al., 2018); (2) algumas proteínas podem ser co-extraídas com lipídeos no momento da extração, dependendo dos solventes utilizados (Gerde et al., 2013; Yao; Gerde; Wang, 2012; Henriques; Park, 1976). Dessa forma, a extração de proteínas antes da extração de lipídeos foi avaliada no presente trabalho, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma de extração de proteínas e outros componentes de *S. obliquus* utilizando diferentes solventes.



A remoção total das proteínas de microalgas é complexa e exigiria combinações de muitas operações unitárias e alto custo aplicado, portanto, os pesquisadores e indústrias focam é na extração de outros componentes da biomassa após a extração de uma porcentagem de proteínas totais e diferentes finalidades para a biomassa residual. Dessa forma, no presente trabalho foi proposto diferentes rotas de extração de proteínas, pigmentos e lipídeos, verificando a influência de solventes na extração desses componentes (Figura 2).

A separação de pigmentos e lipídeos da biomassa microalgal deve considerar o uso de solventes que sejam eficazes na extração destes compostos e na precipitação da proteína, de forma que os pigmentos e lipídeos fiquem na fase sobrenadante e a proteína permaneça insolúvel na biomassa residual. Nessa condição, a biomassa residual poderá ser destinada para ração animal e usada para outros fins, como um ingrediente rico em proteínas. Dessa forma, alguns solventes empregados para extração de pigmentos e lipídeos foram testados (Tabela 1). Nessa proposta foram testados cinco tipos de solventes com diferentes polaridades para precipitar a proteína e verificar a capacidade de extrair pigmentos e lipídeos, a fim de produzir pós ricos em proteína. A polaridade do solvente foi expressa usando a permissividade relativa, ϵ_r . Os solventes e misturas de solventes com polaridade decrescente foram escolhidos devido à sua baixa toxicidade, uso rotineiro para extração de compostos (como pigmentos e lipídeos) e baixos pontos de ebulição, o que permite uma secagem rápida sem tratamento térmico. Os solventes utilizados foram: etanol ($\epsilon_r = 25,3$), etanol: acetona (1:1 v/v, $\epsilon_r = 23,2$), acetona ($\epsilon_r = 21,0$), acetato de etila ($\epsilon_r = 6,1$), acetato de etila: hexano 1:1 ($\epsilon_r = 4,1$) (Grossmann et al., 2018).

A precipitação da proteína por solventes em dispersões aquosas da microalga se baseia na redução da permissividade relativa dos solventes e na substituição de moléculas de caráter hidrofílico da proteína por moléculas de solvente, promovendo assim as interações proteína-proteína, e conseqüentemente a precipitação da proteína (Grossmann et al., 2018). Portanto, a precipitação por solvente pode originar pós ricos em proteínas se o solvente utilizado apresentar polaridade adequada para precipitação da mesma e solubilizar outros biocompostos da microalga. Dessa forma, solventes miscíveis em água, com baixa ou alta polaridade, podem produzir pós com teor de proteínas elevado e teor de pigmentos baixo.

Os valores L^* (varia de 0 (preto) a 100 (branco)), a^* (varia de verde a vermelho) e b^* (varia de - 100 (azul) a + 150 (amarelo)) são apropriados para descrever a

solubilização de pigmentos. Portanto, valor próximo a 100 indica maior extração de pigmentos.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da análise colorimétrica. Os menores valores de L^* , a^* e b^* foram observados para as microalgas controles e para as tratadas com solventes de menor polaridade. As biomassas tratadas com acetona, acetona:etanol (1:1) e etanol apresentaram pós finais mais claros (L^* maior), com maior teor de proteínas e valores de a^* e b^* maiores em relação a amostra integral, ao controle e aos sistemas tratados com solventes de menor polaridade. As biomassas tratadas com acetato de etila:hexano e acetato de etila, apresentaram pós mais escuros e menor teor de proteínas. Dessa forma, os solventes com polaridade intermediária foram mais eficazes em acessar os conteúdos das células hidratadas do que os solventes de baixa polaridade.

Os solventes acetona ($\epsilon_r = 21,0$), acetona:etanol e etanol exibiram maiores valores de L^* , a^* e b^* , e maior teor de proteínas, em relação aos solventes menos polares, indicando maior capacidade para a extração de pigmentos (Tabela 1). As alterações nos valores L^* , a^* e b^* se devem à solubilização dos pigmentos. Para solubilizar os pigmentos, é necessário que o solvente atenda à polaridade do composto de interesse e que seja capaz de enfraquecer as interações intermoleculares, como as de van der Waals e de hidrogênio, a fim de permear a estrutura celular e solubilizar os compostos (Grossmann et al., 2018). Solventes com polaridade intermediária, como etanol ($\epsilon_r = 25,3$), acetona:etanol, e acetona ($\epsilon_r = 21,0$) dissolvem carotenoides, lipídios polares, como aqueles associados à membrana e também ácidos graxos poli-insaturados. Esse comportamento pode explicar a redução do conteúdo de lipídeos quando esses solventes de polaridade intermediária foram usados (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de cor (L *, a *, b *), H°, teor de proteína (N ×5,89) e cinzas da biomassa residual liofilizada, após tratamento com solventes com diferentes permissividades relativas (ϵ_r), e das proteínas solúveis precipitadas no pl e lavadas com acetona.

Solvente	ϵ_r	L*	a*	b*	ΔL^*	H°	Proteína g/100 g	Cinzas	Lipídeos
Amostra integral	-	42,18 ± 0,15j	-0,36 ± 0,07c	3,61 ± 0,05i	-	84,30	40,1071 ± 0,41d	6,67 ± 0,18 b	8,64 ± 0,18 a
Controle	-	45,77 ± 0,12h	-0,38 ± 0,03c	5,45 ± 0,07g	3,59 ± 0,02h	86,05 ± 0,05	22,15 ± 0,27g	7,62 ± 0,48 a	8,39 ± 0,35 a
Acetato de etila	6.08	49,55 ± 0,13f	-0,36 ± 0,02c	10,11 ± 0,08e	7,37 ± 0,02f	87,96 ± 0,04	25,90 ± 0,87f	6,09 ± 0,47 b	6,12 ± 0,12 b
Acet:hex (1:1)	4.13	48,11 ± 0,15g	-0,65 ± 0,04d	8,48 ± 0,04f	5,93 ± 0,02g	85,61 ± 0,02	25,65 ± 0,14f	6,36 ± 0,77 b	4,86 ± 0,13 c
Acetona	21.0	61,89 ± 0,12c	-2,49 ± 0,05g	17,01 ± 0,11b	19,71 ± 0,02c	81,67 ± 0,07	30,34 ± 0,33e	6,54 ± 0,94 b	6,69 ± 0,81 b
Etanol	25.3	59,18 ± 0,17e	-1,28 ± 0,02e	15,21 ± 0,09d	17,00 ± 0,02e	85,19 ± 0,06	29,71 ± 0,41e	6,53 ± 0,86 b	6,76 ± 0,70 b
Etanol:Acetona (1:1)	23.2	60,82 ± 0,12d	-1,43 ± 0,03f	15,46 ± 0,08d	18,64 ± 0,02d	84,72 ± 0,05	29,80 ± 0,20e	6,16 ± 0,45 b	6,60 ± 0,39 b
Proteína	-	44,08 ± 0,28i	0,84 ± 0,08a	4,00 ± 0,08h	1,90 ± 0,02i	78,14 ± 0,02	58,44 ± 0,56c	2,75 ± 0,17 c	-
Proteína 1	21.0	62,52 ± 0,16 b	-0,17 ± 0,01b	16,19 ± 0,18c	20,34 ± 0,03b	89,39 ± 0,03	61,16 ± 0,89b	2,30 ± 0,12 c	-
Proteína 2	21.0	67,77 ± 0,18a	-0,41 ± 0,02c	17,55 ± 0,22a	25,59 ± 0,03a	88,66 ± 0,02	63,14 ± 0,34a	1,98 ± 0,14 c	-

O tipo de solvente e sua polaridade afetaram tanto a extração de pigmentos quanto a cor da biomassa residual. Na figura 3 é possível observar a influência dos solventes sobre a cor das biomassas residuais. As biomassas com colorações mais claras (maior L*) podem ser observadas nos tratamentos com acetona, etanol e acetona: etanol 1:1 (Figura 3E, 3F, 3G). Quanto às proteínas, verifica-se a capacidade da acetona em extrair os pigmentos da proteína, deixando-a mais concentrada e de coloração mais clara (Tabela 1) (Figura 3H, 3I, 3J).

A capacidade de extração de pigmentos pelos diferentes solventes testados pode ser verificada na Figura 3K, onde as maiores concentrações de carotenoides e clorofila a foram encontradas nos sobrenadantes das amostras tratadas com acetona, seguida do etanol:acetona e etanol (Figura 3K). Os menores valores encontrados foram para o acetato de etila:hexano, seguido do acetato de etila (Figura 3K). O acetato de etila foi capaz de extrair mais clorofila b do que a clorofila a e carotenoides. A maior concentração de pigmentos foi encontrada no sobrenadante da proteína lavada com acetona (Figura 3K).

Esses resultados para a microalga *S. obliquus* corroboram com resultados encontrados por de Maadane et al. (2015), que descreveram que a extração de clorofila a, b e carotenoides foi mais eficaz com a utilização desses solventes de polaridade intermediária; de Grossman et al. (2018), que verificaram: (a) que os solventes de polaridade intermediária foram os mais eficazes para extrair pigmentos de microalga *Chlorella protothecoides*; (b) que os valores de L* e b* foram maiores para os solventes acetona, acetona:etanol e etanol; (c) que solventes com polaridade alta (metanol, $\epsilon_r = 33,0$) e baixa polaridade (acetato de etila, $\epsilon_r = 6,1$) produziram pós com menor teor de proteínas e com menores valores de L* e b*.

A explicação para estes resultados se deve à capacidade do solvente para acessar totalmente as células da microalga e os seus resíduos celulares. Os solventes com baixa polaridade, como, acetato de etila:hexano e acetato de etila, não são capazes de acessar totalmente o conteúdo celular hidratado, não sendo eficazes na solubilização de compostos celulares (como pigmentos) em relação aos solventes mais polares (Figura 3C, 3D, 3K). Porém, são eficazes na solubilização de compostos apolares como os lipídeos (Tabela 1). Por outro lado, solventes com polaridades elevada, como o metanol, podem solubilizar proteínas e reduzir sua quantidade na biomassa final (Grossmann et al., 2018).

Observa-se também na Figura 3 que uma grande parte dos pigmentos é extraída junto com as proteínas. Os valores de cor L* e b* da proteína precipitada são próximos ao da amostra integral e da amostra controle da biomassa (Tabela 1), demonstrando que

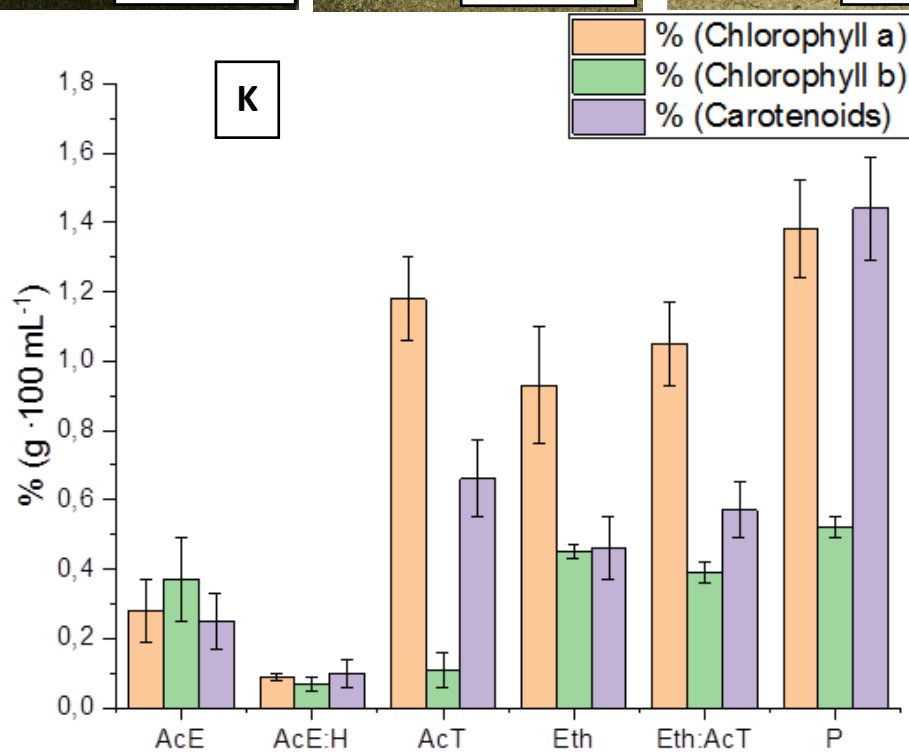
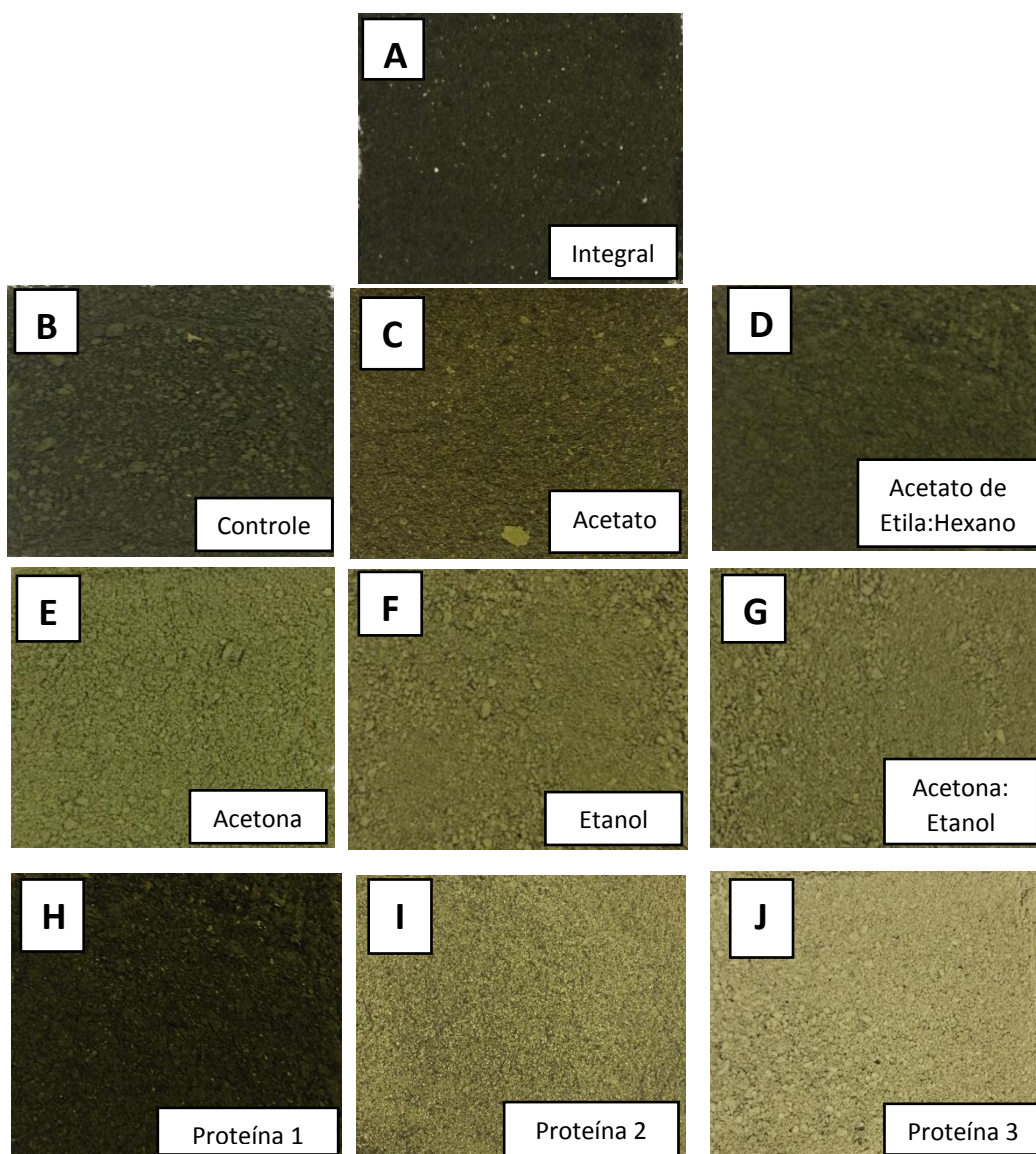
uma grande parte dos pigmentos é extraída juntamente com as proteínas (Figura 3H). Verifica-se que a maior quantidade de pigmentos extraídos está no sobrenadante das proteínas lavadas com acetona (Figura 3K).

Desse modo, a acetona, seguida do etanol:acetona e etanol, foram os solventes testados que exibiram com maior capacidade de extração de pigmentos e maior concentração de proteínas na biomassa residual. A partir desses resultados, a acetona foi escolhida como o solvente para remoção dos pigmentos da proteína precipitada. À medida que a proteína foi lavada com acetona, os pigmentos foram extraídos e os valores de L* e b* aumentaram (Tabela 1, Figuras 3H, 3I, 3J, 3K). Conseqüentemente houve o clareamento da proteína precipitada (Figura 3J). Com a retirada dos pigmentos, as cinzas foram reduzidas e a proteína foi concentrada para 63,14 % após duas lavagens com acetona (Tabela 1).

A partir dos resultados com solventes testados pode-se testar a separação de co-produtos por diferentes rotas. Se o objetivo for separar lipídeos para produzir biodiesel, a extração da proteína preliminar antes dos lipídeos deve ser considerada. Assim, a inclusão da etapa de separação da proteína antes da extração de lipídeos pode reduzir a interferência dos pigmentos sobre a separação do óleo.

Caso o objetivo seja a separação de proteínas e lipídeos, uma possibilidade é o uso do acetato de etila:hexano que extraem menor quantidade de pigmentos e maior quantidade de lipídeos, além de manter alta concentração de pigmentos na biomassa residual e pode ser destinada a produção de ração animal. Se o objetivo for maior exploração de pigmentos, o uso de acetona para extração de carotenoides e outros pigmentos pode ser interessante.

Figura 3 – Biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus* integral (A), após extração de proteína (B), após tratamentos com diferentes solventes (C: Acetato de etila; D: Acetato de etila:Hexano 1:1; E: Acetona; F: Etanol; G: Acetona:Etanol), proteína precipitada – proteína 1 (H) e após a lavagem com acetona (I: proteína 2 - após 1 lavagem com acetona; J: proteína 3 - Após duas lavagens com acetona), K: Quantificação de pigmentos nos sobrenadantes dos tratamentos com solventes (AcE: sobrenadante do C; AcE:H: sobrenadante do D; AcT: sobrenadante do E; Eth: sobrenadante do F; Eth:AcT: sobrenadante do G; P: sobrenadantes do I+J).



Lamminem et al. (2019), estudaram a adequação das microalgas *Spirulina* e *Chlorella* spp. para a nutrição de vacas leiteiras em lactação e observaram que a inclusão das microalgas na dieta resultou em rendimentos de leite e produção de leite com energia corrigida semelhante ao farelo de soja. A *Spirulina* apresentou maiores rendimentos. Esses autores ressaltaram que as proteínas de microalgas são tão apropriadas quanto a proteína do farelo de soja na nutrição de vacas leiteiras em lactação. Silva et al. (2020) analisaram a microalga *Scenedesmus obliquus* não rompida em ratos Wistar e verificaram que a proteína da microalga *S. obliquus* associada a outra proteína, promoveu crescimento e ganho de peso do animal semelhantes a caseína, com boa digestibilidade. Portanto, o emprego da biomassa residual de *S. obliquus* para a utilização em ração animal deve ser avaliado.

Posto que as células de microalgas com parede celular com alto conteúdo de celulose apresentam valores mais baixos de digestibilidade (Silva et al., 2019; Soto-Sierra et al., 2018; Sierra et al., 2017; Janczyk et al., 2007), as proteínas aprisionadas dentro das organelas celulares e da célula podem não exibir todo o seu potencial funcional. O acesso de enzimas (pertencentes ao trato digestivo) às proteínas intracelulares da microalga poderia ser facilitado pelo o rompimento da parede celular e isto poderia melhorar a digestibilidade da proteína algal (Sierra et al., 2017; Janczyk et al., 2007). Dessa forma, a biomassa residual, rica em proteínas insolúveis e em outros compostos pode ser uma alternativa para a utilização na ração animal com aumento da digestibilidade das mesmas, visto que as células já foram rompidas e o acesso das enzimas aos compostos celulares está facilitado.

3.4 Perfil ácido graxo do óleo da microalga *Scenedesmus obliquus* antes e após a extração da proteína

Após obter o óleo da biomassa desproteinizada, o perfil graxo desse óleo foi determinado. A Tabela 2 apresenta os valores totais de ácidos graxos saturados, insaturados e poli-insaturados. O aumento do conteúdo de ácidos graxos saturados de 30,18 para 34,10 % para o óleo antes e após a extração de proteína pode estar relacionado ao aumento do teor de C12 (1,54 para 6,05), de C18 (3,09 para 5,91) e da quantificação de C14 no óleo após a extração de proteína. Apesar disso, a composição do perfil lipídico do óleo após a extração da proteína, está dentro dos valores encontrados para diferentes perfis de óleos extraídos de microalga para transformação em biodiesel (Deshmukh et

al., 2019; Talebi et al., 2013). Dessa forma, a extração da proteína antes da extração lipídica não influenciou de forma negativa no perfil graxo do óleo visando a produção de biodiesel, podendo assim, ser incluída antes da etapa de extração de lipídeos.

Tabela 2 - Perfil ácido graxo do óleo da microalga *Scenedemus obliquus* antes e após a extração da proteína

Ácido graxo	Microalga controle	Microalga após retirada da proteína
C6:0	0,00	0,60
C8:0	0,00	0,00
C10:0	0,00	0,00
C12:0	1,54	6,05
C13:0	0,54	0,66
C14:0	0,00	2,49
C14:1	0,00	0,00
C15:0	0,00	0,59
C15:1	0,00	0,00
C16:0	23,73	16,44
C16:1	4,80	2,29
C17:0	0,00	0,00
C17:1	0,00	0,67
C18:0	3,09	5,91
C18:1n9t	1,62	0,00
C18:1n9c	13,80	12,47
C18:2n6t	7,05	1,53
C18:2n6c	8,63	11,75
C20:0	0,73	1,36
C20:1n9	0,00	0,00
C18:3n6	26,16	32,83
C18:3n3	2,49	0,74
C21:0	0,56	0,00
Saturados	30,18	34,10

Insaturados	64,55	62,27
Poli-insaturados	44,33	46,84

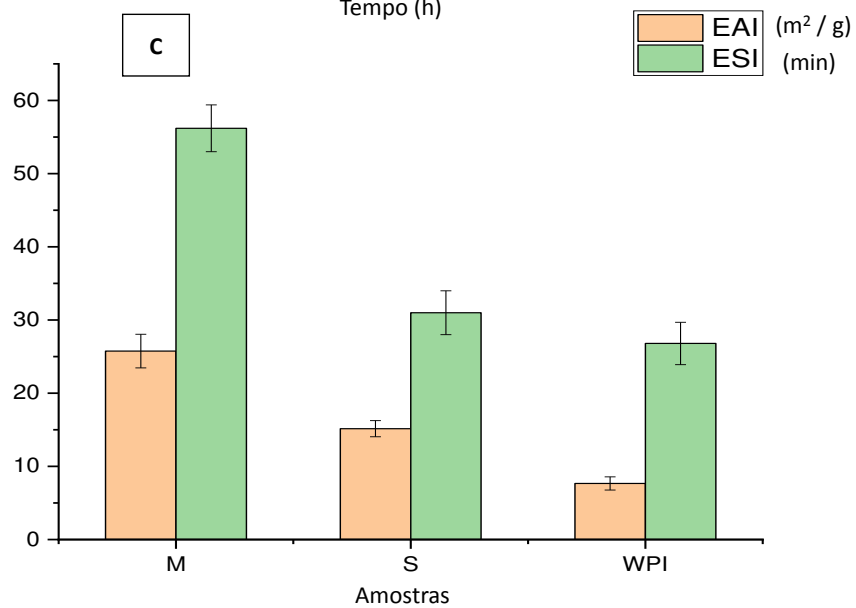
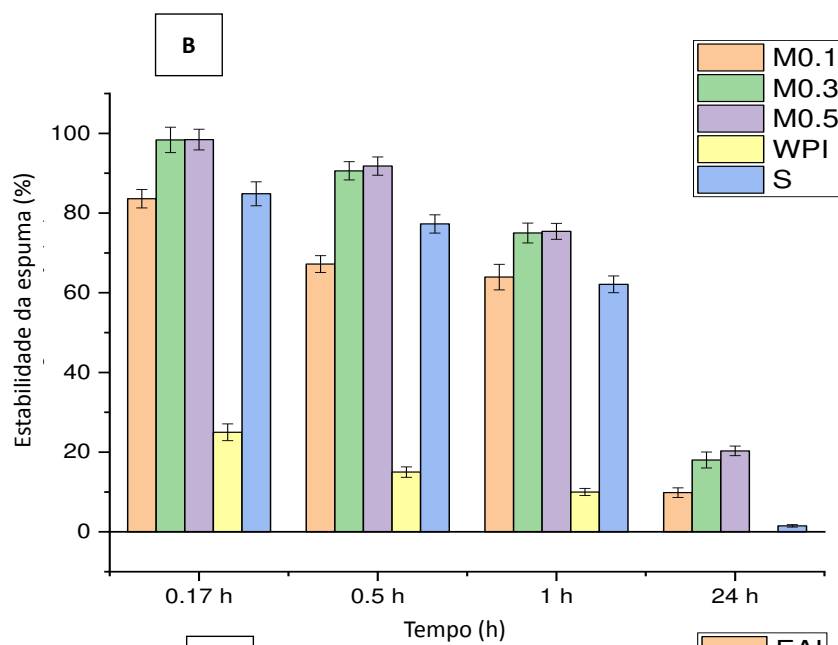
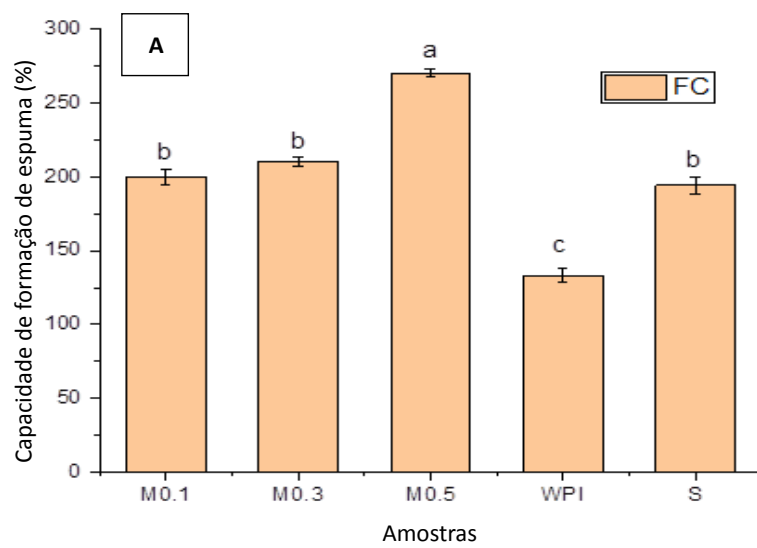
Reis et al. (2015), estudando a influência do tipo de ácido graxo para produção de biodiesel, verificaram que a presença de ácido graxo de cadeia menor (C12, ácido láurico) acelera e aumenta a conversão do ácido graxo em éster metílico. Deshmukh et al. (2019), em uma revisão sobre biodiesel de microalgas, analisando sobre as propriedades do óleo, composição de ácidos graxos, e efeito no desempenho do motor e emissões, concluíram que as propriedades do biodiesel microalgal foram semelhantes às do biodiesel de culturas de plantas convencionais. Além disso, relatam que no geral, as microalgas podem ser vistas como uma fonte potencial de biodiesel em um futuro próximo.

3.5. Propriedades técnico-funcionais das proteínas

3.5.1. Capacidade e estabilidade de formação de espuma

A capacidade de formação de espuma (FC), medida como o aumento percentual no volume após a mistura da suspensão proteica, e a estabilidade da espuma (FS), determinada como a porcentagem do volume restante de espuma registrado após 0,17; 0,5; 1 e 24 h, foram analisadas a partir do concentrado proteico da microalga *S. obliquus* e foram comparadas a FC e FS de sistemas contendo as proteínas de soja e do soro de leite (WPI). A Figura 4 aponta que a capacidade de formação de espuma das proteínas de microalga é elevada e maior do que a encontrada para soja (S) e soro de leite (WPI) na mesma concentração da dispersão (0,5 %). A capacidade de formação de espuma das dispersões de 0,1 e 0,3 % de proteína de *S. obliquus* foi semelhante à da dispersão de 0,5 % de proteína de soja. A proteína de soro de leite apresentou capacidade de formação menor do que as encontradas para a proteína de microalga e soja. Ressalta-se que 0,5 % de dispersão da microalga contém 63 % de proteínas, a de soja e WPI contém aproximadamente 85 % de proteínas, refletindo a alta qualidade das proteínas dessa espécie de microalga.

Figura 4 – Capacidade de formação de espuma (FC) (A) e estabilidade da espuma (B); Capacidade de formação (EAI) e estabilidade da emulsão (ESI) (C).



Quanto à estabilidade da espuma, as dispersões 0,3 e 0,5 % da microalga apresentaram estabilidade acima de 90 % no tempo de 30 min (Figura 6B), enquanto que a proteína de soja apresentou cerca de 70 % e a proteína do soro de leite apresentou cerca de 15 % de estabilidade. Ao final do tempo de 24 h, a WPI não apresentava mais espuma, a soja apresentava cerca de 1 %, enquanto que todas as dispersões da microalga (0,1, 0,3 e 0,5 %) apresentavam, respectivamente, cerca de 10, 20 e 22 % de estabilidade da espuma.

As espumas podem ser definidas como bolhas de ar aprisionadas em um líquido e estabilizadas por proteínas na interface ar-líquido. A formação de espuma, como outras propriedades funcionais, depende de vários fatores, como a estrutura da proteína. Como a formação de espuma implica desdobramento de proteínas para garantir melhor adsorção na interface ar-água, proteínas globulares e compactas são geralmente menos eficazes na formação de espuma do que suas contrapartes mais fibrosas e flexíveis. Por outro lado, a formação rápida de bolhas de ar nem sempre implica estabilidade da espuma, o que é de grande importância na formulação de alimentos (Kinsella, 1981; López et al., 2019). Mediante isto, as proteínas de microalgas apresentam-se como boas formadoras de espuma, criando espumas mais fortemente associadas e mais resistentes à deformação, sendo grandes potenciais para aplicação em formulações de alimentos.

3.4.2. Capacidade e estabilidade da emulsão

A Figura 4C apresenta os valores de EAI para as dispersões proteicas na concentração de 0,5 %. Verifica-se que a capacidade de formação de emulsão da proteína da microalga é superior à da soja e soro de leite. O mesmo comportamento se repete para ESI. Observa-se também que as proteínas da microalga possuem boa capacidade emulsionante

Suarez Garcia et al. (2018) também verificaram uma atividade para formação de espuma e emulsificação da proteína de uma microalga verde, *Tetraselmis suecica*, superior à do isolado de proteína de soro de leite (WPI). A explicação do superior desempenho pode estar associado à presença de carboidratos e glicoproteínas carregadas, visto que se trata de um concentrado proteico de microalga (Suarez Garcia 2018; Schwenzfeier et al., 2013).

As proteínas de algas verdes como, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana* apresentaram atividades prebiótica em *Lactobacillus rhamnosus* e atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida* e *Staphylococcus aureus*. As proteínas de *Scenedesmus obliquus* apresentaram atividade antioxidante e antiviral contra o vírus Coxsackie B3 (Afify et al., 2018). O preço das proteínas de algas usadas na alimentação animal é inferior a US \$ 50 USD / Kg, enquanto as proteínas antioxidantes e anti-inflamatórias são superiores a US \$ 80 USD / Kg (Lai et al., 2019), desse modo, essas funcionalidades e atividades dessas proteínas podem impactar a alta produção das mesmas agregando valor a cadeia de produção de microalgas e co-produtos originados desta, como lipídeos para a conversão de biodiesel, por exemplo.

4 CONCLUSÃO

O uso de solventes com polaridade baixa é menos eficiente para a extração de pigmentos. Assim, esse tipo de solvente adequa-se à extração do óleo microalgal. A inclusão da etapa de separação de proteínas antes da extração de lipídeos é uma alternativa para a produção de óleo com menor teor de pigmentos e interferentes, visto que a maior parte dos pigmentos é separada junto com as proteínas solúveis. O perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Scenedesmus obliquus*, desproteïnizada, foi pouco alterado em relação ao óleo extraído da microalga proteïnizada. O uso da rota proposta gerou um concentrado de proteína solúvel da microalga *Scenedesmus obliquus*, livre de cor intensa, e com alta capacidade e estabilidade de formação de espuma e emulsão.

As proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* podem ser úteis como ingredientes em formulações alimentares pela semelhança nos valores de estabilidade da emulsão em comparação com proteína isolada do soro de leite e pela maior capacidade e estabilidade da espuma comparada com a proteína de soja. Assim, a cadeia produtiva do biodiesel pode ser valorada com a separação dessas proteínas, porém, testes em escala piloto e a análise de viabilidade econômica devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

Afify, A.E.M.M.R., El Baroty, G.S., El Baz, F.K., Abd El Baky, H.H., Murad, S.A., 2018. Scenedesmus obliquus: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. J. Genet. Eng. Biotechnol. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.002>

AOAC, 2005. AOAC Official Methods of Analysis. Assoc. Off. Agric. Chem. Washington, D.C. 18th.

Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein 25, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>

Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. Can. J. Biochem. Physiol. 37.

Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>

Brothers, R., 2002. Microelectrophoresis Apparatus Mk II. 56 High Street, Bottisham, Cambridge CB25 9DA, Engl. 44, 1–36.

Castro-Puyana, M., Herrero, M., Urreta, I., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Suárez-Alvarez, S., 2013. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Nannochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 405, 4607–4616. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6687-y>

Chan, M., Ho, S., Lee, D., Chen, C., Huang, C., Chang, J., 2013. Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Biochem. Eng. J. 78, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.11.017>

Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresour. Technol. 102, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>

Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R.D., Drogui, P., Surampalli, R.Y., 2018. The potential of microalgae in biodiesel production. Renew. Sustain. Energy Rev. 90, 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.073>

Cheng, P., Cheng, J.J., Cobb, K., Zhou, C., Zhou, N., Addy, M., Chen, P., Yan, X., Ruan, R., 2020. *Tribonema* sp. and *Chlorella zofingiensis* co-culture to treat swine wastewater diluted with fishery wastewater to facilitate harvest. Bioresour. Technol. 297, 122516. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122516>

Deshmukh, S., Kumar, R., Bala, K., 2019. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. Fuel Process. Technol. 191, 232–247. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.03.013>

Gerde, J.A., Wang, T., Yao, L., Jung, S., Johnson, L.A., Lamsal, B., 2013. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. ALGAL 2, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.02.001>

Gong, Y., Jiang, M., 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: From strains to biodiesel. Biotechnol. Lett. 33, 1269–1284. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0574-z>

- Grossmann, L., Ebert, S., Hinrichs, J., Weiss, J., 2018. Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*. *Algal Res.* 29, 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.019>
- Gupta, S. Sen, Shastri, Y., Bhartiya, S., 2016. Impact of protein co-production on techno-economic feasibility of microalgal biodiesel. *Comput. Aided Chem. Eng.* 38, 1803–1808. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63428-3.50305-2>
- Henriques, F., Park, R.B., 1976. Compositional characteristics of a chloroform/methanol soluble protein fraction from spinach chloroplast membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 430, 312–320. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(76\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(76)90087-6)
- Ho, S.H., Kondo, A., Hasunuma, T., Chang, J.S., 2013. Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* 143, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.043>
- Ichihara, K., Fukubayashi, Y., 2010. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 51, 635–640. <https://doi.org/10.1194/jlr.d001065>
- Janczyk, P., Franke, H., Souffrant, W.B., 2007. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.007>
- Khetkorn, W., Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Madamwar, D., Pandey, A., Larroche, C., 2017. Microalgal hydrogen production – A review. *Bioresour. Technol.* 243, 1194–1206. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.07.085>
- Kinsella, J.E., 1981. Functional properties of proteins: Possible relationships between structure and function in foams. *Food Chem.* 7, 273–288. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(81\)90033-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(81)90033-9)
- Kumar, M., Sundaram, S., Gnansounou, E., Larroche, C., Thakur, I.S., 2018. Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review. *Bioresour. Technol.* 247, 1059–1068. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.09.050>
- Lai, Y.-C., Chang, C.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., Ng, I.-S., 2019. Towards protein production and application by using *Chlorella* species as circular economy. *Bioresour. Technol.* 289, 121625. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121625>
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Jaakkola, S., Vanhatalo, A., 2019. Different microalgae species as a substitutive protein feed for soya bean meal in grass silage based dairy cow diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 247, 112–126. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2018.11.005>
- Liang, M.-H., Wang, L., Wang, Q., Zhu, J., Jiang, J.-G., 2018. High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8398, 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>

- López, D.N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., Boeris, V., 2019. Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food Res. Int.* 116, 419–429. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.08.056>
- Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., Bakri, Y., Wahby, I., 2015. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *J. Biotechnol.* 215, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>
- Mohanty, B., Mulvihill, D.M., Fox, P.F., 1988. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. *Food Chem.* 28, 17–30. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(88\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(88)90003-9)
- Pearce, K.N., Kinsella, J.E., 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J. Agric. Food Chem.* 26, 716–723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>
- Příbyl, P., Cepák, V., Kaštánek, P., Zachleder, V., 2015. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp. *Algal Res.* 11, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.020>
- Rasala, B.A., Mayfield, S.P., 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; Production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynth. Res.* 123, 227–239. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9994-7>
- Reis, M.C., Freitas, F.A., Lachter, E.R., Gil, R.A.S.S., Nascimento, R.S.V., Poubel, R.L., Borré, L.B., 2015. Produção de biodiesel a partir de ácidos graxos provenientes do refino de óleos vegetais via catálise ácida heterogenea e micro-ondas. *Quim. Nova* 38, 1307–1312. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150163>
- Ruiz, J., Olivieri, G., De Vree, J., Bosma, R., Willems, P., Reith, J.H., Eppink, M.H.M., Kleinegris, D.M.M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2016. Towards industrial products from microalgae. *Energy Environ. Sci.* 9, 3036–3043. <https://doi.org/10.1039/c6ee01493c>
- Schwenzfeier, A., Helbig, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., 2013. Food Hydrocolloids Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis* sp. *Food Hydrocoll.* 30, 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.002>
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresour. Technol.* 102, 9121–9127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046>
- Sharma, P., Gaur, V.K., Kim, S.-H., Pandey, A., 2020. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources. *Bioresour. Technol.* 299, 122580. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122580>
- Sierra, L.S., Dixon, C.K., Wilken, L.R., 2017. Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal Res.* 25, 149–159. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.04.004>

Silva, M.E.T. da, Correa, K. de P., Martins, M.A., da Matta, S.L.P., Martino, H.S.D., Coimbra, J.S. dos R., 2020. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. *J. Funct. Foods* 65, 103711. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.103711>

Soares, J., Krieger Loterio, R., Rosa, R.M., Santos, M.O., Nascimento, A.G., Santos, N.T., Williams, T.C.R., Nunes-Nesi, A., Arêdes Martins, M., 2018. *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. *Ann. Microbiol.* 68, 35–45. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1315-x>

Soto-Sierra, L., Stoykova, P., Nikolov, Z.L., 2018. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Res.* 36, 175–192. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>

Suarez Garcia, E., van Leeuwen, J., Safi, C., Sijtsma, L., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., van den Berg, C., 2018. Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications. *Bioresour. Technol.* 268, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.131>

Suarez Ruiz, C.A., Emmery, D.P., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., van den Berg, C., 2018. Selective and mild fractionation of microalgal proteins and pigments using aqueous two-phase systems. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93, 2774–2783. <https://doi.org/10.1002/jctb.5711>

Talebi, A.F., Mohtashami, S.K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Hadavand Mirzaei, H., Mirzajanzadeh, M., Malekzadeh Shafaroudi, S., Bakhtiari, S., 2013. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Res.* 2, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.04.003>

Ursu, A.V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., Michaud, P., 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 157, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071>

Waghmare, A.G., Salve, M.K., Leblanc, J.G., Arya, S.S., 2016. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresour. Bioprocess.* <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>

Wang, L., Addy, M., Lu, Q., Cobb, K., Chen, P., Chen, X., Liu, Y., Wang, H., Ruan, R., 2019. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in sludge extracts: Nutrient removal and algal utilization. *Bioresour. Technol.* 280, 505–510. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.02.017>

Wang, X., Zhang, X., 2012. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. *Bioresour. Technol.* 126, 307–313. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.09.059>

Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b , as well as Total Carotenoids , Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution *. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 4, 287–295.
<https://doi.org/10.1002/bbb>

Wu, W., Chang, J.-S., 2019. Integrated algal biorefineries from process systems engineering aspects: A review. *Bioresour. Technol.* 291, 121939.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121939>

Yao, L., Gerde, J.A., Wang, T., 2012. Oil extraction from microalga *Nannochloropsis* sp. with isopropyl alcohol. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 89, 2279–2287.
<https://doi.org/10.1007/s11746-012-2124-9>

Zhang, R., Chen, J., Zhang, X., 2018. Extraction of intracellular protein from *Chlorella pyrenoidosa* using a combination of ethanol soaking, enzyme digest, ultrasonication and homogenization techniques. *Bioresour. Technol.* 247, 267–272.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.087>

CAPÍTULO 4

Propriedades emulsificantes do concentrado proteico extraído da microalga *Scenedesmus obliquus* visando a aplicação em sistemas alimentares

Manuscript formatted according to Innovative Food Science and Emerging Technologies

Propriedades emulsificantes do concentrado proteico extraído da microalga *Scenedesmus obliquus* visando a aplicação em sistemas alimentares

Resumo: As indústrias, em geral, buscam por diversos compostos bioativos e com propriedades técnico funcionais que possuam altas atividades utilizando baixas concentrações. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade e estabilidade de formação de emulsão das proteínas extraídas da microalga *S. obliquus*, bem como a resistência destas emulsões a variação de pH e alta salinidade, afim de simular o que ocorre no processamento de alimentos emulsionados. Para isso, foram preparadas dispersões de concentrado de proteína extraído da microalga *S. obliquus* nas concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5 % em diferentes pHs. Análises de diâmetro hidrodinâmico, de desestabilização macroscópica, índice de cremeação e de polidispersidade revelaram que uma concentração de 0,5 % do concentrado proteico era suficiente para produzir uma emulsão estável ao longo de 30 dias em pH mais distantes do ponto isoelétrico (2,5). Emulsões preparadas com as proteínas da microalga foram capazes de resistir a mudança de pH (5,0 – 9,0), sendo desestabilizadas somente próximo ao seu ponto isoelétrico (2-4) em 8 dias de armazenamento. As emulsões 0,5 % formadas a partir da microalga apresentaram resistência a mudança de pH, e resistiram a altas concentrações de NaCl (≤ 500 mM), enquanto as proteínas de soja e soro de leite desestabilizaram em pH 4 a 6 e em concentrações acima de 100 mM de NaCl. Portanto, as proteínas da microalga *S. obliquus* possuem boa capacidade para formar emulsões estáveis, resistentes a variação de pH e à presença de sais, sendo uma alternativa de agente emulsificante para uso na indústria de alimentos e aplicação em sistemas alimentares, mesmo em baixas concentrações.

Palavras – chave: emulsão; ponto isoelétrico; estabilidade; índice de polidispersidade; diâmetro hidrodinâmico.

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios e interesse de pesquisa em alimentos é a busca por novas fontes alimentares e compostos com valor nutricional e produção sustentável. Além disso, as indústrias em geral buscam por diversos compostos bioativos, com propriedades técnico funcionais que possuem altas atividades utilizando baixas concentrações (Silva et al., 2020; Grossmann, Ebert, Hinrichs, & Weiss, 2019; Ebert, Grossmann, Hinrichs, &

Weiss, 2019). As microalgas têm sido bastante pesquisadas como uma fonte de compostos que podem ser usados nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosméticos, fertilizantes, ração animal, e na produção de biocombustíveis (Chen et al., 2018; Kothari et al., 2017). Estes microrganismos têm sido considerados como fonte alternativa e sustentável de proteína, pois possuem facilidade em produzir alta quantidade de compostos em um curto tempo. Isso se dá pela sua alta eficiência de converter energia solar em biomassa, demonstrando altas taxas de crescimento (Chen et al., 2018; Waghmare, Salve, Leblanc, & Arya, 2016). Além disso, novas espécies de microalgas podem contribuir para aumentar a oferta de coprodutos de biomassa com alto valor agregado, como proteínas, carboidratos e pigmentos (Chen et al., 2018; Kothari et al., 2017).

Segundo Vaz et al. (2016), microalgas são fontes de ingredientes bioativos com grande potencial para ser aplicado em suplementos alimentares funcionais. Este potencial de uso para nutrição humana e aplicações, é devido às funções biológicas das microalgas. Alguns efeitos benéficos para saúde, já foram identificados *in vivo*, como efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiante (Silva et al., 2020; Bigagli et al., 2017; Serban et al., 2016). Assim, a utilização de microalgas como alimentos funcionais promove perspectivas futuras com potencial para o desenvolvimento sustentável (Vaz et al., 2016; Bigagli et al., 2017; Raposo & De Moraes, 2015). As microalgas, em geral, possuem um grande potencial para produção de diversos bioprodutos de alto valor, apenas modificando algum parâmetro no seu cultivo e gerando algum tipo de estresse, o que resulta na produção do composto de interesse (Liang, Wang, Wang, Zhu, & Jiang, 2018). Nos estudos de proteínas de microalgas têm sido observado a alta qualidade destas, com boas propriedades tecno-funcionais, bioativas, nutricionais, e que são, em alguns casos, superiores aos concentrados proteicos convencionais, como soja e soro de leite (Grossmann et al., 2019; Afify, El Baroty, El Baz, Abd El Baky, & Murad, 2018; Schwenzfeier, Helbig, Wierenga, & Gruppen, 2013).

A microalga *Scenedesmus obliquus* apresenta alta taxa de crescimento e alta tolerância a variações climáticas, além de apresentar facilidade de serem cultivadas, sendo assim, promissoras para a produção sustentável em larga escala de vários biocompostos (Chan et al., 2013; Afify et al., 2018). Silva et al. (2020) analisaram a toxicidade dessa espécie de microalga em ratos Wistar e não foi observada alteração nos órgãos analisados (fígado, baço e rim), sugerindo o uso dessa microalga como alimento potencialmente seguro, mesmo utilizando ingestão de altas concentrações (23,2 %). Além

disso, o consumo dessa microalga reduziu o teor de triglicérides (70 %), índice aterogênico (80 %) e concentração sérica de glicose (42 %), em ratos Wistar, mesmo em uma dieta balanceada (Silva et al., 2020). Esta espécie possui de 30 a 56 % de proteínas (Afify et al., 2018; Becker, 2007), dependendo do cultivo, e é fonte de aminoácidos essenciais (Thr, Val, Met, Ile, Leu, His) e não essenciais (Arg, Ala, Pro, Asp) (Afify et al., 2018). Além disso, as proteínas dessa microalga apresentaram atividades (i) *in vitro* como atividades antioxidantes e antivirais com efeito inibitório contra o vírus Coxsackie B3 (Afify et al., 2018), e (ii) *in vivo*, como alta digestibilidade, e alta eficiência para o desenvolvimento e crescimento de órgãos e tecidos animais em ratos Wistar, apresentando-se como um potencial candidato a ser utilizado na alimentação humana em diferentes estágios de crescimento (Silva et al., 2020).

Em geral, as microalgas são promissoras na produção de diversos compostos para diversas indústrias incluindo a indústria de alimentos. Proteínas de diferentes espécies de microalgas, como *Spirulina platensis*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella prototecoides*, *Phaeodactylum tricornutum* entre outras, foram testadas quanto a formação de emulsão e apresentaram atividades superiores as proteínas alimentares comuns, como soja e soro de leite (Grossmann et al., 2019; Ebert et al., 2019; Lupatini Menegotto et al., 2019). Existem alguns dados na literatura sobre a microalga *S. obliquus* e suas proteínas (como relatado anteriormente), porém não existem dados sobre as propriedades emulsificantes destas. Mediante isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação e estabilidade da emulsão das proteínas extraídas da microalga *S. obliquus*, bem como a resistência destas emulsões a variação de pH e alta concentração de sal, afim de simular o que ocorre no processamento de alimentos emulsionados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A microalga *Scenedesmus obliquus* foi cultivada no laboratório de Biocombustíveis no Departamento de Engenharia Agrícola (DEA), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. A microalga foi cultivada em um tanque (4.000 L de capacidade de cultivo, densidade de 0,5 g·L⁻¹), com incidência solar e em modo semi-descontínuo, em meio rico em cloreto de potássio (173,9 mg·L⁻¹) e uréia (180 mg·L⁻¹). A curva de crescimento da microalga foi determinada por densidade ótica usando a absorbância (espectrofotômetro Thermo Scientific, Multiskan GO, Alemanha) a 620 nm. As células foram lavadas com água destilada e concentradas para teor de sólidos entre

13 a 15 % (m/m) utilizando centrífuga (3400.g, 5 min.). A seguir, a biomassa foi congelada, seca em liofilizador e armazenada sob refrigeração em recipientes esterilizados. Após, a biomassa da microalga *Scenedemus obliquus* foi caracterizada quanto a sua composição centesimal, com quantificação de umidade (AOAC 925,09, 2005), proteína (AOAC 920,87, 2005), lipídeos (AOAC 920,85, 2005), cinzas (AOAC 923,03, 2005), e carboidratos por diferença [Carboidratos % = 100 – (Proteína + umidade + lipídeos + cinzas)] (AOAC, 2005).

2.1 Obtenção de proteínas da microalga *Scenedemus obliquus*

Os extratos proteicos de *S. obliquus* foram obtidos após rompimentos das células e extração em pH 10,0. As células da microalga foram rompidas em um ultrassom de ponta (Sonics, VCX 750, EUA), utilizando suspensão com 10 % de sólidos, frequência de 20 kHz, amplitude de 90 %, por 5 min e sob banho de gelo para evitar o superaquecimento do sistema. Após, a suspensão das células foi centrifugada a 7000 g, 10 min, 25 °C para separar proteína solúvel e fração insolúvel. Afim de obter maior rendimento de proteína, a biomassa residual (pellet) foi ressuspensa em água deionizada, o pH foi ajustado para 10, e deixada em agitação por 1 h, e novamente centrifugada. Os sobrenadantes com proteínas solúveis foram unidos e o pH foi ajustado para 2,5 (ponto isoelétrico) para precipitação das mesmas. Em seguida, foi feito duas lavagens com acetona para extração de pigmentos e concentração de proteínas. Após foi feito mais duas lavagens com água em pH 2,5. As proteínas precipitadas foram centrifugadas, congeladas e liofilizadas. Após a liofilização, as proteínas foram maceradas em almofariz e pistilo, afim de obter um material uniforme e homogêneo. As proteínas foram caracterizadas quanto a sua composição centesimal, com quantificação de umidade (AOAC 925,09, 2005), cinzas (AOAC 923,03, 2005), lipídeos (AOAC 920,85, 2005), proteína (AOAC 920,87, 2005) e carboidratos por diferença [Carboidratos % = 100 – (Proteína + umidade + lipídeos + cinzas)] (AOAC, 2005).

2.2 Influência da concentração da proteína e do pH sobre a formação da emulsão

Foram preparadas dispersões de proteína da microalga nas concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5 % (m/m) de concentrado proteico em água e deixadas durante a noite em

agitação. Os valores do pH das dispersões foram ajustados para 2,5, 5,0, 7,0 e 10,0 antes da formação da emulsão, e foi adicionado 5 % de óleo de girassol em massa, padronizado para todas as emulsões. Os valores diferentes de pH foram testados de modo a verificar qual melhor condição de formação de emulsão, bem como em qual condição essa emulsão não era formada ou facilmente desestabilizada. Para estabelecer uma concentração ótima de proteína para produzir emulsões estáveis, as proteínas foram ressuspensas em água destilada para obter as concentrações finais de concentrado proteico (não de proteína total) na emulsão de 0,1 a 0,5 % em massa. As emulsões foram preparadas em duas etapas. As emulsões primárias foram preparadas utilizando ultrassom de ponta (Sonics, VCX 750, EUA), 20 kHz, amplitude de 60 %, por 2 min (sob banho de gelo) para ocorrer mistura e homogeneização da suspensão proteica com óleo. Antes da segunda etapa da formação da emulsão, os sistemas foram resfriados em banho de gelo, afim de evitar desnaturação das proteínas. As emulsões primárias foram então submetidas a sonicação com ultrassom de ponta (Sonics, VCX 750, EUA), 20 kHz, utilizando amplitude de 85 %, por 4 min (sob banho de gelo). Afim de comparar a capacidade de formação e estabilidade da emulsão por proteínas da microalga com outras proteínas referência, foram preparadas emulsões a partir de isolados de proteínas comerciais de soro de leite (WPI) (Growth Supplements, 87 % g de proteína/100 produto) e Soja (SPI) (Growth Supplements, 86 % g de proteína/100 produto) na concentração de 0,5 % (dispersão e não de proteína total) e pH 7,0 nas mesmas condições de formação de emulsão aplicadas às proteínas da microalga *S. obliquus*. Foi adicionado azida de sódio (0,02 %) em todas as emulsões formadas para inibir qualquer crescimento microbiano. Todas as emulsões foram coradas com vermelho de Sudan III (Sigma).

2.3 Avaliação da estabilidade da emulsão ao longo do tempo

As emulsões preparadas tanto para proteína da microalga como SPI e WPI foram acompanhadas ao longo do tempo (0, 1, 5, 12, 15 e 30 dias) e analisadas quanto ao tamanho (diâmetro hidrodinâmico), Índice de polidispersidade (PDI), Índice de cremeação (CI %) e aparência.

2.4 Medição de tamanho de partícula

As distribuições de tamanho de partícula de emulsões óleo em água foram determinadas usando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando equipamento Zetasizer APS, ângulo de detecção de 90 ° (Malvern Panalytical, Reino Unido). As emulsões foram diluídas 1: 1000 com água deionizada. O princípio de medição é baseado na difusão de partículas que se movem sob movimento browniano e converte essa medida em tamanho e em distribuição de tamanho das partículas utilizando a relação de Stokes-Einstein. Um índice de refração de 1,45 foi utilizado para todas as medições.

2.5 Índice de polidispersidade (PDI)

O Índice de Polidispersidade foi calculado usando equipamento Zetasizer Pro (Malvern Panalytical, Reino Unido). O Índice de Polidispersidade é adimensional e redimensionado, de forma que valores menores que 0,05 são vistos apenas com padrões altamente monodispersos. Valores maiores que 0,7 indicam que a amostra possui uma distribuição de tamanho muito ampla e provavelmente não é adequada para a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os vários algoritmos de distribuição de tamanho trabalham com dados que se enquadram entre esses dois extremos. Os valores variam de 0 a 1,0.

2.6 Índice de cremação (CI)

A emulsões foram observadas visualmente quanto a sua desestabilização devido à cremação e foi observado a formação de fases durante 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente 25 ± 1 °C. O índice de cremação (CI %) foi quantificado de acordo com a Eq. 1.

$$(\%)CI = \frac{V_c}{V_i} \times 100 \quad (1)$$

Na Eq. (1), V_i representa o volume inicial da emulsão colocada nos tubos cônicos de centrifugação e V_c é o volume de fase oleosa/creme formado no topo dos tubos medido em diferentes tempos após a preparação da emulsão.

Os resultados do diâmetro médio hidrodinâmico, PDI da distribuição do diâmetro hidrodinâmico e CI (%) de cada concentração de dispersão foram apresentados em função do tempo (0, 1, 5, 12, 15 e 30 dias) de armazenamento.

2.7 Teste de estabilidade da emulsão ao estresse por mudança de pH

Foram preparadas dispersões de 0,5 % (m/m) de concentrado de proteína da microalga *S. obliquus* (0,32 % m/m de proteína) e estas foram submetidas a estresse pela mudança de pH. Para isso, após a formação da emulsão em pH 7,0, o valor de pH foi ajustado de 2 a 9 adicionando HCl ou NaOH (0,1, 0,25, 1, 2 e 6 M) de acordo com metodologia descrita por Grossman et al. (2019) e o pH foi verificado durante 30 min. Durante esse período, o pH foi ajustado conforme a necessidade, para manter o pH no valor escolhido e compensar a capacidade tamponante das proteínas. O pH foi verificado novamente após 24 h. As proteínas de referência (SPI e WPI) também foram submetidas ao estresse nas mesmas condições. Foi adicionado azida de sódio (0,02 %) para inibir qualquer crescimento microbiano.

A resistência das emulsões ao estresse pela variação do pH foi acompanhada ao longo de 8 dias, sendo avaliadas no dia 1 e no dia 8 quanto ao tamanho (diâmetro hidrodinâmico), Índice de polidispersidade (PDI), Índice de cremeação (CI %) e aparência.

2.8 Teste de estabilidade da emulsão ao estresse por aumento de salinidade

Dispersões de 0,5 % de proteínas (microalga, SPI e WPI) foram preparadas em pH 7,0 e foram submetidas a estresse por aumento de salinidade. Para isso, várias concentrações de NaCl (0, 25, 50, 100, 250 e 500 mM) foram aplicadas às emulsões formadas, misturando com soluções-mãe concentradas de NaCl na proporção de 9: 1 (v / v) seguindo metodologia descrita por Grossman et al. (2019), com modificações.

Todas as amostras foram armazenadas a temperatura ambiente (25 ° C) e analisadas após 24 h e novamente após 8 dias quanto ao tamanho (diâmetro hidrodinâmico), Índice de polidispersidade (PDI), Índice de cremeação (CI %) e aparência visual. Foi adicionado azida de sódio (0,02 %) para inibir qualquer crescimento microbiano.

2.9 Análise estatística

Os dados referentes ao tamanho das partículas nos diferentes pH, concentrações e tempo, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de médias, Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Os dados foram mostrados em média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1999) versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.


3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição do concentrado proteico da microalga *Scenedesmus obliquus*

Antes da elaboração das emulsões a partir das proteínas da microalga *S. obliquus*, o concentrado proteico obtido foi caracterizado quanto a sua composição centesimal. Os valores estão apresentados na tabela 1. O concentrado proteico apresentava $63,14 \pm 0,3$ % de proteína e aproximadamente 30 % de carboidratos. Essa concentração de proteína varia entre as diversas espécies de microalgas e de acordo com a extração de proteínas. Esses valores estão consistentes com outros trabalhos para diferentes tipos de microalga, em que os extratos e concentrados proteicos consistiam principalmente de proteínas e carboidratos, variando apenas o conteúdo destas (Grossmann et al., 2019; Ebert et al., 2019; Lupatini Menegotto et al., 2019; Grossmann, Ebert, Hinrichs, & Weiss, 2018; Schwenzfeier, Wierenga, & Gruppen, 2011).

Para verificar a capacidade das proteínas da microalga *S. obliquus* em formar emulsão bem como o quão estáveis eram estas, emulsões foram produzidas em diferentes valores de pH e em diferentes concentrações. Uma emulsão estável está diretamente relacionada a um bom emulsificante, na concentração ideal, na interface do sistema óleo-água. O objetivo de testar diferentes pH's e concentrações foi encontrar qual a melhor condição para formação da emulsão, bem como a pior condição. Assim como é de grande interesse para a indústria de alimentos uma emulsão estável, para indústria de petróleo e biocombustíveis, por exemplo, isso pode estar relacionado com problemas e prejuízos.

Tabela 1 - Composição do concentrado proteico extraído da microalga *Scenedesmus obliquus*

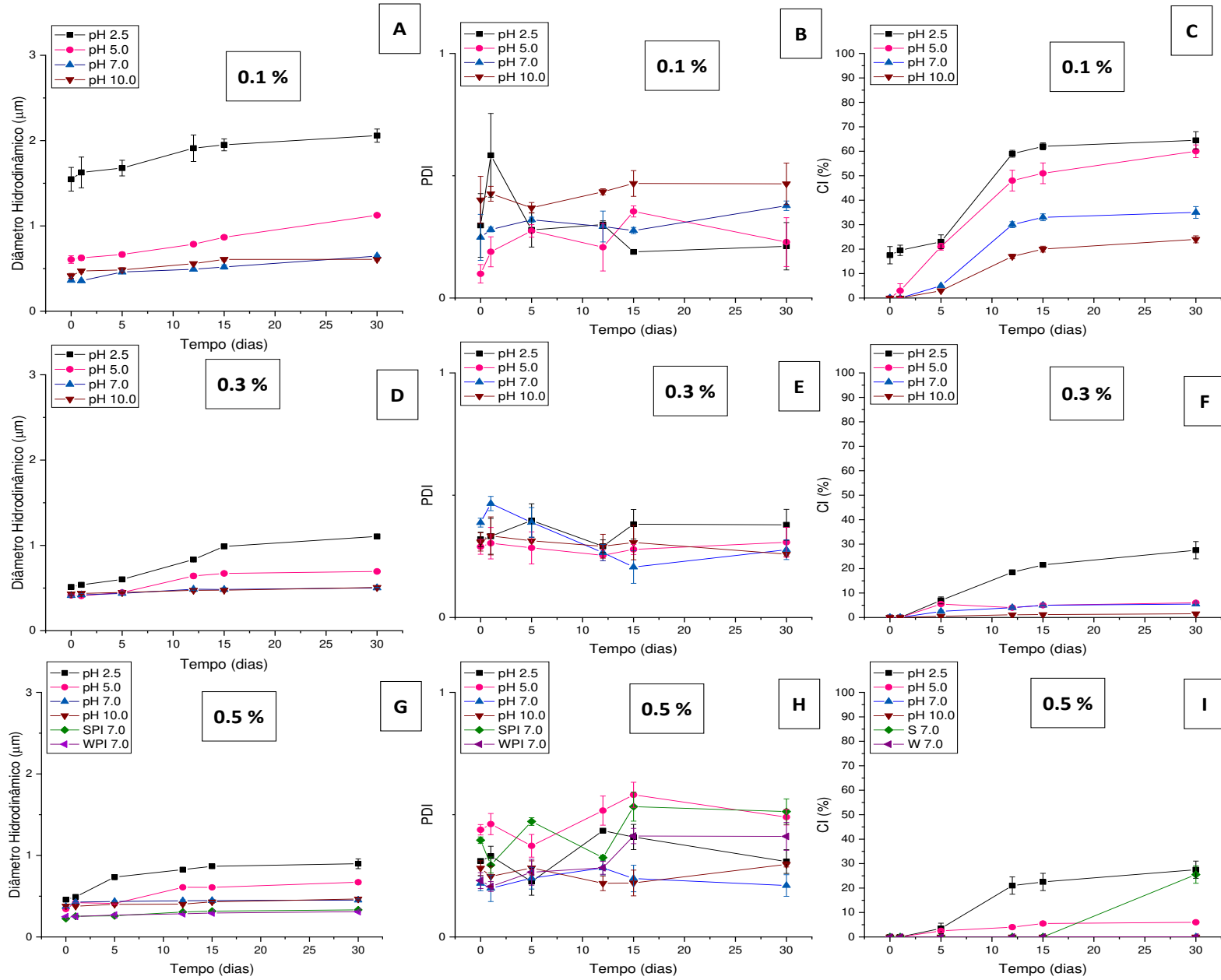
Componentes	Conteúdo (%)
Proteína (Fator = 5,8)	63,14 ± 0,3
Cinzas	1,98 ± 0,2
Lipídeos	0,60 ± 0,1
Umidade	4,30 ± 0,3
Carboidratos	29,98 ± 0,2
Aparência	

Emulsões foram formadas utilizando concentração de 0,1, 0,3 e 0,5 % de concentrado proteico da microalga *S. obliquus*, para estabilizar 5 % de óleo de girassol em sistema de emulsão O/A. Vale ressaltar que as concentrações testadas estão relacionadas com o concentrado proteico (incluindo carboidratos e os outros componentes) e não concentração de proteína puramente, portanto as concentrações testadas de 0,1; 0,3 e 0,5 % forneciam respectivamente 0,06; 0,19 e 0,32 % de proteínas em massa. Enquanto isso, as emulsões das proteínas de soja e soro de leite, forneciam, cada uma, 0,44 % de proteínas em massa. As emulsões formadas foram analisadas nos tempos 0, 1, 5, 12, 15 e 30 dias após a formação da emulsão. Para a determinação da concentração ideal de proteínas, alguns critérios foram analisados: (i) uma concentração mínima de proteína suficiente para que o diâmetro hidrodinâmico (dh) das gotículas não seja maior do que 1 µm; (ii) um diâmetro hidrodinâmico suficientemente pequeno para impedir que as emulsões O/A desestabilizem por separação gravitacional (baixa % CI); (iii) nenhum aumento significativo ($p > 0,05$) do tamanho hidrodinâmico ao longo dos 30 dias de armazenamento, (iv) PDI relativamente pequeno ($< 0,3$) ao longo do armazenamento, mostrando distribuição de tamanho de partícula mais uniforme, e (v) aparência estável da emulsão ao longo dos 30 dias de armazenamento.

Para a concentração 0,1 % de proteína, o pH 2,5 (ponto isoelétrico) apresentou desestabilização imediatamente após a homogeneização (dia 0), com diâmetro médio hidrodinâmico (Dh) maior do que 1 μm , com aumento significativo ($p \leq 0,05$) ao longo dos 30 dias de armazenamento. Além disso, o pH 2,5 apresentou diferença significativa dos demais pH em todos os tempos analisados. O pH 5,0 apresentou semelhança com o pH 7,0 e 10,0 somente no dia 1, apresentando diferença significativa quanto ao tamanho hidrodinâmico médio em todos os demais tempos analisados (Figura 1) e um diâmetro final maior que 1 μm após 30 dias. Os pHs 7,0 e 10,0 apresentaram Dh estatisticamente semelhante ao longo do armazenamento, e menores valores comparados aos pH 2,5 e 5,0. A maior desestabilização da emulsão próximo ao ponto isoelétrico pode ser comumente atribuída a uma diminuição na repulsão eletrostática entre a proteína e a interface, e aumento das forças atrativas (interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals) entre as partículas de proteína, nestas condições ocorre a auto-associação dos componentes proteicos adsorvidos e não-adsorvidos (Davis, Foegeding, & Hansen, 2004; Allen, Dickinson, & Murray, 2006) o que pode alterar as suas propriedades estabilizantes em uma emulsão.

O índice de polidispersidade (PDI) demonstra sobre o grau de homogeneidade de uma amostra. Quanto menor o seu valor, maior será a homogeneidade do diâmetro de partículas no sistema e vice-versa (Liu & Wu, 2010). Para a concentração 0,1 %, os valores de PDI variaram bastante em relação ao tempo e ao pH, apresentando valores bem elevados e bastante variados ao longo do armazenamento (Figura 1B) demonstrando uma distribuição de tamanho de partícula bimodal, o que indica uma desestabilização de gotículas possivelmente por meio de um mecanismo de depleção ou como resultado de proteínas não acopladas (Grossman et al., 2019). Além disso, os valores de % CI que demonstram a separação de fases a partir da desestabilização da emulsão, foram altas para a concentração 0,1 % em geral, principalmente para pH 2,5 (Figura 1C).

Figura 1- Valores de diâmetro hidrodinâmico (A, D, G), Índice de polidispersidade (B, E, H) e % CI (C, F, I) ao longo de 30 dias de armazenamento de emulsões O/A formadas com proteínas da microalga *S. obliquus*; A, B, C - para a concentração de 0,1 % de proteína da microalga; D, E, F - 0,3 % de proteína da microalga em diferentes pH; G, H, I - 0,5 % de proteínas da microalga em diferentes pH em comparação com proteína de soja (SPI) e soro de leite (WPI) em pH 7,0.



Para a concentração 0,3 e 0,5 %, os valores de diâmetro hidrodinâmico não ultrapassaram 0,5 μm ao longo dos 30 dias de armazenamento, em pH 7,0 e 10,0 (Figura 1). Enquanto para pH 2,5 e 5,0 os valores de Dh chegaram a $1,10 \pm 0,02$ e $0,69 \pm 0,02$ μm , respectivamente para concentração 0,3 % (Figura 1D) e $0,89 \pm 0,06$, e $0,67 \pm 0,02$ μm respectivamente para a concentração 0,5 % (Figura 1G).

Para a concentração 0,3 %, apesar de apresentar valores baixos de Dh, estes variaram significativamente ao longo do armazenamento, e o PDI apresentou valores maiores do que 0,3 mesmo nos pH's 7,0 e 10,0 (Figura 1E). Os valores de % CI encontrados foram de 27,5 % para pH 2,5, de 6 % para pH 5,0 e de 5,5 e 1,5 % para pH 7,0 e 10,0, respectivamente, no final de 30 dias de armazenamento (Figura 1F). Dessa forma, verifica-se que a concentração 0,3 % de proteínas foi capaz de manter a estabilidade maior do que utilizando uma concentração 0,1 %.

Para a concentração 0,5 %, o Dh não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em pH 7,0 e 10,0, e variou em média de 0,42 a 0,45 ao longo dos 30 dias de armazenamento para pH 7,0 e de 0,38 a 0,46 para pH 10,0. Os valores de Dh no final do armazenamento não apresentaram diferença significativa entre o pH 10,0 e 7,0. Além disso, o PDI não apresentou valores acima de 0,3 ao longo do armazenamento para o pH 7. Os valores de % CI para a concentração de 0,5 % de proteína, foram os menores encontrados em relação as demais concentrações testadas (Figura 1I), para os pH's 7,0 e 10,0. Além disso, a % CI se comportou semelhante a proteína WPI e melhor que a SPI. As emulsões formadas com as proteínas da microalga e WPI a 0,5 % não apresentaram desestabilização ao final de 30 dias de armazenamento, enquanto a SPI apresentou valor de $25,5 \pm 3,5$ % de CI, demonstrando separação de fase, o que é consequente de desestabilização irreversível.

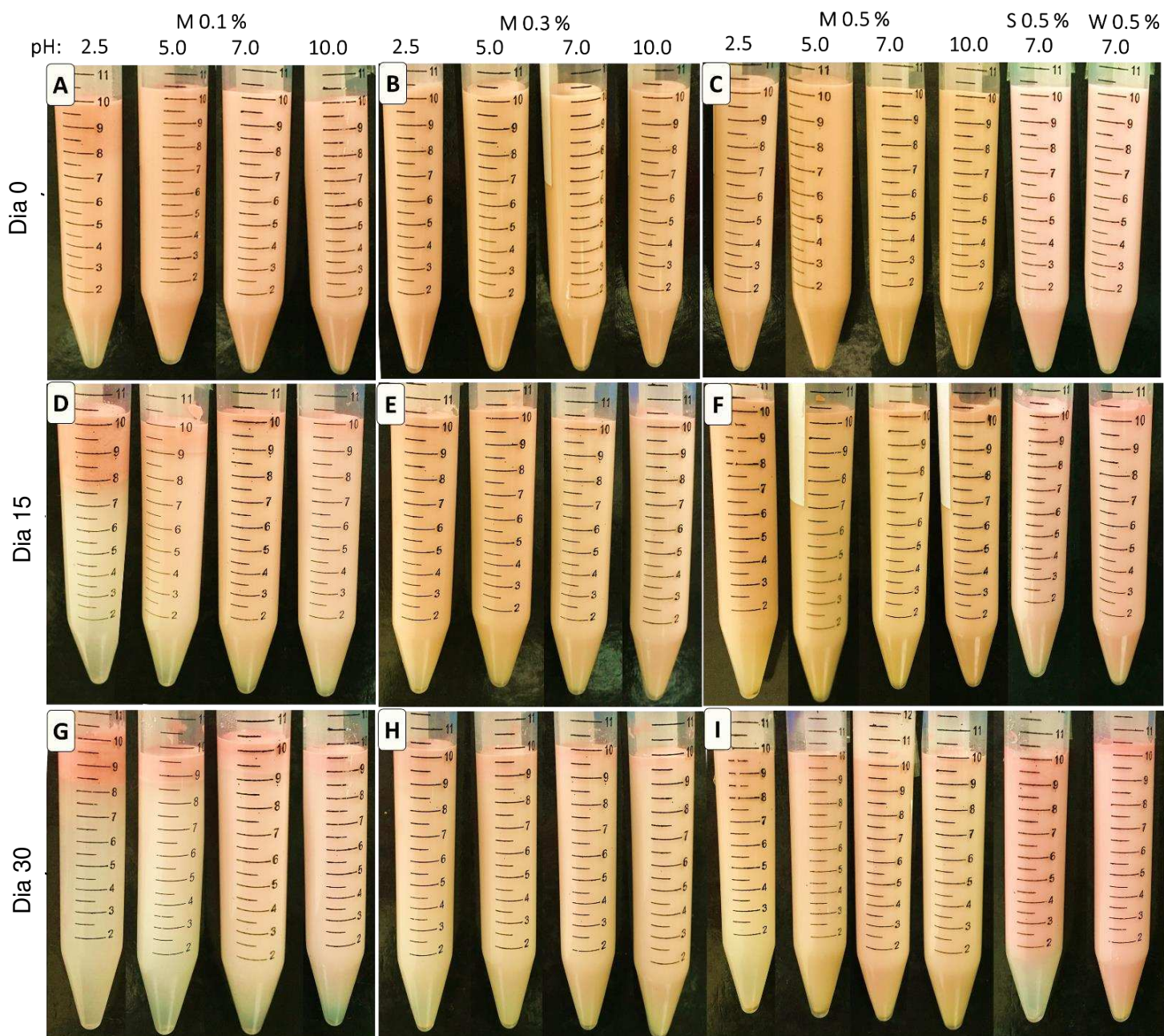
As emulsões formadas a partir das proteínas da microalga *S. obliquus* em comparação com as proteínas SPI e WPI, podem ser melhor visualizadas na Figura 2. Pode-se visualizar que no dia 0, com exceção da 0,1 % pH 2,5, todas as demais apresentaram uma emulsão macroscopicamente estável. No dia 15 de armazenamento, as emulsões com concentração de 0,1 % estavam visivelmente desestabilizadas, sendo o pH 2,5 totalmente desestabilizada com separação de fases. No dia 30 de armazenamento, algumas emulsões formadas com as concentrações 0,3 e 0,5 % começaram a desestabilizar nos pH's 2,5 e 5,0. As emulsões em pH 7,0 e 10,0 na concentração 0,5 % estavam visivelmente semelhantes a emulsão formada com a WPI, enquanto a emulsão formada com a proteína de soja estava visivelmente desestabilizada, demonstrando dessa

forma que a proteína de microalga apresenta melhor capacidade de formação de emulsão O/A e maior estabilidade da mesma do que a proteína de soja.

O grande interesse da indústria de alimentos em proteínas com boa capacidade de formação de emulsão se deve capacidade das proteínas em formar um filme altamente visco-elástico na interface, podendo resistir a choques mecânicos durante o processamento dos alimentos, armazenamento e sua distribuição até o consumidor. Dessa forma, as proteínas que estabilizam emulsões são mais estáveis que emulsões formadas com emulsificantes convencionais, de baixo peso molecular. Portanto, a capacidade das proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* em formar emulsões com elevada estabilidade, mesmo em baixas concentrações (0,3 e 0,5 %), podem permitir a formulação de alimentos emulsionados estáveis.

O pH apresentou efeito significativo quanto a formação e estabilidade da emulsão para as proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus*. Dessa forma, observa-se que com o aumento do pH, houve aumento na propriedade técnico funcional quanto a formação de emulsão. Esse efeito se dá pela solubilidade e desdobraimento da proteína a medida que o pH se afasta do ponto isoelétrico. Essa capacidade das proteínas da microalga em pH mais alto (acima do pI) se dá pelo aumento de carga líquida e das forças repulsivas que consequentemente fazem com que as proteínas absorvam mais água e as maximizem as interações proteína-água (Damodaran, 2004; Menegotto et al., 2019). Além disso, quando a interface é altamente carregada, a estabilidade da solução é aprimorada devido à repulsão eletrostática entre as gotículas (Guzey & McClements, 2006).

Figura 2 – Aparência visual das emulsões O/A formadas com proteínas da microalga *S. obliquus* no dia 0 (A, B, C), dia 15 (D, E, F) e dia 30 (G, H, I) de armazenamento; A, D, G - para a concentração de 0,1 % de proteína da microalga; B, E, H - 0,3 % de proteína da microalga em diferentes pH; C, F, I - 0,5 % de proteínas da microalga em diferentes pH em comparação com proteína de soja (S) e soro de leite (W) em pH 7,0.



A partir dos resultados em geral, dh, PDI, %CI e imagens, é possível verificar que a concentração e o pH possuem efeitos significativos quanto a capacidade e estabilidade da emulsão a partir da proteína da microalga *S. obliquus*. A concentração de 0,1 % apresentou menor capacidade de formação de emulsão em relação às demais concentrações testadas. O pH de ponto isoelétrico e quanto mais próximo a ele, apresentaram emulsões mais instáveis ao longo dos 30 dias de armazenamento, isso pode ter ocorrido devido a agregação entre moléculas da proteína. Além disso, verificou-se que a emulsão da proteína da microalga apresentou maior estabilidade do que a proteína de soja testada, mesmo possuindo menor teor de proteína.

Schwenzfeier et al. (2013) avaliaram emulsões formadas a partir de concentrado proteico (64 %) da microalga *Tetraselmis* sp. em diferentes concentrações e verificaram que a concentração de 0,6 % em massa produzia uma emulsão estável em pH mais distante do ponto isoelétrico. Estes autores relatam que o concentrado proteico, que possui menor teor de proteína que WPI, possui uma fração de polissacarídeos que contribuiu significativamente para a estabilização da emulsão por co-adsorção na superfície da gota. Menegotto et al. (2019), verificaram que em pHs mais distantes do pI as propriedades emulsificantes das proteínas de *Spirulina platensis* foram maiores e melhores. Alguns pesquisadores relatam que as proteínas alimentares, em pH igual ao pI, são pouco solúveis e hidratadas sendo desprovidas de forças repulsivas e eletrostáticas formando assim, emulsões inadequadas (Damodaran, 2004; Yucetepe, Saroglu, & Ozcelik, 2019).

Xi et al. (2020) analisaram a capacidade de conjugado entre carboidrato e WPI em formar emulsão, e verificaram que em pH acima do ponto isoelétrico o grau de glicosilação aumenta e a estrutura da WPI se estende, dando ao conjugado maiores áreas de superfície, expondo mais locais de ligação de contato com as gotas de óleo, possuindo assim um estado mais estável da interface óleo-água. Além disso, verificaram que o pH afetou a estrutura e as propriedades emulsificantes dos conjugados WPI-carboidrato, explicando que o pH possui efeito sobre as estruturas secundária e terciária da WPI, sendo as propriedades emulsificantes melhores para os conjugados formados em ambientes alcalinos.

Grossman et al. (2019) analisaram a formação de emulsão a partir de proteínas da microalga *Chlorella protothecoides* e verificaram que 1,7 % de proteína em massa produziram aumento significativo no diâmetro das gotículas ($\geq 1 \mu\text{m}$) em 7 dias de armazenamento, a concentração de 3,3 % produziu uma distribuição de tamanho de partícula bimodal e a concentração de 2,5 % apresentou emulsão estável com tamanho

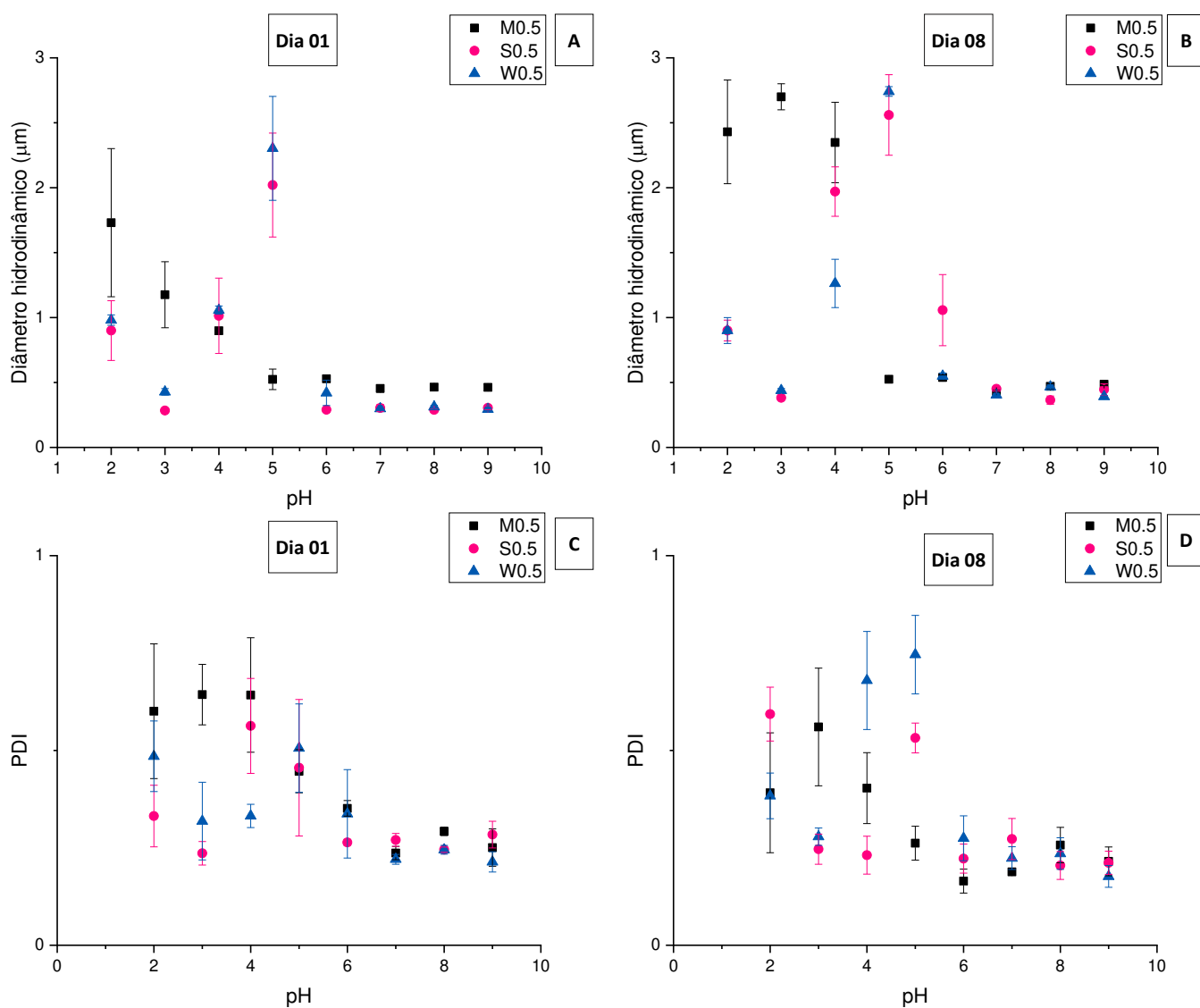
médio de 0,88 a 1,2 μm . Estes autores utilizaram concentração de proteína de microalga acima dos utilizados no presente trabalho e encontraram também tamanho de gotículas maiores.

De um modo geral, as variações encontradas na capacidade e estabilidade de formação de emulsão de proteínas diferentes, está diretamente ligada à natureza particular de cada extrato, por conta que a composição de cada extrato, concentrado e isolado proteico varia de proteína para proteína, bem como da matéria prima extraída. Além disso, as propriedades técnico-funcionais das proteínas podem ser melhoradas a partir do tratamento ultrassônico, devido ao efeito de homogeneização que favorece a dispersão uniforme das partículas de gordura e das proteínas (Grossman et al., 2019; Ahmadi, Razavi, & Varidi, 2017; Jambrak, Mason, Lelas, Herceg, & Herceg, 2008).

3.2 Teste de estabilidade da emulsão ao estresse por mudança de pH

Os resultados apresentados demonstraram que as proteínas da microalga *S. obliquus* pode formar emulsões estáveis por pelo menos 30 dias de armazenamento. A concentração que apresentou melhor estabilidade ao longo do armazenamento foi de 0,5 % em pH 7,0 e 10,0. Como pH 7,0 está mais próximo ao pH natural dos alimentos, o pH 7,0 foi escolhido para os testes de resistência da emulsão aos estresses de mudança de pH e salinidade. Quando se verifica a qualidade de um emulsificante, verifica-se a capacidade de resistir a mudanças seja de pH, concentração de sais e outras mudanças que ocorrem no processamento de alimentos. Portanto, o primeiro teste de resistência foi verificar a capacidade das emulsões formadas a partir das proteínas de microalga em resistir a mudança de pH de 2 a 9, após a formação da emulsão, compará-las as proteínas de referência WPI e SPI e analisar até 8 dias de armazenamento. As amostras foram analisadas quanto ao tamanho do diâmetro hidrodinâmico (Figura 3 A, B), Índice de polidispersidade (Figura 3 C, D) e aparência visual (Figura 4) nos dias 1 e 8 de armazenamento.

Figura 3 - Valores do diâmetro hidrodinâmico (A, B) e Índice de polidispersidade (C, D) para teste da estabilidade da emulsão ao estresse de pH nos dias 1 (A, C) e 8 (B, D) de armazenamento.



As emulsões exibiram aumento de Dh nos pHs 2, 3 e 4, próximos ao ponto isoelétrico (2,5) para as proteínas da microalga *S. obliquus*. No dia 1 de armazenamento, os pHs 2 e 3 já apresentavam valores acima de 1 μm (Figura 3A) e o pH 4,0 já apresentava cerca de 0,9 μm , enquanto os demais pHs apresentavam Dh entre 0,4 a 0,5 μm . No dia 8 de armazenamento, os pHs 2, 3 e 4 apresentavam valores acima de 2 μm , enquanto os demais pHs mantiveram os tamanhos entre 0,4 a 0,5 μm (Figura 3B), mostrando estabilidade no pH acima de 4. O mesmo comportamento ocorreu para as proteínas de soja (S) e soro de leite (W) próximo ao ponto isoelétrico das mesmas. Para as proteínas de soja e soro de leite, no dia 1, o pH 4 apresentava tamanho de 1 μm e pH 5 acima de 2 μm para ambas. No dia 8, esses valores aumentaram, com aumento também do Dh em pH 6 para proteína de soja, que apresentava no 8º dia, valores acima de 1 μm . Consequentemente, o PDI foi maior também próximo aos pontos isoelétricos das proteínas no dia 1 e no dia 8. A desestabilização das emulsões ocorreu próximo ao ponto isoelétrico das proteínas e podem ser melhor visualizados na figura 4, onde verifica-se a separação de fase de forma irreversível.

Os resultados corroboram com outros estudos que avaliaram emulsões formadas a partir de proteínas alimentares como soja, caseína, soro de leite, e de microalgas como *Tetraselmis* sp e *Spirulina platensis*, sendo também observado um aumento do tamanho médio das partículas quando o pH é próximo ao ponto isoelétrico das proteínas (Schwenzfeier et al., 2013; Menegotto et al., 2019; Bengoechea, Romero, Aguilar, Cordobés, & Guerrero, 2010; Demetriades, Coupland, & McClements, 1997).

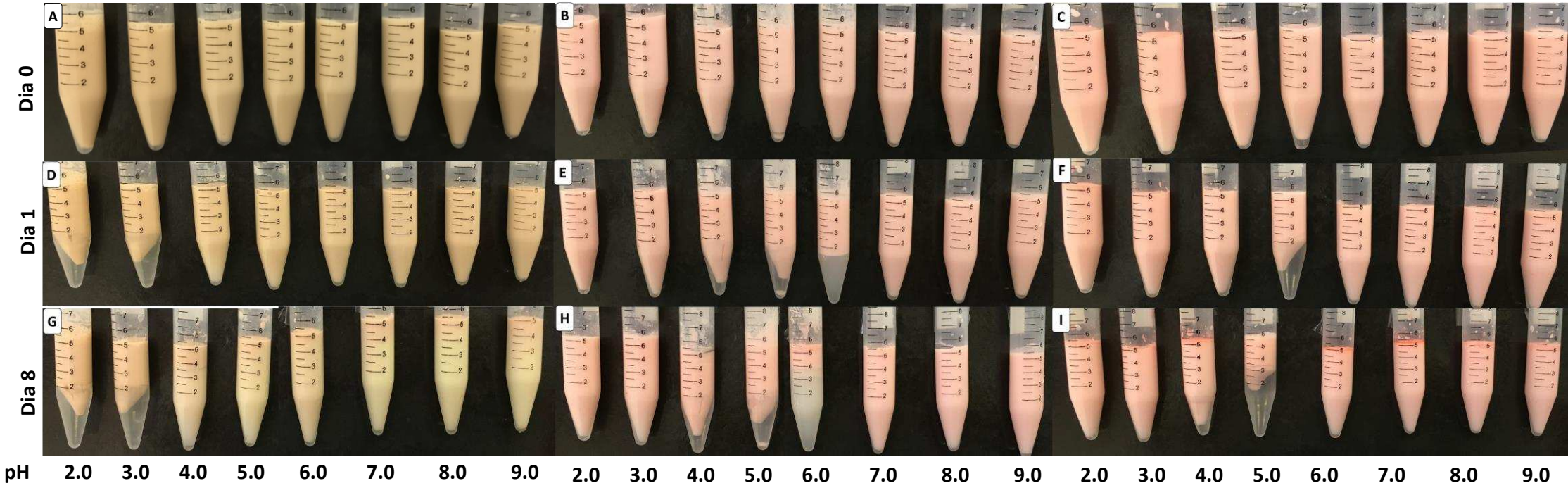
As emulsões da microalga *S. obliquus* desestabilizam somente em pH's mais baixos (2-4), onde estariam incluídos os alimentos muito ácidos. Já as proteínas S e WPI desestabilizam em pH levemente ácido (4-6) onde estão inclusos a maioria dos alimentos processados emulsionados. Dessa forma, sugere-se o uso das proteínas de *S. obliquus* como grandes potenciais para produção de emulsões alimentares estáveis em pH maiores que 4,0.

Figura 4 – Aparência visual das emulsões O/A formadas com proteínas da microalga *S. obliquus* submetidas ao estresse de pH nos dias 0 (A), 1 (D) e 8 (G) de armazenamento; em comparação com proteína de soja (S) (B, E, H) e soro de leite (W) (C, F, I) em 8 dias de armazenamento

M 0.5 %

S 0.5 %

W 0.5 %



Grossman et al. (2019) relataram que emulsões formadas com a proteína da microalga *Chlorella protothecoides* suportam mais variação de pH do que a proteína de referência, WPI. Estes autores relatam ainda que, os carboidratos presentes no extrato de microalgas desempenham um papel importante na estabilização das gotículas de óleo. Porém, estes autores utilizaram 2,5 % de extrato proteico, valores 5 x maior de proteína do que o utilizado no presente trabalho.

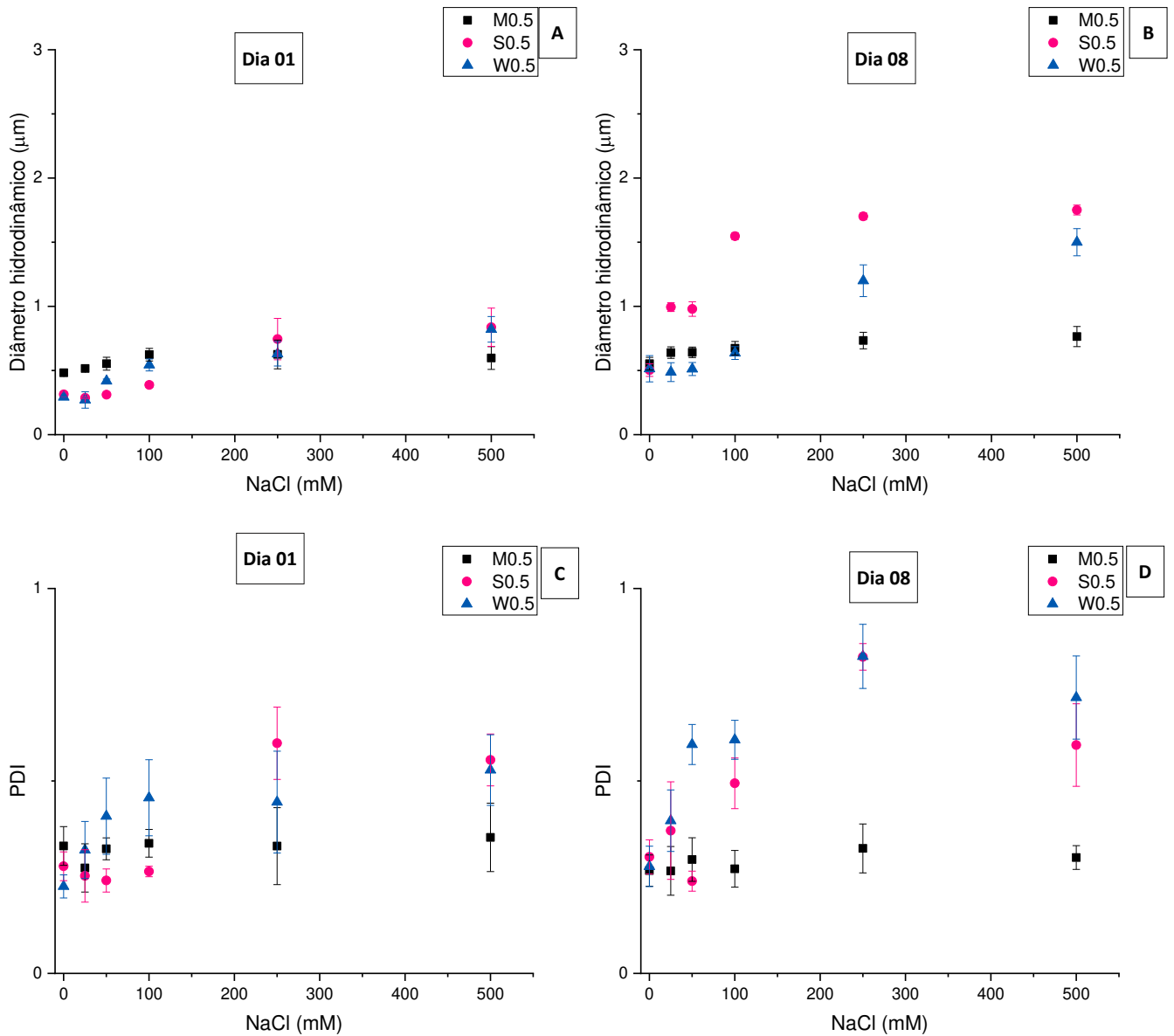
Os resultados desse comportamento de desestabilização próximo ao ponto isoelétrico das proteínas, em até 8 dias de armazenamento, sugerem que o mecanismo de estabilização de gotículas nas emulsões utilizando proteínas de microalga, ocorre por meio de forças de repulsão eletrostática que evitam colisões e coalescências das gotículas de óleo. Além disso, as emulsões apresentaram maior estabilidade em pHs em que elas possuem maior solubilidade e que apresentam potencial zeta elevado e mais eletronegativo (Grossman et al., 2019).

3.3 Teste de estabilidade da emulsão ao estresse por alta salinidade

A avaliação da resistência das emulsões à salinidade é um importante critério, para aplicações em alimentos, pois alguns sistemas alimentares possuem grandes quantidades de sais que podem provocar a desestabilização das emulsões.

As amostras foram analisadas quanto ao tamanho de suas partículas (diâmetro hidrodinâmico) (Figuras 5A, 5B), Índice de polidispersidade (PDI) (Figuras 5C, 5D), e aparência macroscópica (Figura 6), no dia 1 e após 8 dias de armazenamento. Em geral, as emulsões produzidas com as proteínas da microalga *S. obliquus* apresentaram estabilidade alta, sem diferença significativa no tamanho ao longo dos 8 dias de armazenamento, mesmo em altas concentrações de NaCl. Já para as proteínas alimentares, SPI e WPI, houve aumento significativo do diâmetro hidrodinâmico (Figura 5A, 5B) além de apresentarem distribuição bimodais com PDI elevado.

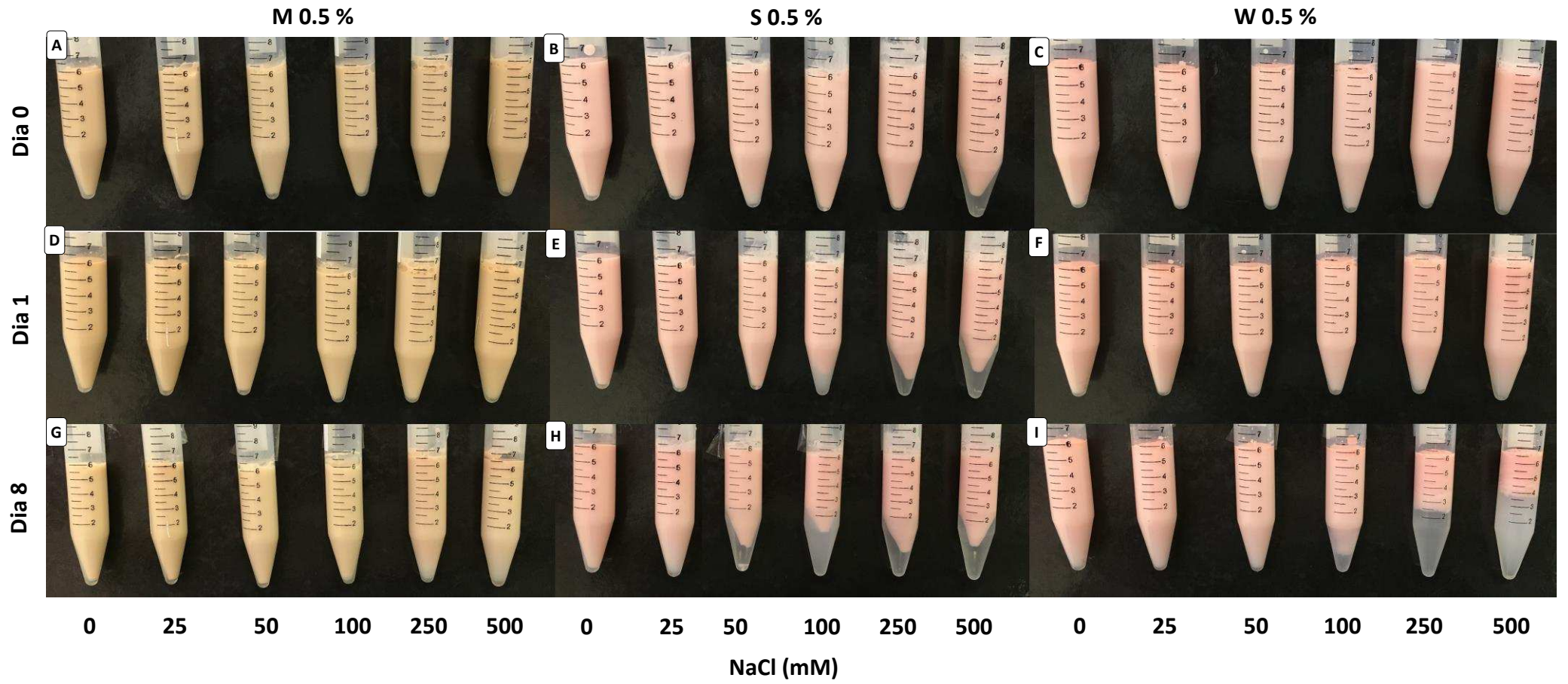
Figura 5 - Valores do diâmetro hidrodinâmico (A, B) e Índice de polidispersidade (PDI) (C, D) para teste de resistência da emulsão a alta salinidade nos dias 1 (A, C) e 8 (B, D) de armazenamento.



A alta estabilidade das emulsões formadas a partir das proteínas da microalga *S. obliquus* em comparação com as proteínas S e W, podem ser melhor visualizadas na aparência visual (Figura 6). As emulsões formadas com as proteínas da microalga não apresentaram separação de fases em nenhuma condição de estresse pelo sal (0 a 500 mM de NaCl) ao longo dos 8 dias de armazenamento (Figura 6 A, D, G). As emulsões

formadas com a proteína de soja (S) apresentaram separação de fases já no dia 0 de armazenamento para a concentração de 500 mM de NaCl (Figura 6B). No primeiro dia de armazenamento, ocorreu a desestabilização da emulsão desde a concentração de 100 mM de NaCl (Figura 6 E), e no oitavo dia, a partir da concentração de 50 mM (Figura 6H), sendo a desestabilização aumentada com o aumento da concentração (≤ 500 mM) do sal e aumento dos dias de armazenamento (8 dias). As emulsões formadas a partir da proteína de soro de leite (W) (Figura 6 C, F, I) apresentaram separação de fases no oitavo dia de armazenamento, a partir da concentração de 100 mM de NaCl, sendo maior a desestabilização com o aumento da concentração do sal.

Figura 6 – Aparência visual das emulsões O/A formadas com proteínas da microalga *S. obliquus* submetidas ao estresse de força iônica nos dias 0 (A), 1 (D) e 8 (G) de armazenamento; em comparação com proteína de soja (S) (B, E, H) e soro de leite (W) (C, F, I) em 8 dias de armazenamento.



Alguns autores relatam que os sistemas que possuem presença de biopolímeros mistos, podem manter uma estabilidade maior em relação aos sistemas puramente estabilizados com proteínas. Isso ocorre devido à complexação eletrostática de polissacarídeos e proteínas, mesmo utilizando altas forças iônicas e valores de pH próximos ao pI. O aumento das interações estéricas repulsivas podem estar relacionadas ao aumento dessa estabilização, pois os polissacarídeos hidrofílicos aumentam a espessura da camada do emulsificante em comparação com os sistemas que contem puramente a proteína (Grossman et al., 2019; Surh, Gu, Decker, & McClements, 2005; Ho, Ishizaki, & Tanaka, 2000). A presença de carboidratos carregados em microalgas e a glicosilação covalente de proteínas de microalgas foram relatadas anteriormente (Ebert et al., 2019; Schwenzfeier, Wierenga, Eppink, & Gruppen, 2014; Schwenzfeier et al., 2011; Cheng, Zheng, Labavitch, & VanderGheynst, 2011; Lutz Grossmann, Hinrichs, & Weiss, 2019). Ebert et al. (2019) verificaram uma interação de polissacarídeos carregados com proteínas a partir das propriedades ativas da superfície em microalgas. Além disso, a forma como as proteínas são adsorvidas na interface é diferente dos emulsificantes de baixo peso molecular, como por exemplo, os fosfolipídios. As proteínas possuem na superfície grupos hidrofóbicos e hidrofílicos e sua rigidez na estrutura limita sua adsorção, enquanto os fosfolipídeos não alteram sua conformação para efeito de adsorção e orientação, pois as partes hidrofílica e hidrofóbica estão na extremidade da molécula.

Grossman et al. (2019) também verificaram resistência das emulsões, formadas por proteínas da *C. protothecoides*, à altas concentrações de NaCl (500 mM), utilizando concentrações de 2,5 % de proteínas em massa. Ebert et al. (2019) verificaram resistência das proteínas das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Phaeodactylum tricornutum* a altas concentrações de NaCl (500 mM). Porém estes autores utilizaram concentração de proteínas (não concentração do extrato) maior do que utilizados no presente trabalho para proteína de microalga, onde utilizaram 1,0 % de proteína, em massa, para *C. sorokiniana* e 3,7 % de proteína em massa para *P. tricornutum*.

De um modo geral, a partir dos resultados relatados, as proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* apresentam funcionalidades superiores às de outras proteínas alimentares comuns, que possuem baixa estabilidade em concentrações altas de sal, e baixas capacidades emulsificantes entre pH 4 e 6, que é o pH usual que envolve a maioria das emulsões alimentícias. Além disso, as proteínas da microalga *S. obliquus*, mesmo em baixas

concentrações, apresentaram propriedades emulsificantes superiores a outras microalgas descritas na literatura, e às proteínas alimentares SPI e WPI. Dessa forma, este estudo possui alta relevância para a indústria de alimentos que busca por bons agentes emulsificantes, em baixas concentrações, que são capazes de resistir a grande variação de pH e sais minerais utilizados nas formulações de alimentos. O uso de baixas concentrações do emulsificante está atrelado a diminuição dos custos pelos fabricantes de alimentos, portanto, a proteína da microalga *S. obliquus* possui potencial para ser utilizado por estas indústrias. Portanto, as proteínas da microalga possuem maior capacidade para formar emulsões estáveis, resistentes a variação de pH e à presença de sais, do que as proteínas da soja e do soro de leite. Assim, a proteína da microalga *S. obliquus* é uma alternativa para aplicação em sistemas alimentares.

4 CONCLUSÃO

As proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* apresentaram alta capacidade de formação e estabilidade da emulsão, mesmo utilizando baixas concentrações (0,3 e 0,5 % m/m de concentrado proteico contendo 63 % de proteína). Emulsões formadas com 0,5 % de proteína da microalga *S. obliquus* em pH 7,0 e 10,0 apresentaram estabilidade ao longo de 30 dias de armazenamento. As emulsões formadas a partir da microalga na concentração de 0,5 % e pH 7,0, apresentaram resistência a mudança de pH (exceto próximo ao pI), e resistiram a altas concentrações de NaCl (≤ 500 mM), enquanto as proteínas de soja e soro de leite desestabilizaram em pH 4 a 6 e em concentrações acima de 100 mM de NaCl. Portanto, as proteínas da microalga *S. obliquus* possuem boa capacidade para formar emulsões estáveis, resistentes a variação de pH e à presença de sais, sendo assim, uma alternativa de agente emulsificante para uso na indústria de alimentos e aplicação em sistemas alimentares, mesmo em baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

- Afify, A. E. M. M. R., El Baroty, G. S., El Baz, F. K., Abd El Baky, H. H., & Murad, S. A. (2018). Scenedesmus obliquus: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.002>
- Ahmadi, Z., Razavi, S. M. A., & Varidi, M. (2017). Sequential ultrasound and

transglutaminase treatments improve functional, rheological, and textural properties of whey protein concentrate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 207–215. <http://doi.org/10.1016/J.IFSET.2017.08.013>

Allen, K. E., Dickinson, E., & Murray, B. (2006). Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream. *LWT - Food Science and Technology*, 39(3), 225–234. <http://doi.org/10.1016/J.LWT.2005.02.004>

Bengoechea, C., Romero, A., Aguilar, J. M., Cordobés, F., & Guerrero, A. (2010). Temperature and pH as factors influencing droplet size distribution and linear viscoelasticity of O/W emulsions stabilised by soy and gluten proteins. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 783–791. <http://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.04.005>

Bigagli, E., Cinci, L., Niccolai, A., Tredici, M. R., Biondi, N., Rodolfi, L., ... Luceri, C. (2017). Safety evaluations and lipid-lowering activity of an *Arthrospira platensis* enriched diet: A 1-month study in rats. *Food Research International*, 102(May), 380–386. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.011>

Chan, M., Ho, S., Lee, D., Chen, C., Huang, C., & Chang, J. (2013). Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 24–31. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2012.11.017>

Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R. D., Drogui, P., & Surampalli, R. Y. (2018). The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(April), 336–346. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.073>

Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Labavitch, J. M., & VanderGheynst, J. S. (2011). The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. *Process Biochemistry*, 46(10), 1927–1933. <http://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2011.06.021>

Damodaran, S. (2004). Adsorbed layers formed from mixtures of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 328–339. <http://doi.org/10.1016/J.COCIS.2004.09.008>

Davis, J. P., Foegeding, E. A., & Hansen, F. K. (2004). Electrostatic effects on the yield stress of whey protein isolate foams. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34(1), 13–23. <http://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2003.10.014>

Demetriades, K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1997). Physical Properties of Whey Protein Stabilized Emulsions as Related to pH and NaCl. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 62(2).

Ebert, S., Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019). Emulsifying properties of water-soluble proteins extracted from the microalgae: *Chlorella sorokiniana* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Food and Function*, 10(2), 754–764. <http://doi.org/10.1039/c8fo02197j>

Grossmann, L., Ebert, S., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2018). Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*. *Algal Research*, 29(November 2017), 266–276. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.019>

- Grossmann, L., Ebert, S., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019). Formation and Stability of Emulsions Prepared with a Water-Soluble Extract from the Microalga *Chlorella protothecoides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(23), 6551–6558. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05337>
- Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019). Solubility and aggregation behavior of protein fractions from the heterotrophically cultivated microalga *Chlorella protothecoides*. *Food Research International*, *116*, 283–290. <http://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.08.037>
- Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, *128–130*, 227–248. <http://doi.org/10.1016/J.CIS.2006.11.021>
- Ho, Y.-T., Ishizaki, S., & Tanaka, M. (2000). Improving emulsifying activity of ϵ -polylysine by conjugation with dextran through the Maillard reaction. *Food Chemistry*, *68*(4), 449–455. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00220-4](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00220-4)
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, *86*(2), 281–287. <http://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2007.10.004>
- Kothari, R., Pandey, A., Ahmad, S., Kumar, A., Pathak, V. V., & Tyagi, V. V. (2017). Microalgal cultivation for value-added products: a critical enviro-economical assessment. *3 Biotech*, *7*(4). <http://doi.org/10.1007/s13205-017-0812-8>
- Liang, M.-H., Wang, L., Wang, Q., Zhu, J., & Jiang, J.-G. (2018). High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *8398*, 1–19. <http://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>
- Liu, C.-H., & Wu, C.-T. (2010). Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *353*(2–3), 149–156. <http://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2009.11.006>
- Lupatini Menegotto, A. L., Souza, L. E. S. de, Colla, L. M., Costa, J. A. V., Sehn, E., Bittencourt, P. R. S., ... Colla, E. (2019). Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. *LWT*, *114*, 108267. <http://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108267>
- Raposo, M. F. D. J., & De Moraes, A. M. M. B. (2015). Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sciences*, *125*, 32–41. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.018>
- Schwenzfeier, A., Helbig, A., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2013). Food Hydrocolloids Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis* sp. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 258–263. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.002>
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., Eppink, M. H. M., & Gruppen, H. (2014). Effect of charged polysaccharides on the techno-functional properties of fractions obtained from algae soluble protein isolate. *Food Hydrocolloids*, *35*, 9–18. <http://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2013.07.019>

- Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, *102*(19), 9121–9127. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046>
- Serban, M. C., Sahebkar, A., Dragan, S., Stoichescu-Hogea, G., Ursoniu, S., Andrica, F., & Banach, M. (2016). A systematic review and meta-analysis of the impact of *Spirulina* supplementation on plasma lipid concentrations. *Clinical Nutrition*, *35*(4), 842–851. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.09.007>
- Silva, M. E. T. da, Correa, K. de P., Martins, M. A., da Matta, S. L. P., Martino, H. S. D., & Coimbra, J. S. dos R. (2020). Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, *65*, 103711. <http://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.103711>
- Surh, J., Gu, Y. S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2005). Influence of Environmental Stresses on Stability of O / W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by SDS – Fish Gelatin Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 4236–4244. <http://doi.org/10.1021/jf047944i>
- Vaz, B. S., Moreira, J. B., Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 73–77. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>
- Waghmare, A. G., Salve, M. K., Leblanc, J. G., & Arya, S. S. (2016). Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*. <http://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b , as well as Total Carotenoids , Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution *. *Journal of Plant Physiology*, *144*(3), 307–313. [http://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Xi, C., Kang, N., Zhao, C., Liu, Y., Sun, Z., & Zhang, T. (2020). Effects of pH and different sugars on the structures and emulsification properties of whey protein isolate-sugar conjugates. *Food Bioscience*, *33*, 100507. <http://doi.org/10.1016/J.FBIO.2019.100507>
- Yucetepe, A., Saroglu, O., & Ozçelik, B. (2019). Response surface optimization of ultrasound-assisted protein extraction from *Spirulina platensis* : investigation of the effect of extraction conditions on techno-functional properties of protein concentrates. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(7), 3282–3292. <http://doi.org/10.1007/s13197-019-03796-5>

CONCLUSÕES GERAIS

A microalga *S. obliquus* não apresentou toxicidade em ratos Wistar mesmo com ingestão de altas doses da microalga. A proteína da microalga quando misturada a outra fonte proteica, é capaz de promover crescimento, ganho de peso e manutenção dos órgãos dos animais. A ingestão de microalga *S. obliquus* reduziu o teor de triglicerídeos (70 %), índice aterogênico (80 %) e concentração sérica de glicose (42 %), mesmo em uma dieta balanceada. Além disso, não foi observada alteração nos órgãos analisados (fígado, baço e rim), sugerindo o uso da microalga como alimento potencialmente seguro. Portanto, *S. obliquus* pode representar uma fonte sustentável promissora de alimentos funcionais e nutracêuticos para possível prevenção e tratamento de diabetes e dislipidemias.

A inclusão da etapa de separação de proteínas antes da extração de lipídeos é uma alternativa para a produção de óleo com menor teor de pigmentos e interferentes, visto que a maior parte dos pigmentos é separada junto com as proteínas solúveis. O uso da rota proposta gerou um concentrado de proteína solúvel da microalga *Scenedemus obliquus*, livre de cor intensa, e com alta capacidade e estabilidade de formação de espuma e emulsão. O uso de solventes com polaridade baixa é menos eficiente para a extração de pigmentos. Assim, esse tipo de solvente adequa-se à extração do óleo microalgal. O perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Scenedemus obliquus*, desproteïnizada, foi pouco alterado em relação ao óleo extraído da microalga proteinizada.

As proteínas da microalga apresentaram alta estabilidade da emulsão, mesmo utilizando baixas concentrações (0,3 e 0,5 % de concentrado proteico contendo 63 % de proteína). As emulsões formadas a partir da microalga apresentaram resistência a mudança de pH e resistiram a altas concentrações de NaCl (≤ 500 mM), enquanto as proteínas de soja e soro de leite desestabilizaram em pH 4 a 6 e em concentrações acima de 100 mM de NaCl. Portanto, as proteínas da microalga *S. obliquus* possuem boa capacidade para formar emulsões estáveis, resistentes a variação de pH e à presença de sais, sendo assim, uma alternativa de agente emulsificante para uso na indústria de alimentos e aplicação em sistemas alimentares. As proteínas da microalga *Scenedemus obliquus* podem ser úteis como ingredientes em formulações alimentares pela semelhança nos valores de estabilidade da emulsão em comparação com proteína isolada do soro de leite e pela maior capacidade e estabilidade da espuma comparada com a proteína de soja. Assim, a cadeia produtiva do biodiesel pode ser valorada com a separação dessas proteínas, porém, testes em escala piloto e a análise de viabilidade econômica devem ser realizados.