



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

**USO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE
BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 COM APLICAÇÃO DE CAMPOS
MAGNÉTICOS**

MAYARA COPELLO VEIGA

Prof^a Dr^a Lucielen Oliveira dos Santos
ORIENTADORA

Rio Grande, RS
2018

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

**USO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA OBTENÇÃO DE
BIOMASSA DE *Spirulina* sp. LEB 18 COM APLICAÇÃO DE CAMPOS
MAGNÉTICOS**

MAYARA COPELLO VEIGA

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

Prof^a Dr^a Lucielen Oliveira dos Santos
ORIENTADORA

Rio Grande, RS

2018

Ficha catalográfica

V426u Veiga, Mayara Copello.
 Uso de diferentes condições de cultivo para obtenção de biomassa de Spirulina sp. LEB 18 com aplicação de campos magnéticos / Mayara Copello Veiga. – 2018.
 82 p.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.
 Orientadora: Dra. Lucielen Oliveira dos Santos.

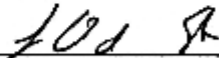
 1. Cultivo de microalgas 2. Biomassa de *Spirulina* 3. Campos magnéticos 4. Proteína I. Santos, Lucielen Oliveira dos II. Título.

CDU 664


Catálogo na fonte: Bibliotecária Claudia Maria Gomes da Cunha CRB10/1942

APROVAÇÃO

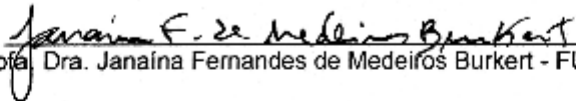
Dissertação defendida por Mayara Copello Veiga e aprovada em 01 de março de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



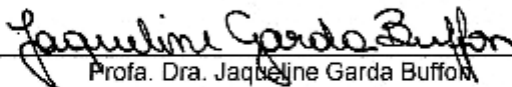
Prof. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos - FURG



Prof. Dra. Raquel Cristine Kuhn - UFSM



Prof. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert - FURG



Prof. Dra. Jaqueline Garda Buffon

*Dedico este trabalho ao meu namorado Vinícius, por
sempre me apoiar e acreditar em mim.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e sabedoria para lidar com os momentos difíceis.

Aos meus pais Luciane e Edison, e irmãos, Nycole e Marcos Vinícius, por todo amor, apoio e confiança, por sempre estarem presentes nos momentos de alegria e de dificuldade, por acreditarem e se orgulharem de mim.

Ao meu namorado Vinícius, pelo apoio, confiança, paciência nos momentos de crise e angústia, por sempre me incentivar e por ser meu companheiro e amigo ao longo destes anos.

À minha avó Carmo, pelo exemplo de força e determinação, pelos melhores conselhos e pelo amor e carinho sempre.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Lucielen Oliveira dos Santos, pelos ensinamentos, orientação, confiança e pelo exemplo de profissional.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Às professoras da banca, Janaína Burkert, Jaqueline Buffon e Raquel Kuhn, pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

À minha família e meus sogros, por me incentivar e entender minha ausência em alguns momentos.

Às minhas dedicadas iniciantes científicas, Mariana Martins e Mariana Oliveira, pela amizade, companheirismo, dedicação e toda ajuda na realização deste trabalho.

À minha amiga Eduarda, pela amizade mesmo longe, pelas conversas descontraídas e por sempre estar disposta a levantar questões para melhorar este trabalho.

Aos meus amigos, Igor, Cleber, Bruno, Sabrine e Tamyris, pelas conversas, pelas risadas e por sempre estarem dispostos a me escutar.

Às técnicas de laboratório e amigas, Luisa e Rejane, por sempre estarem dispostas a ajudar, pelas conversas, pelos conselhos e pelo chimarrão de todo dia.

Ao pessoal do LEB e BIOTEC, especialmente a Aline, pela disponibilidade em sanar minhas dúvidas.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

À FURG, por disponibilizar ensino gratuito e de qualidade.

A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para elaboração deste trabalho.

Muito obrigada!

“If you can dream it, you can do it.”

Walt Disney

RESUMO

Microalgas podem ser consideradas um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação de energia solar em compostos orgânicos. Por apresentar em sua composição aminoácidos essenciais, vitaminas, pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados e sais minerais, bem como elevado teor proteico, a adição da biomassa de *Spirulina* pode ser empregada para melhorar o valor nutricional de produtos alimentícios. A aplicação de campos magnéticos (CM) em cultivos destaca-se devido sua capacidade de interação com funções biológicas dos organismos, através de alterações no crescimento celular. Portanto, o objetivo do estudo foi realizar modificações nas condições de cultivo e aplicar CM no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 para obtenção de biomassa com potencial aplicação em suplementos proteicos. Os cultivos foram realizados durante 16 d em fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L com volume útil de 1,8 L, mantidos em estufas termostatzadas com fotoperíodo de 12 h (claro/escuro), iluminância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aeração de 0,3 vvm e concentração inicial de biomassa de $0,2 \text{ g L}^{-1}$. Avaliou-se nos ensaios a utilização de diferentes temperaturas (30°C e 35°C), concentrações de nitrato de sódio (NaNO_3) ($2,5 \text{ g L}^{-1}$ e $1,875 \text{ g L}^{-1}$) no meio Zarrouk e aplicação de 30 mT e 60 mT, através da fixação de ímãs de ferrite ao redor do fotobiorreator. No cultivo controle, os ímãs foram substituídos por material inerte de mesma dimensão. Durante o cultivo determinou-se concentração de biomassa, pH, parâmetros cinéticos de crescimento e composição proximal da biomassa. Nas melhores condições de cultivo determinou-se a composição proximal, bem como digestibilidade proteica *in vitro* e solubilidade proteica. Obteve-se maior concentração de biomassa ao utilizar 60 mT, 30°C e $1,875 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 , sendo esta 27,1 % superior ao cultivo controle. Não houve diferença na concentração de proteínas na biomassa para os ensaios realizados, mas a aplicação de 60 mT reduziu em 247,5 % a concentração de carboidratos. A biomassa com maior digestibilidade proteica *in vitro* foi encontrada no cultivo controle (78,4 %), porém a maior solubilidade foi encontrada na biomassa obtida no cultivo exposto a 60 mT, sendo 89 % em pH 6. Sendo assim, pode-se concluir que a biomassa obtida no cultivo submetido a exposição de CM é promissora para ser utilizada como ingrediente no desenvolvimento de suplementos proteicos.

Palavras-chave: Microalga. Fotobiorreator tubular. Proteína. Digestibilidade proteica. Solubilidade Proteica.

USE OF DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS FOR THE OBTAINMENT OF BIOMASS *Spirulina* sp. LEB 18 WITH APPLICATION OF MAGNETIC FIELDS

ABSTRACT

Microalgae can be considered one of the most efficient biological systems to transform solar energy into organic compounds. Because it contains essential amino acids, vitamins, pigments, polyunsaturated fatty acids, mineral salts and high protein content. The addition of the biomass of this microalga can be used to improve the nutritional value of food products. The magnetic field (MF) application in cultures has been highlighted due to the ability of the MF to interact with biological functions of organisms, through changes in cell growth. Therefore, the objective of the study was to modify the culture conditions and to apply MF in *Spirulina* sp. LEB 18 to obtain biomass with potential application in protein supplements. The cultures were carried out for 16 d in 2 L vertical tubular photobioreactors with a useful volume of 1.8 L. It kept in thermostatic incubators with 12 h photoperiod (light/dark), 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ illuminance and aeration of 0.3 vvm. The initial concentration was 0.2 g L⁻¹. In the cultures was evaluated the use of different temperatures (30°C and 35 °C), concentrations of sodium nitrate (NaNO₃) (2.5 g L⁻¹ and 1.875 g L⁻¹) in the Zarrouk medium and application of 30 mT and 60 mT, by the fixation of ferrite magnets around the photobioreactor. In the control culture, inert material of the same size replaced the magnets. In the cultivation, biomass concentration, pH, kinetic parameters of growth and proximal composition of the biomass were determined. The proximal composition was determined after obtaining biomass under the best conditions of culture, as well as *in vitro* protein digestibility and protein solubility. The highest biomass concentration was obtained with 60 mT, 30°C and 1.875 g L⁻¹ of NaNO₃, which was 27.1 % higher than the control culture. There was no difference in protein concentration for the assays performed, but the application of 60 mT reduced the carbohydrate concentration by 247.5 %. Biomass with higher protein digestibility *in vitro* was observed in the control culture (78.4 %), but the highest solubility was found in the biomass obtained in the culture exposed to 60 mT, being 89 % in pH 6. Thus, it can conclude that the biomass obtained in the culture submitted to MF application is promising to be used as an ingredient in the development of protein supplements.

Keywords: Microalgae. Tubular photobioreactor. Protein. Protein digestibility. Protein solubility.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de cultivo estudadas para a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.	39
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos dos ensaios com a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.	50
Tabela 3 - Relação entre os parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos utilizando CM e seus respectivos cultivos controle.	51
Tabela 4 - Caracterização da biomassa dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	54
Tabela 5 - Relação entre os resultados de caracterização da biomassa obtidos nos cultivos utilizando CM e seus respectivos cultivos controle.....	55
Tabela 6 - Concentração de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	57
Tabela 7 - Digestibilidade proteica <i>in vitro</i> para a biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 do cultivo controle e com aplicação de CM.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotobiorreator tubular com aplicação de campo magnético.	40
Figura 2 - Concentração de biomassa dos cultivos utilizando 30°C com a) 2,5 g L ⁻¹ de nitrato de sódio e b) 1,875 g L ⁻¹ de nitrato de sódio.	48
Figura 3 - Concentração de biomassa dos cultivos utilizando 35°C com a) 2,5 g L ⁻¹ de nitrato de sódio e b) 1,875 g L ⁻¹ de nitrato de sódio.	48
Figura 4 - pH dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 utilizando 30°C com a) 2,5 g L ⁻¹ de nitrato de sódio, b) 1,875 g L ⁻¹ de nitrato de sódio e 35°C utilizando c) 2,5 g L ⁻¹ de nitrato de sódio e d) 1,875 g L ⁻¹ de nitrato de sódio.	52
Figura 5 - Solubilidade proteica da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	60
Figura AP 1 - Linearização da concentração de biomassa da fase exponencial de crescimento dos cultivos a 30°C e 2,5 g L ⁻¹ de nitrato de sódio.	78
Figura AP 2 - Linearização da concentração de biomassa da fase exponencial de crescimento dos cultivos a 30°C e 1,875 g L ⁻¹ de nitrato de sódio.	78
Figura AP 3 - Linearização da concentração de biomassa da fase exponencial de crescimento dos cultivos a 35°C e 2,5 g L ⁻¹ de nitrato de sódio.	79
Figura AP 4 - Linearização da concentração de biomassa da fase exponencial de crescimento dos cultivos a 35°C e 1,875 g L ⁻¹ de nitrato de sódio.	79
Figura AP 5 - Cultivo de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em fotobiorreatores tubulares com aplicação de 60 mT.	80

NOMENCLATURA

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ANOVA	Análise de variância
CM	Campos magnéticos
DPIV	Digestibilidade proteica <i>in vitro</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
NaNO ₃	Nitrato de sódio
P _{máx}	Produtividade máxima de biomassa
PS	Proteína solúvel
PSS	Concentração de proteínas solúveis no sobrenadante
P _{TOTAL}	Proteína total
SP	Solubilidade proteica
Tg	Tempo de geração ou tempo de duplicação celular
TCA	Ácido tricloroacético
vvm	Volume da corrente gasosa por volume de meio por minuto
X _{máx}	Concentração celular máxima
μ _{máx}	Velocidade específica máxima de crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1	MICROALGAS	27
3.2	<i>Spirulina</i>	27
3.3	PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O CULTIVO MICROALGAL	28
3.4	MEIO DE CULTIVO	30
3.4.1	Carbono.....	30
3.4.2	Nitrogênio.....	31
3.5	CAMPOS MAGNÉTICOS	32
3.6	PROTEÍNAS	34
3.7	ALIMENTOS COM ADIÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Spirulina</i>	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	39
4.2	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DURANTE O CULTIVO	40
4.2.1	Determinação da concentração de biomassa	41
4.2.2	Determinação de pH	41
4.3	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO.....	41
4.4	RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO LÍQUIDO	41
4.5	COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS COM CAMPO MAGNÉTICO E OS ENSAIOS CONTROLE.....	42
4.6	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	42
4.6.1	Determinação da concentração de proteínas	42
4.6.2	Determinação da concentração de carboidratos	43
4.6.3	Determinação da concentração de lipídios.....	43
4.6.4	Determinação do teor de umidade	44
4.6.5	Determinação do teor de cinzas	44
4.7	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA PROTEICA	44
4.7.1	Determinação de proteína total por micro-Kjeldahl	44
4.7.2	Digestibilidade proteica <i>in vitro</i>	45

4.7.3	Solubilidade proteica	46
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1	CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E PARÂMETROS CINÉTICOS.....	47
5.2	RESULTADOS DE pH OBTIDOS DURANTE OS CULTIVOS.....	51
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	53
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA PROTEICA	57
5.5	DIGESTIBILIDADE PROTEICA <i>IN VITRO</i>	58
5.6	SOLUBILIDADE PROTEICA	59
6	CONCLUSÃO.....	62
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXO	75
	APÊNDICES	79

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional tem estimulado a busca por novas fontes de alimentos, principalmente alimentos ricos em proteínas. A utilização de microalgas, como a *Spirulina* para o desenvolvimento de suplementos alimentares se torna interessante devido a elevada concentração de proteína presente nesta microalga. Devido a sua composição, uma parcela do mercado poderia ser abastecida com alimentos contendo proteínas e lipídios microalgais, tornando-se uma alternativa sustentável e de menor custo, entretanto, para que isso ocorra devem ser estudadas novas abordagens tecnológicas para o cultivo de microalgas (DRAAISMA et al., 2013).

A cianobactéria *Spirulina* apresenta elevada concentração de proteínas em sua composição podendo variar conforme as condições do cultivo. Esta microalga é reconhecida como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (FOX, 1996) o que permite sua utilização em formulações alimentares. A utilização desta biomassa em alimentos torna-se atrativa em comparação com a produção convencional de proteínas, pois esta microalga necessita de água, luz, dióxido de carbono e nutrientes inorgânicos para se desenvolver (CHRONAKIS; MADSEN, 2011; VONSHAK, 1997).

Fatores como temperatura, iluminação, pH e disponibilidade de nutrientes no meio durante um cultivo microalgal podem influenciar na composição da biomassa. Neste contexto, alguns parâmetros nos cultivos vêm sendo modificados com o objetivo de estimular o crescimento e induzir a produção de biomoléculas de interesse. Dentre estes parâmetros destacam-se a aplicação de campos magnéticos (CM) (HRISTOV, 2010), o uso de diferentes temperaturas e diferentes concentrações de nutrientes no meio de cultivo (COLLA et al., 2007).

Na tentativa de aumentar a concentração de proteína presente na *Spirulina*, novas tecnologias devem ser testadas dentre elas a utilização de CM. Segundo Hunt et al. (2009), os CM atuam como estimuladores ou inibidores de crescimento em organismos biológicos, podendo ter efeito sobre o metabolismo de micro-organismos, influenciando a síntese de carboidratos, proteínas e acúmulo de aminoácidos essenciais. Em estudos anteriores Deamicì, Costa e Santos (2016) utilizando esta microalga, obtiveram aumento no crescimento celular e na concentração proteica da biomassa, quando esta foi exposta a aplicação de CM de 60 mT por 24 h d⁻¹.

Além disso, a modificação nas condições de cultivo como a utilização de diferentes concentrações de fonte de nitrogênio no meio e o uso de diferentes temperaturas podem aumentar a concentração proteica e o crescimento celular das microalgas (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008). Além destas modificações a aplicação de CM podem contribuir com o conteúdo proteico da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. Segundo estudo de Colla et al. (2007) avaliando diferentes concentrações de nitrato de sódio (NaNO_3) em diferentes temperaturas para o cultivo da microalga *Spirulina platensis*, houve aumento da concentração proteica para 71 % ao utilizar a concentração de $1,875 \text{ g L}^{-1}$ a 35°C em comparação com o cultivo controle ($2,5 \text{ g L}^{-1}$ a 30°C) contendo 65 %.

A maior produção de biomassa com elevado conteúdo proteico pode ser uma alternativa para alimentação humana, pois compete favoravelmente em termos de quantidade e qualidade com as proteínas convencionais. Proteínas alimentares são definidas devido sua funcionalidade em produtos alimentícios e por apresentarem fácil digestão. Na indústria de alimentos, as proteínas de soja e do leite são as mais utilizadas devido suas propriedades funcionais e valor nutritivo (AGARWAL et al., 2015). Fontes alternativas de proteínas para alimentação humana precisam ser desenvolvidas para atender a demanda populacional. As proteínas microalgais competem favoravelmente com as fontes convencionais em termos de qualidade e quantidade, o que torna a biomassa microalgal uma fonte promissora de proteína alimentar. A suplementação alimentar é o consumo de determinado nutriente quando o indivíduo não consegue atender suas necessidades nutricionais através da alimentação. A suplementação proteica pode ser utilizada para atender indivíduos com necessidades especiais, como idosos, recém-nascidos e praticantes de atividade física intensa (ALVES; LIMA, 2009).

A partir disto, este estudo teve como objetivo aliar a aplicação de CM, diferentes temperaturas e diferentes concentrações de NaNO_3 com intuito de obter biomassa com potencial aplicação em suplementos proteicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 com potencial uso no desenvolvimento de suplementos proteicos, a partir da aplicação de campos magnéticos e modificações nas condições de cultivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes temperaturas, concentrações de nitrato de sódio e aplicação de campo magnético durante cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18;
- Avaliar digestibilidade e solubilidade proteica da biomassa microalgal.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICROALGAS

Microalgas são micro-organismos fotoautotróficos com requerimentos nutricionais relativamente simples, filogeneticamente podem ser procarióticos ou eucarióticos (OLAIZOLA, 2003). A biomassa produzida pelo cultivo de microalgas destina-se às mais diversas aplicações como, suplemento alimentar, produção de carotenoides, vitaminas, ração animal ou fonte de biocombustíveis (ANDRADE; COSTA, 2008). Microalgas são consideradas organismos promissores para a produção de biomassa devido a sua capacidade de crescer rapidamente e produzir quantidades significativas de biomoléculas, como proteínas, carboidratos e lipídios (CHISTI, 2007).

A alteração nos parâmetros de cultivo das microalgas pode influenciar no crescimento e na composição, modificando estrutura e composição bioquímica (nutrientes, vitaminas, enzimas e toxinas) (VONSHAK, 1997). Devido a isso, estudos na alteração das condições de cultivos são realizados com intuito de favorecer o crescimento e a produção de biomoléculas de interesse (RODRIGUES et al., 2010; SOLOVCHENKO et al., 2008; SUBHASH et al., 2014; XIE et al., 2017).

As cianobactérias, também conhecidas como algas verde azuladas, apresentam maior diversidade morfológica entre os organismos procarióticos (GIOVANNONI et al., 1988), diferenciando-se devido ao uso de água como doador de elétrons e produção de oxigênio, que é liberado para o meio ambiente. Estes micro-organismos possuem capacidade de se adaptar em ambientes, sendo tolerantes a mudanças de pH, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Estas características podem estar relacionadas à condição procarionte e a simplicidade de suas células. Algumas espécies necessitam de nutrientes, água e luz para seu crescimento, que possui altas velocidades (CHRONAKIS, 2001).

3.2 *Spirulina*

A microalga *Spirulina* (*Arthrospira*) é uma cianobactéria filamentosa denominada de alga azul pertencente ao grupo das *Cyanophytas*. Sua morfologia consiste na presença de tricomas cilíndricos multicelulares que se organizam em uma forma espiralada (VONSHAK, 1997).

A *Spirulina* é utilizada na nutrição humana devido ao seu elevado conteúdo de proteínas e seu excelente valor nutritivo. Sua biomassa vem sendo produzida comercialmente há cerca de 30 anos, sendo que 60 % a 70 % de sua massa seca é constituída por proteínas (BECKER, 2007). Desde 1981, esta microalga foi aceita legalmente como fonte de proteínas pelo FDA (*Food Drug Administration*) podendo ser comercializada como alimento (FOX, 1996). Existem evidências de que a ingestão de pequenas quantidades de biomassa microalgal (na maioria dos gêneros *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina*) pode afetar de forma positiva a fisiologia de animais, auxiliando o sistema imunológico (BELAY, 2002).

Quando cultivada em condições ideais de nutrientes, a biomassa de *Spirulina* é rica em proteínas, porém quando se realiza a restrição de algum destes nutrientes, altera-se a composição da microalga. Como por exemplo, a diminuição da concentração de nitrogênio no meio ocasiona a diminuição da síntese proteica. A partir disto, o conteúdo de proteína pode ser convertido em compostos de armazenamento de energia, como carboidratos (DISMUKES et al., 2008).

A temperatura ótima para o crescimento desta microalga encontra-se entre 30°C e 35°C, temperaturas acima disto podem ocasionar efeito deletério nesta cianobactéria (VONSHAK, 1997). Para o cultivo da *Spirulina*, o pH do meio deve ser mantido alcalino, pois esta microalga cresce de forma natural em ambientes com elevada salinidade e alcalinidade. De acordo com Costa et al. (2002), o intervalo de pH para o cultivo de *Spirulina* deve estar entre 8,3 e 11, pois nesta faixa a cianobactéria possui maior taxa fotossintética.

3.3 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O CULTIVO MICROALGAL

Diversos fatores podem influenciar no cultivo de microalgas, desde temperatura, luminosidade, pH, aeração, concentração salina e disponibilidade de nutrientes no meio (JOHANSEN, 2012). Estes fatores influenciam na composição da microalga, ou seja, em sua estrutura, valor nutricional, digestibilidade e em sua composição bioquímica (nutrientes, enzimas, toxinas biossintetizadas) (VONSHAK, 1997).

Os cultivos microalgais podem ser realizados em sistemas abertos ou fechados. Os sistemas abertos, geralmente são conduzidos em lagoas ao ar livre e sem controle em alguns parâmetros como luminosidade e temperatura, deixando assim os cultivos mais expostos a contaminantes e variações. Em sistemas fechados, no entanto, é possível controlar o funcionamento do sistema, permitindo maior controle dos parâmetros de cultivo ocasionando

maior eficiência fotossintética e, conseqüentemente obtendo maiores concentrações de biomassa (SU et al., 2008).

Um dos principais parâmetros para o crescimento de microalgas é a temperatura, a qual exerce influência sobre as reações metabólicas, afetando também a natureza do metabolismo, a concentração de biomassa, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa. A temperatura do ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008).

Colla et al. (2007) estudaram as concentrações de 0,625; 1,25; 1,875 e 2,5 g L⁻¹ de NaNO₃ em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) no cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* juntamente com a influência de diferentes temperaturas (30°C e 35°C). Os autores observaram que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi influenciada apenas pela temperatura, e a temperatura de 30°C estimulou o crescimento da microalga, obtendo-se concentração de biomassa máxima de 0,92 g L⁻¹. Além disso, obteve-se concentração de proteínas de 70,15 % ao associar a concentração de 1,875 g L⁻¹ de NaNO₃ e temperatura de 35°C, aumentando em 12,6 % a concentração proteica em relação ao cultivo controle utilizando 2,5 g L⁻¹ de NaNO₃ a 30°C.

A influência da luz no desenvolvimento das microalgas está relacionada ao fotoperíodo (tempo de exposição à luz), intensidade e ao tipo de luz (cor). O cultivo sob alta intensidade luminosa é responsável pela foto-oxidação e foto-inibição. A foto-oxidação pode causar efeitos letais para as células, o que pode levar à perda total da cultura. Já a foto-inibição pode diminuir o crescimento microalgal (OLAIZOLA, 2003).

Para que os componentes do meio de cultura sejam devidamente absorvidos, deve-se haver controle do pH, o qual é influenciado pelas proporções entre formas de carbono dissolvidas na água de cultivo. O crescimento de microalgas pode ser afetado por variações nos níveis de pH, através de alteração no consumo do carbono disponível, o que pode ocasionar interferência na fotossíntese (ISMAIEL, EL-AYOUTY, PIERCEY-NORMORE, 2016).

A aeração também contribui para o crescimento das microalgas, pois proporciona a homogeneização das células. Além disso, facilita a transferência de gases, previne a sedimentação e ajuda no contato entre as células e os nutrientes (LITCHFIELD, 1977; RICHMOND, 2004).

A salinidade é outro fator importante a ser considerado, pois pode afetar o crescimento e a composição da célula, sendo que cada microalga possui uma salinidade

considerada ótima. A variação na salinidade do meio pode prejudicar o crescimento da microalga devido ao estresse osmótico e iônico (BRAND, 1984).

3.4 MEIO DE CULTIVO

A composição do meio de cultura é uma simulação do meio natural em que a espécie habita e deve conter sais minerais, algumas vitaminas e alguns elementos traços. Os nutrientes necessários dividem-se em macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg, Si e Fe) e micronutrientes (Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Co, Ca, Na, Se e Ni) (LOURENÇO, 2006).

3.4.1 Carbono

O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para as microalgas, pois é o componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídios). Em cultivos de microalgas ocorre uma relação complexa entre pH e concentração de dióxido de carbono, devido ao equilíbrio químico entre as espécies ($\text{CO}_2(\text{aq}) \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$) (RICHMOND, 2004).

A adição da fonte de carbono aos cultivos microalgais possibilita maior rendimento em biomassa, pois além do assimilado através do metabolismo fotossintético haverá maior disponibilidade de carbono, o que pode resultar em maior produção de carboidratos (DERNER, 2006; RICHMOND, 2004). Os carboidratos são os principais derivados da fotossíntese a partir do metabolismo de fixação de carbono pelas microalgas. Estes podem ser acumulados como materiais de reserva (amido), ou tornarem-se componentes principais das paredes celulares (CHEN et al., 2013).

A fotossíntese é um processo complexo que ocorre em duas fases. A fase fotoquímica converte a energia luminosa em energia química, proporcionando um redutor bioquímico (NADPH) e um composto de alta energia (ATP). A fase química utiliza os produtos obtidos na fase clara (NADPH e ATP) na redução do CO_2 a carboidrato (VONSHAK, 1997).

Na fase fotoquímica as enzimas ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e fosforibuloquinase são responsáveis pela fixação do CO_2 e catalisam a regeneração do aceptor de CO_2 . Nas cianobactérias, a fixação de CO_2 ocorre via ciclo de Calvin-Benson, onde os carboidratos são os principais derivados da fotossíntese a partir do

metabolismo de fixação de carbono pelas microalgas. Estes podem ser acumulados como materiais de reserva, ou tornarem-se componentes principais das paredes celulares (BAROUKH et al., 2015).

3.4.2 Nitrogênio

O nitrogênio é componente do metabolismo primário das células, além de três classes de substâncias estruturais, proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes, dentre estes se destacam as clorofilas e ficobilinas. Este macronutriente é requerido para a síntese de aminoácidos que irão participar da síntese de proteínas e outros componentes celulares como a ficocianina (RICHMOND, 2004).

Elevadas concentrações de nitrogênio no meio de cultivo possuem tendência a aumentar a concentração de proteínas e clorofilas presentes na microalga. Em baixas concentrações podem reduzir a velocidade de crescimento celular, sendo nitrato ou ureia as fontes mais utilizadas para o cultivo de microalgas (PINHO; TORRES; SANT'ANNA, 2010). De acordo com Rajoka et al. (2006), a utilização de diferentes fontes de nitrogênio no meio ocasiona mudanças na síntese de proteínas e pigmentos.

A utilização de nitrato como fonte de nitrogênio no meio de cultivo garante altas concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, o que justifica o uso dos meios de cultivo Zarrouk (1966), Paoletti et al. (1975) e Schollosser (1982) que empregam NaNO_3 e nitrato de potássio (KNO_3) em sua composição (MATSUDO, 2006).

Abd El-Baky, El Baz e El-Baroty (2008) também investigaram diferentes concentrações de NaNO_3 (0,0; 0,624; 1,25; 1,78 e 2,5 g L^{-1}) no meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), para o cultivo de *Spirulina maxima* com o objetivo de aumentar os níveis de carotenoides, ficocianina, compostos fenólicos e clorofila. Com o aumento da concentração de NaNO_3 (2,5 g L^{-1}) os níveis de clorofila aumentaram em 111 % e a concentração de ficocianina em 134 % em comparação com os ensaios sem adição de NaNO_3 .

A utilização de ureia como fonte de nitrogênio promove ganho energético ao meio de cultivo, pois sua hidrólise espontânea em meio alcalino forma amônia, que é facilmente assimilada pela *Spirulina* (MATSUDO, 2006).

Costa et al. (2002) estudaram o crescimento de *Spirulina platensis* em água coletada da Lagoa Mangueira (RS) suplementada com ureia e bicarbonato de sódio. A água da lagoa apresenta baixas concentrações dos nutrientes necessários para o desenvolvimento desta microalga, sendo necessária a adição de nutrientes para prevenir o decréscimo da

concentração celular. Para realização dos cultivos foram utilizados erlenmeyer de 2 L e concentração celular inicial de 0,1 g L⁻¹. Neste estudo, foram testadas as concentrações de 0,0; 2,88; 9,84; 16,8 e 19,70 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio e 0,0; 1,7; 5,85; 10,0 e 11,7 mg L⁻¹ de ureia. Os autores observaram que a adição de 5,85 mg L⁻¹ de ureia, sem adição de bicarbonato de sódio, aumentou a produção de biomassa em 2,67 vezes em comparação ao ensaio somente com água da Lagoa, sem suplementação de nutrientes.

3.5 CAMPOS MAGNÉTICOS

Campos magnéticos (CM) correspondem à região onde atuam forças magnéticas. Os CM podem ser classificados como uniformes, contínuos ou alternados, sendo que campos uniformes mantêm a intensidade em determinado local, campos contínuos mantêm a intensidade ao longo do tempo e os campos alternados variam a intensidade aplicada. A unidade utilizada pelo sistema internacional (SI) é o tesla (T) (BURNS; MACDONALD, 1975).

Os efeitos biológicos causados pelo CM dependem da intensidade, da frequência, do tempo de exposição e da orientação dos polos. Os efeitos causados pelo CM podem ser nulos, inibitórios ou estimulantes (HUNT et al., 2009). As respostas biológicas à aplicação de CM não são lineares. Atribui-se os efeitos de estímulo ou inibição dos campos a mudanças das membranas, mudanças na síntese de DNA, alterações do fluxo de íons através das membranas ou mudanças nas estruturas de biomoléculas (SANTOS, 2008).

A utilização de tratamentos magnéticos no cultivo microalgal apresenta certas vantagens, como não apresentar toxicidade e não ser poluente, além disso, é uma tecnologia segura e com menor custo (TU et al., 2015). A influência da exposição de microalgas ao CM vem sendo realizada a fim de entender quais seus efeitos no metabolismo destas células. Estudos procuram mostrar a possibilidade de interação dos CM, nas diferentes aplicações biotecnológicas, na tentativa de identificar quais os parâmetros mais favoráveis ao processo, como intensidades, tempos de exposição e tipos de campo (LI et al., 2007; SMALL; HÜNER; WAN, 2012). Os bioefeitos dos CM no cultivo de microalgas necessitam de mais pesquisas, porém com os poucos trabalhos reportados na literatura, é possível observar resultados positivos em relação ao crescimento e produção de biomassa. No entanto, se faz necessário estudar diferentes intensidades de CM e diferentes períodos de exposição, bem como diferentes espécies de microalgas (DEAMICI et al., 2016).

Hirano, Ohta e Abe (1998) avaliaram os efeitos de diferentes CM (0,05 – 70 mT) no cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* IAM M – 135 e verificaram que com o aumento da intensidade magnética houve aumento da eficiência fotossintética. Ao aplicar 10 mT obteve-se velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de 0,22 d⁻¹, enquanto no cultivo controle, sem aplicação de CM, a $\mu_{\text{máx}}$ foi 0,15 d⁻¹. A concentração de carboidratos aumentou 1,2 vezes ao utilizar 10 mT em relação ao cultivo controle, e o mesmo foi observado para a concentração de ficocianina que aumentou em 54 %. O crescimento foi inibido quando a microalga *S. platensis* foi exposta a CM acima de 40 mT, enquanto os conteúdos de clorofila e β -caroteno não foram afetados pela presença do CM. Quando foi aplicado 70 mT, houve decréscimo de 20 % na concentração de ficocianina e diminuição da concentração de carboidratos em 0,6 vezes, quando comparado ao cultivo controle.

Li et al. (2007) cultivaram *Spirulina platensis* durante 7 dias com aplicação de CM máximo de 550 mT a fim de avaliar os efeitos do CM no crescimento e na composição nutricional da microalga. Os melhores resultados foram alcançados com 250 mT, onde houve aumento da massa seca em 47 % em 6 d de cultivo, e aumento da concentração de clorofila *a* em 31 % em relação ao cultivo controle. Ao utilizar 550 mT obteve-se crescimento da microalga até 4 d de cultivo, após este período houve diminuição na concentração de biomassa ocasionando morte celular no 6º d. Os autores concluíram que a intensidade de 250 mT deve ser aplicada a fim de aumentar o crescimento da microalga quando cultivada em fermentadores *air-lift*.

Tu et al. (2015) avaliaram o efeito do CM (0,5 mT – 500 mT) na concentração de clorofila *a*, oxigênio dissolvido e taxa de produção de oxigênio fotossintético de *Scenedesmus obliquus* FACHB-276 em sistema de tratamento de efluentes. A utilização de 100 mT durante 0,5 h aumentou a produção de clorofila *a* em 11,5 % e a taxa de produção de oxigênio em 24,6 % em relação ao controle.

Deamici et al. (2016) avaliaram o efeito de 30 mT e 60 mT no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 em períodos de exposição de 1 h d⁻¹ e 24 h d⁻¹ utilizando ímãs de ferrite. Os autores relataram que o cultivo submetido a 30 mT durante 1 h d⁻¹ obteve maior concentração de proteína (64 %) em comparação ao cultivo controle (60 %).

Em outro estudo Deamici, Costa e Santos (2016) estudaram o efeito de CM durante o cultivo da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 com intensidade de 60 mT por 1 h d⁻¹ ou 24 h d⁻¹, avaliando o crescimento da microalga, bem como a concentração de proteínas na biomassa. A concentração de proteínas observada foi 14,3 % maior quando utilizou-se 60 mT durante 24 h d⁻¹.

Bauer et al. (2017) estudaram a influência de 30 mT e 60 mT no cultivo de *Chlorella kessleri* LEB 113 durante 1 h d⁻¹ e 24 h d⁻¹. A utilização de 60 mT durante 1 h d⁻¹ estimulou o crescimento da microalga em 82,8 % em comparação com o cultivo controle, além disso, estas condições proporcionaram estímulo na produção de clorofila *a* em 38,9 %.

3.6 PROTEÍNAS

As proteínas são as macromoléculas mais versáteis dos organismos vivos, são polímeros complexos, formados por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, e por grande número de aminoácidos. A partir das proteínas diferentes organismos podem gerar produtos diversos, como enzimas, hormônios, anticorpos, fibras musculares e transportadores, possuindo atividades biológicas distintas. Proteínas podem interagir entre si e com outras biomoléculas o que aumenta sua funcionalidade (MONTERO-LOMELI; RUMJANEK, 2013).

A organização espacial de uma proteína é resultante do tipo de aminoácidos que a compõem e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros. A estrutura de proteínas pode ser desestabilizada por mudanças de pH, temperatura, adição de sais, pressão, forças de cisalhamento, ou até mesmo combinação destas condições (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Durante o processamento de alimentos podem ocorrer alterações na estrutura da proteína, porém algumas delas são desejáveis modificando sua estrutura e funcionalidade intencionalmente. As proteínas produzidas biologicamente podem ser utilizadas na alimentação, entretanto, proteínas alimentares são definidas por apresentarem fácil digestão e devem ser utilizáveis funcionalmente em produtos alimentícios (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Proteínas de qualidade inferior carecem de um ou mais aminoácidos em sua composição, já as proteínas consideradas superiores provêm de alimentos com todos aminoácidos essenciais, mantendo um equilíbrio proteico e permitindo o crescimento e reparo de tecidos (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2002). Segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010), fontes alternativas de proteínas para alimentação humana precisam ser desenvolvidas para atender a demanda populacional. No entanto, a adequação dessas novas fontes de proteínas para uso em alimentos depende de seu custo e de sua capacidade de cumprir a função normal dos ingredientes proteicos. Neste contexto enquadram-se as proteínas obtidas a partir de micro-organismos.

As proteínas microalgais competem favoravelmente, em termos de qualidade e quantidade, com as fontes convencionais como soja, ovos e peixe, tornando os organismos unicelulares uma fonte promissora de proteína alimentar (EJIKE et al., 2017). A composição bioquímica das microalgas depende das condições de cultivo utilizadas, o que acarreta modificações no valor nutricional da biomassa que será utilizada como ingrediente alimentar (BECKER, 2007). A *Spirulina* é utilizada na alimentação humana devido a seu elevado teor proteico e valor nutritivo, atribui-se a esta cianobactéria possíveis efeitos promotores de saúde, como diminuição de hiperlipidemia, supressão da hipertensão, proteção contra falha renal e supressão de elevado nível de glicose (SPOLAORE et al., 2006).

A qualidade nutricional de uma proteína é determinada pelo conteúdo, proporção e disponibilidade de seus aminoácidos, sendo um dos aspectos mais importantes para definir o valor nutricional de novos ingredientes e alimentos (EJIKE et al., 2017). O uso de ensaios biológicos *in vivo* para avaliar a qualidade da proteína usando animais experimentais é demorado e com custo elevado, enquanto os ensaios *in vitro* que simulam a digestão de proteínas, com enzimas proteolíticas padronizadas, oferecem uma maneira efetiva de analisar grande número de amostras (MIŠURCOVÁ et al., 2010). Esses métodos podem complementar a composição de nutrientes e o perfil de aminoácidos, além disso, apresentam menor custo que os testes *in vivo*, não exigem testes em animais, os resultados são obtidos rapidamente e podem-se utilizar pequenas quantidades de amostra (BECKER, 2007).

Lisboa, Pereira e Costa (2016) avaliaram a digestibilidade proteica da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e seus hidrolisados proteicos, estes hidrolisados foram obtidos a partir de hidrólise enzimática utilizando a enzima Protemax 580 L. A biomassa microalgal apresentou digestibilidade proteica de 74,1 %, enquanto que os hidrolisados com elevado grau de hidrólise apresentaram valores próximos a 100 % e os hidrolisados com baixo grau de hidrólise de 91,5 % de digestibilidade. Resultados semelhantes foram reportados por Mišurcová et al. (2010) que obtiveram 71,4 % de digestibilidade proteica ao analisar a biomassa de *Spirulina pacifica* e 81,9 % com biomassa de *Spirulina platensis*.

3.7 ALIMENTOS COM ADIÇÃO DE BIOMASSA DE *Spirulina*

As algas verdes azuladas são talvez a forma de vida mais antiga na Terra e têm sido utilizadas como fonte de alimento humano desde tempos remotos. Microalgas possuem a capacidade de incrementar o conteúdo nutricional de alimentos, afetando de maneira positiva a saúde humana. Devido a isso a aplicação de microalgas na alimentação objetivou estudos de

seu cultivo para melhorar ainda mais sua composição nutricional (AQUARONE et al., 2001; LOURENÇO, 2006).

Dentre as proteínas presentes na biomassa de *Spirulina* encontram-se principalmente as ficobiliproteínas. Sendo estas responsáveis pela captação de luz durante a fotossíntese e por atuar como mecanismos de reserva de nitrogênio. Quando em situações de estresse, onde há deficiência de fonte de nitrogênio, as ficobiliproteínas são degradadas liberando nitrogênio para os processos metabólicos essenciais. Além disso, as proteínas encontradas nesta microalga apresentam todos os aminoácidos essenciais em sua composição (LOURENÇO, 2006).

Por apresentar elevada concentração de proteínas, a *Spirulina* é uma excelente opção de suplemento nutricional para os vegetarianos, sendo uma alternativa às proteínas de origem animal. Este suplemento tem se tornado cada vez mais procurado por atletas e pessoas que buscam uma vida mais saudável (KARKOS et al., 2011). Além de possuir elevada concentração de proteínas em sua composição a biomassa de *Spirulina* exibe alta digestibilidade (74,1 %) (LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016). Avaliações nutricionais demonstraram que a biomassa desta microalga é benéfica como suplemento alimentar e pode ser utilizada para substituição das fontes convencionais de proteínas (BECKER, 2007).

Estudos utilizando a biomassa de *Spirulina* em alimentos vêm sendo realizados a fim de preparar novos alimentos como hipercalóricos, *shakes* para idosos (SANTOS et al., 2016), biscoitos (BATISTA et al., 2017; MORAIS; MIRANDA; COSTA, 2006), pães (FIGUEIRA et al., 2011) e massas (FRADIQUE et al., 2010).

Morais, Miranda e Costa (2006) elaboraram biscoitos de chocolate contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina* a fim de avaliar as características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. As concentrações de biomassa adicionadas nos biscoitos foram 1 %, 3 % e 5 % (v/v). Os biscoitos contendo 1 % da biomassa apresentaram 86,9 % de digestibilidade e maior aceitação pelos julgadores na análise sensorial com 58 % de intenção de compra pelos julgadores.

Fradique et al. (2010) desenvolveram massa do tipo espaguete adicionando 0,5 %, 1 % e 2 % ($m\ m^{-1}$) de biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina maxima* e compararam com a massa espaguete de semolina padrão. Neste estudo foram avaliados os parâmetros de qualidade das massas cruas e cozidas, como tempo de cozimento, textura e índice de absorção de água. As massas adicionadas de biomassa de *Spirulina* apresentaram tempo de cozimento de 5 min, semelhante a amostra controle (massa sem adição de biomassa). As amostras contendo 0,5 % de *Chlorella* apresentaram maior aceitação pelos julgadores.

Figueira et al. (2011) desenvolveram pães sem glúten utilizando farinha de arroz e pães enriquecidos com biomassa de *Spirulina platensis* (2 % a 5 %) para aumentar o teor proteico dos pães. Quando comparados ao pão não enriquecido, a adição de biomassa aumentou em 39,0 % o conteúdo proteico e não houve diferença significativa na análise sensorial para os pães adicionados de biomassa.

Santos et al. (2016) desenvolveram *shakes* para idosos, um produto foi enriquecido com 750 mg de biomassa de *Spirulina* a cada 100 g de produto, e o outro foi desenvolvido sem adição de biomassa. Os produtos foram submetidos a análise sensorial e estimativa de vida útil. O produto desenvolvido sem adição de biomassa resultou em 79 % de intenção de compra dos julgadores, enquanto o produto adicionado de biomassa apresentou 55 % e tempo de validade de 19 meses, sendo que para o produto sem adição de *Spirulina* o tempo de validade passou para 24 meses.

Park e Lee (2016) realizaram estudo utilizando suplementação de *Spirulina* com o intuito de obter respostas no metabolismo de idosos coreanos, sendo selecionados 78 idosos. Metade deles utilizou 8 g de biomassa de *Spirulina* diariamente como suplementação e a outra metade foi suplementada com placebo (100 % amido). Os idosos que utilizaram a biomassa como fonte de suplementação apresentaram diminuição do colesterol de 191,1 mg dl⁻¹ para 179,2 mg dl⁻¹ após 12 semanas.

Carvalho et al. (2016) desenvolveram suplementos para praticantes de atividade física, um com 0,5 % m m⁻¹ de biomassa de *Spirulina* e outro sem adição de biomassa. Os suplementos desenvolvidos foram: repositores de eletrólitos, suplementos para recuperação muscular e intensificadores musculares, estes suplementos foram comparados com amostras comerciais. Não houve diferença significativa na aceitação sensorial dos repositores de eletrólitos e nos suplementos para intensificação muscular. O suplemento desenvolvido para recuperação muscular sem adição de biomassa obteve 73 % de aceitação pelos julgadores, enquanto o suplemento comercial obteve 55 %, já o suplemento com adição de 0,5 % de biomassa obteve 72 % de aceitação.

Batista et al. (2017) avaliaram a adição de biomassa das microalgas *Arthrospira platensis* F & M-C256, *Chlorella vulgaris* Allma, *Tetraselmis suecica* F & M-M33 e *Phaeodactylum tricornutum* F & M-M40 como ingredientes inovadores para melhorar as propriedades funcionais de biscoitos. As concentrações de 2 % e 6 % (m m⁻¹) de biomassa foram testadas e comparadas ao controle, sem adição de biomassa. As propriedades sensoriais e físicas dos cookies foram avaliadas durante 8 semanas, apresentando alta estabilidade de cor e textura. Os cookies preparados com biomassa de *A. platensis* e *C. vulgaris* apresentaram

concentrações de proteínas de 7,8 % e 8 %, respectivamente, enquanto a amostra controle apresentou 4,9 %. Todos os biscoitos avaliados, com e sem adição de biomassa microalgal, apresentaram digestibilidade proteica *in vitro* de 90 %. O biscoito contendo 2 % de biomassa de *A. platensis* apresentou 45 % de intenção de compra pelos julgadores, obtendo a maior aceitação global a partir de análise sensorial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para este estudo foi utilizada a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 isolada da Lagoa Mangueira localizada no município de Santa Vitória do Palmar – RS (MORAIS et al., 2008). Para manutenção do inóculo, foi utilizado meio de cultivo Zarrouk (ANEXO 1) (ZARROUK, 1966). Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L com volume útil de 1,8 L, mantidos em estufas termostatizadas com fotoperíodo de 12 h (claro/escuro), iluminância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e aeração de 0,3 vvm (volume de ar volume de meio⁻¹ min⁻¹) (DEAMICI; COSTA; SANTOS, 2016; MENESTRINO, 2017). A iluminância foi medida através de luxímetro (Instrutherm, LD-209, Brasil) e os ensaios foram realizados com agitação contínua, fornecida por injeção de ar comprimido, passando por filtro de lã de vidro para esterilização.

A concentração de biomassa inicial foi $0,2 \text{ g L}^{-1}$ e os ensaios foram realizados durante 16 dias (MENESTRINO, 2017), sendo testadas temperaturas de 30°C e 35°C , bem como diferentes concentrações de nitrato de sódio ($2,5 \text{ g L}^{-1}$ e $1,875 \text{ g L}^{-1}$) em meio Zarrouk (COLLA et al., 2007), conforme apresentado na Tabela 1. Nos ensaios com aplicação de CM foram estudadas as intensidades de 30 mT e 60 mT (DEAMICI; COSTA; SANTOS, 2016) com período de exposição do cultivo ao CM de 24 h d^{-1} durante o período de cultivo (16 d).

Tabela 1 - Condições de cultivo estudadas para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

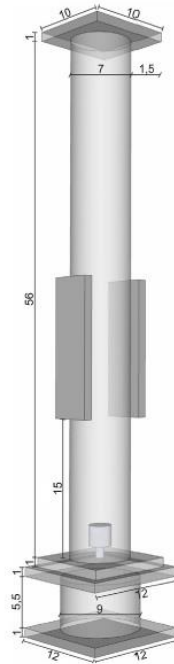
Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração de NaNO ₃ (g L ⁻¹)	Aplicação de CM* (mT)
1	30	2,50	-
2	30	2,50	30
3	30	2,50	60
4	35	2,50	-
5	35	2,50	30
6	35	2,50	60
7	30	1,875	-
8	30	1,875	30
9	30	1,875	60
10	35	1,875	-
11	35	1,875	30
12	35	1,875	60

*CM = Campo magnético

A aplicação de CM durante os cultivos foi realizada a partir da adaptação de ímãs de ferrite ao redor dos fotobiorreatores (Figura 1). Para todos os ensaios, foram realizados cultivos controle sem aplicação de CM mantendo-se as condições de temperatura, concentração de nitrato de sódio, aeração e luminosidade. Nos cultivos controle os ímãs foram substituídos por material inerte, a fim de manter a uniformidade luminosa recebida pela microalga.

A evaporação da água durante os cultivos foi controlada por meio da manutenção do volume das culturas com reposição diária de água destilada estéril. Os cultivos foram realizados em triplicata.

Figura 1 - Fotobiorreator tubular com aplicação de campo magnético.



Fonte: Deamici et al. (2016).

4.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DURANTE O CULTIVO

Diariamente nos cultivos foram retiradas alíquotas de 5 mL para determinação da concentração de biomassa e pH.

4.2.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada mediante leitura da densidade ótica dos cultivos em espectrofotômetro (QUIMIS, Q7980RM, BRASIL), com comprimento de onda de 670 nm, utilizando curva padrão que relaciona a densidade ótica e a massa seca de biomassa (COSTA et al., 2002).

4.2.2 Determinação de pH

O pH dos cultivos foi avaliado por meio da leitura direta em pHmetro digital (KASVI, K39-2014B, CHINA).

4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

Os parâmetros de crescimento determinados nos cultivos foram a produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$) (Equação 1), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) (Equação 2), concentração de biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$) e tempo de geração (t_g) (Equação 3).

$$P_{\text{máx}} = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)} \quad (1)$$

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}} \quad (3)$$

4.4 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO LÍQUIDO

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recuperada do meio líquido através de centrifugação (HITACHI, himac CR-GIII, Japão) (9500 x g; 20°C; 20 min), ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada (9500 x g; 20°C; 10 min) para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa centrifugada foi seca em estufa com circulação de ar por 24 h a 40°C, após esse período a biomassa foi homogeneizada utilizando gral e pistilo. As amostras

secas foram mantidas em freezer a -20°C para posterior caracterização quanto ao teor de proteínas, lipídios, carboidratos, cinzas e umidade.

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS COM CAMPO MAGNÉTICO E OS ENSAIOS CONTROLE

A eficiência de aplicação dos CM para os resultados da caracterização da biomassa foi calculada a partir da Equação 4 (BAUER et al., 2017; DEAMICI et al., 2016), onde o valor da eficiência corresponde à diferença percentual da resposta avaliada com a aplicação de CM (C_{CM}), em relação as respostas obtidas nos CC (C_{controle}).

$$\text{Eficiência } (\eta) (\%) = \frac{(C_{\text{CM}} - C_{\text{Controle}})}{C_{\text{CM}}} \cdot 100 \quad (4)$$

4.6 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

As biomassas obtidas ao final dos cultivos foram avaliadas quanto a concentração de proteínas, carboidratos, lipídios, cinzas e umidade. Para realização das determinações de proteínas e carboidratos foi necessário preparar extratos aquosos com a biomassa. A partir de 5 mg de biomassa microalgal seca foi adicionado 10 mL de água destilada, que foram sonicados em sonda ultrassônica (COLE PARMER, CPX 130, EUA) por 10 min, em ciclos de 59 s (59 s ligada e 59 s desligada). O conteúdo de lipídios, cinzas e umidade foram determinados utilizando a biomassa seca.

4.6.1 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas nas biomassas foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina. Para realização desta metodologia foram adicionados 0,5 mL do extrato obtido da biomassa juntamente com 0,5 mL de NaOH 1 mol L^{-1} em tubos de ensaios. Estes tubos foram aquecidos a 100°C durante 5 min em banho-maria e após foram resfriados em banho de água fria durante 10 min. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de solução de Na_2CO_3 5 % (m v^{-1}), tartarato de sódio e potássio 1 % (m v^{-1}) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 % (m v^{-1}), após 10 min adicionou-se

0,5 mL de Follin-Ciocalteau (1 mol L^{-1}). Os tubos foram mantidos no escuro durante 30 min e após este período foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm.

4.6.2 Determinação da concentração de carboidratos

A concentração de carboidratos foi determinada pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glicose. Para realização deste método adicionou-se 1 mL do extrato de biomassa e 1 mL de solução fenol 5 % ($v v^{-1}$) em tubos de ensaio. Os tubos foram agitados e adicionou-se 5 mL de H_2SO_4 , sendo agitados novamente. Após repouso de 10 min, os tubos foram resfriados em banho de água fria por 20 min para parar a reação com o ácido. Transcorrido este tempo, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 488 nm.

4.6.3 Determinação da concentração de lipídios

Os lipídios presentes na biomassa foram extraídos segundo método proposto por Folch, Lees e Stanley (1957), utilizando como solventes clorofórmio e metanol. Para tal, foram utilizados 200 mg de biomassa e 5 mL de clorofórmio-metanol (2:1) sendo adicionados em tubos de centrifuga. Em seguida, os tubos foram agitados em banho ultrassônico por 15 min e centrifugados a $6000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante obtido foi recolhido para tubo falcon de 50 mL. Estas etapas foram realizadas quatro vezes. No tubo falcon contendo o sobrenadante, adicionou-se 5 mL de KCl 0,88 % ($m v^{-1}$) e centrifugou-se a 6000 g por 5 min para separação das fases. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 5 mL de metanol-água (2:1), centrifugou-se novamente a 6000 g durante 5 min e descartou-se o sobrenadante, a fase inferior foi filtrada em papel filtro contendo sulfato de sódio anidro direto em balão de fundo chato. Os solventes foram evaporados em rotaevaporador e estufa a 50°C por 2 h. O teor de lipídios foi determinado por diferença de massa, de acordo com a Equação 5.

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{\text{massa final dos lipídios}}{\text{massa de amostra}} \cdot 100 \quad (5)$$

4.6.4 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado a partir de metodologia oficial descrita pela *Official Methods of Analysis - AOAC (2000)*, onde as amostras foram submetidas a 105°C em estufa até massa constante, de acordo com a Equação 6.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{\text{massa da amostra úmida} - \text{massa da amostra seca}}{\text{massa da amostra úmida}} \cdot 100 \quad (6)$$

4.6.5 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado a partir de metodologia oficial descrita pela *Official Methods of Analysis - AOAC (2000)*. A biomassa seca foi incinerada em bico de Bunsen e após foi transferida para forno mufla a 560°C por 3 h. O teor de cinzas foi obtido de acordo com a Equação 7.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa da cinza}}{\text{massa da amostra}} \cdot 100 \quad (7)$$

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA PROTEICA

Após a caracterização de todas as condições testadas pelos métodos descritos anteriormente, selecionou-se os ensaios em que se obteve biomassa com maior concentração de proteínas para dar seguimento ao desenvolvimento do estudo. Sendo assim, foi realizada a caracterização da biomassa selecionada quanto a concentração de proteínas utilizando método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2000). Além disso, também foram realizadas análises de digestibilidade proteica *in vitro* e solubilidade proteica.

4.7.1 Determinação de proteína total por micro-Kjeldahl

A concentração de proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi determinada através do método micro-Kjeldahl (AOAC, 2000). Para desenvolvimento desta metodologia foram pesados 200 mg de amostra em papel filtro juntamente com 700 mg de catalisador, contendo sulfato de potássio e selênio, em tubo digestor, onde foram adicionados 3 mL de

peróxido de hidrogênio e 7 mL de ácido sulfúrico. As amostras foram digeridas por aproximadamente 6 h. Após o resfriamento das amostras, estas foram transferidas para tubos de destilação de nitrogênio, onde foram adicionados 20 mL de água destilada e 4 gotas de fenolftaleína. Em erlenmeyer foram adicionados 10 mL de ácido bórico 4 % e 4 gotas de indicador misto, sendo este e o tubo de destilação contendo a amostra adaptados no destilador, onde foram liberados 30 mL de NaOH 40 % no tubo contendo a amostra. Após recolher aproximadamente 125 mL no erlenmeyer coletor, retirou-se o erlenmeyer e o tubo de destilação do equipamento. As amostras foram tituladas utilizando HCl 0,1 mol L⁻¹. A concentração total de proteínas foi calculada a partir da Equação 8, onde V foi o volume de HCl gasto na titulação da amostra, F o fator da solução de HCl e P a massa da amostra, o fator de conversão utilizado para a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi 5,95, segundo López et al. (2010).

$$\text{Proteínas (\%)} = V \cdot F \cdot \frac{0,014}{P} \cdot 5,95 \cdot 100 \quad (8)$$

4.7.2 Digestibilidade proteica *in vitro*

A digestibilidade proteica *in vitro* da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi avaliada através do método descrito por Akesson e Stahmann (1964). Alíquotas de 500 mg de amostra foram suspensas em 10 mL de solução contendo 1 mg mL⁻¹ de pepsina e incubadas a 37°C por 3 h. Após este período, a hidrólise com pepsina foi inibida através da adição de 10 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹. As amostras foram centrifugadas a 660 x g por 15 min, o sobrenadante foi armazenado a 4°C e filtrado posteriormente. No precipitado, adicionou-se 10 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,2 mol L⁻¹, pH 8,0) contendo 2 mg mL⁻¹ de pancreatina, mantendo-se a reação a 37°C por 24 h. Após a hidrólise com pancreatina, adicionou-se TCA 30 % para parar a reação. TCA 5 % foi utilizado para completar o volume reacional para 50 mL e centrifugou-se novamente a 660 x g por 15 min, o sobrenadante foi filtrado e o precipitado descartado. Os sobrenadantes provenientes da hidrólise com pepsina e pancreatina foram quantificados quanto à proteína solúvel pelo método de Lowry et al., (1951) utilizando tirosina como padrão de referência. A digestibilidade proteica da biomassa foi calculada a partir da Equação 9, onde DPIV é a digestibilidade proteica *in vitro*, P_S a concentração de proteína solúvel após a digestão enzimática determinada pelo método de

Lowry et al. (1951) (mg mL^{-1}) e P_{TOTAL} a concentração de proteína total na biomassa determinada por micro-Kjeldahl (AOAC, 2000) (mg mL^{-1}).

$$\text{DPIV (\%)} = \frac{P_s}{P_{\text{TOTAL}}} \cdot 100 \quad (9)$$

4.7.3 Solubilidade proteica

A solubilidade das proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi determinada através do método de Morr et al. (1985) em pH 2, 4 e 6. Amostras de 500 mg foram ressuspensas em 2 mL de NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) sob agitação. Após total dispersão da amostra foram adicionados 40 mL de solução tampão em pH correspondente e manteve-se sob agitação durante 45 min. Após este período, o volume foi completado em balão volumétrico de 50 mL e a suspensão foi centrifugada a $660 \times g$ por 30 min. A concentração de proteína solúvel foi determinada segundo Lowry et al. (1951) e a solubilidade proteica calculada utilizando-se a Equação 10, onde SP é a solubilidade proteica, P_{SS} a concentração de proteínas solúveis no sobrenadante determinada por Lowry et al. (1951) (mg mL^{-1}) e P_{TOTAL} a concentração de proteínas na amostra determinada por micro-Kjeldahl (AOAC, 2000) (mg mL^{-1}).

$$\text{SP (\%)} = \frac{P_{\text{SS}} \cdot 50}{m_{\text{AMOSTRA}} \cdot \frac{P_{\text{TOTAL}}}{100}} \cdot 100 \quad (10)$$

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas nos ensaios foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e por teste de Tukey para comparação entre médias, com nível de significância de 90 % de confiança. Também se realizou teste t de Student com nível de significância de 95 %.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E PARÂMETROS CINÉTICOS

Na Figura 2 encontram-se as concentrações de biomassa (g L^{-1}) ao longo do tempo de cultivo (16 d) de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando 30°C , diferentes concentrações de NaNO_3 e CM de 30 mT e 60 mT. Conforme pode ser observado, houve crescimento da microalga em todas as condições testadas, porém a aplicação de CM estimulou o crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18, além disso, pode-se observar que a redução da concentração de NaNO_3 em associação com 60 mT obteve maior concentração de biomassa ($X_{\text{máx}}$) ($1,40 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$). Nenhum dos ensaios realizados apresentou fase de adaptação, apresentando crescimento exponencial desde o primeiro dia.

Segundo Deamici, Costa e Santos (2016) ao cultivar *Spirulina* sp. LEB 18 com aplicação de CM de 30 mT e 60 mT em diferentes períodos de exposição (1 h d^{-1} e 24 h d^{-1}), houve aumento de 95 % na concentração de biomassa ($X_{\text{máx}}$) ao utilizar intensidade de 60 mT durante 1 h d^{-1} em comparação ao cultivo controle, sem aplicação de CM. Além disso, no estudo de Li et al. (2007), ao aplicar intensidades de 0 a 550 mT os autores observaram efeito estimulante no crescimento ao utilizar 250 mT, porém ao aplicar maiores intensidades houve inibição do crescimento de *Spirulina platensis*. No cultivo da microalga *Chlorella kessleri*, Bauer et al. (2017) utilizaram 30 mT e 60 mT em diferentes tempos de exposição (1 h d^{-1} e 24 h d^{-1}) para verificar os efeitos sobre o crescimento da microalga. Os autores obtiveram maior $X_{\text{máx}}$ ($1,39 \text{ g L}^{-1}$) ao utilizar 60 mT durante 1 h d^{-1} , em comparação com o cultivo controle ($0,76 \text{ g L}^{-1}$).

Sendo assim, conforme foi observado neste estudo, bem como nos estudos de Deamici, Costa e Santos (2016), Li et al. (2007) e Bauer et al. (2017) a utilização de maiores intensidades obtiveram maiores concentrações de biomassa, demonstrando efeito estimulante para o crescimento de microalgas. Ao utilizar 35°C (Figura 3) pode-se perceber que houve redução na concentração de biomassa em comparação a 30°C . De acordo com Pandey et al. (2014), isto pode estar relacionado com estímulo da taxa de respiração da microalga em temperaturas elevadas, o que ocasiona alto gasto de energia celular e conseqüentemente a redução da concentração de biomassa. Portanto, a utilização de elevadas temperaturas, como no caso de 35°C , em associação com diferentes concentrações de NaNO_3 e aplicação de CM não influenciou no crescimento microalgal, não havendo diferença entre os cultivos com

aplicação de CM e os cultivos controle. A utilização da temperatura de 30°C obteve maiores $X_{m\acute{a}x}$ e, portanto, deve ser utilizada para obtenção de biomassa microalgal.

Figura 2 - Concentração de biomassa dos cultivos utilizando 30°C com a) 2,5 g L⁻¹ de nitrato de sódio e b) 1,875 g L⁻¹ de nitrato de sódio.

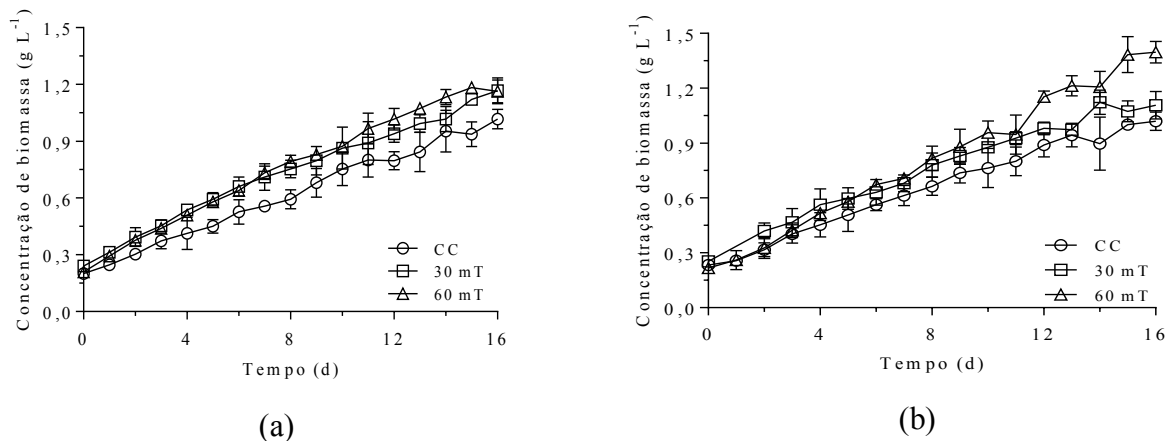
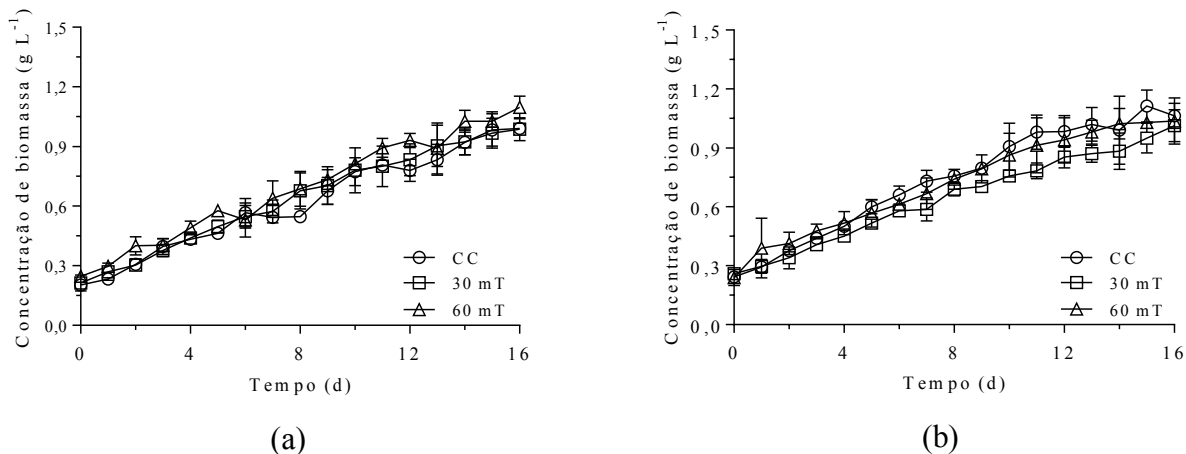


Figura 3 - Concentração de biomassa dos cultivos utilizando 35°C com a) 2,5 g L⁻¹ de nitrato de sódio e b) 1,875 g L⁻¹ de nitrato de sódio.



Ogbonda, Aminigo e Abu (2007) avaliaram a influência das temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C e 40°C, bem como de diferentes pH (8,5; 9; 9,5 e 10) na produção e composição da biomassa de *Spirulina* sp. utilizando meio Bangladesh n° 3 (Bd 3). Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 250 mL, com volume útil de 50 mL e iluminância de 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde foi estudada a interação entre pH e temperatura durante o cultivo. Os autores observaram que a temperatura ótima para o cultivo foi 30°C e o pH ótimo foi 9, obtendo-se concentração de biomassa de 4,9 g L⁻¹ após 35 d de cultivo.

No estudo de Colla et al. (2007) foram estudadas a influência da temperatura e concentração de NaNO_3 em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) no crescimento e na composição da biomassa de *Spirulina platensis* LEB 52. Os ensaios foram realizados em fotobiorreatores de 20 L com volume útil de 14 L, iluminância de $31,35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 12 h claro/ 12 h escuro, com concentração de biomassa inicial de $0,15 \text{ g L}^{-1}$. As temperaturas de 30°C e 35°C e as concentrações de $0,625$; $1,25$; $1,875$ e $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 foram testadas. A maior concentração de biomassa foi encontrada ao utilizar 30°C ($0,92 \text{ g L}^{-1}$) após 25 d de cultivo, e não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de NaNO_3 testadas. O $\mu_{\text{máx}}$ também não variou com a concentração de NaNO_3 , porém apresentou diferença significativa entre as temperaturas testadas, sendo de $0,074 \text{ d}^{-1}$ para 30°C e $0,054 \text{ d}^{-1}$ a 35°C .

A obtenção de maiores $X_{\text{máx}}$ ao utilizar 30°C pode estar relacionada com a pressão parcial de CO_2 no meio ser maior nesta temperatura do que a 35°C , o que conduz ao aumento da concentração de bicarbonato e conseqüentemente aumento da taxa fotossintética (COLLA et al., 2007). A baixa pressão parcial de CO_2 na atmosfera, normalmente, não consegue manter a demanda necessária para assimilação de carbono inorgânico durante o crescimento intensivo das microalgas, ocasionando limitação no crescimento. Porém, o aumento da capacidade de transferência de CO_2 pode aumentar a disponibilidade de carbono inorgânico no cultivo, o que ocasiona maior crescimento microalgal (PCHARA, 2016).

Na Tabela 2 encontram-se os parâmetros cinéticos dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18, conforme pode ser observado, a utilização de diferentes concentrações de NaNO_3 nos ensaios a 30°C ou 35°C , não ocasionou mudanças na concentração de biomassa obtida nos ensaios controle, sem aplicação de CM (Ensaio 1, 4, 7 e 10). Porém, ao utilizar 30°C , concentração de NaNO_3 de $1,875 \text{ g L}^{-1}$ e 60 mT, obteve-se $1,40 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ de $X_{\text{máx}}$, aumentado em 27,1 % a concentração de biomassa em relação ao cultivo controle, sendo esta condição adequada para produção de biomassa microalgal. Para os cálculos referentes a $\mu_{\text{máx}}$, utilizou-se os gráficos de linearização da concentração de biomassa (APÊNDICE – Figuras AP 1, AP 2, AP 3 e AP 4).

Os valores encontrados neste estudo foram maiores do que os reportados por Vaz, Costa e Moraes (2016), que obtiveram $X_{\text{máx}}$ de $0,61 \text{ g L}^{-1}$ ao utilizar 30°C , $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 , aeração de 0,3 vvm e iluminância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e foram semelhantes ou superiores aos resultados de Duarte et al. (2017), onde o maior $X_{\text{máx}}$ encontrado foi $0,89 \text{ g L}^{-1}$ nas mesmas condições de cultivo. Desta forma, pode-se afirmar que a concentração de biomassa máxima para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 pode variar devido a modificações realizadas durante o

cultivo da microalga. Neste caso, a aplicação de CM estimulou o crescimento desta microalga.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos dos ensaios com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

Ensaio	T (°C)	NaNO ₃ *	CM**	X _{máx} (g L ⁻¹)	P _{máx} (g L ⁻¹ d)	μ _{máx} (d ⁻¹)	tg (d)
1	30	2,50	-	1,02 ± 0,05 ^{b,c}	0,06 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,04 ^a	3,83 ± 0,67 ^a
2	30	2,50	30	1,17 ± 0,07 ^b	0,08 ± 0,02 ^a	0,18 ≤ 0,01 ^a	3,86 ± 0,21 ^a
3	30	2,50	60	1,18 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,01 ^a	3,59 ± 0,11 ^a
4	35	2,50	-	0,98 ± 0,08 ^c	0,07 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,03 ^a	3,44 ± 0,46 ^a
5	35	2,50	30	1,02 ± 0,10 ^{b,c}	0,06 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,06 ^a	4,33 ± 1,44 ^a
6	35	2,50	60	1,10 ± 0,06 ^{b,c}	0,08 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	4,26 ± 0,31 ^a
7	30	1,875	-	1,02 ± 0,05 ^{b,c}	0,06 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,03 ^a	4,00 ± 0,73 ^a
8	30	1,875	30	1,11 ± 0,07 ^{b,c}	0,08 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,03 ^a	4,15 ± 0,70 ^a
9	30	1,875	60	1,40 ± 0,06 ^a	0,08 ≤ 0,01 ^a	0,21 ± 0,03 ^a	3,41 ± 0,58 ^a
10	35	1,875	-	1,11 ± 0,08 ^{b,c}	0,08 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	3,91 ± 0,19 ^a
11	35	1,875	30	1,02 ± 0,08 ^{b,c}	0,05 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,02 ^a	5,18 ± 0,97 ^a
12	35	1,875	60	1,03 ± 0,01 ^{b,c}	0,09 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	3,93 ± 0,25 ^a

* Concentração de nitrato de sódio; ** Campo Magnético.

X_{máx} – Concentração de biomassa máxima; P_{máx} – Produtividade máxima; μ_{máx} – Velocidade específica máxima de crescimento e tg – Tempo de geração.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas (p ≤ 0,10) pelo teste de Tukey, para a mesma resposta.

Na Tabela 3 encontram-se os valores da eficiência de aplicação do CM. Para avaliar a influência do CM e para comparação com os cultivos controle (Ensaio 1, 4, 7 e 10), levou-se em consideração as condições de cultivo, separando-se pelas mesmas condições de temperatura e concentração de NaNO₃.

O ensaio a 30°C com aplicação de 60 mT e 1,875 g L⁻¹ de NaNO₃ proporcionou aumento de 27,1 % no X_{máx} e 25 % na P_{máx} em comparação com o cultivo controle, além disso, aumentou em 14,3 % o μ_{máx}, reduzindo o tg em 17,3 %, sendo considerado o melhor resultado para produção de biomassa. Para os ensaios a 35°C utilizando a mesma concentração de NaNO₃, houve inibição no X_{máx} tanto para 30 mT quanto 60 mT. A exposição ao CM juntamente com a utilização de temperatura mais elevada e redução na fonte de nitrogênio pode ter causado estresse nas células da microalga, o que pode ter ocasionado a inibição do crescimento celular, pois a temperatura afeta as atividades metabólicas, bem como a disponibilidade e absorção de nutrientes e outras propriedades físicas do ambiente. As reações metabólicas são baseadas na diferença de cargas elétricas e íons do sistema, que podem ter sido alteradas pela aplicação do CM.

Tabela 3 - Eficiência de aplicação do CM para parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos utilizando CM e seus respectivos cultivos controle.

Ensaio*	T (°C)	NaNO ₃ **	CM*** (mT)	X _{máx} (%)	P _{máx} (%)	μ _{máx} (%)	tg (%)
2	30	2,50	30	+12,8	+25,0	-5,5	+0,7
3	30	2,50	60	+13,6	+33,3	0	-6,7
5	35	2,50	30	+3,9	-16,6	-17,6	+20,5
6	35	2,50	60	+10,9	+12,5	-25,0	+19,2
8	30	1,875	30	+8,1	+25,0	-5,8	+3,6
9	30	1,875	60	+27,1	+25,0	+14,3	-17,3
11	35	1,875	30	-8,8	-60,0	-22,2	+24,5
12	35	1,875	60	-7,8	+11,1	0	+0,5

* (+) valores positivos significam aumento da resposta e (-) valores negativos indicam diminuição da resposta.

** Concentração de nitrato de sódio; *** Campo Magnético.

X_{máx} – Concentração de biomassa máxima; P_{máx} – Produtividade máxima; μ_{máx} – Velocidade específica máxima de crescimento e tg – Tempo de geração.

Outros ensaios que obtiveram resultados satisfatórios foram os que utilizaram 30 mT e 60 mT, 30°C e 2,5 g L⁻¹ de NaNO₃, o que ocasionou o aumento de 12,8 % e 13,6 % no X_{máx}, respectivamente, em relação ao cultivo controle. Além disso, houve aumento na P_{máx} para ambas intensidades. A utilização da mesma concentração de NaNO₃ a 35°C e 60 mT aumentou a P_{máx} em 12,5 %, porém ao utilizar 30 mT houve inibição de 16,6 %. Além disso, houve aumento no X_{máx} para as duas intensidades testadas.

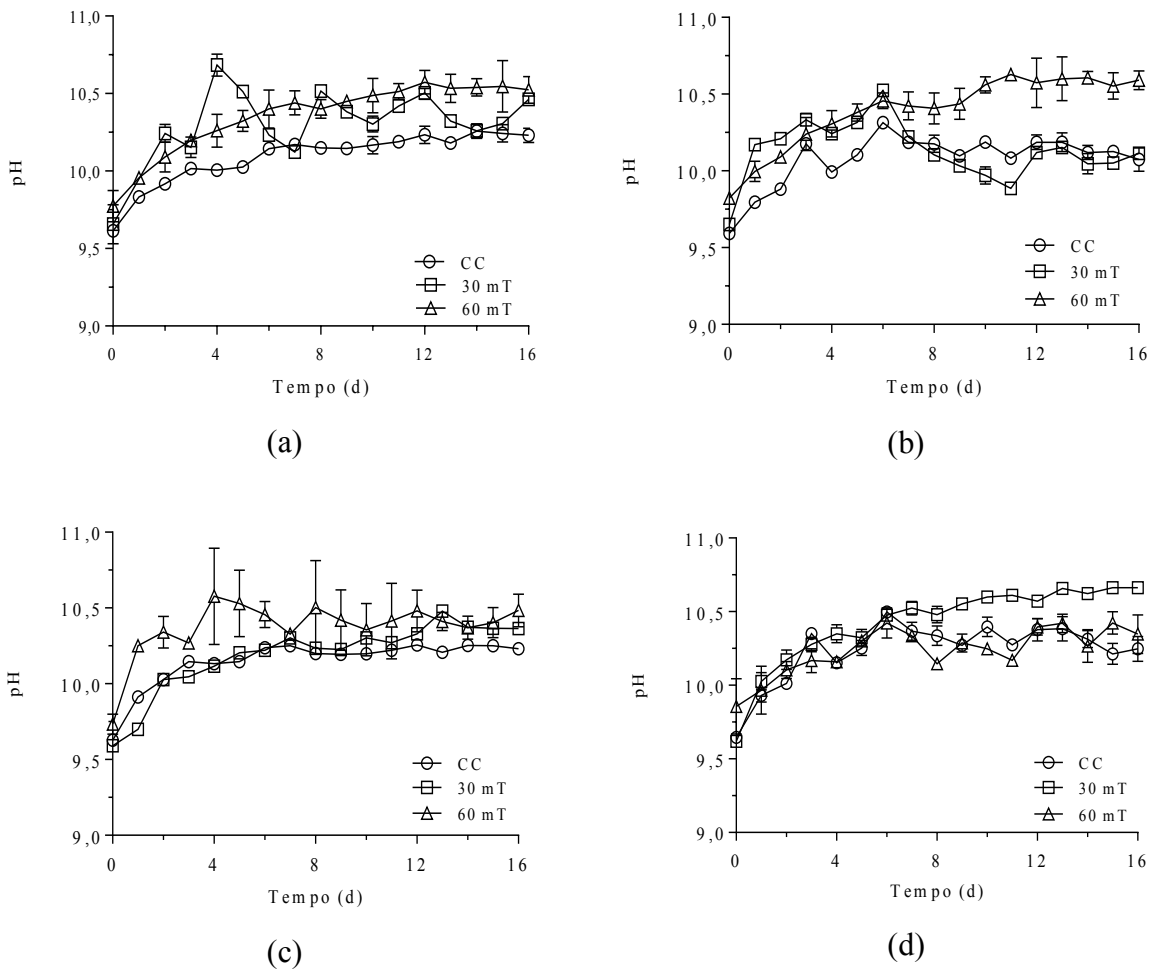
Nos estudos de Menestrino (2016) e Deamici, Costa e Santos (2016) foi observado aumento na produção de biomassa ao utilizarem 30 mT e 60 mT no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18. Porém, Hirano, Ohta e Abe (1998), observaram efeito inibitório no crescimento de *Spirulina platensis* no intervalo de 40-70 mT. A comparação destes estudos com os resultados obtidos evidencia que o efeito do CM não atua de maneira linear e que além dos fatores de tempo de exposição, frequência e intensidade, a condição celular da cepa utilizada deve ser considerada.

5.2 RESULTADOS DE pH OBTIDOS DURANTE OS CULTIVOS

O pH dos cultivos de *Spirulina* variou de 9,6 a 10,7. De acordo com Costa et al. (2002), o cultivo de cianobactérias deve ser realizado com pH entre 8,3 e 11,0, pois nesse intervalo apresenta elevada taxa fotossintética, além disso, fora deste intervalo, as culturas estão sujeitas a contaminação. De acordo com Shiraiwa, Goyal e Tolbert (1993), o aumento gradual do pH reflete o mecanismo de assimilação do bicarbonato por cianobactérias, as células incorporam dois íons de bicarbonato, um é consumido e internalizado como dióxido

de carbono (CO_2), enquanto o outro é liberado como carbonato (CO_3^{2-}), levando ao aumento progressivo do pH no meio.

Figura 4 - pH dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando 30°C com a) 2,5 g L⁻¹ de nitrato de sódio, b) 1,875 g L⁻¹ de nitrato de sódio e 35°C utilizando c) 2,5 g L⁻¹ de nitrato de sódio e d) 1,875 g L⁻¹ de nitrato de sódio.



Conforme pode ser observado na Figura 4, a aplicação de 30 mT e 60 mT modificou o pH dos cultivos quando comparado ao ensaio controle. Porém, mesmo com estas modificações no pH, os resultados obtidos mantiveram-se dentro da faixa considerada ótima para o cultivo de *Spirulina*. Dependendo da intensidade aplicada o CM pode alterar os níveis de energia e orientação do *spin* dos elétrons, além disso, todas as forças magnéticas ocasionam mudanças na movimentação de elétrons e íons, o que pode ter ocasionado a mudança do pH no início do cultivo.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A Tabela 4 apresenta a caracterização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 quanto a concentração de proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas dos cultivos. Não houve diferença significativa em relação a concentração de proteínas nos ensaios estudados. O uso de diferentes temperaturas, diferentes concentrações de NaNO₃ e aplicação de CM não influenciou na concentração proteica. Porém, obteve-se elevadas concentrações de proteínas para as diferentes condições testadas, permanecendo na faixa de 50 % a 70 % e de acordo com Becker (2007), o cultivo de *Spirulina* em meio Zarrouk pode atingir de 60 % a 70 % (massa seca) dependendo das condições de cultivo, evidenciando resultados satisfatórios neste estudo. De acordo com Spolaore et al. (2016) a elevada concentração de proteínas na biomassa de *Spirulina* sp. é um fator importante devido ao aumento do valor nutricional da biomassa, tornando-se uma fonte alternativa de proteínas para consumo humano e animal.

Com relação a concentração de carboidratos, a maior concentração encontrada foi $21,2 \pm 3,7$ %, ao utilizar 30°C e 2,5 g L⁻¹ de NaNO₃ e sem aplicação de CM, sendo esta biomassa adequada para utilização como ingrediente em suplementos hipercalóricos, *shakes* para idosos (SANTOS et al., 2016), biscoitos (MORAIS et al., 2006), pães (FIGUEIRA et al., 2011) e massas (FRADIQUE et al., 2010). A utilização de 60 mT em associação a diferentes temperaturas e concentrações de NaNO₃ apresentou redução na concentração de carboidratos.

A redução na concentração de carboidratos também foi reportada no estudo de Menestrino (2017) ao cultivar *Spirulina* sp. LEB 18 com aplicação de 30 mT durante 24 h d⁻¹, apresentando redução de 1,6 %. Hirano, Ohta e Abe (1998) avaliaram o efeito da exposição dos cultivos de *Spirulina platensis* a CM de 5 a 70 mT. Os autores verificaram aumento na síntese de carboidratos quando o cultivo foi exposto a 10 mT, porém em intensidades superiores, como 30 mT e 60 mT, houve redução da síntese, esta redução pode estar relacionada com a inibição de algumas reações do ciclo de Calvin-Benson.

Segundo estudo de Lima e Sato (2001) a concentração de lipídios presente na biomassa de *Spirulina maxima* é de 6 % (m m⁻¹). Porém, os valores encontrados neste estudo foram superiores aos descritos pelos autores, o que se deve ao gênero estudado ser o mesmo, porém não da mesma espécie. De acordo com Vonshak (1997), quanto maior a temperatura de cultivo, maior a concentração de ácidos graxos, atingindo o maior valor entre 30°C e 35°C para a maioria das cepas de *Spirulina*, porém não houve diferença significativa quando foram utilizadas diferentes temperaturas, mas ao aplicar 60 mT utilizando 30°C, houve redução de

85,7 % na concentração de lipídios (Tabela 5), o que indicou que a utilização de CM desta intensidade reduziu a síntese lipídica.

Tabela 4 - Caracterização da biomassa dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18.

Ensaio	T (°C)	NaNO ₃ *	CM** (mT)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)
1	30	2,5	-	67,5±4,6 ^a	21,2±3,7 ^a	14,0±1,5 ^{a,b}	2,0±0,6 ^g
2	30	2,5	30	50,1±6,1 ^b	7,5±0,9 ^{c,d}	12,4±5,8 ^{a,b}	2,2±0,8 ^g
3	30	2,5	60	64,8±6,0 ^a	6,1±0,3 ^d	13,4±1,2 ^{a,b}	9,4±1,6 ^b
4	35	2,5	-	65,6±2,1 ^a	11,2±3,1 ^{b,c,d}	16,4±4,7 ^{a,b}	8,5±0,4 ^{b,c}
5	35	2,5	30	55,6±8,1 ^{a,b}	11,9±3,5 ^{b,c}	12,9±2,4 ^{a,b}	5,3±1,7 ^{d,e,f}
6	35	2,5	60	64,4±1,3 ^a	14,2±1,2 ^b	15,0±4,1 ^{a,b}	-***
7	30	1,875	-	55,9±1,3 ^{a,b}	12,1±1,8 ^{b,c}	16,9±1,1 ^a	16,1±1,0 ^a
8	30	1,875	30	58,1±3,8 ^{a,b}	10,0±1,1 ^{b,c,d}	11,8±1,5 ^{a,b}	4,9±0,1 ^{e,f}
9	30	1,875	60	59,2±5,8 ^{a,b}	7,4±1,3 ^{c,d}	9,1±1,5 ^b	8,6±0,4 ^{b,c}
10	35	1,875	-	63,1±0,9 ^a	13,1±2,2 ^b	11,1±2,1 ^{a,b}	7,0±0,4 ^{c,d}
11	35	1,875	30	57,9±4,9 ^{a,b}	7,4±0,3 ^{c,d}	11,0±2,8 ^{a,b}	6,9±1,9 ^{c,d,e}
12	35	1,875	60	61,9±4,7 ^{a,b}	10,2±1,5 ^{b,c,d}	12,6±0,9 ^{a,b}	4,3±1,0 ^f

* Concentração de nitrato de sódio; ** Campo Magnético.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p \leq 0,10$) pelo teste de Tukey, para a mesma resposta.

***Não foi possível fazer a determinação.

Na Tabela 5 encontram-se os valores referentes a eficiência de aplicação de CM. Para calcular a eficiência considerou-se os ensaios com CM em comparação com os cultivos controle (Ensaio 1, 4, 7 e 10), consideram-se os ensaios que foram realizados nas mesmas condições de temperatura e concentração de NaNO₃.

A utilização de 30 mT e 60 mT, a 30°C e 2,5 g L⁻¹ de NaNO₃, reduziram a síntese de proteínas, carboidratos e lipídios quando comparadas ao cultivo controle (Ensaio 1). Este resultado difere dos efeitos observados por Deamici, Costa e Santos (2016), que obtiveram aumento de 16,6 % na concentração de proteínas, 13,7% na concentração de carboidratos e 18,2 % na concentração lipídica, ao utilizar 60 mT durante 24 h d⁻¹ no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18. A diferença entre os resultados obtidos pode estar relacionada com a iluminância utilizada, pois os autores utilizaram 60 μmol m⁻² s⁻¹ enquanto neste estudo utilizou-se 30 μmol m⁻² s⁻¹. Lv et al. (2010) ao cultivarem a microalga *Chlorella vulgaris* com 24, 60 e 120 μmol m⁻² s⁻¹ obtiveram maior concentração lipídica e produtividade de biomassa ao utilizar iluminância de 60 μmol m⁻² s⁻¹. Ao utilizar intensidades superiores ou inferiores a esta, os autores obtiveram menor produtividade e concentração de lipídios. Sendo assim, a iluminância pode modificar o pH, Mg²⁺ e NADPH, aumentando indiretamente a atividade das principais enzimas da síntese lipídica, enquanto tanto a limitação como a inibição da luz podem reduzir a atividade enzimática.

Tabela 5 - Eficiência de aplicação do CM para os resultados de caracterização da biomassa obtidos nos cultivos utilizando CM e seus respectivos cultivos controle.

Ensaio*	T (°C)	NaNO ₃ **	CM*** (mT)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
2	30	2,5	30	-25,7	-182,6	-12,9
3	30	2,5	60	-4,6	-247,5	-4,5
5	35	2,5	30	-15,2	6,2	-21,3
6	35	2,5	60	-1,9	21,1	-9,3
8	30	1,875	30	3,8	-21	-43,2
9	30	1,875	60	5,6	-63,5	-85,7
11	35	1,875	30	-8,9	-77	-0,9
12	35	1,875	60	-1,9	-28,4	11,9

* (+) valores positivos significam aumento da resposta e (-) valores negativos indicam diminuição da resposta.

** Concentração de nitrato de sódio; *** Campo Magnético.

Ao utilizar 1,875 g L⁻¹ de NaNO₃ a 30°C, a aplicação de CM estimulou a síntese proteica em relação ao controle em 3,8 % e 5,6 % com intensidades de 30 mT e 60 mT, respectivamente. Porém mesmo com o efeito positivo na síntese não houve diferença significativa na concentração de proteínas, conforme pode ser observado na Tabela 4.

Ao utilizar 35°C e 2,5 g L⁻¹ de NaNO₃ houve redução na síntese de proteínas e lipídios e aumento na síntese de carboidratos de 21,1 % ao utilizar 60 mT e 6,2 % com 30 mT

em comparação com o cultivo controle. Além disso, a utilização de $1,875 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 na mesma temperatura e 30 mT, estimulou a síntese lipídica em 11,9 % em relação ao controle, porém utilizando 60 mT houve redução da síntese. A síntese de proteínas e carboidratos foi reduzida ao utilizar CM de 30 mT e 60 mT. De acordo com Teng (2005) a constituição fisiológica e bioquímica dos micro-organismos pode ser suscetível à ação das forças eletromagnéticas. Todas as reações metabólicas são baseadas na diferença de cargas elétricas e íons do sistema. Da mesma forma, Santos et al. (2017) afirmaram que as forças eletromagnéticas causam mudanças na metabolização das células biológicas e a movimentação de elétrons e íons podem ocasionar mudanças na concentração de biomoléculas, como proteínas, carboidratos e lipídios. Além disso, pode modificar as atividades dos radicais livres, o crescimento celular e a atividade enzimática.

Para adicionar novos ingredientes em alimentos, como no caso da biomassa microalgal, a caracterização deve ser realizada por métodos oficiais descritos pela AOAC (2000). Para realização destes métodos é necessário utilizar concentrações elevadas de amostra, principalmente para realização em triplicata, portanto optou-se por utilizar métodos que necessitavam de menores concentrações de amostra para caracterizá-la quanto a concentração de proteínas, carboidratos e lipídios nos ensaios realizados (Tabela 4) para selecionar as condições com maiores concentrações de proteínas.

Segundo a Resolução nº 18 de 27 de abril de 2010 da ANVISA, para ser considerado um suplemento proteico, o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 50 % de seu valor energético proveniente de proteínas, porém, como não houve diferença significativa na concentração de proteínas, optou-se por utilizar a condição com menor concentração de carboidratos na biomassa para dar continuidade ao estudo. Produtos lácteos com concentração de proteínas superior a 80 % são utilizados como substitutos de refeição, bebidas que conferem saciedade, bebidas e suplementos em pó para esportistas e como ingredientes em produtos nutricionais em geral. Paralelamente ao elevado teor de proteínas, o baixo teor de carboidratos e alta solubilidade são requisitos que conferem excelente perfil nutricional para fornecer um ingrediente funcional eficaz para muitas aplicações nutricionais (LAGRANGE; WHITSETT; BURRIS, 2015). Baixas concentrações de carboidratos aumentam a velocidade de absorção de líquidos pelo intestino, enquanto seu excesso, será armazenado no organismo em forma de gordura (SALVO; GIMENO, 2002). Devido a isso, a condição em que se obteve menor concentração de carboidratos foi no ensaio 3, apresentando redução de 247,5 % na concentração de carboidratos em relação ao cultivo

controle, ao utilizar 30°C, 60 mT e 2,5 g L⁻¹ de NaNO₃, sendo esta condição a mais adequada para desenvolvimento de suplementos proteicos adicionados de biomassa microalgal.

Devido a isso, após a caracterização prévia dos ensaios realizados, selecionou-se as condições do ensaio 3 para dar continuidade ao estudo, porém como não foram encontrados dados na literatura em relação a digestibilidade proteica *in vitro* e solubilidade proteica de biomassa obtida de cultivos com exposição ao CM, selecionou-se o ensaio com as mesmas condições de temperatura e concentração de NaNO₃, porém sem aplicação de CM para fins de comparação, sendo este o Ensaio 1.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA PROTEICA

A partir da seleção do Ensaio 1 (cultivo controle) e Ensaio 3 (cultivo com aplicação de CM), foi realizada a determinação da concentração de proteínas pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 200), as concentrações de lipídios e carboidratos consideradas foram as mesmas obtidas previamente. Na Tabela 6 encontram-se os resultados referentes a caracterização das condições selecionadas para dar continuidade ao estudo.

Tabela 6 - Concentração de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

Ensaio	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	Cinzas (%)
Cultivo controle	62,2 ± 0,3 ^a	14,0 ± 1,5 ^a	21,2 ± 3,7 ^a	2,0 ± 0,6 ^b
Cultivo com CM	59,2 ± 0,3 ^b	13,4 ± 1,2 ^a	6,1 ± 0,3 ^b	9,4 ± 1,6 ^a

Cultivo Controle: 30°C, 2,5 g L⁻¹; Cultivo com CM: 30°C, 2,5 g L⁻¹, 60 mT.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste t de Student, para a mesma resposta.

Conforme pode ser observado na Tabela 6, não houve diferença significativa na concentração de lipídios para ambos ensaios. Porém, observou-se diferença na concentração de proteínas, sendo que o ensaio com exposição ao CM obteve menor concentração proteica. Mesmo com esta diferença optou-se por continuar o estudo com esta condição por apresentar menor teor de carboidratos. Pois, de acordo com Salvo e Gimeno (2002) baixas concentrações de carboidratos aumentam a velocidade de absorção de líquidos pelo intestino, sendo esta condição a mais adequada para utilização como ingrediente em suplementos proteicos (SALVO; GIMENO, 2002).

Suplementos alimentares com elevado teor de proteínas possuem grande demanda de mercado e são consumidos para melhorar a performance em esportes, hipertrofia e recuperação muscular (AGARWAL et al., 2015). Também é importante o consumo de

suplementos ricos em proteínas para idosos, para compensar a perda de massa muscular, proporcionando benefícios à saúde (BAUER et al., 2013). Devido à alta concentração de proteína encontrada, esta biomassa pode ser utilizada para preparar novos alimentos, como suplementos proteicos.

5.5 DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO*

A digestibilidade *in vitro* foi realizada na biomassa do cultivo controle e do cultivo com aplicação de CM. Conforme pode ser observado na Tabela 7, o cultivo controle apresentou maior digestibilidade em comparação com o cultivo utilizando CM. O efeito do CM estático na concentração de radicais livres é ampliado se o par de radicais é de carga oposta, portanto, estes radicais são alguns dos possíveis sítios de ação da exposição ao CM (SMALL; HÜNER; WAN, 2012). Os CM também podem causar estresse oxidativo em organismos por meio da alteração dos níveis de energia e orientação do *spin* de elétrons e concentração do tempo de vida dos radicais livres, os quais mudam as probabilidades relativas de recombinação de outras interações com possíveis consequências biológicas (REPACHOLI; GREENEBAUM, 1999).

Tabela 7 - Digestibilidade proteica *in vitro* para a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 do cultivo controle e com aplicação de CM.

Ensaio	Digestibilidade proteica <i>in vitro</i> (%)
Cultivo controle	78,4 ± 2,1 ^a
Cultivo com CM	73,6 ± 1,3 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste t de Student, para a mesma resposta.

Além disso, as proteínas de algas são suscetíveis à ação de enzimas proteolíticas, por outro lado, existem compostos presentes, como compostos fenólicos e polissacarídeos que podem limitar a digestibilidade de suas proteínas (IBAÑEZ; CIFUENTES, 2013). Sabe-se que os CM afetam a produção de biomoléculas nos micro-organismos (DEAMICI et al., 2016; BAUER et al., 2017; HIRANO; OHTA; ABE, 1998; OLIVEIRA, 2017) e, portanto, pode ter ocasionado alterações que resultaram em menor digestibilidade nos ensaios com CM.

A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos. A partir dela pode-se determinar a qualidade proteica dos alimentos ingeridos (PIRES et al., 2006). Na literatura, os estudos encontrados para determinar a digestibilidade proteica *in vitro* utilizam

as enzimas pepsina e pancreatina para simular o sistema enzimático digestivo (BECKER, 1994; LISBOA; PEREIRA; COSTA, 2016; PEREIRA, 2016).

No estudo de Almeida et al. (2015) os autores encontraram digestibilidade proteica *in vitro* de 55,2 % na proteína isolada de soja. Comparando este estudo com os resultados encontrados, pode-se dizer que a biomassa de *Spirulina* apresentou maior digestibilidade do que a proteína de soja. Além disso, no estudo de Sinha et al. (2007) foi avaliada a digestibilidade proteica *in vitro* de concentrado proteico de soro de leite antes e após ser hidrolisado, antes da hidrólise a digestibilidade encontrada foi 25 % e após hidrólise aumentou para 70 %. A digestibilidade é extremamente importante quando se deseja aplicar ingredientes a alimentos, como suplementos proteicos, a partir disso, a digestibilidade das proteínas da biomassa de *Spirulina* é comparável com as proteínas do soro do leite e maior que as proteínas vegetais, evidenciando que esta biomassa pode ser utilizada na indústria de alimentos.

Segundo estudo de Becker (1994), a biomassa da *Spirulina* sp. apresentou digestibilidade de 70 %. Este mesmo resultado foi encontrado por Pereira (2016), que obteve 70 % de digestibilidade proteica ao avaliar a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, enquanto Lisboa, Pereira e Costa (2016) obtiveram digestibilidade proteica de 74,1 % para biomassa desta microalga. Mišurcová et al. (2010) obtiveram 71,4 % ao analisar a biomassa de *Spirulina pacifica* e 81,9 % com biomassa de *Spirulina platensis*.

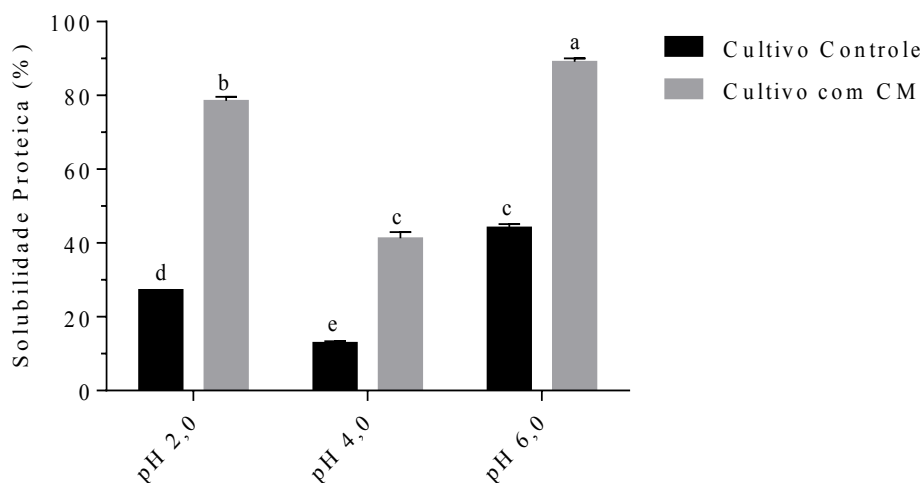
A digestibilidade proteica de concentrados proteicos comerciais varia de 55,2 % para a proteína de soja (ALMEIDA et al., 2015) a 70 % em concentrado de soro de leite (SINHA et al., 2007), portanto, a digestibilidade proteica encontrada neste estudo apresentou resultados superiores aos concentrados comercializados, o que torna estes ensaios promissores para obtenção de biomassa visando sua utilização como ingrediente em suplementos alimentares.

5.6 SOLUBILIDADE PROTEICA

A Figura 5 apresenta a solubilidade das proteínas da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 com e sem aplicação de CM em diferentes pH, pode-se observar que a maior solubilidade proteica foi encontrada em pH 6 para a biomassa obtida no cultivo com aplicação de CM (89,1 %). Além disso, a solubilidade da biomassa proveniente do cultivo submetido ao CM foi superior ao cultivo controle em todos os pH testados. Segundo estudo de Pereira (2016) a quebra das moléculas de proteínas em peptídeos menores pode justificar o aumento

da solubilidade proteica. A utilização de CM durante o cultivo pode causar modificações na estrutura e na morfologia celular, o que pode ter ocasionado quebra das proteínas em peptídeos menores. Porém, para possível confirmação desta teoria seria necessário realizar análise de microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 5 - Solubilidade proteica da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18



Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste t de Student, para a mesma resposta.

A solubilidade proteica é considerada como uma propriedade crítica pelos fabricantes de alimentos, pois elevada solubilidade permite a dispersão rápida e completa das moléculas de proteína, portanto, é importante conhecer a solubilidade quando se pretende determinar o grau de extração e purificação das proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Devido a isso, a manutenção da solubilidade proteica tem sido o foco principal de pesquisadores e cientistas de alimentos (AGARWAL et al., 2105). A solubilidade de proteínas depende do pH em que elas estão inseridas, aumentando em pH acima do ponto isoelétrico (PI) e diminuindo, em menor proporção, em pH abaixo do PI devido à acidez. O aumento da solubilidade se deve ao aumento da repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína e hidratação dos resíduos carregados (YADA, 2004).

Devido às suas propriedades funcionais e valor nutritivo, as proteínas de soro de leite e soja nas suas formas concentrada e isolada, são amplamente utilizadas na indústria de alimentos (AGARWAL et al., 2015). A solubilidade de concentrados proteicos comerciais encontrados para o soro de leite, em pH 4 e 7, ficaram em torno de $59,1\% \pm 0,5\%$ e $73,9 \pm 3,5\%$, respectivamente (SANMARTÍN et al., 2013). Para os concentrados proteicos comerciais de soja nos mesmos pH, foram encontradas solubilidade de 30 % em pH 4 e 50 %

em pH 7 (VISHWANATHAN et al., 2011). Além disso, os resultados encontrados na biomassa proveniente do cultivo sem aplicação de CM foram semelhantes aos reportados por Pereira (2016), que encontrou solubilidade de 30 %, 10 % e 50 % em pH 3, 4 e 7 para biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. Portanto, pode-se dizer que a solubilidade proteica da biomassa de *Spirulina* é comparável com concentrados proteicos comerciais de soro de leite e de soja, sendo assim, esta biomassa é a mais indicada para ser utilizada na indústria de alimentos.

6 CONCLUSÃO

A utilização de CM nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 estimulou o crescimento da microalga em 27,1 %, obtendo concentração de biomassa de $1,40 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ ao utilizar 60 mT, 30 °C e $1,875 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 . Mesmo com algumas modificações, a aplicação de CM manteve o pH entre 9,6 e 10,7, sendo esta faixa adequada para o cultivo desta microalga.

A aplicação de 30 mT e 60 mT não influenciou na concentração de proteínas da biomassa microalgal em comparação com o cultivo controle. Porém a utilização de 60 mT apresentou redução de 247,5 % na concentração de carboidratos. Devido a isso, esta condição foi selecionada por apresentar potencial uso como ingrediente na formulação de suplementos proteicos.

A maior digestibilidade proteica foi encontrada no cultivo sem aplicação de CM ($78,4 \pm 2,1 \%$). A biomassa obtida do cultivo submetido ao CM apresentou maior solubilidade proteica em todos os pH testados, apresentando 89 % em pH 6. Por isso, a utilização desta biomassa se mostrou promissora para utilização em alimentos, apresentando potencial para ser utilizada como ingrediente na fabricação de suplementos proteicos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 obtida no cultivo com 60 mT como ingrediente para suplementos proteicos;
- Estudar a aplicação de CM em diferentes microalgas;
- Cultivar microalgas com diferentes intensidades de CM;
- Estudar a influência dos CM na produção de carotenoides, ficocianina e clorofila *a*
- Avaliar modificações realizadas na morfologia celular de microalgas submetidas ao cultivo com CM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-BAKY, H. H.; EL BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga *Spirulina maxima*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 10, p. 292–300, 2008.
- AGARWAL, S.; BEAUSIRE, R. L. W.; PATEL, S.; PATEL, H. Innovative uses of milk protein concentrates in product development. **Journal of Food Science**, v. 80, n. S1, p. A23–A29, 2015.
- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A Pepsin Pancreatin Digest Index of Protein Quality Evaluation. **The Journal of nutrition**, v. 83, n. 64, p. 257–261, 1964.
- ALMEIDA, C. C.; MONTEIRO, M. L. G.; COSTA-LIMA, B. R. C. DA; ALVARES, T. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 7–11, 2015.
- ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Dietary supplement use by adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 4, p. 287–294, 2009.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551–1556, 2008.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists international**. 17. ed. Washington: D. C., 2000.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na produção de alimentos - Volume 4**. São Paulo: Editora Blucher, 2001.
- BAROUKH, C.; MUÑOZ-TAMAYO, R.; STEYER, J. P.; BERNARD, O. A state of the art of metabolic networks of unicellular microalgae and cyanobacteria for biofuel production. **Metabolic Engineering**, v. 30, p. 49–60, 2015.
- BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; FRADINHO, P.; FRAGOSO, S.; BURSIC, I.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity *in vitro* digestibility. **Algal Research**, v. 26, p. 161-171, 2017.
- BAUER, J.; BIOLO, G.; CEDERHOLM, T.; CESARI, M.; CRUZ-JENTOFT, A. J.; MORLEY, J. E.; PHILLIPS, S.; SIEBER, C.; STEHLE, P.; TETA, D.; VISVANATHAN, R.; VOLPI, E.; BOIRIE, Y. Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: A position paper from the prot-age study group. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 14, n. 8, p. 542–559, 2013.
- BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivators. **Bioresource Technology**, v. 244, Part 2, p. 1425-1432, 2017.
- BECKER, E. W. Microalgae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 207-

210, 2007.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27–48, 2002.

BERTOLDI, F.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **B. Ceppa**, v. 26, n. 1, p. 9–20, 2008.

BRAND, L. E. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v. 18, n. 5, p. 543-556, 1984.

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

BURNS, D.; MACDONALD, S. **Physics for biology and pre-medical students**. 2^a ed. Filipinas: Addison-wesley publishers limited, 1975.

CARVALHO, L. F.; MOREIRA, J. B.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Acceptance of novel foods for physical activity practitioners formulated with *Spirulina*. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 2, n. 4, p. 7-11, 2016.

CHEN, C-Y.; ZHAO, X-Q.; YENC, H-W.; HOD, S-H.; CHENG, C-L.; LEE, D-J.; BAI, F-W.; CHANG, J-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHRONAKIS, I. S. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain Pacifica): thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. **Jounal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 888–898, 2001.

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

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1489–1493, 2007.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

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

- DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, 2016.
- DEAMICI, K. M.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Magnetic fields as triggers of microalga growth: evaluation of its effect on *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 62–67, 2016.
- 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.
- DISMUKES, G.C.; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G.M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, n.19, p. 235-240, 2008.
- DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R.; SLEGGERS, P. M.; BRENTNER, L. B.; ROY, A.; BARBOSA, M. J. Food commodities from microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 169–177, 2013.
- DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472-475, 2017.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- EJIKE, C. E. C. C.; COLLINS, S. A.; BALASURIYA, N.; SWANSON, A. K.; MASON, B.; UDENIGWE, C. C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 59, p. 30-36, 2017.
- FIGUEIRA, F. D. S.; CRIZEL, T. M.; SILVA, C. R.; SALAS-MELLADO, M. M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 4, p. 308–316, 2011.
- FOLCH J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- FOX, R. D. **Spirulina Production e Potencial**. France: Edsud, 1996.
- FRADIQUE, M.; BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; RAYMUNDO, A. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1656–1664, 13 maio 2010.
- GIOVANNONI, S. J.; TURNER, S.; OLSEN, G. J.; BARNS, S.; LANE, D. J.; PACE, N. R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 8, p. 3584–3592, 1988.

HIRANO, M.; OHTA, A.; ABE, K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 313–316, 1998.

HUNT, R. W.; ZAVALIN, A.; BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 10, p. 4515–4558, 2009.

IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 703–709, 2013.

ISMAIEL, M. M. S.; EL-AYOUTY, Y. M.; PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 298-304, 2016.

JOHANSEN, M. N. **Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy**. New York: Nova Science Publishers, 2012.

KARKOS, P. D.; LEONG, S. C.; KARKOS, C. D.; SIVAJI, N.; ASSIMAKOPOULOS, D. A. *Spirulina* in clinical practice: evidence-based in human applications. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2011, p. 1-4, 2011.

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

LI, Z; GUO, S; LI, L; CAI, M. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 700-705, 2007.

LIMA, U. A.; SATO, S. *In*: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biociencia industrial, Biociencia na produção de alimentos**, v. 4, Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo- SP, 541 p. 2001.

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

LITCHFIELD, J. H. Single cell protein. **Food Technology**, v. 31, p.175-179. 1977.

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

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

LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

- LV, J. M.; CHENG, L. H.; XU, X. H.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6797-6804, 2010.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2007.
- MATSUDO, M.; C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando ureia como fonte de nitrogênio**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fundamentos da fisiologia do exercício**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.
- MENESTRINO, B.; C. **Influência de campos magnéticos em diferentes fases da fotossíntese da microalga *Spirulina* sp. LEB 18**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.
- MIŠURCOVÁ, L.; KRÁČMAR, S.; KLEJDUS, B.; VACEK, J. Nitrogen content, dietary fiber, and digestibility in algal foods products. **Czech Journal Food Science**, v. 28, n. 1, p. 27-35, 2010.
- MONTERO-LOMELI, M.; RUMJANEK, F. D. **Técnicas em biociências: Protocolos comentados para o laboratório**. Rio de Janeiro: MedBook, 2013.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* Strain. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 32, p. 1879–1880, 2008.
- MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 323–328, 2006.
- MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715–1718, 1985.
- OGBONDA, K. H.; AMINIGO, R. E.; ABU, G. O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2207-2211, 2007.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 459–466, 2003.
- OLIVEIRA, M. Magnetic stimulation on the growth of the microalga *Nannochloropsis oculata*. **Electronic Thesis and Dissertation Repository**, 2017.
- PANDEY, A.; LEE, D. J.; CHISTI, Y.; SOCCOL, C. R. **Biofuels from Algae**, New York: Elsevier, 2014.

PARK, H. J.; LEE, H. S. The influence of obesity on the effects of *Spirulina* supplementation in the human metabolic response of Korean elderly. **Nutrition Research and Practice**, v. 10, n. 4, p. 418-423, 2016.

PCHARA, F. R. F. **Estudo da transferência de CO₂ por borbulhamento para o cultivo de microalgas em laboratório**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2016.

PEREIRA, A.; M. **Obtenção de concentrado, isolado e hidrolisado proteico a partir da biomassa de *Spirulina***. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

PINHO, M. A.; TORRES, R. C. D. O.; SANT'ANNA, E. S. Fontes alternativas de nutrientes para o cultivo de *Arthrospira (Spirulina)* spp. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 159-168, 2010.

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

RAJOKA, M. I.; KHAN, S. H.; JABBAR, M. A.; AWAN, M. S.; HASHMI, A. S. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2163-2169, 2007.

REPACHOLI, M. H.; GREENEBAUM, B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: Health effects and research needs. **Bioelectromagnetics**, v. 20, p. 133-160, 1999.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Ed. Blackwell Science Ltda, 2004.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4491-4498, 2010.

SALVO, V. L. M. A.; GIMENO, S. G. A. Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência de consumo de alimentos. **Revista Saúde Pública**, v. 36, p. 505-512, 2002.

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

SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2016.

SANTOS, L. O. **Estudo da produção de glutatona a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as fermentações**. Tese (Doutorado

em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

SANTOS, L. O.; DEAMICI, K. M.; MENESTRINO, B. C.; GARDA-BUFFON, J.; COSTA, J. A. V. Magnetic treatment of microalgae for enhanced product formation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 169, p. 1-6, 2017.

SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. **Plant Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 649-657, 1993.

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

SMALL, D. P.; HÜNER, N. P. A.; WAN, W. Effect of static magnetic fields on the growth photosynthesis and ultrastructure of *Chlorella kessleri* microalgae. **Bioelectromagnetics**, v. 33, p. 298-308, 2012.

SOLOVCHENKO, A. E.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; DIDI-COHEN, S.; COHEN, Z.; MERZLYAK, M. N. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids, and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 245-251, 2008.

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

SU, Z.; KANG, R.; SHI, S.; CONG, W.; CAI, Z. An economical device for carbon supplement in large-scale micro-algae production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 641-645, 2008.

SUBHASH, G. V.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y. V.; MOHAN, S. V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789-793, 2014.

TENG, H. C. A Puzzle of the effect of magnetic field on biological cells. **Life Science Journal**, v. 2, p.16-21, 2005.

TU, R., JIN, W., XI, T., YANG, Q., HAN, S-F., ABOMOHRRA, A.E-F. Effect of static magnetic field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivates in municipal wastewater. **Water Research**, p. 1-7, 2015.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO₂ Biofixation by the cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the green alga *Chlorella fusca* LEB 111 grown using gas effluents and solids residues of thermoelectric origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 418-429, 2016.

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

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

XIE, T.; XIA, Y.; ZENG, Y.; LI, X.; ZHANG, Y. Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 247-255, 2017.

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

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

ANEXO

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO ZARROUK

Componente	Zarrouk (g L⁻¹)	Zarrouk modificado (g L⁻¹)
NaHCO ₃	16,8	16,8
K ₂ HPO ₄	0,5	0,5
NaNO ₃	2,5	1,875
K ₂ SO ₄	1,0	1,0
NaCl	1,0	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,2
CaCl ₂	0,04	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	0,01
EDTA	0,08	0,08
Solução A5*	1,0 (mL L ⁻¹)	1,0 (mL L ⁻¹)
Solução B6**	1,0 (mL L ⁻¹)	1,0 (mL L ⁻¹)

*Solução A5 contém (g L⁻¹): H₃BO₃ (2,86), MnCl₂.4H₂O (1,81), ZnSO₄.7H₂O (0,222), NaMoO₄ (0,015), CuSO₄.5H₂O (0,079).

**Solução B6 contém (g L⁻¹): NH₄VO₃ (23,0), K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O (96,0), NiSO₄.7H₂O (48,0), Na₂WO₄.2H₂O (18,0), TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O (61,1), Co(NO₃)₂.6H₂O (44,0).

APÊNDICES

Figura AP 1 – Linearização da concentração de biomassa da fase exponencial de crescimento dos cultivos a 30°C e 2,5 g L⁻¹ de nitrato de sódio.

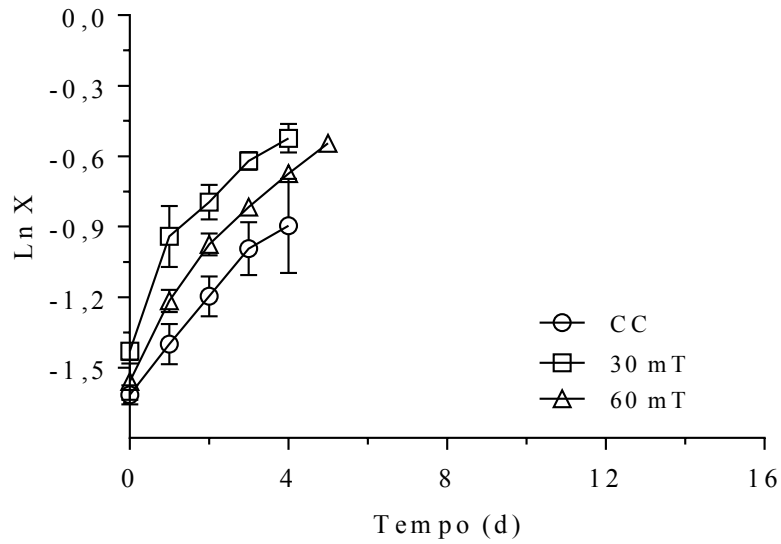


Figura AP 2 - Linearização da concentração de biomassa da fase exponencial de crescimento dos cultivos a 30°C e 1,875 g L⁻¹ de nitrato de sódio.

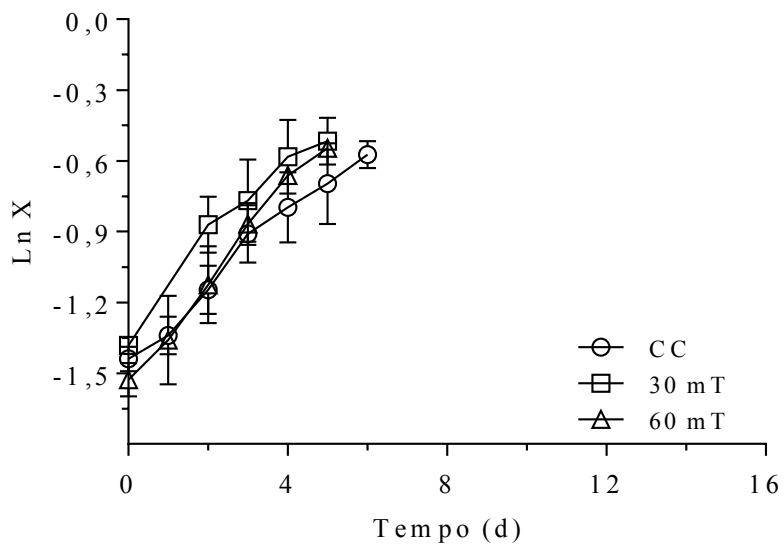


Figura AP 3 - Linearização da concentração de biomassa da fase exponencial de crescimento dos cultivos a 35°C e 2,5 g L⁻¹ de nitrato de sódio.

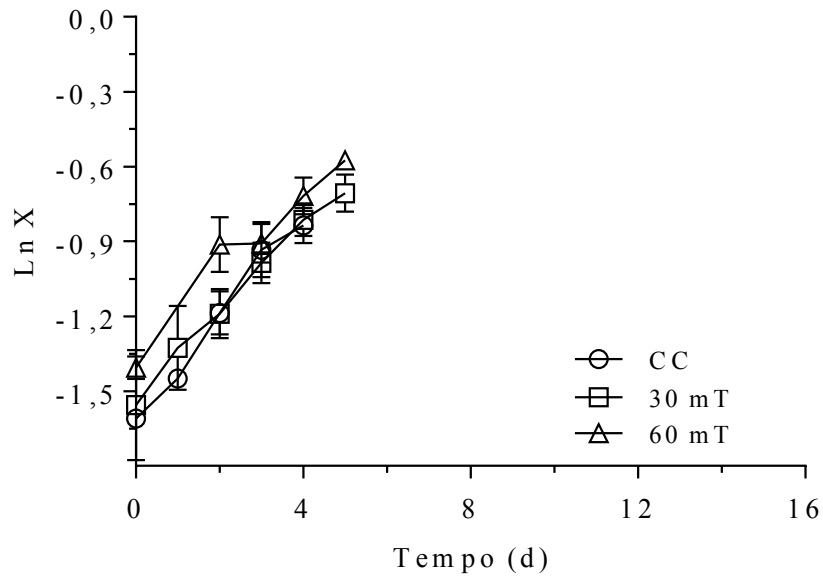


Figura AP 4 - Linearização da concentração de biomassa da fase exponencial de crescimento dos cultivos a 35°C e 1,875 g L⁻¹ de nitrato de sódio.

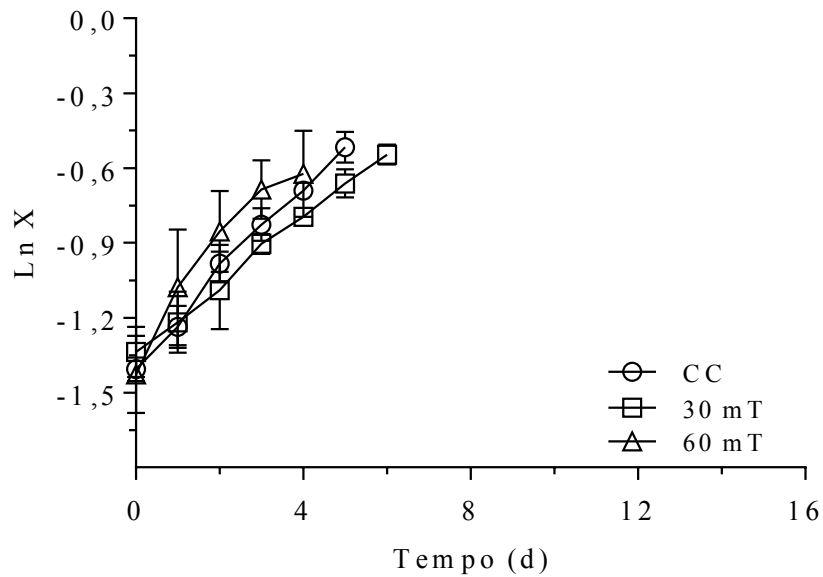


Figura AP 5 - Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em fotobiorreatores tubulares com aplicação de 60 mT.

