



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GÉSSICA MARCHESE ROMAN

Avaliação da incorporação de microalga *Chlorella* sp. em massas alimentícias

Porto Alegre

2016

GÉSSICA MARCHESE ROMAN

Avaliação da incorporação de microalga *Chlorella* sp. em massas alimentícias

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos da UFRGS como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Rech

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Cruz Silveira
Thys

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família, em especial aos meus pais, Andreia e Paulo, e meus tios, Maristela e Augusto, que me apoiaram e continuaram apoiando durante esse tempo, me auxiliando sempre e tendo paciência durante as longas semanas estudando para as provas e trabalhos.

À Prof^a. Dra. Rosane Rech e Prof^a. Dr^a. Roberta Cruz Silveira Thys que me possibilitaram a realização do trabalho, pela orientação, apoio e disponibilidade, muito obrigada!

Agradeço ao pessoal do laboratório 117 do ICTA, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial a Tânia, pela ajuda ao longo do caminho.

Agradeço a atenção e os ensinamentos da Prof^a. Dr^a. Simone Hickmann Flôres!

Agradeço também aos meus colegas da Engenharia, que me proporcionaram diversão e aprendizado ao longo destes anos.

À Universidade e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos conhecimentos e desafios proporcionados.

À todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho. Obrigada!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo geral.....	10
2.2	Objetivos específicos.....	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	Mudanças na alimentação	11
3.2	Microalgas	12
3.2.1	Meio de cultivo para microalgas	14
3.2.2	Microalgas na alimentação	15
3.2.3	Microalga <i>Chlorella</i>	17
3.3	Compostos obtidos de microalgas	18
3.3.1	Pigmentos	18
3.3.1.1	Clorofila.....	18
3.3.1.2	Ficobilinas	19
3.3.1.3	Carotenoides	19
3.3.2	Ácidos graxos	21
3.4	Massas alimentícias	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Microalgas	24
4.1.1	Pré-inóculo	24
4.1.2	Cultivo em fotobiorreator	25
4.2	Extrato obtido a partir da biomassa	26
4.3	Preparo das massas alimentícias frescas	27
4.4	Composição centesimal da microalga	29
4.4.1	Extração de lipídeos por Bligh & Dyer	29
4.5	Avaliação de parâmetros das massas alimentícias	29
4.5.1	Tempo ótimo de cocção.....	30
4.5.2	Ganho de peso	30
4.5.3	Perda de sólidos	30
4.5.4	Cor	30
4.6	Avaliação das propriedades funcionais	31
4.6.1	Carotenoides totais	31
4.6.2	Identificação e quantificação de carotenoides	31
4.7	Análise sensorial	32
4.8	Análise estatística.....	33

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1	Extrato	34
5.2	Composição centesimal da microalga	34
5.3	Parâmetros das massas alimentícias	34
5.4	Propriedades funcionais.....	38
5.4.1	Carotenoides totais	38
5.4.2	Identificação de carotenoides	40
5.5	Avaliação sensorial	43
6	CONCLUSÃO.....	46
7	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO I.....	53
	ANEXO II - FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL.....	54
	ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tendências observadas para o consumo de alimentos (Brasil <i>Food Trends</i> 2020). 11	
Figura 2. Esquema dos principais compostos produzidos pelas microalgas e suas principais aplicações (Adaptado de SAFI <i>et al.</i> , 2014)...... 13	
Figura 3. Biscoitos adicionados de <i>Chlorella vulgaris</i> (GOUVEIA <i>et al.</i> , 2007)...... 16	
Figura 4. Efeito da concentração de biomassa de <i>Diacronema vlkianum</i> em massas alimentícias frescas (FRADIQUE <i>et al.</i> , 2013). 16	
Figura 5. Massas contendo diferentes porcentagens de biomassa de <i>Spirulina maxima</i> (1), <i>Chlorella vulgaris</i> verde (2) e <i>Chlorella vulgaris</i> laranja (3) (FRADIQUE <i>et al.</i> , 2010)...... 17	
Figura 6. Pães de farinha de arroz, controle (a) e adicionados de 2% (b), 3% (c), 4% (d) e 5% (e) de <i>Spirulina platensis</i> (FIGUEIRA <i>et al.</i> , 2011)...... 17	
Figura 7. Estrutura dos carotenoides: (a) Xantofilas - zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina, respectivamente; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004). 20	
Figura 8. <i>Chlorella sp.</i> , adaptado de (ICB, 2016). 24	
Figura 9. Estufa rotatória com os pré-inóculos das microalgas. 25	
Figura 10. Cultivo da microalga em fotobiorreatores tipo <i>air-lift</i> 26	
Figura 11. Etapas de elaboração do extrato a partir da biomassa. 27	
Figura 12. Preparo e secagem das massas alimentícias frescas. 28	
Figura 13. Massa fresca com incorporação de 1 e 2 % de biomassa da microalga <i>Chlorella sp.</i> 28	
Figura 14. Massa fresca com incorporação de 1 e 2 % extrato (equivalência) da microalga <i>Chlorella sp.</i> 29	
Figura 15. Cromatograma de carotenoides obtidos em HPLC-MS da microalga <i>Chlorella sp.</i> * ¹ <i>all-trans</i> -violaxantina, ² <i>cis</i> -violaxantina, ³ 13- <i>cis</i> -luteína, ⁴ 13'- <i>cis</i> -luteína, ⁵ <i>all-trans</i> -luteína, ⁶ <i>all-trans</i> -zeaxantina, ⁷ 15- <i>cis</i> - β -caroteno, ⁸ <i>all-trans</i> - α -caroteno, ⁹ 13- <i>cis</i> - β -caroteno, ¹⁰ <i>all-trans</i> - β -caroteno, ¹¹ 9- <i>cis</i> - β -caroteno. 40	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Requisitos nutricionais para o cultivo de microalgas.	14
Tabela 2: Formulações das massas alimentícias.	27
Tabela 3: Composição centesimal da microalga <i>Chlorella sp.</i>	34
Tabela 4: Avaliação dos parâmetros das massas alimentícias frescas.	35
Tabela 5: Parâmetros de cor das massas alimentícias antes e após cocção.....	37
Tabela 6: Perda de cor das massas alimentícias após a cocção.....	38
Tabela 7: Análise carotenoides totais da microalga <i>Chlorella sp.</i> na biomassa e extrato.....	38
Tabela 8: Carotenoides totais em massas alimentícias frescas com incorporação da microalga <i>Chlorella sp.</i> na forma de biomassa e extrato.	39
Tabela 9: Identificação e quantificação dos carotenoides por cromatografia da biomassa e seu extrato.	41
Tabela 10: Identificação e quantificação dos carotenoides das massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa antes e após a cocção.	42
Tabela 11: Teor de β - caroteno e luteína encontrado em alguns vegetais.....	43
Tabela 12: Aceitação de atributos das massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa e 2 % de extrato.	43
Tabela 13: Aceitação de atributos das massas alimentícias com incorporação de 1 % de biomassa e 1 % de extrato.	44

RESUMO

As microalgas vêm ganhando grande espaço dentro do panorama das pesquisas mundiais, visto que são microrganismos que apresentam taxa de crescimento rápido, possuem cultivo simples e são capazes de produzir biomassa rica em compostos biologicamente ativos como por exemplo, vitaminas, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, pigmentos entre outros. O objetivo do projeto foi avaliar misturas formadas pela associação da microalga *Chlorella* sp., através da elaboração de misturas com incorporação (0 a 2 %) da biomassa e do extrato obtido a partir biomassa da microalga, em farinha de trigo. Esperou-se com este estudo poder vincular à farinha de trigo, um produto de alto valor nutricional, como as microalgas, avaliando suas características em massas alimentícias frescas. A biomassa da microalga *Chlorella* sp. foi obtida através do cultivo em fotobiorreatores e o extrato a partir da biomassa por meio da extração exaustiva com etanol. A avaliação da biomassa foi realizada através de testes físico-químicos como de lipídeos, umidade, teor de cinzas e proteínas, as massas alimentícias foram avaliadas através da análise dos parâmetros de cocção, de cor, carotenoides e análise sensorial. A análise centesimal da microalga demonstrou uma grande quantidade de proteínas e cinzas, o que pode resultar no incremento de minerais e aumento de proteínas nas massas alimentícias. Quanto aos parâmetros de cocção, em todas as amostras a perda de sólidos foi inferior a 12 % podendo ser consideradas de boa qualidade. Os valores de carotenoides totais chegaram a 2,33 mg g⁻¹ na biomassa e 14,55 mg g⁻¹ no extrato da microalga. O aumento dos carotenoides foi gradual com a incorporação da microalga nas massas alimentícias, obtendo valor máximo de 48 µg g⁻¹ nas massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa. Os carotenoides majoritários identificados foram: luteína, β-caroteno, α-caroteno e zeaxantina. Quanto a avaliação sensorial, todas as formulações atingiram valores ótimos de aceitação global, chegando a 88 % nas massas alimentícias com 1 % de incorporação da biomassa. Logo, as microalgas têm grande potencial para serem empregadas na elaboração de novos produtos, como pães, massas, biscoitos e bolos, tornando-se mais uma alternativa alimentar com boas características nutricionais, podendo promover benefícios à saúde do consumidor.

Palavras-chave: microalgas, carotenoides, massas alimentícias.

1 INTRODUÇÃO

A valorização de alimentos funcionais produzidos com ingredientes naturais cresce a cada dia, motivando as indústrias a realizarem pesquisas e projetos de desenvolvimento de novos produtos, focados na qualidade de vida através de uma alimentação nutritiva. Junto a isso, o desenvolvimento de alternativas mais produtivas do que a agricultura tradicional, de fácil adaptação a diferentes climas e culturas, se torna cada vez mais necessário, visto o cenário global em que cada vez se produz mais, o que limita o espaço destinado a determinada função.

As microalgas vêm ganhando grande espaço dentro das pesquisas mundiais, são microrganismos que apresentam taxa de crescimento rápido, possuem cultivo simples e são capazes de produzir biomassa rica em compostos bioativos como ácidos graxos insaturados e carotenoides. O maior desafio é o uso de compostos obtidos da microalga, já aceitos pela comunidade científica e comprovadamente benéficos ao ser humano, para adição em alimentos, contribuindo assim para a mudança de hábito da população brasileira, não adaptada ainda ao consumo de alimentos adicionados de microalgas ou seus extratos.

Cultivos de microalgas já têm sido realizados visando à produção de biomassa para uso na elaboração de alimentos, sendo que as principais formas de inserção das microalgas na alimentação humana são os suplementos alimentares (formulações em pó, tabletes, capsulas ou extratos), podendo também ser incorporadas em massas, *snacks*, chocolates ou gomas e bebidas. As principais espécies utilizadas para estes fins são *Arthrospira*, *Chlorella* sp., *Dunaliella salina* e *Aphanizomenon flos-aquae* (PULZ; GROSS, 2004; DERNER *et al.*, 2006).

As microalgas *Spirulina* (*Arthrospira*) e *Chlorella* possuem o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) podendo ser utilizadas como alimento sem oferecer risco a saúde. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite a sua comercialização desde que o produto final esteja devidamente registrado, para as microalgas *Spirulina* e *Chlorella*.

À medida que novas ações positivas são atribuídas aos mais diversos alimentos, é fundamental que se investigue a melhor maneira de adequá-los à dieta comum da população, a fim de estimular cada vez mais o consumo de alimentos com ingredientes bioativos. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar incorporação de microalgas em massas alimentícias, produto presente na alimentação dos brasileiros, além de determinar suas características tecnológicas e aceitação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver massas alimentícias frescas com incorporação da biomassa da microalga *Chlorella* sp. e seu extrato e avaliar suas propriedades tecnológicas, funcionais e sensoriais.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o cultivo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreatores, afim de obter a biomassa necessária para o desenvolvimento das massas;
- Obter o extrato de *Chlorella* sp. a partir da biomassa;
- Desenvolver massas alimentícias frescas enriquecidas com microalgas (biomassa e seu extrato);
- Caracterizar a biomassa e seu extrato em relação ao conteúdo de carotenoides;
- Avaliar a quantidade de carotenoides presente nas massas alimentícias e estimar a perda destes após a cocção;
- Avaliar parâmetros tecnológicos das massas alimentícias (tempo ótimo cocção, ganho de peso, perda de sólidos e perda de cor);
- Realizar a avaliação sensorial das massas desenvolvidas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mudanças na alimentação

Os alimentos associados a benefícios à saúde são uma tendência do mercado alimentício deste século. Entre os elementos que podem explicar o êxito dos alimentos funcionais, cita-se a preocupação crescente da população pela saúde e pelo bem-estar, como pode-se perceber nas tendências observadas no consumo de alimentos no Brasil (Brasil *Food Trends* 2020) mostradas na Figura 1. Neste estudo, observou-se forte correlação com as tendências de consumo de alimentos encontradas em outros países do mundo, onde um dos itens está associado a saudabilidade.

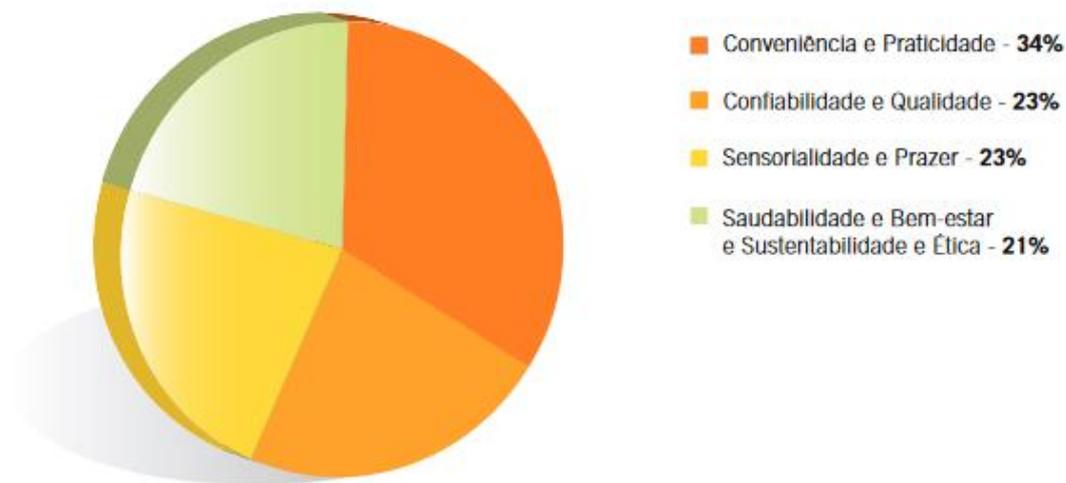


Figura 1. Tendências observadas para o consumo de alimentos (Brasil *Food Trends* 2020).

O que mais se destaca no último grupo é a busca por alimentos que podem trazer algum benefício à saúde. A pesquisa demonstrou o interesse dos consumidores não só pela saudabilidade mas também pela qualidade de vida, que inclui a sociedade e o meio ambiente, priorizando a compra de alimentos industrializados quando o fabricante demonstre preocupação com o meio ambiente ou projetos sociais (Brasil *Food Trends* 2020).

Quanto à sustentabilidade, a população do planeta já atingiu 7,2 bilhões de pessoas, segundo a Organização das Nações Unidas no estudo "Perspectivas de População Mundial". De acordo com as projeções de crescimento demográfico apresentadas pela entidade, a população mundial deve chegar a 8,1 bilhões de pessoas em 2025 e 9,6 bilhões em 2050 (ONU, 2013), aumentando cada vez mais os impactos da agricultura sobre o ambiente. Alimentar bilhões de

peças e manter o clima dentro de limites habitáveis são os principais problemas a serem enfrentados visando garantir ofertas para as gerações futuras (MILINSKI *et al.*, 2006). É possível que novas técnicas produtivas sejam cada vez mais investigadas no sentido de produzir alimentos saudáveis e abundantes a baixo custo, propiciando complementar as necessidades nutricionais diárias da população e, ao mesmo tempo, repensando as práticas agrícolas que hoje são adotadas. Nesse contexto, várias contribuições da biotecnologia e bioprocessos têm sido investigadas visando remediar danos ambientais e melhorar a qualidade de vida das pessoas.

A aquicultura é outra tendência que deverá se consolidar, destacando, o cultivo de organismos que apresentam elevado valor nutricional, altas taxas de produção de biomassa e necessidades de pequenos espaços. Neste contexto as culturas em massa de microalgas e outros microrganismos deverão ocupar papel de destaque (HABIB *et al.*, 2008).

3.2 Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes eucarióticos com representantes nas Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta ou procarióticos com representantes nas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) (DERNER *et al.*, 2006). Apresentam estrutura simples, dimensões microscópicas, e possuem alta capacidade de adaptação e tolerância em condições ambientais consideradas extremas, sendo capazes de sobreviver em diferentes habitats (águas doces, águas salobras e águas marinhas) e em diferentes condições de pH e temperaturas. Estima-se a existência de mais de 50 mil espécies, mas apenas um número limitado (cerca de 30 mil), foram estudadas até o momento (MATA *et al.*, 2010).

Microalgas já vêm sendo cultivadas há mais de 40 anos com diversos fins, como é o caso da *Spirulina* como suplemento alimentar para aumentar o valor nutricional de alimentos, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* para produção de carotenoides, e uma gama de espécies para aquicultura. A pesquisa de microalgas data do final do século XIX, tendo como pioneiros pesquisadores poloneses, russos, holandeses e franceses. No Brasil somente nos anos 70 foi iniciada a criação das primeiras coleções de microalgas em cultivo e apenas na década de 80 esses cultivos realmente começaram a se difundir (LOURENÇO, 2006).

Cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Dentre os inúmeros compostos extraídos, ou com potencial de exploração

comercial, podem ser relacionados carotenoides (β -caroteno, luteína, etc.), ácidos graxos poli-insaturados, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos, os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (SPOLAORE *et al.*, 2006). Na Figura 2 são apresentados alguns produtos obtidos a partir de microalgas e suas aplicações.

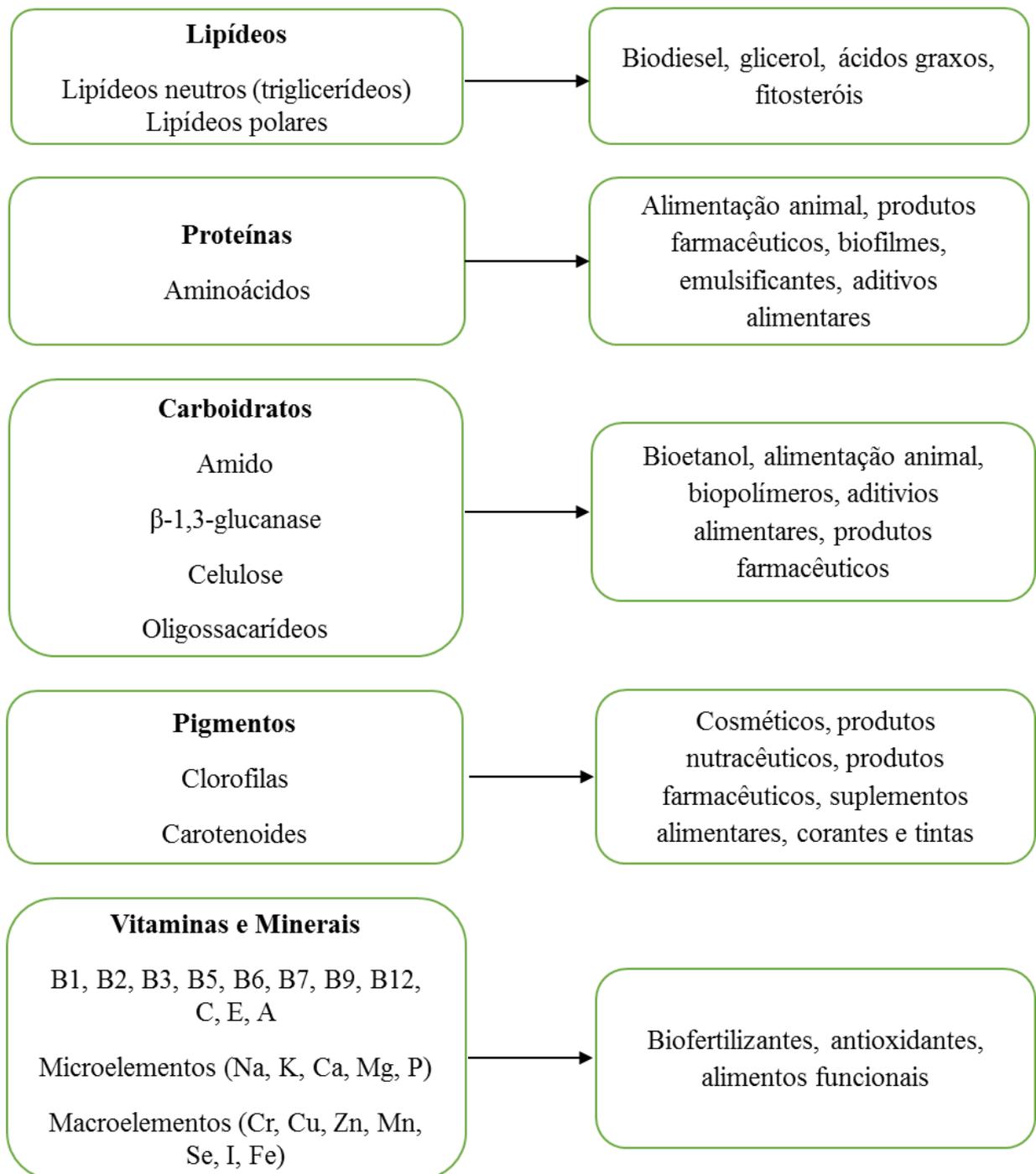


Figura 2. Esquema dos principais compostos produzidos pelas microalgas e suas principais aplicações (Adaptado de SAFI *et al.*, 2014).

3.2.1 Meio de cultivo para microalgas

O crescimento das microalgas é influenciado por diversos fatores físico-químicos, tais como temperatura, concentração de nutrientes, luminosidade e concentração de oxigênio e gás carbônico (CO₂).

O meio de cultivo pode ser definido como o ambiente específico que contém os nutrientes necessários ao desenvolvimento das microalgas em cultivo. Entre as espécies, ocorrem variações desses nutrientes tanto em relação à quantidade, quanto aos tipos que devem ser utilizados, podendo os diferentes tipos de meios de cultura serem adequados a vários grupos de microalgas, para somente alguns deles ou para determinadas espécies. Ainda assim, estas necessidades nutricionais são dependentes de distintas condições ambientais (GUILLARD, 1975).

As microalgas possuem menos celulose em relação a espécies de plantas terrestres, devido a isso possuem uma demanda maior de nutrientes, como carbono, nitrogênio, fósforo, ferro, entre outros; pois se utilizam da fotossíntese para se multiplicar (MARKOU *et al.*, 2014). Na Tabela 1 estão sintetizados os requisitos nutricionais para o cultivo de microalgas.

Tabela 1: Requisitos nutricionais para o cultivo de microalgas.

Nutrição	Principais Ingredientes	Função	Faixa
Carbono	CO ₂ , HCO, CO ₃ , etc.	Fornecer C para toda a célula, etc.	1 – 10 g L ⁻¹
Nitrogênio	NO ₃ , Uréia, N ₂ , etc.	Fornecer N para toda a célula, etc.	10 – 2000 mg L ⁻¹
Fósforo	Hidrofosfato, fosfato, etc.	Fornecer P para todas as reações nas células, etc.	10 – 500 mg L ⁻¹
Enxofre	Sulfato, etc.	Fornecer S para proteínas e reações, etc.	1 – 200 mg L ⁻¹
Sais inorgânicos	K, Ca, Na, Mg, etc.	Manter estrutura e atividade celular, etc.	0,1 – 100 mg L ⁻¹
Elementos-traço	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, etc.	Ser fator coenzima, etc.	0,01 – 10 mg.L ⁻¹
Vitaminas	Vitaminas VB, VC, VE, etc.	Ajudar na divisão celular, etc.	0,01–1000 µg.L ⁻¹

Fonte: Adaptado ZENG *et al.*, 2011.

Muitos meios de cultivo de microalgas marinhas são formulados utilizando como base água do mar, que possui grande quantidade de sólidos e gases dissolvidos, onde estão presentes inúmeros elementos químicos, porém, muitos destes estão presentes em quantidades limitadas e são insuficientes para proporcionar seu crescimento adequado. Devido a isso, muitas vezes a água do mar necessita ser suplementada com macro e micronutrientes a fim de obter respostas de crescimento mais rápidas das espécies. Normalmente os meios de cultura marinhos podem ser constituídos de três formas: meios de cultura definidos, os quais são preparados a partir de água de elevada pureza à qual são adicionados os sais constituintes da água do mar e os sais nutrientes que estimulam o crescimento, meios de cultura semidefinidos, os quais utilizam a água do mar como matriz, a qual é enriquecida com nutrientes inorgânicos, de composição conhecida, e os meios de cultura indefinidos, os quais são feitos a partir de água do mar enriquecida com uma mistura não determinada de substâncias orgânicas e inorgânicas (LOURENÇO, 2006).

3.2.2 Microalgas na alimentação

No mercado de alimentos funcionais, a utilização de microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas, apresenta rápido desenvolvimento em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia. As principais microalgas cultivadas comercialmente são espécies dos gêneros *Chlorella beyerinck*, (Chlorophyceae) e *Arthrospira stizenberger* (Cyanophyceae) para a adição em alimentos naturais, *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyceae) para a obtenção de β -caroteno e *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) para a obtenção de astaxantina (SPOLAORE *et al.*, 2006).

As principais formas de inserção das microalgas na alimentação humana são os suplementos alimentares (formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos), podendo também ser incorporadas em massas, *snacks*, chocolates ou gomas e bebidas. As principais espécies utilizadas para estes fins são *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella salina* e *Aphanizomenon flos-aquae* (PULZ; GROSS, 2004; DERNER *et al.*, 2006). Compostos como carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados também poderiam ser extraídos através de cultivos em larga escala de microalgas para serem aplicados na indústria de alimentos (MATA *et al.*, 2010).

Algumas microalgas como *Spirulina* e *Chlorella* possuem o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA, podendo ser utilizadas como alimento sem oferecer risco a saúde, sendo estas as principais microalgas

cultivadas comercialmente para a adição em alimentos naturais mundialmente conhecidos como “*health food*” (BECKER, 2004).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite a sua comercialização desde que o produto final (cápsula, pó ou produtos no qual o microrganismo tenha sido adicionado) esteja devidamente registrado, para as microalgas *Spirulina* e *Chlorella*.

Além disso, inúmeras pesquisas vêm sendo feitas com microalgas na alimentação humana, por elas possuírem em sua composição antioxidantes, fibras, ácidos graxos, poder corante e oligoelementos (GOUVEIA *et al.*, 2007). As Figuras 3, 4, 5 e 6, mostram alguns produtos desenvolvidos a partir de microalgas.



Figura 3. Biscoitos adicionados de *Chlorella vulgaris* (GOUVEIA *et al.*, 2007).



Figura 4. Efeito da concentração de biomassa de *Diacronema vlkianum* em massas alimentícias frescas (FRADIQUE *et al.*, 2013).



Figura 5. Massas contendo diferentes porcentagens de biomassa de *Spirulina maxima* (1), *Chlorella vulgaris* verde (2) e *Chlorella vulgaris* laranja (3) (FRADIQUE *et al.*, 2010).

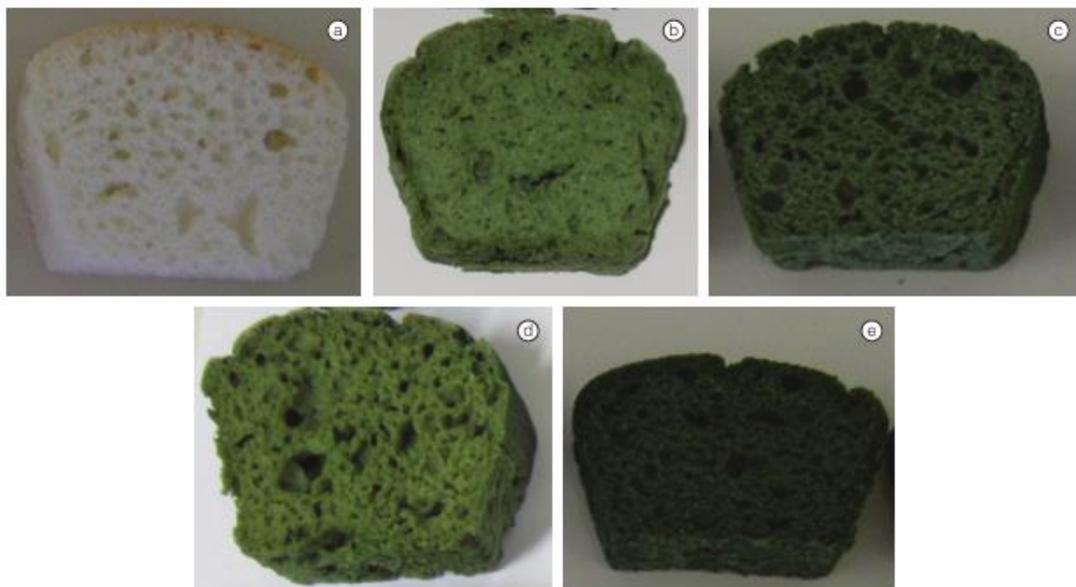


Figura 6. Pães de farinha de arroz, controle (a) e adicionados de 2% (b), 3% (c), 4% (d) e 5% (e) de *Spirulina platensis* (FIGUEIRA *et al.*, 2011).

3.2.3 Microalga *Chlorella*

A microalga *Chlorella* faz parte do grupo das Chlorophytas ou algas verdes. É uma alga unicelular, com formato esférico, globular ou elipsoidal, não móvel e pode atingir diâmetros entre 2,0 μm e 10,0 μm . Dependendo da espécie da microalga *Chlorella*, elas podem ser

marinhas ou dulcícolas. Sua composição média é de aproximadamente 10 % de carboidrato, 44 % de proteína, 29 % de lipídios e 8,5 % de minerais e vitaminas (PHUKAN *et al.*, 2011).

A microalga *Chlorella* é cultivada desde 1960 no Japão, sendo que, em 1980, já existiam aproximadamente 26 fábricas de grande escala na Ásia, produzindo cerca de 1000 kg de biomassa por mês (SPOLAORE *et al.*, 2006). Ela foi a primeira espécie a ser cultivada em grande escala, em 1961, no Japão pela empresa Nihon *Chlorella*, para ser comercializada como suplemento alimentar (LOURENÇO, 2006). Ela é utilizada em muitas pesquisas de biodiesel (ZHOU *et al.*, 2013) e é a segunda microalga mais produzida no mundo para aplicação na nutrição humana, cosméticos e aquicultura (BRENAN; OWENDE, 2010).

3.3 Compostos obtidos de microalgas

3.3.1 Pigmentos

As microalgas são microrganismos fotossintéticos e seus pigmentos podem ser classificados em três grandes grupos: as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas, pigmentos que se diferem em sua composição química e quanto à faixa do espectro da luz visível na captação de luz.

3.3.1.1 Clorofila

As clorofilas são os principais pigmentos absorventes de luz em plantas verdes, algas e bactérias fotossintéticas. As clorofilas estão localizadas nas lamelas de organelas intercelulares das plantas verdes conhecidas como cloroplasto. Elas estão associadas a carotenoides, lipídeos e lipoproteínas (DAMODARAN, PARKIN & FENNEMA, 2010).

O papel principal nos sistemas de absorção de luz é desempenhado pela clorofila *a*, portanto, ela está presente em todas as espécies de microalgas fotossintetizantes. As clorofilas *b*, *c* e *d* são pigmentos acessórios da fotossíntese, sendo que a maioria das algas possui alguma delas (LOURENÇO, 2006). A clorofila, devido à sua atividade como agente quelante, pode ser usada para tratamentos de úlcera e recuperação de fígado e para reparação celular, pois aumenta a hemoglobina no sangue, que aumenta o crescimento celular; também pode ser usada como aditivo em alimentos, devido à sua forte pigmentação verde, aliada à demanda dos consumidores por alimentos naturais. Acredita-se que quase todas as culturas de microalgas em condições ótimas de crescimento possuem aproximadamente 4 % do seu peso seco de clorofila, mas foi relatado que a microalga *Chlorella* pode possuir maiores quantidades (HARUN *et al.*,

2010). As clorofilas não apresentam grande valor comercial pois já existem melhores matérias-primas alternativas às microalgas (LOURENÇO, 2006).

3.3.1.2 Ficobilinas

O grupo das ficobilinas está presente apenas em alguns tipos de algas e pode ser classificado como pigmentos azuis, sendo chamado de ficocianinas, ou pigmentos vermelhos, sendo chamado de ficoeritrinas. As ficobilinas aumentam o espectro de captação da luz pela fotossíntese e também atuam como reserva de nitrogênio (LOURENÇO, 2006). As principais aplicações deste grupo são como corantes alimentares, substituindo os corantes sintéticos e como pigmentos naturais em cosméticos (SPOLAORE *et al.*, 2006).

3.3.1.3 Carotenoides

Os carotenoides são os pigmentos mais relevantes presentes nas microalgas. São pigmentos acessórios na captação de luz durante a fotossíntese e também são capazes de proteger a estrutura fotossintética do excesso de luz através da eliminação das espécies reativas de oxigênio, como oxigênio molecular singlete e outros radicais livres. Em humanos, as funções mais relevantes dos carotenoides estão ligadas às propriedades antioxidantes dos mesmos (VILCHEZ *et al.*, 2011).

Os carotenoides são classificados como tetraterpenos, formado por 40 átomos de carbono, constituídos de unidades isoprenoides de cinco carbonos. Possuem uma longa cadeia de hidrocarbonetos poliênicos que podem conter de 9 a 15 ligações conjugadas. A estrutura linear e simétrica destes possibilita diversas modificações como: ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções oxigenadas (álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, ésteres e ácidos carboxílicos) ou a combinação destes processos, o que resulta em uma diversidade de estruturas (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004; AMBRÓSIO *et al.* 2006; MORAIS, 2006).

São encontradas na natureza duas classes de carotenoides: os carotenos e as xantofilas. Os primeiros, tais como β -caroteno, são hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula. As xantofilas, por sua vez, são os derivados oxigenados, sendo representados pela luteína, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, entre outros (VALDUGA *et al.*, 2009). Alguns carotenoides possuem atividade pró-vitáminica A (β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina e β -criptoxantina) e outros, como a luteína e zeaxantina,

carotenoides de pigmentação amarela, são ativos contra a degeneração macular relacionada à idade e a catarata, mas sem atividade pró-vitáminica A. Tal proteção ocorre devido à sua atividade antioxidante, pois as ligações duplas conjugadas que ambos possuem, são varredores de radicais livres e supressores de oxigênio singlete (GAMA; SYLOS, 2007; ARSCOTT; TANUMIHARDJO, 2010; BRITTON, 1995). Na Figura 7 está representada a estrutura de alguns carotenoides do grupo dos carotenos e xantofilas

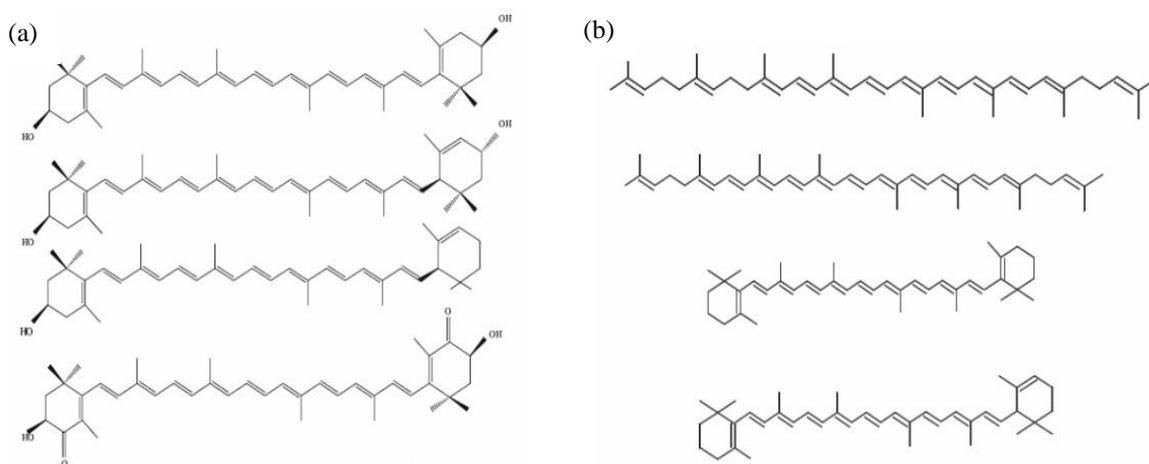


Figura 7. Estrutura dos carotenoides: (a) Xantofilas - zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina, respectivamente; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).

Nas indústrias de alimentos, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes, com a finalidade de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos que não possuem cor e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Mais recentemente, com o crescente interesse pela saúde, os carotenoides também têm sido adicionados aos alimentos devido a suas atividades biológicas, a fim de enriquecer nutricionalmente o produto alimentício. São também precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de algumas flores (SÁNCHEZ-CONTRERAS *et al.*, 2000), coloração específica e fotoproteção (MARASCO; SCHMIDT, 2003).

A adição de carotenoides na alimentação está relacionada com a diminuição no risco de doenças degenerativas, inflamações, envelhecimento, aumento da atividade do sistema imunológico (GUERIN *et al.*, 2003), menor risco de desenvolvimento de vários tipos de doenças degenerativas (SCHÜNEMANN *et al.*, 2002), proteção dos seres humanos contra

certos tipos de câncer, como mama e pulmão (REDDY *et al.*, 2003), doenças cardiovasculares (HALLIWELL, 2000), melhoria no tratamento de lesões musculares, redução de cólicas menstruais (LOURENÇO, 2006), aumento da resistência a infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias (GOUVEIA; EMPIS, 2003), bem como o aumento da atividade do sistema imunológico (GUERIN *et al.*, 2003).

Alves-Rodrigues e Shao (2004) sugerem que a luteína pode ser empregada na indústria de alimentos funcionais para enriquecimento de produtos, tais como bebidas lácteas, cereais, biscoitos, molhos e sopas, e também como corante natural, sendo utilizada para colorir alimentos como óleos comestíveis, margarina, maionese, mostarda, molhos de salada, iogurte, bolos, sorvete e produtos lácteos.

3.3.2 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são importantes constituintes da dieta humana, apresentando efeitos terapêuticos e desempenhando importante papel tecnológico na indústria de alimentos. Os ácidos graxos extraídos de microalgas podem ser utilizados como ingrediente alimentício, fármacos ou transformados em biocombustíveis. Os principais ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são o ácido linoleico, ácido linolênico, araquidônico, ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaenoico (DHA) (BROWN; ZEILER, 1993 *apud* COSTA, 2006).

O ácido linolênico (C18:3-6, GLA) é necessário para síntese do ácido araquidônico e prostaglandinas. O perfil de ácidos graxos é determinante nas propriedades físicas, químicas e sensoriais dos alimentos. Os ácidos EPA e DHA podem atuar na prevenção e tratamento de várias doenças, como cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (SANDER, 2000).

Alguns ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, produzidos pelas microalgas, possuem uso nutricional e farmacêutico, sendo de alto valor agregado, como os dos grupos ω -3 e ω -6, por exemplo, o α -linoleico (18:3, ALA), ácido eicosapentaenoico (20:5, EPA), docosaenoico, (22:6, DHA) e araquidônico (20:4n-6, AA) (SPOLAORE *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2009; MATA *et al.*, 2010).

3.4 Massas alimentícias

Massa alimentícia é um alimento tradicional à base de cereais muito popular devido à sua facilidade de transporte, manuseio, cocção e armazenamento, também devido a suas propriedades nutricionais e boa palatabilidade (AKILLIOGLU; YALCIN, 2010).

A história do macarrão está associada com a evolução da humanidade; há mais de 6 mil anos, o homem descobriu que podia moer alguns cereais e misturar com água e desde então as massas alimentícias tiveram ampla aceitação e a demanda aumentou. No Brasil, o macarrão veio na bagagem de italianos que imigraram no início do século XIX, estimulando a cultura do trigo, a construção de moinhos e a criação das primeiras fábricas de massas. Desde então o consumo do macarrão cresceu e segundo ABIMAPI (Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados) hoje é um dos alimentos preferidos pelos brasileiros. As massas alimentícias estão definitivamente incorporadas ao cardápio do brasileiro tanto como prato principal ou complemento e em muitas combinações, com alto índice de aceitabilidade (MENEGASSI; LEONEL, 2005).

De acordo com a legislação brasileira, massas alimentícias são os produtos obtidos da farinha de trigo (*Triticum aestivum L.* e ou de outras espécies do gênero *Triticum*) e ou derivados de trigo *durum* (*Triticum durum L.*) e ou derivados de outros cereais, leguminosas, raízes e ou tubérculos, resultantes do processo de empasto e amassamento mecânico, sem fermentação. Podem ser adicionados outros ingredientes, acompanhados de complementos isolados ou misturados à massa, desde que não descaracterizem o produto. Os produtos podem ser apresentados secos, frescos, pré-cozidos, instantâneos ou prontos para o consumo, em diferentes formatos e recheios (BRASIL, 2005).

Segundo a Resolução nº 93 de 31 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000), as massas alimentícias podem ser classificadas quanto ao teor de umidade, sendo massa fresca definida a um processo de secagem parcial, de forma que o produto final apresente umidade máxima de 35,0 % (fração mássica).

O Brasil é o terceiro maior mercado de massas do mundo, com um faturamento anual superior a US\$ 2,2 bilhões, atrás dos Estados Unidos (US\$ 2,7 bilhões) e da Itália (US\$ 3,6 bilhões), de acordo com levantamento da ABIMAPI. De 2009 a 2014, as vendas de massas no país cresceram 20,6 %, acima da média mundial (18,3 %), e as perspectivas são ainda mais favoráveis para o Brasil: até 2019, o consumo deve avançar 6,6 % no mundo e mais do que o dobro no Brasil (15,4 %), de acordo com a consultoria Euromonitor. Considerando o consumo per capita de massas alimentícias o Brasil está em 9º lugar no cenário mundial, totalizando 4,35 kg/ano; na primeira colocação está a Itália com um consumo per capita de 26,12 kg/ano (ABIMAPI, 2016).

As massas alimentícias são uma opção nutricional bastante saudável e, por isso, apropriadas para serem utilizadas como alimentos funcionais, através da incorporação de ingredientes adequados. Segundo Ambrosi *et al.* (2008), alimentos funcionais devem estar na forma de alimentos comuns, sendo consumidos como parte da dieta, proporcionando benefícios específicos à saúde. Além dos aspectos nutricionais, a adição de compostos que contém naturalmente compostos bioativos e de poder corante em massas alimentícias, podem propiciar uma aparência atraente com características sensoriais positivas. A cor é uma propriedade de importância tecnológica uma vez que é o atributo que mais influencia a aceitação dos alimentos, mas são os seus efeitos benéficos à saúde que despertam o interesse da comunidade científica no mundo inteiro.

A massa é um alimento básico em muitos países, com ótimo perfil nutricional, sendo uma boa fonte de hidratos de carbono e uma fonte moderada de proteínas e vitaminas, é de fácil preparação e muito versátil (BOROSKI *et al.*, 2011). Devido à sua fácil confecção, são excelentes para a adição de ingredientes funcionais, apresentando também baixo custo e boa aceitação. Um estudo relacionado à ingestão de massas relatou que 97 % dos indivíduos assumiram serem consumidores frequentes do produto (LEMES *et al.*, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microalgas

A microalga utilizada neste trabalho foi *Chlorella* sp. (Figura 8) gentilmente doada pela coleção de Cultura do Departamento de Biologia Marinha, UFF (Niterói-RJ). A microalga foi mantida em erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio de cultura de Guillard - "f/2" (LOURENÇO, 2006) a temperatura de 22 °C em câmara de germinação (BOD) sob fotoperíodo de 12/12 h (claro / escuro) no Laboratório de Bioengenharia (ICTA/UFRGS).

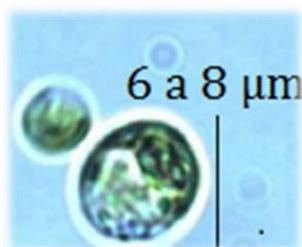


Figura 8. *Chlorella* sp., adaptado de (ICB, 2016).

4.1.1 Pré-inóculo

Para inocular cada cultivo em reator, uma alíquota de 20 mL de algas da cultura mãe do banco de cultivo foi inoculado em 180 mL de meio de cultivo estéril Guillard - "f/2" (LOURENÇO, 2006) em frasco erlenmeyer de 500 mL, que foram colocados em uma incubadora com agitação orbital, com temperatura controlada de 28 °C e iluminação permanente através de lâmpadas eletrônicas com intensidade luminosa de aproximadamente 5,0 klx (Figura 9). Após 7 dias, estes pré-inóculos ficaram prontos para iniciar o cultivo.



Figura 9. Estufa rotatória com os pré-inóculos das microalgas.

4.1.2 Cultivo em fotobiorreator

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de placa tipo *airlift*, em acrílico, com volume de 2,4 L, providos de camisa de aquecimento/resfriamento conectadas a banho térmico (KOCHEM *et al.*, 2014). A aeração foi fixada em 1 L min^{-1} de volume de ar enriquecido com 1 % (fração de ar) de CO_2 , utilizando-se duas pedras porosas conectadas a manguueiras inseridas no fundo dos reatores. A temperatura do biorreator foi controlada através do banho termostático em 28°C .

A assepsia dos reatores foi realizada adicionando 10 mL de solução de hipoclorito de sódio (2,5 %) aos reatores cheios de água, esses foram deixados por 24 h e após foram enxaguados com água destilada estéril. Após os reatores foram preenchidos com 2,16 L de meio de cultivo e 240 mL do pré-inóculo. O meio de cultivo utilizado foi o Guillard - “f/2” modificado com 600 mg L^{-1} de NaNO_3 contendo (por litro): 34 g de sal marinho (Red Sea), 5 mg de fosfato de sódio, 30 mg de silicato de sódio, 1 mL de solução de metais-traço, 1 mL de solução de vitaminas e 1 mL de solução-tampão de pH. A solução de metais-traço contém (por litro): 9,8 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 22 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 180 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6,3 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,36 g de Na_2EDTA e 3,15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A solução de vitaminas contém (por litro): 100 mg de tiamina, 0,5 mg de cianocobalamina e 0,5 mg de biotina. Para fazer o meio de cultivo foram preparadas soluções-estoque de acordo com LOURENÇO (2006). O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

A solução de vitaminas foi esterilizada por microfiltração e adicionada após o resfriamento do meio de cultivo.

Diariamente cada reator foi suplementado com 1 mL L^{-1} de solução de fosfato e 1 mL L^{-1} de solução de metais-traços. No final de 9 dias, todo o conteúdo do fotobiorreator foi centrifugado. A biomassa obtida foi liofilizada e armazenada a temperatura de $-22 \text{ }^\circ\text{C}$. A Figura 10 ilustra os cultivos em fotobiorreatores.

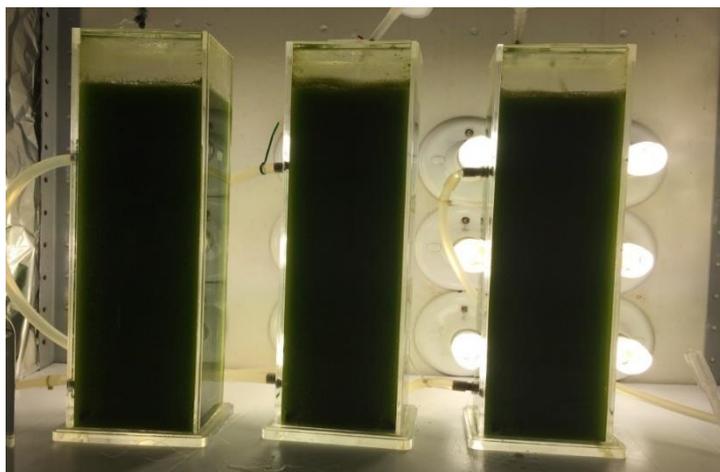


Figura 10. Cultivo da microalga em fotobiorreatores tipo *air-lift*.

4.2 Extrato obtido a partir da biomassa

Devido a questão sensorial associada as microalgas, que podem conferir sabor residual e odor característico, optou-se por avaliar além da biomassa, as características do extrato obtido a partir de microalgas.

Para obter o extrato, 30 g de biomassa liofilizada foram colocadas em gral (100 mL) e em seguida adicionado 15 mL de água para hidratação por 24 h, após realizada extração exaustiva com etanol puro (3 vezes) e centrifugado ($3000 \times g$ por 20 min). O sobrenadante foi transferido para um balão de fundo redondo e seco em evaporador rotativo ($T < 30 \text{ }^\circ\text{C}$) para posterior liofilização. Foi calculado o rendimento do extrato a partir da biomassa inicial (Eq. 1).

$$\text{Rendimento extrato} = \frac{\text{Peso do extrato}}{\text{Peso da biomassa}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Algumas etapas da obtenção do extrato podem ser visualizadas na Figura 11.



Figura 11. Etapas de elaboração do extrato a partir da biomassa.

4.3 Preparo das massas alimentícias frescas

Na produção das massas alimentícias frescas, utilizou-se farinha de trigo comum (Orquídea Massa Fresca, Moinho Tondo S.A), água gelada (30% sobre o peso da farinha) e a microalga. As formulações das massas padrão, com biomassa de microalga e com extrato de microalga são apresentadas na Tabela 2. Para fins de comparação entre as massas com biomassa e extrato, foi realizada a equivalência de ambos de acordo com o rendimento (Eq. 2), tendo em vista adicionar a mesma quantidade para avaliar e comparar as características sensoriais. Água gelada foi adicionada à mistura aos poucos, até alcançar a textura a adequada (aproximadamente 10 min). A massa foi extrusada (Extrusora GPANIZ, Modelo AME 0715) em formato de talharim e exposta em varal específico para que a umidade final fosse inferior a 35 %. Algumas das etapas de preparo e secagem das massas podem ser observadas na Figura 12.

Tabela 2: Formulações das massas alimentícias.

Formulação	Farinha de trigo (g)	Biomassa (g)	Extrato equivalência (g)
P	100	0	0
B1	100	1	0
B2	100	2	0
E1	100	0	1
E2	100	0	2

P: Padrão. B1: Massas alimentícias incorporação 1 % biomassa. B2: Massas alimentícias incorporação 2 % biomassa. E1: Massas alimentícias incorporação 1 % extrato (equivalência). E2: Massas alimentícias incorporação 2 % extrato (equivalência).

$$\text{Equivalência extrato} = \text{Rendimento} \times \text{Peso da biomassa} \quad \text{Eq. (2)}$$



Figura 12. Preparo e secagem das massas alimentícias frescas.

As Figuras 13 e 14 mostram as massas alimentícias frescas preparadas com as formulações descritas na Tabela 2.



Figura 13. Massa fresca com incorporação de 1 e 2 % de biomassa da microalga *Chlorella* sp.



Figura 14. Massa fresca com incorporação de 1 e 2 % extrato (equivalência) da microalga *Chlorella* sp.

4.4 Composição centesimal da microalga

As análises físico-químicas de umidade, cinzas e proteínas, foram determinadas segundo AOAC (1990) e lipídeos por Bligh & Dyer (1959). O teor de carboidratos foi estimado por diferença.

4.4.1 Extração de lipídeos por Bligh & Dyer

O teor de lipídeos totais na biomassa e no extrato foi determinado segundo o método descrito por Bligh & Dyer, (1959). Pesou-se 1 g de biomassa e colocou-se em um recipiente âmbar com tampa. Em seguida adicionou-se uma quantidade de clorofórmio (20 mL), metanol (10 mL), e água (10 mL). Na sequência, o conteúdo do frasco foi mantido em agitador magnético por 20 min. Na mistura foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de uma solução 10 % de Na_2SO_4 . A mistura resultante foi transferida para um funil de separação. A fase inferior foi filtrada em papel filtro contendo 1 g de sulfato de sódio anidro, e 5 mL do filtrado foram coletados e transferidos para um béquer previamente seco tarado. O béquer foi levado para a secagem em estufa a 105 °C por 2 h. O teor de lipídeos foi determinado pela diferença entre a massa do béquer após a secagem e a massa do béquer vazio.

4.5 Avaliação de parâmetros das massas alimentícias

Os parâmetros das massas alimentícias foram analisados segundo *American Association of Cereal Chemists Official Methods* n° 16-50 (AACC, 1995). Os parâmetros avaliados foram:

tempo ótimo de cocção, aumento de peso do produto cozido e perda de sólidos solúveis em água de cozimento. As análises foram determinadas em triplicata.

4.5.1 Tempo ótimo de cocção

O tempo ótimo de cocção foi determinado pela cocção de 10 g de amostra em 170 mL de água destilada em ebulição, até atingir o tempo de cozimento, o qual foi caracterizado pela gelatinização do amido em toda seção da massa. Este ponto foi determinado pela compressão do produto cozido entre duas lâminas de vidro até o desaparecimento do eixo central, a cada minuto.

4.5.2 Ganho de peso

O ganho de peso foi determinado pesando 10 g de massa antes e após a cocção, em 170 mL de água, obedecendo o tempo ideal de cada amostra. O resultado, expresso em porcentagem, é a razão entre o peso da massa cozida pelo peso da massa crua (Eq. 3).

$$\text{Ganho de peso \%} = \frac{\text{Peso após cocção} \times 100}{\text{Peso antes cocção}} \quad \text{Eq. (3)}$$

4.5.3 Perda de sólidos

Esse teste foi realizado observando os sólidos solúveis presentes na água de cozimento das massas. Após a cocção (10 g em 170 mL de água destilada), os sólidos perdidos na água foram quantificados pela evaporação de 25 mL de água de cocção em estufa a 105 °C até peso constante (Eq. 4).

$$\text{Perda de sólidos} = \frac{(\text{Peso cápsula com amostra após estufa} - \text{Peso cápsula}) \times 100}{\text{Peso inicial}} \quad \text{Eq. (4)}$$

4.5.4 Cor

As medições de cor foram realizadas antes e após a cocção das massas alimentícias frescas tendo em vista analisar a perda de cor durante o cozimento. Também foi avaliado a diferença de cor entre as massas com adição de extrato e biomassa, para isso foi utilizado um colorímetro portátil (Konica Minolta modelo CR 400, Singapura). Os parâmetros colorimétricos foram obtidos de acordo com a *Comission Internationale de l'Eclairage* (CIELAB sistema) e foram determinados os valores de L^* (luminosidade), variando desde o preto (0) ao branco (100), o valor a^* varia de verde (- 60) ao vermelho (60) eo valor b^* chroma

varia de azul (-60) para amarelo (60). A diferença de cor (ΔE) das amostras de massa antes e após a cocção foi calculado usando a Equação 5.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2} \quad \text{Eq. (5)}$$

4.6 Avaliação das propriedades funcionais

4.6.1 Carotenoides totais

Os carotenoides totais foram analisados por espectrofotometria. Às amostras devidamente pesadas, adicionou-se 10 mL de etanol 95 %. As amostras da biomassa, extrato e massas alimentícias ficaram armazenadas ao abrigo de luz por 12 h a temperatura de 4 °C. Depois desse período, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para medida da absorbância em espectrofotômetro (*Amersham Biosciences*, Ultrospec 3100 Pro) nos comprimentos de onda de 664 nm, 649 nm, 470 nm e 750 nm. Para determinação dos carotenoides totais foram utilizadas as equações (6), (7) e (8) (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

$$C_a = 13,36 \times DO_{664 \text{ nm}} - 5,19 \times DO_{649 \text{ nm}} \quad \text{Eq. (6)}$$

$$C_b = 27,43 \times DO_{649 \text{ nm}} - 8,12 \times DO_{664 \text{ nm}} \quad \text{Eq. (7)}$$

$$C_{Ct} = \frac{1000 \times DO_{470 \text{ nm}} - 2,13 \times C_a - 97,64 \times C_b}{209} \quad \text{Eq. (8)}$$

Em que:

C_a = concentração de Clorofila a (mg g^{-1});

C_b = concentração de Clorofila b (mg g^{-1});

C_{Ct} = concentração de carotenoides totais (mg g^{-1}).

4.6.2 Identificação e quantificação de carotenoides

Os extratos de carotenoides foram preparados de acordo com o método de Mercadante e Rodrigues-Amaya (1998). As etapas principais são extração dos pigmentos com acetona e saponificação com KOH 10 % em metanol por uma noite à temperatura ambiente. Após a retirada do álcali, o extrato foi concentrado em rotaevaporador ($T < 35$ °C), seco sob fluxo de nitrogênio e armazenado em freezer ($T < -18$ °C) para posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O cromatógrafo utilizado foi o Waters Alliance® E2695 com arranjo de diodos (PDA) Waters 2998 e software Empower. O extrato foi diluído em éter terc-butil metil (MTBE) (JTBaker, Cas. Número 1634/04/04, pureza de 99,96 %). Após a diluição, o extrato foi transferido para o ultrassom (Unique, modelo USC 1400) durante 5 min e posteriormente filtrado (Millex LCR 0,45, 13 mm) para a injeção subsequente.

Foi utilizada uma coluna de fase reversa C30 polimérica de 250 mm × 4,6 mm ID, 3 µm (YMC, modelo CT99SO3-2546WT). A fase móvel foi água / metanol / éter metil-terc-butílico (MTBE) (JTBaker, Cas. Número 1634/04/04, pureza de 99,96 %) a partir de 5:90:5, atingindo em 12 min 0:95:5, em 25 min, 0:89:11, 0:75:25, em 40 min e, finalmente, 00:50:50 depois de um total de 60 min, com uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹ a 33 °C (ZANATTA; MERCADANTE, 2007). Os espectros foram realizados, entre 250 e 600 nm e os cromatogramas transformados em um comprimento de onda fixo de 450 nm.

Os solventes utilizados, todos de grau cromatográfico, foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo com membrana de 0,45 µm (apropriada para solvente orgânico) e degaseificados em ultrassom. As amostras foram filtradas em membrana de polietileno de 0,22 µm de poro.

A caracterização dos carotenoides foi baseada nos seguintes parâmetros: (1) tempo de retenção na coluna, (2) comparação das características dos espectros no UV-visível, como λ_{\max} , grau de estrutura fina (%III/II) e intensidade do pico *cis* (%A_B/A_{II}) com dados da literatura (BRITTON *et al.*, 1995).

Foram construídas curvas de calibração para os principais carotenoides, com 6 a 9 níveis de concentração, em triplicata. Os extratos foram injetados em triplicata e os resultados foram expressos em micrograma de carotenoides por grama de amostra (µg g⁻¹).

4.7 Análise sensorial

Foram realizados os testes sensoriais de aceitação de atributos com 51 provadores não treinados (Anexo I - estatística número de provadores), no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, das massas alimentícias frescas com incorporação de microalga *Chlorella* sp. Para a seleção dos provadores foi utilizado como critério o consumo do produto analisado, não ter alergia a algum dos ingredientes presentes na formulação e a disponibilidade para a realização do teste. A cada provador foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III) autorizando sua participação voluntária na pesquisa. Este formulário

dispõe da abordagem da natureza da pesquisa, objetivos, finalidade, potenciais riscos e/ou incômodos. Foram selecionados 51 provadores, de ambos os sexos.

Para a realização dos testes de avaliação sensorial, as amostras de massas alimentícias foram cozidas em água fervente com sal na proporção de 1 L de água potável para 100 g de massa fresca e 2 g de sal de cozinha. Foram servidas, aproximadamente, 20 g de cada amostra com leve molho de tomate e cebola, na temperatura usual de consumo (aproximadamente 50 °C) em copos plásticos acompanhados de um copo com água mineral, e ficha de avaliação sensorial (Anexo II). As amostras foram avaliadas em duas sessões, a primeira avaliou as massas com 2 % de incorporação de biomassa e extrato, e a segunda avaliou as massas com 1 % de incorporação de biomassa e extrato.

Os candidatos avaliaram o quanto gostaram ou desgostaram do produto apresentado em relação aos parâmetros: aparência, cor, aroma, textura, sabor, sabor residual e aceitação global (QUEIROZ; TREPTOW, 2006). A avaliação foi realizada através da ficha de análise sensorial com uma escala hedônica estruturada de nove pontos, onde 1 equivale a “desgostei muitíssimo” e 9 a “gostei muitíssimo”. As informações foram mantidas em sigilo.

4.8 Análise estatística

A avaliação dos resultados da análise sensorial foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA) fator duplo sem repetição, teste de Tukey, em nível de significância de 5 %, utilizando o programa *Statistica* 12.0 (StatSoft Inc.). As demais análises foram analisadas através do teste de Tukey em nível de significância de 5 %, utilizando o programa *Statistica* 12.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extrato

O extrato obtido a partir da biomassa das microalgas teve rendimento de 14,3 % e apresentou em torno de 61 % de lipídeos.

5.2 Composição centesimal da microalga

Os resultados obtidos de cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos das microalgas podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal da microalga *Chlorella* sp.

Parâmetro	Fração mássica (%)
Lipídeos	9,4 ± 0,7
Proteína	11,7 ± 0,1
Cinzas	4,6 ± 0,1
Carboidratos*	74,3 ± 0,6

*Calculado por diferença.

A composição centesimal da microalga pode variar muito dependendo das condições do cultivo, fatores como nutrientes no meio, iluminação, temperatura, pH, CO₂, são alguns parâmetros que devem ser observados quando se deseja otimizar algum produto obtido das microalgas. Este cultivo não foi realizado com a finalidade de otimizar algum produto obtido das microalgas. Os resultados demonstraram alto teor de proteínas e cinzas, o que pode resultar no incremento de minerais e proteínas nas massas alimentícias.

5.3 Parâmetros das massas alimentícias

A perda de sólidos consiste na quantidade de sólidos solúveis encontrados na água de cozimento das massas alimentícias após o tempo ideal de cocção. O comportamento das massas alimentícias durante e após o cozimento é um parâmetro de qualidade muito importante para os consumidores, visto que os mesmos desejam uma massa com um tempo mínimo de cozimento, sem grandes perdas de sólidos solúveis na água e que após esse processo, mantenham-se firmes e íntegras em seu formato. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros de cocção das massas alimentícias.

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros das massas alimentícias frescas.

Amostra	Umidade (%)	Tempo ótimo de cocção	Perda de sólidos (%)	Ganho de peso (%)
P	28,9 ± 0,8 ^b	4 min	6,9 ± 0,5 ^a	180,7 ± 1,3 ^a
B1	31,6 ± 0,8 ^a	5 min	7,5 ± 0,2 ^a	181,7 ± 1,4 ^a
B2	29,5 ± 1,6 ^b	5 min	6,6 ± 0,5 ^a	183,5 ± 3,1 ^a
E1	32,5 ± 1,0 ^a	5 min	6,7 ± 0,3 ^a	189,7 ± 0,3 ^b
E2	33,3 ± 0,7 ^a	5 min	5,9 ± 0,2 ^b	184,6 ± 0,6 ^a

P: Padrão. B1: Massas alimentícias com incorporação de 1 % de biomassa. B2: Massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa. E1: Massas alimentícias com incorporação de 1 % de extrato (equivalência). E2: Massas alimentícias com incorporação de 2 % de extrato (equivalência). Resultados são médias de três determinações ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto aos parâmetros de cocção, observou-se que a perda de sólidos das massas alimentícias não teve diferença significativa em relação a amostra padrão, apenas a amostra com incorporação de 2 % de extrato (E2) apresentou perda de sólidos inferior, o que representa uma característica extremamente positiva para massas frescas, devendo esta, ser melhor investigada. A perda de sólidos para todas as amostras avaliadas foi inferior a 12 %. Segundo Hosney (1999), massas alimentícias com perda de sólidos inferior a 12% são consideradas de boa qualidade. Já para Hummel (1966), massas alimentícias de alta qualidade devem ter uma perda de sólidos de até 6 % visto que a perda de sólidos entre 6 % e 8 % representa uma massa de qualidade média, e maior ou igual a 10 % são características de massas de má qualidade. Por sua vez, Donnelly (1979) também considera 8 % como o valor máximo aceitável para a perda de sólidos na água de cozimento. Apesar das massas terem apresentado uma perda de sólidos considerada adequada, esse percentual pode ser reduzido através da utilização de uma farinha de trigo com um maior percentual de proteínas formadoras de glúten (gliadinas e gluteninas), da incorporação de emulsificantes ou até mesmo de ovos.

Cemim *et al.* (2014) avaliaram a perda de sólidos em massas alimentícias verdes elaboradas com folhas de brócolis e espinafre e obtiveram um resultado semelhante a este trabalho para as massas enriquecidas com de folhas de brocolis (6,36 %) valores de perda de sólidos maiores para as massas enriquecidas com espinafre (8,62 %). Gallegos-Infante *et al.* (2010) avaliaram a perda de sólidos em massas alimentícias secas com adição de farinha de feijão (15 % e 30 %), chegando a atingir 21 % de sólidos na água de cocção, afetando negativamente os parâmetros de cocção. Isso pode ocorrer pois a adição em maiores

quantidades de farinhas que não contém glúten na produção de massas pode diminuir a força do glúten, interrompendo e enfraquecendo a estrutura global das massas, aumentando a perda de sólidos (RAYAS-DUARTE *et al.*, 1996).

Quanto a umidade, a ANVISA por meio da RDC nº 93, de 31 de outubro de 2000, que rege os padrões de identidade e qualidade de massa alimentícia, determina que a umidade máxima permitida em massa fresca é de 35 % (BRASIL, 2000), estando assim, todas as formulações dentro dos parâmetros pré-determinados.

O ganho de peso está relacionado à capacidade de absorção de água das massas e depende do formato das mesmas. Para Kruger *et al.* (1996), as massas à base de trigo devem apresentar aumento de peso entre 160 e 180 %. Segundo Donnely (1979), o aumento de peso deve ser da ordem de 200 a 250 %, enquanto Hummel (1966) cita valores mínimos de 100%, sendo massas frescas com valores de absorção de água entre 200 % e 300 % consideradas de alta qualidade. O ganho de peso das massas alimentícias foi em torno de 182 %, apresentando, segundo estes autores, valores adequados para este parâmetro de qualidade. Cemim *et al.* (2014) também avaliaram ganho de peso em massas alimentícias verdes e encontraram valores semelhantes aos obtidos neste trabalho (em torno de 183 %) para massas com incorporação de folhas de brócolis e espinafre.

Devido à alta concentração de compostos bioativos e pigmentos de cor presentes na biomassa de microalga, a utilização da mesma em produtos alimentícios apresenta uma grande vantagem visto que sua incorporação não necessita ser em grandes quantidades para alcançar o efeito nutricional desejado, garantindo assim o mantimento das características tecnológicas do produto, o que não ocorre quando são utilizadas farinhas vegetais funcionais. No caso da incorporação em massas alimentícias, a adição em pequena quantidade é fundamental para não afetar a rede de glúten, e obter resultados semelhantes às tradicionais nos parâmetros de cocção.

Os parâmetros de cor podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de cor das massas alimentícias antes e após cocção.

		L^*	a^*	b^*
Padrão	Crua	79,5 ± 2,2 ^a	-0,1 ± 0,0 ^a	19,6 ± 0,5 ^e
	Cozida	63,5 ± 2,0 ^c	-0,6 ± 0,2 ^a	19,8 ± 1,0 ^e
B1	Crua	64,0 ± 0,1 ^c	-16,1 ± 0,1 ^e	40,4 ± 0,3 ^a
	Cozida	47,2 ± 2,8 ^f	-11,0 ± 0,7 ^{b,c,d}	32,4 ± 3,5 ^{c,d}
B2	Crua	55,6 ± 3,1 ^{d,e}	-16,3 ± 1,9 ^e	34,8 ± 4,6 ^{b,c,d}
	Cozida	39,9 ± 1,0 ^g	-8,8 ± 1,3 ^b	23,2 ± 2,8 ^e
E1	Crua	69,3 ± 1,6 ^b	-12,2 ± 0,6 ^d	39,8 ± 4,2 ^{a,b}
	Cozida	54,2 ± 0,3 ^e	-9,5 ± 0,6 ^{b,c}	36,2 ± 1,6 ^{a,b,c}
E2	Crua	60,3 ± 1,2 ^{c,d}	-13,6 ± 0,9 ^d	40,9 ± 3,7 ^a
	Cozida	46,5 ± 2,6 ^f	- 9,0 ± 0,6 ^b	31,1 ± 2,6 ^d

P: Padrão. B1: Massas alimentícias com incorporação de 1 % de biomassa. B2: Massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa. E1: Massas alimentícias com incorporação de 1 % de extrato (equivalência). E2: Massas alimentícias com incorporação de 2 % de extrato (equivalência). Resultados são médias de três determinações ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação aos parâmetros de cor, observou-se baixo valor de luminosidade, ou seja, uma coloração mais escura na amostra com biomassa na concentração de 2% (B2), que também apresentou coloração mais esverdeada, com menores valores obtidos para o parâmetro a^* (varia de verde - 60 ao vermelho + 60). As amostras com extrato e biomassa apresentaram diferença significativa em relação a cor, sendo que as amostras com 1 e 2% de biomassa (B1 e B2), apresentaram tendência um pouco mais elevada à coloração verde, enquanto as amostras cozidas com 1 e 2 % de extrato (E1 e E2) à coloração amarela.

Na coloração das massas verdes enriquecidas com 25 % de brócolis e espinafre (Cemim *et al.*, 2014), o parâmetro a^* apresentou valores de -2,33 e -5,26 respectivamente para as massas cruas e valores de -3,03 e -4,41 para as massas cozidas. Comparativamente, as massas com microalgas (biomassa e extrato), mesmo com menor incorporação (1 % e 2 %), apresentaram valores mais baixos para este parâmetro em todas as formulações (Tabela 5), indicando que as massas enriquecidas com microalgas apresentaram pigmentação verde mais acentuada, pode ser atribuído ao fato de microalgas em condições ótimas de crescimento possuírem em torno de 4 % do seu peso seco em clorofila ou até quantidades maiores para microalga *Chlorella* (HARUN *et al.*, 2010).

A perda de cor nas massas após o cozimento foi estimada em todas as amostras e os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Perda de cor das massas alimentícias após a cocção.

Massas alimentícias	ΔE (Perda de cor)
Padrão	16,1 \pm 0,2 ^a
B1	19,3 \pm 3,8 ^a
B2	21,5 \pm 3,5 ^a
E1	16,4 \pm 0,2 ^a
E2	17,7 \pm 2,2 ^a

P: Padrão. B1: Massas alimentícias com incorporação de 1 % de biomassa. B2: Massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa. E1: Massas alimentícias com incorporação de 1 % de extrato (equivalência). E2: Massas alimentícias com incorporação de 2 % de extrato (equivalência). Resultados são médias de três determinações \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto à perda de cor das massas após o cozimento, os resultados não mostraram diferença estatística entre as amostras, isto é, todas as amostras apresentaram a mesma variação (perda) global de cor. Desta forma, pode-se concluir que a coloração das massas não foi perdida após a cocção das mesmas, visto que o ΔE medido para as amostras com microalga foi estatisticamente igual ao da amostra padrão.

5.4 Propriedades funcionais

5.4.1 Carotenoides totais

A análise de carotenoides totais foi avaliada no extrato e na biomassa da microalga, os dados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Análise carotenoides totais da microalga *Chlorella* sp. na biomassa e extrato.

Amostra	Carotenoides totais (mg g ⁻¹)
Biomassa	2,33 \pm 0,04 ^b
Extrato	14,55 \pm 0,33 ^a

Resultados são médias de três determinações \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O valor de carotenoides totais na biomassa chegou a 2,33 mg g⁻¹ e no extrato 14,55 mg g⁻¹. O valor de carotenoides encontrado no extrato se mostrou coerente de acordo com seu rendimento a partir da biomassa.

Menegol *et al.* (2015) encontraram valores próximos para carotenoides totais na biomassa da microalga *Chlorella* sp., atingindo valores de 2,44 mg g⁻¹ em cultivos com meio

rico em nitrogênio (375 mg L^{-1}) e temperatura de $27 \text{ }^\circ\text{C}$. Redaelli (2012) avaliou carotenoides totais na biomassa da microalga *Chlorella minutissima* em diferentes condições de concentração salina e temperatura, em todas as condições avaliadas a relação de carotenoides por biomassa obtido foi de $2,5 \text{ mg.g}^{-1}$, valores próximos aos encontrados.

O resultado encontrado de carotenoides totais sendo aproximadamente $2,5 \text{ mg.g}^{-1}$ significa que 0,25 % do peso seco das microalgas é constituído por carotenoides, o que está de acordo com SPOLAORE *et al.* (2006), que afirmaram que os carotenoides estão presentes nas microalgas geralmente na concentração de 0,1 a 0,2 % do seu peso seco.

Os carotenoides totais também foram avaliados nas massas alimentícias frescas, os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Carotenoides totais em massas alimentícias frescas com incorporação da microalga *Chlorella* sp. na forma de biomassa e extrato.

Massas alimentícias		Carotenoides totais ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Perda após cocção
P	Crua	$0,5 \pm 0,0^f$	
	Cozida	$0,9 \pm 0,2^f$	
B1	Crua	$23,4 \pm 0,3^c$	32,5 %
	Cozida	$15,8 \pm 0,1^d$	
E1	Crua	$18,4 \pm 0,4^d$	38,0 %
	Cozida	$11,4 \pm 1,4^e$	
B2	Crua	$48,0 \pm 1,0^a$	31,5 %
	Cozida	$32,9 \pm 0,5^b$	
E2	Crua	$45,4 \pm 0,9^a$	33,3 %
	Cozida	$30,3 \pm 0,2^b$	

P: Padrão. B1: Massas alimentícias com incorporação de 1 % de biomassa. B2: Massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa. E1: Massas alimentícias com incorporação de 1 % de extrato (equivalência). E2: Massas alimentícias com incorporação de 2 % de extrato (equivalência). Resultados são médias de três determinações \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O aumento dos carotenoides foi gradual com a incorporação da microalga chegando a $48 \mu\text{g g}^{-1}$ na amostra B2 crua e $32,9 \mu\text{g g}^{-1}$ na amostra B2 cozida, todas as amostras apresentaram diferença estatística com relação à amostra padrão. Apesar das massas com incorporação de 2 % de extrato terem apresentado valores menores de carotenoides totais do que as massas com incorporação de 2 % de biomassa, estes não diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Podemos notar também a perda de carotenoides após a cocção das massas alimentícias (aproximadamente de 32%), o que é esperado, devido à sensibilidade dos carotenoides frente a temperaturas elevadas (DAMODARAN, PARKIN & FENNEMA, 2010). Visto o fato de que a concentração destes compostos bioativos é alta nas microalgas, a agregação destes compostos em massas alimentícias se mostrou extremamente positiva, se considerarmos o fato de que se trata de um produto regularmente consumido pela população.

5.4.2 Identificação de carotenoides

A partir dos cromatogramas dos extratos de carotenoides da microalga *Chlorella* sp., verificou-se a presença de mais de trinta carotenoides, e destes, onze foram identificados, sendo os carotenoides majoritários luteína, β -caroteno, α -caroteno e zeaxantina, como pode ser observado na Figura 15.

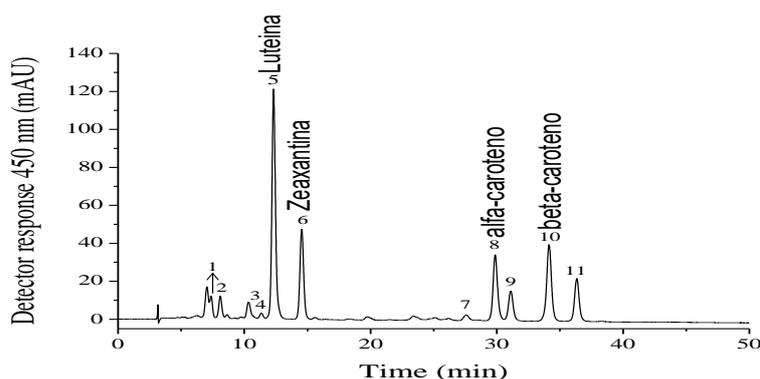


Figura 15. Cromatograma de carotenoides obtidos em HPLC-MS da microalga *Chlorella* sp. *¹*all-trans*-violaxantina, ²*cis*-violaxantina, ³13-*cis*-luteína, ⁴13'-*cis*-luteína, ⁵*all-trans*-luteína, ⁶*all-trans*-zeaxantina, ⁷15-*cis*- β -caroteno, ⁸*all-trans*- α -caroteno, ⁹13-*cis*- β -caroteno, ¹⁰*all-trans*- β -caroteno, ¹¹9-*cis*- β -caroteno.

Os pigmentos identificados nos cromatogramas foram: *all-trans*-violaxantina, *cis*-violaxantina, 13-*cis*-luteína, 13'-*cis*-luteína, *all-trans*-luteína, *all-trans*-zeaxantina, 15-*cis*- β -caroteno, *all-trans*- α -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, *all-trans*- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno (Figura 15). O restante dos picos não foram identificados; na Tabela 9 estão descritos os valores encontrados para cada um dos carotenoides identificados por cromatografia em mg g^{-1} .

O valor de carotenoides totais chegou a $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ para a biomassa e $14,6 \text{ mg g}^{-1}$ para o extrato da microalga *Chlorella* sp. Verifica-se que o pigmento *all-trans*-luteína foi o principal carotenoide encontrado na microalga, contribuindo com $0,54 \text{ mg g}^{-1}$ na biomassa e $4,57 \text{ mg g}^{-1}$ no extrato do total do conteúdo de carotenoides, seguido pelo *all-trans*- β -caroteno com

concentração de 0,29 mg g⁻¹ na biomassa e 2,59 mg g⁻¹ no extrato. Esses valores são consideráveis se comparados a outros trabalhos que avaliaram carotenoides em microalga. Mendonça (2014) avaliou cromatogramas dos extratos de carotenoides da microalga *Spirulina platensis* e o pigmento *all-trans*-β-caroteno foi o principal carotenoide desta microalga, contribuindo com aproximadamente 140 μg g⁻¹ do total do conteúdo de carotenoides, comparando aos valores encontrados para biomassa de *Chlorella* sp., 540 μg g⁻¹ de luteína e 290 μg g⁻¹ de *all-trans*-β-caroteno.

Tabela 9: Identificação e quantificação dos carotenoides por cromatografia da biomassa e seu extrato.

Carotenoides	Extrato (mg g ⁻¹)	Biomassa (mg g ⁻¹)
<i>all-trans</i> -violaxantina	0,33 ± 0,00	0,04 ± 0,00
<i>cis</i> -violaxantina	0,27 ± 0,01	0,04 ± 0,00
13- <i>cis</i> -luteína	0,34 ± 0,00	0,05 ± 0,00
13'- <i>cis</i> -luteína	0,11 ± 0,02	0,01 ± 0,00
<i>all-trans</i> -luteína	4,57 ± 0,23	0,54 ± 0,02
<i>all-trans</i> -zeaxantina	0,95 ± 0,03	0,09 ± 0,00
15- <i>cis</i> -β-caroteno	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,00
<i>all-trans</i> -α-caroteno	1,93 ± 0,19	0,22 ± 0,00
13- <i>cis</i> -β-caroteno	0,70 ± 0,08	0,09 ± 0,00
<i>all-trans</i> -β-caroteno	2,59 ± 0,16	0,29 ± 0,00
9- <i>cis</i> -β-caroteno	1,16 ± 0,06	0,14 ± 0,00

Resultados são médias de três determinações ± desvio padrão.

Segundo PEREZ-GARCIA *et al.* (2011), a *Chlorella* é a principal espécie utilizada na produção de luteína. Redaelli (2012) avaliou os cromatogramas dos carotenoides do extrato saponificado de microalga liofilizada *Chlorella minutissima* no final dos cultivos e o perfil dos carotenoides nos cromatogramas foi sempre o mesmo, apresentando uma maior quantidade do carotenoide luteína (61,2 %), seguido de zeaxantina (19,6 %) com uma pequena quantidade de β-caroteno (4 %), independentemente das condições de luz, concentração salina e temperatura utilizadas nos cultivos.

A identificação dos carotenoides também foi realizada na amostra da massa alimentícia enriquecida com 2 % de biomassa, pois obteve melhores resultados na análise de carotenoides

totais. A intenção foi identificar e quantificar o teor de carotenoides presente na amostra e avaliar o teor de carotenoides antes e após a cocção das massas (Tabela 10).

Tabela 10. Identificação e quantificação dos carotenoides das massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa antes e após a cocção.

B2	Carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Crua	Cozida
<i>all-trans</i> -violaxantina	$0,99 \pm 0,11^a$	$0,72 \pm 0,02^a$
<i>cis</i> -violaxantina	$0,34 \pm 0,00^a$	$0,17 \pm 0,01^b$
13- <i>cis</i> -luteína	$0,48 \pm 0,06^a$	$0,39 \pm 0,04^a$
13'- <i>cis</i> -luteína	$0,20 \pm 0,00^a$	$0,17 \pm 0,02^a$
<i>all-trans</i> -luteína	$6,29 \pm 0,78^a$	$4,98 \pm 0,17^b$
<i>all-trans</i> -zeaxantina	$1,36 \pm 0,02^a$	$1,12 \pm 0,06^b$
15- <i>cis</i> - β -caroteno	$0,27 \pm 0,03^a$	$0,20 \pm 0,01^a$
<i>all-trans</i> - α -caroteno	$3,27 \pm 0,02^b$	$3,63 \pm 0,14^a$
13- <i>cis</i> - β -caroteno	$0,77 \pm 0,05^a$	$0,59 \pm 0,04^b$
<i>all-trans</i> - β -caroteno	$3,92 \pm 0,02^b$	$4,46 \pm 0,17^a$
9- <i>cis</i> - β -caroteno	$1,41 \pm 0,04^a$	$1,24 \pm 0,06^a$

Resultados são médias de duas determinações \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Estimar a perda de carotenoides após a cocção é um ponto fundamental quando a intenção é agregar valor nutricional em massas alimentícias, pois, é desta forma que o consumidor irá consumir o produto.

Observando a Tabela 10, nota-se que alguns carotenoides sofreram perda após a cocção das massas alimentícias, apresentando diferença estatística pelo teste de Tukey com 5 % significância, sendo estes: *all-trans*-luteína, *cis*-violaxantina, *all-trans*-zeaxantina e 13-*cis*- β -caroteno. Já para os carotenoides *all-trans*- β -caroteno e *all-trans*- α -caroteno do grupo dos carotenos houve um aumento na massa cozida. Alguns estudos avaliaram o conteúdo de carotenoides em alimentos e reportaram que há uma maior facilidade de extração dos carotenoides após o processamento térmico, produzindo aumento irreal na quantidade total de carotenoides pró-vitamínicos A. Provavelmente, devido a uma desagregação mais eficiente do complexo carotenoide-proteína pós-cozimento (CAMPOS; ROSADO, 2005; GRANADO *et al.*, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Para identificar se os valores encontrados para os carotenoides na massa enriquecida com microalgas cozida são significativos, foi comparado os valores dos carotenoides majoritários luteína e β -caroteno com alguns vegetais, como podemos observar na Tabela 11.

Tabela 11: Teor de β -caroteno e luteína encontrado em alguns vegetais em base seca.

	β -caroteno (mg.100 g ⁻¹)	Luteína (mg.100 g ⁻¹)
Cenoura	10,00	-
Tomate	0,40	-
Brócolis	0,48	0,80
Espinafre	4,23	7,29
Pimenta verde	0,25	0,74
*Massa enriquecida microalgas (B2)	0,45	0,50

*Teor de β -caroteno e luteína encontrado neste trabalho.

Fonte: SÁNCHEZ *et al.*, 2014.

Os teores de β -caroteno e luteína na massa enriquecida com microalgas são significativos se comparados com outros vegetais (Tabela 11). Os valores acima estão expressos em base seca, ao observarmos que a maioria dos vegetais possuem mais de 90 % de água em sua composição (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos), o consumo destes deve ser elevado para atingir os valores descritos na tabela, diferente do consumo de um prato de macarrão que costuma ter mais de 100 g quando consumido.

5.5 Avaliação sensorial

Na primeira análise sensorial realizada, as massas alimentícias enriquecidas com 2 % de biomassa e seu extrato foram submetidas à avaliação sensorial por 51 provadores. A equipe de provadores foi composta por 40 mulheres (76,9 %) e 12 homens (23,1 %) com idade entre 18 e 58 anos. A Tabela 11 mostra as médias obtidas para cada atributo nas duas formulações.

Tabela 12: Aceitação de atributos das massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa e 2 % de extrato.

Atributo	Extrato (E2)	Biomassa (B2)
Aparência	7,4 \pm 1,1 ^a	7,5 \pm 1,1 ^a
Cor	7,8 \pm 0,9 ^b	8,0 \pm 0,9 ^a
Aroma	7,4 \pm 0,9 ^a	7,2 \pm 1,1 ^a
Textura	7,8 \pm 0,9 ^a	7,7 \pm 1,1 ^a
Sabor	7,5 \pm 1,2 ^a	7,4 \pm 1,2 ^a
Sabor residual	7,3 \pm 1,4 ^a	7,3 \pm 1,5 ^a
Aceitação global	7,7 \pm 0,9 ^a	7,7 \pm 0,8 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As massas apresentaram ótima aceitação, indicando que a adição tanto do extrato como da biomassa foi agradável ao paladar. As massas alimentícias com incorporação de extrato obtiveram 85,7 % de aceitação e as massas com incorporação de biomassa 86 %, sendo que não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey com 5 % de significância.

Na segunda análise sensorial foram avaliadas as massas com 1 % de incorporação tanto de biomassa como do extrato equivalente. A equipe de provadores foi composta por 35 mulheres (67,3 %) e 17 homens (32,7 %) com idade entre 18 e 55 anos. A Tabela 12 mostra as médias obtidas para cada atributo nas duas formulações.

Tabela 13: Aceitação de atributos das massas alimentícias com incorporação de 1 % de biomassa e 1 % de extrato.

Massas alimentícias	Extrato (E1)	Biomassa (B1)
Aparência	7,1 ± 1,2 ^b	7,8 ± 0,9 ^a
Cor	6,9 ± 1,4 ^b	8,0 ± 0,9 ^a
Aroma	6,9 ± 1,4 ^a	7,1 ± 1,2 ^a
Textura	7,5 ± 1,3 ^b	7,9 ± 0,9 ^a
Sabor	7,5 ± 1,3 ^b	7,8 ± 0,9 ^a
Sabor residual	7,2 ± 1,3 ^b	7,6 ± 1,1 ^a
Aceitação global	7,3 ± 1,1 ^b	7,9 ± 0,8 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nessa pesquisa, a cor pode ter influenciado na avaliação do atributo aparência, pois a aceitação da massa com incorporação de biomassa, que estava com coloração verde mais acentuada, foi mais aceita pelos consumidores, com 88 % de aceitação, enquanto a massa com extrato obteve 81,5%, diferentemente das massas com incorporação de 2% que apresentaram praticamente a mesma aceitação. Entre as massas E1 e B1 apenas o atributo aroma não apresentou diferença estatística entre elas, o que indica que os provadores perceberam diferença entre as amostras com extrato e biomassa nas massas com 1 % de incorporação. Como as análises foram realizadas em dias diferentes os provadores não foram os mesmos, o que pode ter contribuído para a diferença entre as análises.

Todas as formulações com incorporação da microalga *Chlorella* sp. (biomassa e extrato) atingiram o percentual mínimo satisfatório de aceitação (70 %) proposto por Teixeira *et al.* (1987). Massas verdes em geral possuem boa aceitação no mercado, como observado por Cemim *et al.* (2014) que avaliaram a aceitação de massas verdes formuladas com incorporação

de 25 % de folhas de brócolis e espinafre, e ambas atingiram o percentual mínimo satisfatório, com aceitação de 74,4 % e 81,1 %, respectivamente.

Barros (2010) avaliou o índice de aceitação de macarrão enriquecido com *Spirulina platensis* em três formulações (5, 10 e 15 %). A formulação que apresentou o maior índice de aceitação foi a que continha 10 % de *S. platensis*, as demais formulações não atingiram o percentual mínimo satisfatório de aceitação de 70 % proposto por Teixeira et al., (1987), com 67,24 e 69,92 % de aceitação para o macarrão adicionado de 5 e 15 % de *S. platensis*, respectivamente.

A intenção de adicionar o extrato devido a questões sensoriais, no intuito de reduzir sabor residual e odor característico das microalgas não foi percebido, visto que o sabor residual e odor não foram pronunciados nas amostras e segundo os comentários observados na ficha de análise sensorial, os provadores citaram que não havia sabor pronunciado, lembrando uma massa comum. Vários provadores também relataram não haver diferença entre as amostras com biomassa e extrato, diferindo apenas na cor das massas alimentícias.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos foi possível perceber que a incorporação da microalga *Chlorella* sp. (biomassa e extrato) praticamente não alterou os parâmetros de cocção das massas alimentícias frescas.

O aumento dos carotenoides totais foi gradual com a incorporação da microalga chegando a $48 \mu\text{g g}^{-1}$ e $32,9 \mu\text{g g}^{-1}$ nas massas alimentícias com incorporação de 2 % de biomassa antes e após cocção, e os carotenoides majoritários encontrados na microalga e nas massas alimentícias foram a luteína, β -caroteno, α -caroteno e zeaxantina.

Quanto a avaliação sensorial, todas as formulações obtiveram uma ótima aceitação, chegando a 88 % nas massas alimentícias com incorporação de 1 % de biomassa e aproximadamente 86 % nas massas com incorporação de 2 % de biomassa e extrato.

Analisando as massas alimentícias tanto sensorial quanto tecnologicamente, com biomassa de *Chlorella* e seu extrato, os dois ingredientes se mostraram promissores, porém, seria interessante trabalhar com a biomassa da microalga, por não ser necessário a utilização de extração com solvente (etanol) e por haver menos operações unitárias envolvidas no processo obtenção, facilitando a adição tanto em massas quanto em produtos alimentícios.

Assim, diante destes dados, podemos concluir que o uso da microalga *Chlorella* sp. demonstrou ser uma ótima opção para utilização na produção de massas alimentícias frescas, enriquecendo o produto com compostos bioativos.

7 REFERÊNCIAS

AACC (1995). American Association of Cereal Chemists. Approved methods of 16th AACC. 9° ed. Saint Paul, v.1-2.

ABIMAPI. Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados. Estatísticas massas alimentícias. Disponível em: < <http://www.abimapi.com.br/estatistica-massas.php> >. Acesso em 15 de julho de 2016.

AKILLIOGLU, H. G.; YALCIN, E. Some quality characteristics and nutritional properties of traditional egg pasta. **Food Science and Biotechnology**, Turquia, v. 19, n. 2, p. 417-424, 2010.

ALVES-RODRIGUES, A., SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, n. 150, p. 57-83, 2004.

AMBROSI, M. A., REINEHR, C. O., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V., COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, p. 109 - 117, 2008.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

AOAC (1990). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist, Arlington. 15th ed., v. 2, p. 685-1298.

AOCS. Sampling and analysis of commercial fats and oils. AOCS Official Method, Cc 6-25, 1997.

ARSCOTT, S. A., & TANUMIHARDJO, S. A. Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 2, p. 223-239, 2010.

BARROS, K. K. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Setembro de 2010.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, p. 312-351, 2004.

BLIGH, E. G., & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p. 911-917, 1959.

BOROSKI, M.; AGUIAR, A. C.; BOEING, J.S.; ROTTA, E. M.; WIBBY, C. L.; BONAFÉ, E. G.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Enhancement of pasta antioxidant activity with oregano and carrot leaf. **Food Chemistry**, p. 696-700, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário da União**; Poder Executivo, 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Anvisa. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 93, de 31 de outubro de 2000. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de massa alimentícia. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2000/93_00rdc.htm>. Acesso em: 20 de junho de 2016.

BRASIL *FOOD TRENDS* 2020. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.brazilfoodtrends.com.br/Brasil_Food_Trends/index.html>. Acesso em: 22 de junho de 2016.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. p. 557-577, 2010.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal.**, v.9, p.1551-1558, 1995.

CAMPOS, F. M.; ROSADO, G. P. Novos fatores de conversão de carotenoides provitamínicos A. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n.3, p.571-578, 2005.

CEMIN, R. P.; RIOS, A. O.; THYS, R. C. S.; FLÔRES, S. H.; RECH, R. Use of broccoli (*Brassica oleracea italica*) leaves powder to produce fresh pasta. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química** (COBEQ). Florianópolis, 2014.

COSTA, J. A. V., RADMANN, E. M., CERQUEIRA, V. S., & CRISTINA, G. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alim. Nutr.**, 17, 429-4366, 2006.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. Ed. Editora: Artmed, 2010

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DONNELLY, B. J. Pasta products: Raw material, Technology, Evaluation. **Macaroni J.**, v. 61, n. 1, p. 6, 1979.

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

FRADIQUE, M. et al. Isochrysis galbana and Diacronema vlkianum biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 312-319, 2013.

FRADIQUE, M., BATISTA, A. P., NUNES, M. C., GOUVEIA, A. L., BANDARRA, N. M. & RAYMUNDO. 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, 10, p. 1656-1664, 2010.

GALLEGOS-INFANTE, J.A., ROCHA-GUZMAN, N.E., GONZALEZ-LAREDO, R.F., OCHOA-MARTÍNEZ, L.A., CORZO, N., BELLO-PEREZ, L.A., MEDINA-TORRES, L., PERALTA-ALVAREZ, L.E. Quality of spaghetti pasta containing Mexican common bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 119, p. 1544-1549, 2010.

GAMA, J. J. T., SYLOS, C.M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1686-1690, 2007.

GOUVEIA L, BATISTA A. P., MIRANDA A., EMPIS J. AND RAYMUNDO A. *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 433- 436, 2007.

GOUVEIA, L., & EMPIS, J. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: Effect of storage conditions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 227-233, 2003.

GRANADO, F., OLMEDILLA, B. B. I. & ROJAS-HIDALGO, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. **J. Agric. Food Chem**, v. 40, p. 2135-2140, 1992.

GUERIN, M., HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210-216, 2003.

GUILLARD, R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: Smith, W., Chanley, M. (Eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. [s.l.] Springer US, p. 29-60, 1975.

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

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: How should we move forward? **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, 410-418, 2000.

HARUN, R.; M. SINGH; G. M. FORDE; M. K. DANQUAH. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.3, p.1037-1047, 2010.

HOSENEY, C. Principles of cereal science and technology. St. Paul, MN, USA: **American Association of Cereal Chemists**, p. 269-274, 1999.

HUMMEL, C. Macaroni products: manufacture, processing and packing. London, Food Trade P. 1966 JAY, J. M. **Modern food microbiology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 3, p. 488-506, 1992.

KHAN, S. A.; RASHMI; M. Z. HUSSAIN; S. PRASAD; U. C. BANERJEE. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, n.9, p.2361-2372, 2009.

KOCHEM, L. H. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor with an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

KRUGER, J. E.; MATSUO, R. B.; DICK, J. W. Pasta and Noodle Technology. St. Paul: **American Association of Cereal Chemists**, p.356, 1996.

LEMES, A. C.; TAKEUCHI, K. P.; CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Fresh Pasta Production Enriched with *Spirulina platensis* Biomass. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 741-750, 2012.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2001.

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

MATA, T. M.; A. A. MARTINS; N. S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.1, p. 217-232, 2010.

MARASCO, E; SCHIMDT-DANNERT, C. Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v. 1, n. 3, p. 145-157, 2003.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p.186-202, 2014.

MENDONÇA, T. A. **Carotenoides da microalga *Spirulina platensis*: obtenção e avaliação da atividade antioxidante**. 2014. 62 p. Dissertação mestrado - Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2014.

MENEGASSI B.; LEONEL M. Efeito da adição de farinha de mandioquinha-salsa nas características de massa alimentícia. Publ. UEPG **Ciências Exatas Terra**, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa, v. 11, n. 3, p. 13-19, 2005.

MENEGOL, T., RODRIGUES, E. F., GREGORY, G., RODRIGUES, E., RECH, R. Influência da temperatura e concentração de nitrogênio no cultivo da microalga *Chlorella* sp. 5º Simpósio de Segurança Alimentar, Bento Gonçalves, maio de 2015. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/gerenciador/painel/trabalhosversaofinal/SAM256.pdf>>. Acesso em: 24 de agosto de 2016.

MERCADANTE, A. Z. R.-A., D. B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4102-4106, 1998.

MILINSKI, M.; SEMMANN, D.; KRAMBECK, H. J.; MAROTZKE, J. Stabilizing the Earth's climate is not a losing game: supporting evidence from public goods experiments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 11, p. 3994-3998, 2006.

MORAIS, F. L. **Carotenoides: características biológicas e químicas**. Especialização (Especialista em Qualidade de Alimentos). 2006. 60 f. Pós-graduação *latu senso* em Qualidade de Alimentos, Centro de Excelência em Turismo. Universidade de Brasília, 2006.

ONUBR. Nações Unidas no Brasil. População mundial deve atingir 9,6 bilhões em 2050, diz novo relatório da ONU 2013. Disponível em: < <https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/>>. Acesso em 10 de setembro 2016.

PEREZ-GARCIA, O.; F. M. E. ESCALANTE; L. E. DE-BASHAN; Y. BASHAN. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p.11-36, 2011.

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends**, v. 88, n. 10, p. 3307-3312, 2011.

PULZ, O. e GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, n.6, p.635-648, 2004.

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O. Análise sensorial para a avaliação da qualidade dos alimentos. **Editora FURG**, Rio Grande, 2006.

RAYAS-DUARTE, P., MOCK, C. M., & SATERLEE, L. D. Quality of spaghetti containing buckwheat, amaranth and lupin flours. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 381-387, 1996.

REDAELLI, C. **Estudo da produção de lipídeos e carotenoides por *Chlorella minutissima* em fotobiorreator**. 2012. 85 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

REDDY, L., ODHAV, B., & BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: A global perspective. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 99, n. 1, p.1-13, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **J. Micronutr. Anal**, v.5, p. 191-225, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B; KIMURA, M. Harvest plus handbook for carotenoid analysis. Washington, DC e Cali: **International Food Policy Research Institute e International Center for Tropical Agriculture**, p.58, 2004.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SÁNCHEZ C., BARANDA A. B., MARANON I. M. The effect of high pressure and high temperature processing of carotenoids and chlorophylls content in some vegetables. **Food chemistry**, 163, 37-45, 2014.

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SANCHES, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 528-534, 2000.

SANDER, A.B.T. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 176-178, 2000.

SCHUNEMANN, H. J., MCCANN, S., GRANT, B. J. B., TREVISAN, M., MUTI, P., & FREUDENHEIM, J. L. Lung function in relation to intake of carotenoid and other antioxidant vitamins in a population-based study. **American Journal of Epidemiology**, v.155, n.5, 463-471, 2002.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos**. 2004. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Campinas, 2004.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos /NEPA-UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA/UNICAMP, 2011. 161 p.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. Análise sensorial de alimentos. Florianópolis: **Editora da UFRS**, 180p, 1987.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMAN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCIO, M. D. Produção de Carotenoides: Microrganismos como Fonte de Pigmentos Naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p.2429-2436, 2009.

VILCHEZ, C., FORJÁN E., CUARESMA, M., BÉDMAR, F., GARBAYO, I., VEGA, J. M. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 319-333, 2011.

ZANATTA, C. F., & MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.

ZENG, X.; M. K. DANQUAH; X. D. CHEN; Y. LU. Microalgae Bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, 2011.

ZHOU, X., P.; XIA, L.; GE, H.; ZHANG, D.; HU, C. Feasibility of biodiesel production by microalgae *Chlorella* sp. (FACHB-1748) under outdoor conditions. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 131-135, 2013.

ANEXO I

Software n-Query Versão 3.0

STORED STATEMENTS for MGT0-1

When the sample size in each of the 4 groups is 51, a one-way analysis of variance will have 80% power to detect at the 0,050 level a difference in means characterized by a Variance of means, of 0,624, assuming that the common standard deviation is 3,350.

NAE – Departamento de Estatística

Instituto de Matemática/ UFRGS

ANEXO II - FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Análise Sensorial

Você está recebendo 2 amostras de massas alimentícias com ingrediente funcional. Prove as amostras da esquerda pra direita, ingerindo água entre elas e avalie os parâmetros de acordo com a escala abaixo.

Idade:

Data:

Nome:

1- desgostei muitíssimo
2- desgostei muito
3- desgostei moderadamente
4- desgostei levemente
5- nem gostei nem desgostei
6- gostei levemente
7- gostei moderadamente
8- gostei muito
9- gostei muitíssimo

Amostra	985	147
Aparência		
Cor		
Aroma		
Textura		
Sabor		
Sabor residual		
Aceitação global		

Comentários:

ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Produção de massa fresca enriquecida com microalga -----

Participante n.º

Prezado(a) Senhor(a):

Representamos um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) que está realizando um estudo sobre desenvolvimento de massa fresca enriquecida nutricionalmente.

O objetivo da pesquisa é enriquecer uma formulação de massa fresca com a biomassa de microalgas e seu extrato, e avaliar as características sensoriais de todos os produtos desenvolvidos. Os resultados desta pesquisa trarão informações sobre a aceitação dos consumidores quanto à utilização da microalga para o enriquecimento de massas frescas. A composição da massa é farinha de trigo, água e biomassa da microalga *Chlorella* sp.. Esta formulação contém glúten.

Pretende-se realizar análise sensorial dos produtos elaborados. Os testes de aceitação serão realizados no Laboratório de Análise Sensorial do ICTA. Os provadores receberão 4 amostras codificadas (servidas em copos plásticos ou pratos brancos com diferentes codificações de 3 dígitos) referentes aos diferentes processamentos, 1 copo de água para ser consumido entre as amostras e uma ficha para avaliar as amostras quanto a aceitação dos atributos aparência, cor, aroma, textura, sabor e a aceitação global, utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos, onde 1 corresponde a “desgostei muitíssimo”, 5 “nem gostei nem desgostei” e 9 a “gostei muitíssimo”.

O teste não deve ser realizado por indivíduos alérgicos a qualquer dos ingredientes da formulação.

O participante pode **desistir** de provar as amostras em qualquer uma das etapas **sem sofrer qualquer prejuízo**. Conforme resolução 466/12, “Toda pesquisa com seres humanos envolve risco”, contudo não é esperado nenhum desconforto ou risco aos participantes da pesquisa.

O participante **não terá custos** com a realização do teste, e **não será concedido qualquer tipo de benefício financeiro** pela participação.

A avaliação deste estudo será mantida em **sigilo**. As informações do participante (nome, idade, sexo) não serão divulgadas e nem passadas a outros estudos, e não será necessário informar o nome do responsável no estudo. Em caso de qualquer dúvida, o senhor (a) poderá entrar em contato com o pesquisador responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do UFRGS pelos telefones:

Pesquisador responsável Rosane Rech - Telefone: 3308-6683

Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS – Telefone 3308-4085

Porto Alegre, ____ de _____ de 2013.

Eu, _____ recebi as orientações necessárias para entender o presente estudo, e desejo participar da pesquisa.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

Obs: O presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 466/12), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do participante e a outra com o pesquisador responsável.