

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CURSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

VERÔNICA BUENO RIBAS

**EXTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEICOS EM MICROALGAS EMPREGANDO
HIDRÓLISE QUÍMICA: EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE REAÇÃO**

**Itaqui
2022**

VERÔNICA BUENO RIBAS

**EXTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEICOS EM MICROALGAS EMPREGANDO
HIDRÓLISE QUÍMICA: EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE REAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharela em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Valcenir Júnior Mendes Furlan

Coorientadora: Profa. Dra. Graciela Salete Centenaro

Itaqui

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

Ribas, Verônica Bueno

Extração de aminoácidos proteicos em microalgas empregando hidrólise química: efeito da temperatura e do tempo de reação / Verônica Bueno Ribas.

31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade R482e Federal do Pampa, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2022.

"Orientação: Valcenir Júnior Mendes Furlan".

1. aminoácidos. 2. cromatografia gasosa. 3. planejamento experimental. 4. *Spirulina* sp..

I. Título.

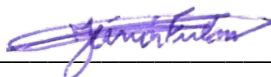
VERÔNICA BUENO RIBAS

**EXTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PROTEICOS EM MICROALGAS EMPREGANDO
HIDRÓLISE QUÍMICA: EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE REAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharela em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 08 de agosto de 2022.


Banca examinadora:



Prof. Dr. Valcenir Júnior Mendes Furlan
Orientador
UNIPAMPA



Profa. Dra. Graciela Salete Centenaro
UNIPAMPA



Prof. Dr. Augusto Gonzaga Oliveira de Freitas
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão, que sempre estiverem ao meu lado, me apoiando e incentivando a crescer. Obrigada por tudo, amo vocês!

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Valcenir Júnior Mendes Furlan pela orientação e pelo fundamental conhecimento transmitido durante o período de análises no laboratório.

A Profa. Dra. Graciela Salete Centenaro pela coorientação na elaboração deste trabalho e por ter aceitado o convite de ser membro da banca de avaliação.

Ao Prof. Dr. Augusto Gonzaga Oliveira de Freitas por ter aceitado o convite de participar da banca de avaliação e pelas valiosas sugestões.

Aos colegas do grupo de pesquisa Betânia Nascimento, João Pedro Cunha e Kassandra Fontoura pelas trocas de conhecimento, pelo convívio e pelos momentos de amizade.

Aos demais amigos e colegas pelos momentos de estudos, descontração e amizade.

Aos meus pais, Luiz Evanir Tamiosso Ribas e Marli Bueno Ribas, e meu irmão, Mathias Bueno Ribas, que nesses 4 anos de graduação, mesmo de longe, sempre estiveram comigo, me motivando e vibrando a cada conquista.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de conclusão de curso (TCC) está apresentado na forma de um artigo científico de acordo com o “Manual de Normatização de Trabalhos Acadêmicos: conforme as normas da ABNT” do sistema de bibliotecas da Universidade Federal do Pampa.

RESUMO

As microalgas são organismos fotossintetizantes capazes de se reproduzir e sobreviver em diversos tipos de ambientes. A sua composição celular permite a produção de inúmeros metabólitos, muitos de interesse biotecnológico para a indústria. Destacam-se pelo alto teor proteico e a qualidade no perfil de aminoácidos. Dentre as microalgas com maior procura, tanto pelo apelo nutricional, apresentando vitaminas, carotenoides, minerais e ácidos graxos indispensáveis, quanto pelas vantagens tecnológicas, pode-se citar a *Spirulina* sp. Esta microalga possui de 60-70% de proteínas e aminoácidos essenciais em sua composição. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da temperatura e do tempo de reação na extração dos aminoácidos proteicos durante a hidrólise ácida da microalga *Spirulina* sp. Um planejamento composto central rotacional foi empregado e as variáveis independentes estudadas foram temperatura de reação, variando de 99,7 e 170,3 °C e tempo de hidrólise, variando de 1,1 a 27,9 h. A resposta foi a concentração de aminoácidos, utilizado como agente catalisador HCl (6 mol/L). A partir do estudo, 57,9% dos aminoácidos foram afetados significativamente pelas variações da temperatura e tempo de hidrólise. Quando a temperatura passou de 160 para 110 °C, obteve-se efeito positivo para Metionina, Serina e Glutamina. Com o aumento do tempo de 5 para 24 h, houve efeito positivo para Metionina, Asparagina, Histidina e Triptofano. E para a interação de temperatura e tempo, verificou-se efeito positivo para Serina, Treonina, Ácido Glutâmico, Asparagina, Lisina, Arginina, Histidina, Tirosina e Triptofano.

Palavras-chave: aminoácidos; cromatografia gasosa; planejamento experimental; *Spirulina* sp.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic organisms capable of reproducing and surviving in different types of environments. Its cellular composition allows the production of numerous metabolites, many of biotechnological interest for the industry. They stand out for their high protein content and quality amino acid profile. Among the most sought-after microalgae, both for its nutritional appeal, presenting essential vitamins, carotenoids, minerals and fatty acids, and for its technological advantages, *Spirulina* sp. This microalgae has 60-70% protein and essential amino acids in its composition. The objective of this work was to study the effect of temperature and reaction time on protein amino acid extraction during acid hydrolysis of the microalgae *Spirulina* sp. A compound rotational center design was used and the independent variables studied were reaction temperature, which ranged between 99.7 and 170.3 °C, and hydrolysis time, which ranged between 1.1 and 27.9 h. The answer was the concentration of amino acids, used as catalyst HCl (6 mol/L). From the study, 57.9% of the amino acids were significantly affected by variations in temperature and hydrolysis time. When the temperature changed from 160 to 110 °C, a positive effect was obtained for Methionine, Serine and Glutamine. As the time increased from 5 to 24 h, there was a positive effect for Methionine, Asparagine, Histidine and Tryptophan. And for the interaction of temperature and time, there was a positive effect for Serine, Threonine, Glutamic Acid, Asparagine, Lysine, Arginine, Histidine, Tyrosine and Tryptophan.

Keywords: amino acids; gas chromatography; experimental planning; *Spirulina* sp.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1	Reagentes	13
2.2	Amostra.....	13
2.3	Determinação de proteínas	13
2.4	Hidrólise ácida.....	13
2.5	Determinação de aminoácidos proteicos.....	14
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1	Proteínas	15
3.2	Análise estatística das hidrólises ácidas da <i>Spirulina</i> sp.....	16
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
	REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos geralmente microscópicos unicelulares ou coloniais fotossintéticos que estão naturalmente presentes em diferentes ambientes aquáticos/úmidos, incluindo rios, lagos, oceanos e solos (EMBRAPA, 2016). “Alga” não é um grupo taxonômico, é uma forma de se descrever os organismos fotoautotróficos que não possuem as raízes e os caules das plantas (TORTORA, 2017). Devido à sua composição unicelular, as microalgas são produtores extremamente eficazes de energia, sendo que algumas espécies convertem a luz solar, água e dióxido de carbono em óleo natural (forma líquida de energia), hidratos de carbono e proteínas (MIRA, 2015).

Os diferentes produtos que podem ser obtidos da cultura microalgal possuem diversas vantagens do ponto de vista da indústria, que por sua vez, levou a um aumento do interesse comercial, baseado no potencial biotecnológico destes organismos (OLIVEIRA, 2019). As microalgas podem ser usadas para produzir inúmeros metabólitos, como proteínas, lipídios, carboidratos, carotenoides ou vitaminas, aditivos para alimentos e rações, cosméticos e produção de energia (PRIYADARSHANI & RATH, 2012).

O alto teor de proteínas variando de 50-70% da sua composição, a qualidade e o padrão de aminoácidos da maioria das microalgas são algumas das razões para considerá-las como uma fonte não convencional de proteínas (DRAAISMA *et al.*, 2013; CHEW *et al.*, 2017).

A Spirulina é um microrganismo primitivo originário há cerca de 3,5 bilhões de anos que estabeleceu a capacidade de utilizar o dióxido de carbono dissolvido na água do mar como fonte de nutrientes para sua reprodução. É uma cianofícea fotossintetizante (alga azul-esverdeada) que cresce vigorosamente sob sol forte, altas temperaturas e condições altamente alcalinas (FAO, 2008).

Essa microalga vem sendo utilizada na alimentação devido seu alto conteúdo proteico, ótima digestibilidade e sua composição de aminoácidos essenciais (DEMIR & TÜKEL, 2010). Além disso, é uma rica fonte de vitaminas, especialmente vitamina B12 e provitamina A (β -caroteno); minerais, principalmente ferro; ácido γ -linolênico dietético (GLA) e uma série de outros fitoquímicos com potenciais benefícios para a saúde (BELAY, 2002).

O conteúdo proteico da Spirulina atinge 60-70% da sua massa seca, possui digestibilidade de 70% e aminoácidos essenciais, tornando essa microalga de excelente qualidade. Entre os aminoácidos não essenciais estão a alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutâmico, glicina, prolina, serina e tirosina. Entre os essenciais, destacam-se a valina, leucina, isoleucina, metionina, treonina, fenilalanina, histidina e lisina (AMBROSI, 2008).

Segundo a Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Spirulina está na lista de constituintes autorizados para uso em suplementos alimentares, exceto para os suplementos alimentares indicados para lactentes (0 a 12 meses) ou crianças de primeira infância (1 a 3 anos) (BRASIL, 2018).

Uma vez que os alimentos são ingeridos, suas proteínas são hidrolisadas e pequenos peptídeos e, aminoácidos são liberados por digestão e absorvidos pelo organismo. Assim, a qualidade das proteínas em um determinado alimento depende fortemente de seu conteúdo de aminoácidos e digestibilidade. Os aminoácidos participam de muitos processos bioquímicos, vias de crescimento, manutenção e atividade metabólica de células e órgãos, e suas necessidades variam, dependendo da fase da vida e a qualidade das proteínas. Dessa forma, o conhecimento do perfil de aminoácidos em proteínas é muito importante para a caracterização de seu valor biológico e como seus benefícios nutricionais podem ser afetados pelo processamento de alimentos ou durante o armazenamento (ARISTOY & TOLDRÁ, 2016).

A hidrólise ácida que se baseia na digestão utilizando um reagente ácido é o método mais comum para fragmentar uma amostra de proteínas antes da análise de aminoácidos. Esta técnica pode ser melhorada otimizando a temperatura e o tempo de incubação associada a adição de compostos protetores de oxidação ácida (ARISTOY & TOLDRÁ, 2016).

A cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (GC-MS) é amplamente utilizada para análise aminoácidos, pois, entre os métodos de separação, tem a mais alta resolução permitindo a separação de misturas complexas (ARISTOY & TOLDRÁ, 2016; OTTER, 2012). O uso acentuado da cromatografia gasosa se deve também aos baixos limites de detecção que podem ser atingidos, essa característica faz que haja necessidade de apenas pequenas quantidades de amostra. Ademais, é uma excelente técnica quantitativa, sendo possível a obtenção de resultados em

concentrações que variam de picogramas a miligramas (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006).

O planejamento experimental é uma ferramenta essencial no aprimoramento e desenvolvimento de processos (BUTTON, 2012). Implica em uma visão preliminar da pesquisa como um todo, prevendo o conjunto das ações que serão executadas em seu desenvolvimento baseando-se em critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema (CURI, 1987). O detalhamento metodológico permitirá que a pesquisa tenha o caráter de reprodutibilidade, podendo ser reproduzida pelos pesquisadores (CAVALCANTE & COSTA, 2021). As vezes a finalidade é otimizar o sistema, isto é, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta. Pode ocorrer a necessidade de satisfazer determinados critérios ao mesmo tempo. Nessa situação uma técnica conveniente é a Metodologia de Superfícies de Resposta (MSR) (BARROS *et al.*, 2001).

O uso de um modelo estatístico para planejamento e avaliação dos resultados de um experimento é extremamente importante, já que proporciona uma interpretação mais precisa do fenômeno investigado (COSTA, 1997 *apud* ALVES, 2017). Além disso, destacam-se alguns benefícios, como redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação; estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos; determinação da confiabilidade dos resultados; representação do processo estudado através de expressões matemáticas entre outros (BUTTON, 2012).

Diante do exposto, o presente trabalho consistiu em estudar o efeito da temperatura e do tempo de reação na extração dos aminoácidos proteicos durante a hidrólise ácida da microalga *Spirulina* sp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Ácido clorídrico (HCl) 6 e 0,1 mol/L, fenol 1 g/L, diclorometano, acetonitrila e N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA), reagentes utilizados na hidrólise e derivatização dos aminoácidos.

As soluções padrão de aminoácidos (L-alanina, L-glicina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, DL-norleucina (padrão interno), L-prolina, L-metionina, L-serina, L-treonina, L-fenilalanina, L-ácido aspártico, L-hidroxiprolina, L-cisteína, L-ácido glutâmico, L-asparagina, L-lisina, L-glutamina, L-cistina, L-arginina, L-histidina, L-tirosina e L-triptofano) (L-Amino acids: Sigma-Aldrich, St. Louis, US) foram preparadas na concentração de 2 mg/mL em solução aquosa de HCl (0,1 mol/L) e armazenadas sob refrigeração.

2.2 Amostra

O trabalho foi realizado utilizando biomassa comercial liofilizada da microalga *Spirulina* sp. devido à estabilidade da composição química.

2.3 Determinação de proteínas

As proteínas foram quantificadas através do teor de nitrogênio total da amostra pelo método Kjeldahl, considerando como fator de correção 6,25 (AOAC, 2000).

2.4 Hidrólise ácida

A extração dos aminoácidos proteicos da microalga foi realizada em um frasco de vidro, do tipo Schlenk, onde 100 mg de biomassa de *Spirulina* sp. foram submetidas à hidrólise ácida com 10 mL de ácido clorídrico (6 mol/L), contendo 1 g/L de fenol como agente cocatalisador, sob pressão reduzida (<50 mm Hg) a temperatura (T) constante e período de reação (H).

A fim de determinar o número de experimentos necessários para avaliar o efeito das variáveis na extração de aminoácidos proteicos, empregou-se um planejamento fatorial completo com dois fatores de estudo segundo Rodrigues e Lemma (2005), constituído por quatro ensaios lineares nos níveis -1 e +1, quatro ensaios axiais ($\alpha = \pm 1,41$) e três ensaios no ponto central, totalizando 11 experimentos. As variáveis

independentes estudadas foram temperatura (T) de reação, com variação de 99,7 a 170,3 °C e tempo (H) de hidrólise, variando entre 1,1 e 27,9 h, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis do delineamento composto central rotacional com seus respectivos níveis codificados e reais.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
T (°C)	170,3	160	135	110	99,7
H (h)	1,1	5	14,5	24	27,9

T = temperatura da reação; H = tempo de hidrólise.

Fonte: Autora, 2022.

Após, o hidrolisado foi diluído (1:100) com HCl (0,1 mol/L) e submetido ao procedimento de derivatização e análise cromatográfica. Os resultados foram avaliados através dos coeficientes de regressão, análise de variância (ANOVA), verificação dos efeitos significativos ao nível de 5% de confiança e da utilização da metodologia de superfície de resposta para otimização das condições operacionais.

2.5 Determinação de aminoácidos proteicos

A derivatização das soluções padrão e dos aminoácidos obtidos a partir da amostra foi realizada conforme o método descrito por Donadel (2015) com posterior análise cromatográfica em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS) (Shimadzu Corporation QP2010-Plus, Kyoto, JP) de acordo com a condição otimizada por Ribas *et al.* (2022).

Os analitos foram identificados positivamente pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massas dos padrões analíticos de 23 aminoácidos (L-Amino acids: Sigma-Aldrich, St. Louis, US). A quantificação dos aminoácidos foi baseada na metodologia indicada por Jiménez-Martín *et al.* (2012), realizada por calibração externa (0,2-60 $\mu\text{g/mL}$) com as áreas previamente normalizadas pelo padrão interno (DL-norleucina: 100 μL , a 10 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos em g/100g de proteína.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Proteínas

Uma das características marcantes e que destaca a *Spirulina* como alimento funcional, é o seu alto teor proteico, indicando esta alga para uma gama de pesquisas enfatizando este nutriente de alto custo e essencialidade para o desenvolvimento humano (DONATO, 2015).

A biomassa comercial liofilizada da *Spirulina* sp. utilizada no presente trabalho apresentou 71,23%±0,28 de proteínas, valor superior ao encontrado em outros estudos. De acordo com Donato (2015), a biomassa liofilizada da microalga *Spirulina platensis* apresentou um percentual de proteínas de 58,62%. Análises realizadas por Uebel (2017) demonstraram um teor de proteínas entre 50,40 e 57,0% para a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 liofilizada. As variações encontradas podem ocorrer devido a diferença da espécie, dos métodos de análise e dos mecanismos operacionais empregados nos meios de cultivo.

O desenvolvimento de produtos está em estreita relação com as necessidades e tendências ou modas de consumo das populações, o que traz como consequência a necessidade de respostas rápidas das indústrias de alimentos às mudanças do mercado consumidor (BARBOSA *et al.*, 2016), principalmente quando se trata de alimentos e/ou bebidas com apelo nutricional.

No estudo de Ambrosi (2008) é possível verificar as propriedades nutricionais e nutracêuticas da *Spirulina*. Esta microalga apresenta diversos constituintes como proteínas de alta qualidade, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas e minerais. Proporciona também efeitos benéficos na hiperlipidemia, na obesidade, no sistema imunológico, na microbiota intestinal, efeitos antivirais entre outros.

A aplicação da microalga *Spirulina* sp. em iogurte liofilizado contribuiu para o aumento do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, bem como para o acréscimo de proteínas (SUYAMA, 2020). Em Pereira e Costa (2020), a adição de hidrolisado proteico de *Spirulina* em gelatina também melhorou a capacidade antioxidante da sobremesa. A adição de *Spirulina platensis* em sorvete caseiro, causou uma elevação significativa na quantidade de proteínas, levando a um enriquecimento nutricional (TIEPO *et al.*, 2021).

Para Melo (2015), a formulação de massa alimentícia tipo espaguete enriquecida

com *Spirulina platensis* demonstrou boa aceitabilidade. O teor proteico e de minerais apresentaram um aumento significativo, tornando a massa uma alternativa de alimento com alta qualidade nutricional. Segundo Damasceno *et al.* (2017), a adição de *Spirulina platensis* na concentração de 6% em barra de cereal mostrou um incremento proteico de 41,60% em relação a amostra controle, confirmando a sua capacidade de melhoria de um alimento.

O desenvolvimento de massa alimentícia sem glúten com adição de *Spirulina platensis* apresentou o potencial desta microalga no enriquecimento de nutrientes. Nas massas contendo Spirulina, os teores de proteína foram superiores aos da formulação controle, comprovando que a Spirulina pode melhorar a composição proteica dos alimentos, sendo utilizada como suplemento para compor uma dieta celíaca (PERON *et al.*, 2018).

Os estudos citados acima demonstram a vasta aplicabilidade da microalga Spirulina. Quando adicionada em formulações alimentícias mantém ou eleva as propriedades nutricionais, enriquecendo o produto e aumentando a sua qualidade. Sendo assim, o elevado conteúdo proteico verificado neste estudo (71,23%) é característico desta microalga e pode ser considerado um recurso nutricional, sendo utilizada como suplemento (BRASIL, 2018), bem como ingrediente para preparações alimentares.

3.2 Análise estatística das hidrólises ácidas da *Spirulina sp.*

A Tabela 2 representa o planejamento fatorial com 11 ensaios realizados, com valores codificados, originais e aminoácidos obtidos.

Tabela 2 – Matriz do delineamento composto central rotacional ($\alpha = \pm 1,41$) para a hidrólise ácida da *Spirulina* sp.

Ensaio ^a	Valores codificados		Valores reais		Aminoácido (g/100 g proteína)																		
	T	H	T (°C)	H (h)	Ala	Gly	Val	Leu	Ile	Pro	Met	Ser	Thr	Phe	Asp	Glu	Asn	Lys	Gln	Arg	His	Tyr	Trp
E1	-1	-1	160	5	8,04	4,69	6,56	8,31	5,36	9,11	0,54	3,35	9,24	5,76	8,98	8,98	0,80	3,08	0,54	2,28	0,80	4,42	0,40
E2	+1	-1	110	5	7,95	3,52	3,78	6,39	3,39	7,43	1,96	4,56	7,43	5,08	7,04	6,65	0,78	1,56	1,30	1,56	0,00	2,61	0,39
E3	-1	+1	160	24	8,13	4,26	6,53	8,13	5,06	8,52	2,13	1,60	5,19	5,46	6,39	7,06	0,80	1,73	0,53	1,73	0,80	2,93	0,40
E4	+1	+1	110	24	8,24	4,12	5,72	7,98	4,92	8,64	2,39	5,98	12,76	5,32	8,51	8,91	0,80	2,39	0,53	2,66	0,80	3,46	0,40
E5	$-\alpha$	0	170,3	14,5	8,65	4,67	6,87	8,52	5,08	9,20	2,34	2,34	8,38	6,32	8,93	8,38	0,82	2,47	0,55	1,92	0,82	3,43	0,41
E6	$+\alpha$	0	99,7	14,5	8,77	3,91	4,18	7,42	3,51	8,91	2,02	6,48	13,50	5,53	8,91	7,69	0,81	1,89	1,62	1,62	0,00	3,37	0,40
E7	0	$-\alpha$	135	1,1	8,12	3,78	2,94	6,30	2,10	7,42	1,96	5,04	7,28	3,64	7,42	6,86	0,84	1,26	0,70	1,26	0,00	1,82	0,42
E8	0	$+\alpha$	135	27,9	7,81	4,60	6,55	8,50	5,58	9,48	2,65	4,04	11,01	6,13	9,20	9,48	0,84	3,62	0,70	2,37	0,84	4,18	0,42
E9	0	0	135	14,5	8,66	4,20	5,73	8,10	4,89	9,00	2,10	5,59	13,00	5,17	9,08	8,66	0,84	1,82	0,70	2,50	0,84	3,21	0,42
E10	0	0	135	14,5	9,09	4,47	6,43	8,67	5,45	8,81	2,20	5,45	11,89	5,73	8,53	8,25	0,84	1,96	0,60	2,24	0,84	3,22	0,42
E11	0	0	135	14,5	8,03	4,61	6,56	8,23	5,58	9,90	2,45	5,78	14,00	5,98	9,50	9,20	0,84	2,00	0,60	2,30	0,84	3,50	0,42

^a Experimentos realizados em ordem aleatória; T = temperatura da reação; H = tempo de hidrólise; p = 0,05; Ala = Alanina; Gly = Glicina; Val = Valina; Leu = Leucina; Ile = Isoleucina; Pro = Prolina; Met = Metionina; Ser = Serina; Thr = Treonina; Phe = Fenilalanina; Asp = Ácido Aspártico; Glu = Ácido Glutâmico; Asn = Asparagina; Lys = Lisina; Gln = Glutamina; Arg = Arginina; His = Histidina; Tyr = Tirosina; Trp = Triptofano.

Fonte: Autora, 2022.

O planejamento experimental foi analisado com os valores codificados, pois a soma dos desvios em relação a média é igual a zero. Além disso, utilizou-se o erro puro, visto que é possível avaliar a repetibilidade em um ponto, quando apresenta pequeno número de repetições (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A partir dos coeficientes de regressão analisados ($p = 0,05$), os termos não estatisticamente significativos a um nível de significância 5% foram incorporados à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA.

De acordo com Box e Wetz citado por Barros Neto *et al.* (1996), a regressão é considerada como útil para fins preditivos caso o valor $MQ_{regressão}/MQ_{resíduo}$ seja, pelo menos, quatro a cinco vezes maior que o $F_{tabelado}$. Além disso, o modelo deverá apresentar um coeficiente de determinação (R^2) igual ou maior a 0,95, isto é o modelo deverá explicar no mínimo 95% da variação dos dados experimentais. Nenhuma das respostas avaliadas apresentou um modelo matemático preditivo, visto que o $F_{calculado}$ não foi suficientemente maior que o $F_{tabelado}$. Além do mais, nenhum modelo conseguiu explicar no mínimo 95% da variação dos dados experimentais, sendo assim, não foi permitida a construção da superfície de resposta permitindo a visualização do comportamento dos hidrolisados, em função das variáveis que apresentaram influência significativa sobre a variável resposta.

Porém, a única resposta que apresentou modelo significativo e preditivo foi o aminoácido Serina, o qual é descrito a seguir:

Tabela 3 – Coeficientes de regressão e significância estatística de cada fator para o aminoácido Serina.

Fatores	Coeficiente de regressão	Significância estatística (p)*
Média	5,60	0,0002
T (L)	1,43	0,0016
T (Q)	-0,75	0,0083
H (Q)	-0,68	0,0100
T (L) x H (L)	0,79	0,0106

*Nível de significância de 5%; T = temperatura da reação; H = tempo de hidrólise; L = linear; Q = quadrático.

Fonte: Autora, 2022.

Conforme a Tabela 3, a partir dos coeficientes de regressão analisados ($p = 0,05$), o fator H (L) linear não apresentou significância estatística dentro do intervalo

de confiança (95%). Então esta variável foi excluída e incorporada no resíduo total para cálculo da ANOVA e a análise foi realizada novamente.

Através da ANOVA foi verificada a significância da regressão em nível de 95% de confiança, utilizando o teste F (Tabela 4).

Tabela 4 – ANOVA para a concentração de Serina na *Spirulina* sp.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado} (p ≤ 0,05)	R ²
Regressão	23,44	4	5,86	27,28	4,53	0,95
Resíduo	1,28	6	0,21			
Falta de ajuste	1,23	4				
Erro puro	0,05	2				
Total	24,73	10				

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação.

Fonte: Autora, 2022.

O modelo apresentou regressão significativa em nível de 95% de confiança (F_{calculado} superior ao F_{tabelado}) com R² igual a 0,95 (Tabela 4), evidenciando que o modelo explicou 95% da variação dos dados experimentais. O valor de F_{calculado} da regressão foi 6,0 vezes superior ao F_{tabelado}, indicando que o modelo é preditivo. Além disso, a média quadrática do erro puro apresentou um valor baixo (0,0270), logo o experimento foi bem controlado, isto é, os desvios padrões das respostas são pequenos.

O modelo com as variáveis que representam a concentração do aminoácido Serina na *Spirulina* sp., em função da temperatura e tempo de reação na faixa estudada, está representado pela Equação 1:

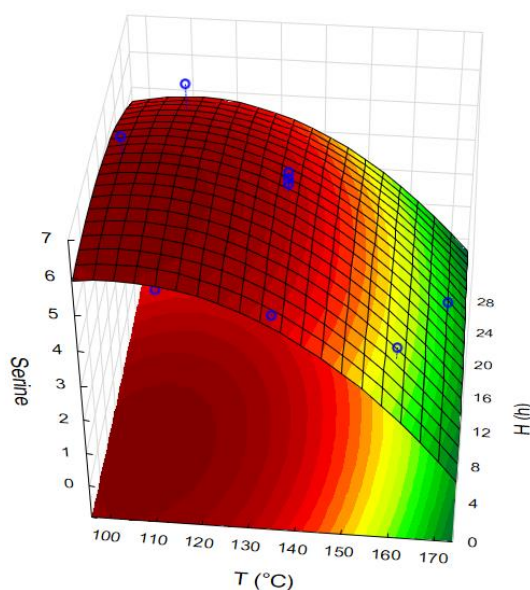
$$\text{Serina} = 5,60 + 1,43 \cdot T - 0,75 \cdot T^2 - 0,68 \cdot H^2 + 0,79 \cdot T \cdot H \quad (1)$$

Onde: Serina = aminoácido (g/100 g de proteína); T = temperatura da reação (°C); H = tempo de hidrólise (h)

Assim, o modelo foi utilizado na construção da superfície de resposta permitindo a visualização do comportamento dos hidrolisados ácidos de *Spirulina* sp., em função

das variáveis que apresentaram influência significativa sobre a variável resposta Serina, mostrado na Figura 1. A 100 °C e 14,5 h foi obtida a máxima concentração de Serina (6,48 g/100 g de proteína) para a microalga *Spirulina* sp., empregando ácido clorídrico (6 mol/L) contendo 1 g/L de fenol como agente catalisador.

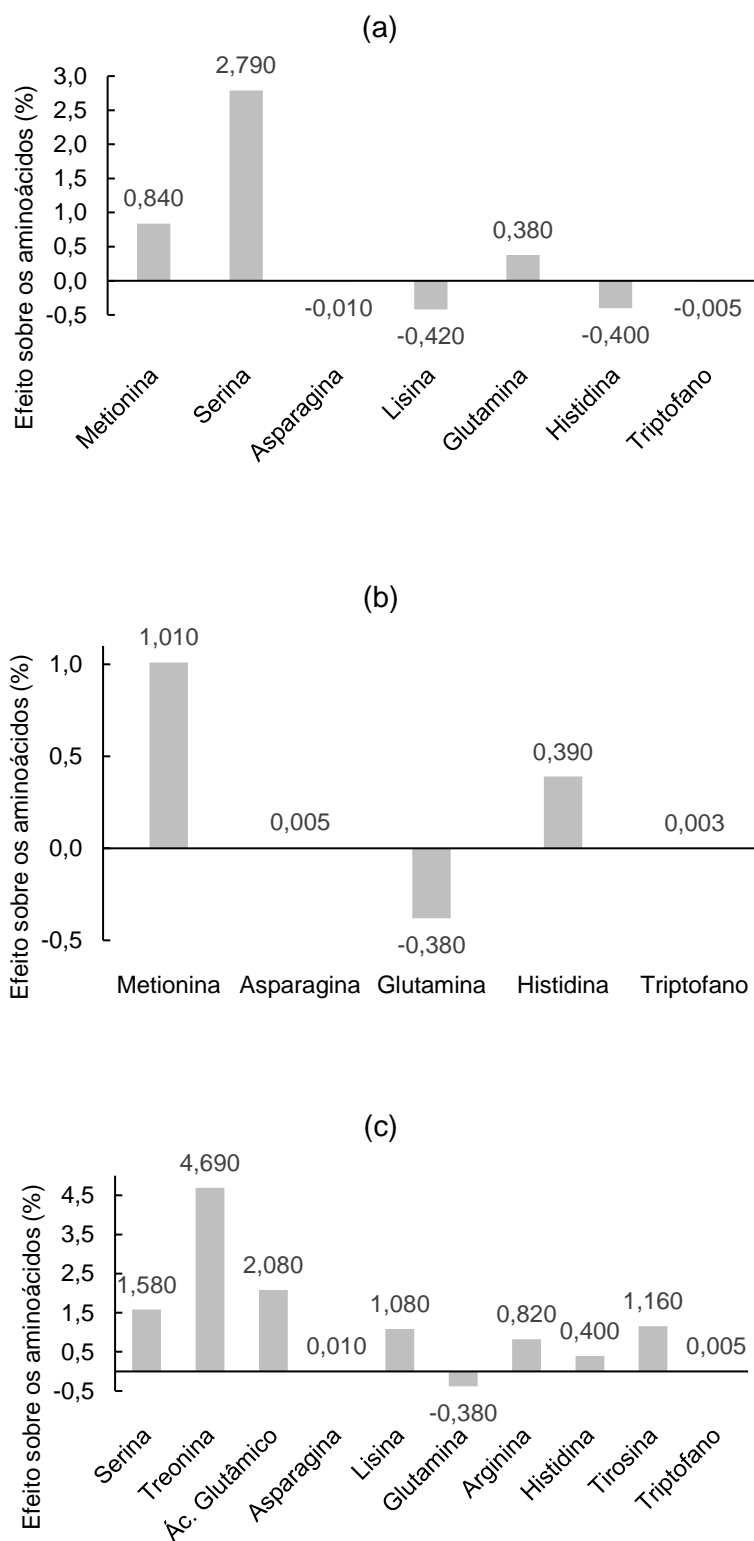
Figura 1 – Superfície de resposta representando a Serina nos hidrolisados ácidos da *Spirulina* sp.



Serina = aminoácido (g/100 g de proteína); T = temperatura da reação (°C); H = tempo de hidrólise (h).
Fonte: Autora, 2022.

No entanto, o tratamento estatístico dos resultados permitiu a análise dos efeitos principais da temperatura de reação e tempo de hidrólise, sobre a concentração de aminoácidos proteicos, visto que os resultados da análise estatística da concentração de aminoácidos para a microalga, apresentaram coeficientes de regressão significativos ($p \leq 0,05$). Isso mostra que essas variáveis independentes, dentro das condições estudadas, apresentam também uma resposta importante à avaliação da hidrólise, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Efeitos significativos ($p \leq 0,05$) da temperatura de reação, tempo de hidrólise e interação nos conteúdos de aminoácidos proteicos dos hidrolisados ácidos da *Spirulina* sp.



(a) Efeito da temperatura; (b) Efeito do tempo; (c) Efeito da interação.

Fonte: Autora, 2022.

Dos 22 aminoácidos analisados, três (Hidroxirolina, Cisteína e Cistina) não foram detectados na biomassa microalgal, entre os demais determinados, 42,1% (Alanina, Glicina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Fenilalanina e Ácido Aspártico) não foram afetados pelas condições de estudo. Em Carvajal (2009), Machado *et al.* (2017) e Volkmann (2006), na análise da composição de aminoácidos da Spirulina, a Hidroxirolina também não foi detectada, corroborando com o presente trabalho.

De acordo com Morist *et al.* (2001), a carência em aminoácidos sulfurados, Cisteína e Cistina, é uma característica do perfil aminoacídico das algas verdes-azuis, dessa forma, demonstrando a dificuldade de detecção por este estudo.

Entretanto, 57,9% (Metionina, Serina, Treonina, Ácido Glutâmico, Asparagina, Lisina, Glutamina, Arginina, Histidina, Tirosina e Triptofano) foram afetados significativamente pelas variações da temperatura e tempo de hidrólise.

Houve maior exposição dos analitos Metionina, Serina e Glutamina quando a variável temperatura passou de 160 para 110 °C, porém essa baixa temperatura diminuiu a liberação dos aminoácidos Asparagina, Lisina, Histidina e Triptofano da cadeia de proteínas da Spirulina. Certos resíduos (Lisina e Histidina) apresentam maior tendência à racemização, transformação que pode influenciar na análise (WEISS *et al.*, 1998). O efeito negativo para a Histidina também pode ser explicado, de acordo com Fountoulakis e Lahm (1998), que agentes presentes na solução de proteína ou em reagentes podem reagir ou catalisar reações e assim afetar a quantificação da mesma. Já o triptofano é um aminoácido de baixa abundância e é parcialmente destruído (BLACKBUM, 1978) (Figura 2 a).

O aumento do tempo de hidrólise de 5 para 24 h favoreceu a fragmentação das cadeias de proteínas, o que ocasionou um efeito positivo para os aminoácidos Metionina, Asparagina, Histidina e Triptofano, com exceção da Glutamina que foi afetada negativamente (Figura 2 b). Esta elevação de tempo foi positiva, visto que há a necessidade de um elevado tempo de hidrólise para a quebra eficiente das ligações dos aminoácidos com resíduos hidrofóbicos, como a Metionina e o Triptofano (WEISS *et al.*, 1998; NELSON & COX, 2004).

A interação entre as variáveis temperatura e tempo de hidrólise apontou um efeito positivo, com aumento da concentração para maioria dos compostos, exceto a Glutamina (Figura 2 c). A baixa taxa de extração deste aminoácido foi percebida, pois

sob condições ácidas pode transformar-se em Ácido Glutâmico, conforme apontado por Aristoy e Toldrá (2016).

As proteínas são construídas a partir do mesmo conjunto ubíquo de subunidades monoméricas relativamente simples, os aminoácidos (NELSON & COX, 2004). A capacidade de separar e quantificar aminoácidos é essencial para a caracterização e elucidação estrutural de polipeptídeos e proteínas (MUDIAM *et al.*, 2012). Esta separação e quantificação pode ser realizada por uma variedade de métodos, sendo que a principal preocupação é que as condições devem ser idealmente otimizadas para cada tipo de alimento e aminoácido (OTTER, 2012).

A determinação da composição de aminoácidos é um processo analítico relativamente complexo, composto pela hidrólise completa do substrato para liberação dos resíduos, e devido à presença de grupos altamente polares (NH_2 , OH , COOH) e sua natureza não volátil, os aminoácidos precisam ser derivatizados (OTTER, 2012) para posterior análise cromatográfica e então, quantificação (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

A hidrólise é uma etapa importante e seu desempenho adequado é um pré-requisito para uma análise bem-sucedida. Vários estudos tratam dos efeitos do tempo e da temperatura na completude da técnica, já que a combinação desses fatores é fundamental para a determinação dos resíduos sensíveis e sua influência é amplamente investigada. Quaisquer que sejam as condições, elas representam um compromisso entre o desempenho da reação e a conservação dos produtos da reação, visando entregar os melhores resultados, dependendo do objetivo da análise (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

O tratamento com ácido clorídrico (HCl) é o método de hidrólise mais comum (Figura 3). Isso se deve à praticidade de aplicação desse reagente, que pode ser utilizado tanto na fase líquida quanto na fase gasosa, sendo possível a sua posterior evaporação. Neste método determinados aminoácidos podem sofrer hidrólise ou serem parcialmente destruídos (FOUNTOULAKIS & LAHM, 1998).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microalga *Spirulina* sp. apresentou um elevado teor proteico de 71,23% e diversos aminoácidos em sua composição, demonstrando a sua potencialidade e tornando-se uma alternativa de matéria-prima e/ou incremento alimentício para a indústria.

Com a redução da temperatura os aminoácidos Metionina, Serina e Glutamina apresentaram efeito positivo na resposta analítica, sendo que a baixa temperatura afetou a eficiência na extração da Asparagina, Lisina, Histidina e Triptofano.

No aumento do tempo, observou-se efeito positivo para Metionina, Asparagina, Histidina e Triptofano, visto que esta elevação foi prejudicial para a Glutamina.

A interação entre temperatura e tempo proporcionou efeito positivo para os aminoácidos Serina, Treonina, Ácido Glutâmico, Asparagina, Lisina, Arginina, Histidina, Tirosina e Triptofano, porém para a Glutamina foi desfavorável.

De acordo com as variáveis estudadas, o planejamento foi favorável para determinados aminoácidos, tornando visível os efeitos positivos nas concentrações aminoacídicas pelo aumento da liberação dos mesmos.

No entanto, há poucos estudos que investiguem a extração de aminoácidos para analisar diferentes grupos de alimentos, desta forma faz-se necessário estudos futuros que busquem a variabilidade de métodos para separação, detecção e quantificação de aminoácidos proteicos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, I. B. **Otimização dos processos produtivos de uma malharia por meio da aplicação do Design of Experiments**. 2017. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Engenharia, Juiz de Fora, 2017.
- AMBROSI, M. A. *et al.* Propriedades de saúde da microalga Spirulina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008.
- ARISTOY, M. C. & TOLDRÁ, F. Amino acids: determination. In: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 141-148.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
- BARBOSA, E. S. P. *et al.* Avaliação sensorial de bebida proteica com adição da microalga *Spirulina platensis*. **Revista Processos Químicos**. p. 146-150, 2016.
- BARROS NETO, I. S. & SCARMINIO, R. E. B. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2a. ed. Campinas: Unicamp, 1996.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. São Paulo: Editora da Unicamp, 2001.
- BANI RASHAID, A. H.; JACKSON, G. P. & HARRINGTON, P. B. Validation of a method of measuring the amino acid composition of proteins by gas chromatography/mass spectrometry. **Enliven: Bio analytical Techniques**, v. 1, p.1-12, 2014.
- BELAY, A. The potential application of Spirulina (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27-45, 2002.
- BLACKBURN, S. (STANLEY). **Amino acid determination: methods and techniques**. 2. ed. [s.l.] Marcel Dekker Inc, 1978.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União**: Edição 144, Seção I, Brasília, DF, p. 141, 2018.
- BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados**. Universidade Federal de Campinas. Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica. Campinas, 2012.
- CAMPANELLA, L.; CRESCENTINI, G. & AVINO, P. Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on

Spirulina. **Analisis**, v. 27, p. 533– 540, 1999.

CARVAJAL, J. C. L. **Caracterização e modificações químicas da proteína da microalga Spirulina (*Spirulina máxima*)**. Tese de Doutorado (Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, João Pessoa/PB, 2009.

CAVALCANTE, M. & COSTA, J. G. Considerações sobre planejamento experimental e métodos estatísticos em Ciências Agrárias. **Diversitas Journal**, vol. 6, n. 4, p. 3706-3723, 2021.

CHEW, K. W. *et al.* Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

CHIOU, S.-H. & WANG, K.-T. Simplified protein hydrolysis with methanesulphonic acid at elevated temperature for the complete amino acid analysis of proteins. **Journal of Chromatography**, n. 448, p. 404-410, 1988.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

COSTA, N. A. A. *et al.* Gerenciamento de processos – metodologia base para a melhoria contínua. **Encontro Nacional de Engenharia de Produção (ENEGEP)**, 1997.

CURI, P. R. Alguns aspectos do planejamento experimental. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 37, n. 5, p. 341-345, 1987.

DAMASCENO, I. A. M. *et al.* Barra de cereal enriquecida com biomassa de *Spirulina platensis*. **Revista Agrarian**, v. 10, n. 38, p. 278-287, 2017.

DEMIR, B. S. & TÜKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 64, p. 123-128, 2010.

DONADEL, J. Z. **Determinação por cromatografia em fase gasosa de aminoácidos livres em salames submetidos a ultrassom**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Santa Maria, 2015.

DONATO, N. R. **Secagem de Spirulina (*Spirulina platensis*) e utilização na produção de biscoitos**. Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Campina Grande/PB, 2015.

DRAAISMA, R. B. *et al.* Produtos alimentares de microalgas. **Parecer atual em biotecnologia**, v. 24, n. 2, p. 169-177, 2013.

EMBRAPA. Agroenergia em revista: microalgas. **Embrapa Agroenergia**, n.10, 2016.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **Fisheries and Aquaculture**, n. 1034, p. 1-41, 2008.

FOUNTOULAKIS, M. & LAHM, H. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, n. 826, p. 109–134, 1998.

JACOB-LOPES, E. *et al.* Caracterização da fração proteica da cianobastéria *Aphanothece Microscopica Nägeli* cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 482-488, 2006.

JIMÉNEZ-MARTÍN, E. *et al.* Gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of free amino acids as their dimethyl- tert -butylsilyl (TBDMS) derivatives in animal source food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2456-2463, 2012.

LAUAND, F. *et al.* Efeito da hipovolemia sobre a cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 24, n. 4, p. 317-321, 2004.

MACHADO, A. R. *et al.* Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 264–278, mar. 2017.

MELO, R. D. **Formulação e caracterização de massa alimentícia tipo espaguete enriquecida com *Spirulina platensis*: uma alternativa para o combate a desnutrição infantil**. 2015. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Nutrição) – Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Saúde, Cuité/PB, 2015.

MIRA, V. S. **Desenvolvimento de um iogurte suplementado com *Spirulina platensis*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial**. 2015. 167 f. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar. Peniche Instituto Politécnico de Leiria, 2015.

MORIST, A. *et al.* Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**. v. 37, p. 535-547, 2001.

MUDIAMA, M. K. R. *et al.* Rapid and simultaneous determination of twenty amino acids in complex biological and food samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry with the aid of experimental design after ethyl chloroformate derivatization. **Journal of Chromatography B**. n. 907, p. 56–64, 2012.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

OLIVEIRA, M. B. **Avaliação da composição taxonômica de cepas de microalgas coletadas em tanques de piscicultura e cultivadas com vinhaça**. 2019. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Curso de Biotecnologia, Dourados, 2019.

OTTER, D. E. Standardised methods for amino acid analysis of food. **British Journal of Nutrition**, n. 108, p. 230–237, 2012.

PEREIRA, A. M.; SANTOS, T. D. & COSTA, J. A. V. Aplicação de hidrolisado proteico de *Spirulina* em gelatina. *In: 7º Simpósio de Segurança Alimentar – Inovação em Sustentabilidade – Online, 2020. Anais [...]. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos – RS, 2020.*

PERON, B. C. *et al.* Massa alimentícia isenta de glúten com adição de *Spirulina platensis*: avaliação tecnológica e caracterização físico-química. **Desafios da Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 4. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2018.

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

RIBAS, V. B. *et al.* Otimização do sistema cromatográfico para determinação de aminoácidos. *In: MEDEIROS, J. A. & NIRO, C. M. (Org.). Pesquisas e Atualizações em Ciência dos Alimentos*. 1. ed. Jardim do Seridó: Agron Food Academy, p. 703-710, 2022.

RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 1a. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RUIZ, R. O. *et al.* Uso de ácido trans-retinóico em derme: estudo experimental. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 8, n. 3, p. 17-24, 2006.

SILVA, T. F. & PENNA, A. L. B. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.

SUYAMA, I. M. *et al.* Aplicação da microalga *Spirulina* spp. em iogurte liofilizado. **Scientia Plena**, v. 16, n. 2, 2020.

TIEPO, C. B. V. Addition of *Spirulina platensis* in handmade ice cream: physicochemical and sensory effects. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 88106-88123, 2021.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UEBEL, L. S. **Planta industrial para produção de Spirulina: variáveis físico-químicas, respostas biológicas e aplicação de normas de garantia da**

qualidade. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2017.

VOLKMANN, H. **Utilização de rejeito de dessalinizador como meio de cultura alternativo para cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis***. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis/SC, 2006.

WEISS, M. *et al.* Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 795, n. 2, p. 263–275, fev. 1998.