



**Mapeamentos Tecnológico e Filogenético  
direcionados para obtenção de hidrolisados  
proteicos de *Spirulina maxima***

Bernardo Fonseca Matias

**Trabalho de Conclusão de Curso de  
Engenharia Química**

Orientadores:

Élcio Ribeiro Borges, *D.Sc.* Escola de Química/UFRJ

Anita Ferreira do Valle, *D.Sc.* Instituto de Química/UFRJ

Ricardo Sposina Sobral Teixeira, *D.Sc.* Instituto de Química/UFRJ

Daniel Perrone Moreira, *D.Sc.* Instituto de Química/UFRJ

Outubro de 2021

# **Mapeamentos Tecnológico e Filogenético direcionados para obtenção de hidrolisados proteicos de *Spirulina* maxima**

***Bernardo Fonseca Matias***

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado por:

---

Maria Antonieta Couto Gimenes *D.Sc.* (EQ-UFRJ)

---

Elisa D`Avila Costa Cavalcanti *D.Sc.* (IQ-UFRJ)

---

Marcelo Mendes Viana *D.Sc.* (EQ-UFRJ)

Orientado por:

---

Élcio Ribeiro Borges, *D.Sc.* (EQ-UFRJ)

---

Anita Ferreira do Valle, *D.Sc.* (IQ-UFRJ)

---

Ricardo Sposina Sobral Teixeira, *D.Sc.* (IQ-UFRJ)

---

Daniel Perrone Moreira, *D.Sc.* (IQ-UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Outubro de 2021

Ficha Catalográfica

Fonseca Matias, Bernardo

FM433t Trabalho de Conclusão de Curso / Bernardo Fonseca  
Matias. -- Rio de Janeiro, 2021.

104 f.

Orientador: Élcio Ribeiro Borges. Coorientadores: Anita  
Ferreira do Valle e Ricardo Sposina Sobral Teixeira.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Bacharel em  
Engenharia Química, 2021.

1. Spirulina maxima. 2. Prospecção tecnológica. 3. Proteases. 4.  
Fungos. 5. Filogenética. I. Ribeiro Borges, Élcio, orient. II. Ferreira  
do Valle, Anita, coorient. III. Sposina Sobral Teixeira, Ricardo. IV.  
Perrone Moreira, Daniel. V Mapeamentos Tecnológico e  
Filogenético direcionados para obtenção de hidrolisados proteicos  
de Spirulina maxima

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para superar todas as dificuldades enfrentadas durante esses tempos tão conturbados.

À minha mãe Cristina por ter me dado todo apoio possível para que eu pudesse fazer a faculdade que sonhei e me motivar durante os momentos de crise para que eu não desistisse.

À minha namorada Beatriz por ser minha companheira e por todo o suporte, crescimento pessoal e compreensão nos momentos bons e ruins dessa jornada.

A todos os meus amigos que me apoiaram de diversas formas e em diversos momentos durante toda jornada, me alegrando, divertindo, confortando, dividindo dores, horas de estudos e muitos momentos memoráveis.

Aos meus orientadores Élcio Borges, Anita do Valle, Ricardo Sposina e Daniel Perrone, por toda a ajuda, paciência, disposição e confiança.

À toda a EQ, e seus professores, técnicos, administradores, equipe de limpeza, equipes das xerox e ao Diretório Acadêmico por terem me fornecido conhecimento, oportunidades, estrutura e todas as características que fazem de uma graduação uma experiência além da acadêmica.

*“Até a escuridão tem de passar. Um novo dia virá. E, quando o sol brilhar, brilhará ainda mais forte.”*

O SENHOR DOS ANÉIS – AS DUAS TORRES, 1954.

(J. R. R. TOLKIEN)

## RESUMO

MATIAS, Bernardo Fonseca. **Mapeamentos Tecnológico e Filogenético direcionados para obtenção de hidrolisados proteicos de *Spirulina maxima***. Orientadores: Elcio Ribeiro Borges; Anita Ferreira do Valle; Ricardo Sposina Sobral Teixeira; Daniel Perrone Moreira. Rio de Janeiro, 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (BACHARELADO EM ENGENHARIA QUÍMICA). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A microalga *Spirulina maxima* apresenta grande potencial no setor alimentício devido ao seu alto teor proteico e sua composição nutricional, podendo ser uma matéria prima sustentável com aplicações em diversas indústrias como cosméticos, fármacos e aditivos alimentares. Com a crescente necessidade da introdução de novos produtos e inovações no mercado alimentício, impulsionada pelas questões humanitárias da fome e da miséria, a microalga *S. maxima* apresenta-se como um alimento funcional que não demonstra toxicidade humana e é altamente digerível por humanos e animais. Sendo assim, o presente trabalho foi concebido com o objetivo de mapear a aplicação desse microrganismo no que diz respeito às bebidas, uma forma de uso que permite maior diferenciação em seus produtos, além de ser muito pouco presente na literatura, sendo uma área com bastante espaço para inovações. Utilizando uma metodologia de mapeamento tecnológico, foi possível determinar que a busca dos consumidores por alimentos mais funcionais e saudáveis aumenta, porém, as bebidas derivadas da biomassa algácea ainda são muito pouco presentes. Outras conclusões obtidas a partir do mapeamento foram: A predominância da Índia na quantidade de produções acadêmicas do campo; A utilização de iogurtes majoritariamente como objeto dos artigos avaliados; Baixo desenvolvimento de alternativas à adição da biomassa em bebidas. Ocorreu também a produção da biomassa de *S. maxima* em frascos agitados e, posteriormente, em fotobiorreatores de maneira a acumular biomassa seca em quantidade suficiente para os estudos práticos seguintes. Foi avaliado o conteúdo proteico da biomassa gerada, alcançando um valor de 69.9 % na biomassa seca. Após essa análise, o foco do trabalho se voltou para a aplicação dessa biomassa na forma de um hidrolisado enzimático, visando evitar características sensoriais indesejadas. Iniciaram-se estudos para seleção de microrganismos produtores de proteases. Os estudos tiveram como embasamento metodologias de prospecção filogenética, consistindo na comparação de enzimas comerciais já utilizadas com proteases produzidas por microrganismos disponíveis em laboratório. As comparações foram feitas com o auxílio do software *MEGA-X*, que realizou o alinhamento de sequências de aminoácidos assim como a confecção de árvores filogenéticas e sua validação estatística. De acordo com os resultados obtidos pela avaliação filogenética, foram escolhidas para os experimentos as espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus clavatus* e *Trichoderma reesei*. As espécies foram estudadas e avaliadas a partir da coleta diária de alíquotas de seus meios de cultivo, onde foram medidas as atividades proteolíticas. Os cultivos foram mantidos sob agitação de 200 min<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. Os resultados obtidos na primeira etapa de cultivo foram atividades proteolíticas alcançados valores máximos em (U/mL) de 31.2 (*A. niger*), 38.4 (*A. awamori*), 40.1 (*A. clavatus*) e 34.7 (*T. reesei*). Com as atividades obtidas em conjunto com o embasamento fornecido

pela filogenia, as proteases apresentam-se como candidatas para aplicação no processo produtivo de hidrólise da biomassa de *S. máxima*.

## ABSTRACT

The microalgae *Spirulina maxima* has great potential in the food sector due to its high protein content and nutritional composition and can be a sustainable source of material with applications in various industries such as cosmetics, pharmaceuticals and food additives. With the growing need for the introduction of new products and innovations in the food market, driven by humanitarian issues of hunger and poverty, the microalgae *S. maxima* presents itself as a functional food that does not show human toxicity and is highly digestible by humans and animals. Therefore, this research was conceived with the objective of mapping the application of this microorganism regarding beverages, a form of use that allows greater differentiation in its products, in addition to being very little present in the literature, being an area with room for innovations. Using a technological mapping methodology, it was possible to determine that consumers' search for more functional and healthier foods increases, however, beverages derived from algal biomass are still very little present. Other conclusions obtained from the mapping were: The predominance of India in the number of academic productions in the field; The use of yogurts mostly as the object of the evaluated articles; Low development of alternatives to the addition of biomass in beverages. After the technological mapping, the production of biomass of *S. maxima* in shaken flasks was performed in photobioreactors to accumulate dry biomass in sufficient quantity for the following practical studies. The protein content of the generated biomass was evaluated, reaching a value of 69.9% in dry biomass. After this analysis, the focus of the work turned to the application of this biomass in the form of an enzymatic hydrolysate, aiming to avoid unwanted sensory characteristics. Studies for the selection of protease-producing microorganisms were initiated. The studies were based on phylogenetic prospection methodologies, consisting in the comparison of commercial enzymes already used with proteases produced by microorganisms available in the laboratory. Comparisons were made with the aid of the MEGA-X software, which performed the alignment of amino acid sequences as well as the construction of phylogenetic trees and their statistical validation. According to the results obtained by the phylogenetic evaluation, the species *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus clavatus* and *Trichoderma reesei* were chosen for the experiments. The species were studied and evaluated from the daily collection of aliquots from their culture media, where proteolytic activities were measured. The cultures were kept under agitation for 200 min<sup>-1</sup> and temperature of 30 °C. The results obtained in the first stage of cultivation were proteolytic activities reaching maximum values in (U/mL) of 31.2 (*A. niger*), 38.4 (*A. awamori*), 40.1 (*A. clavatus*) and 34.7 (*T. reesei*). With the activities obtained together with the foundation provided by the phylogeny, the proteases are presented as candidates for application in the productive process of hydrolysis of the biomass of *S. maxima*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - RESUMO DAS VIAS DE OBTENÇÃO DE PRODUTOS ORIUNDOS DE MICROALGAS E SUAS RESPECTIVAS ÁREAS DE APLICAÇÃO.....	20
Figura 2 - VISTA DO SISTEMA DE LAGOS DE PRODUÇÃO DE MICROALGAS DO GÊNERO SPIRULINA NA PROVÍNCIA DE HAINAN.....	24
Figura 3 - SISTEMA DE LAGOS PARA A PRODUÇÃO DE MICROALGAS DO GÊNERO SPIRULINA NA MONGÓLIA INTERIOR.....	25
Figura 4 – DIAGRAMA DE BLOCOS BASAL PARA A PRODUÇÃO DE MICROALGAS DO GÊNERO SPIRULINA.....	26
Figura 5 – MECANISMO SIMPLIFICADO DA AÇÃO DE UMA PROTEASE ASPÁRTICA.....	27
Figura 6 – OBJETIVOS DA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.....	40
Figura 7 – ILUSTRAÇÃO COMPARATIVA ENTRE UM CLADOGRAMA (ESQUERDA) E UM FILOGRAMA (DIREITA), ASSIM COMO SEUS CLADOS.....	49
Figura 8 - SEQUÊNCIA DE FASES A SEREM ADOTADAS PARA A EXECUÇÃO, ORGANIZAÇÃO E CONCLUSÃO DA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.....	52
Figura 9 - DIAGRAMA SIMPLIFICADO DE ETAPAS DO CULTIVO DE <i>S. MAXIMA</i>	61
Figura 10 – PARÂMETROS DE ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS .	65
Figura 11 – PARÂMETROS DE ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS .	66
Figura 12 – PORCENTAGEM DE ARTIGOS CONSIDERADOS RELEVANTES OU DESCARTADOS.....	70
Figura 13 - NÚMERO DE ARTIGOS RELEVANTES POR ANO DE PUBLICAÇÃO.	71
Figura 14 - PAÍSES COM MAIS ARTIGOS PUBLICADOS.....	72
Figura 15 – PARTICIPAÇÃO DE ARTIGOS DAS TAXONOMIAS DA ANÁLISE MESO.....	74
Figura 16 – QUANTIDADE DE DOCUMENTOS PRESENTES NAS TAXONOMIAS DE NÍVEL MICRO PROVENIENTES DE “BEBIDAS”. .....	76
Figura 17 - QUANTIDADE DE ARTIGOS POR TAXONOMIA REPRESENTANDO O NÍVEL MESO “MÉTODO DE OBTENÇÃO DE BIOMASSA”.....	77
Figura 18 - FREQUÊNCIA DAS TAXONOMIAS PARTICIPANTES DA MESO “PRODUÇÃO”. .....	78
Figura 19 – COMPARAÇÃO DA ATUAÇÃO DE CADA TAXONOMIA NA MESO “FORMA DE ADIÇÃO”. .....	79



Figura 20 – CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>SPIRULINA MAXIMA</i> EM MEIO AO E VOLUME DE CULTIVO DE 50 L, A 30 °C E SOB IRRADIÂNCIA DE 120 $\mu\text{MOL FÓTONS} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ NA DENSIDADE CELULAR INICIAL (DOI) 0,1 .....	82
Figura 22 – NÚMERO DE PROTEÍNAS ANALISADAS POR ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	83
Figura 23 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE AMINOPEPTIDASES (3.4.11) .....	84
Figura 24 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE DIPEPTIDIL-PEPTIDASES (3.4.14).....	85
Figura 25 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE SERINOENDOPEPTIDASES (3.4.21) ..	86
Figura 26 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE METALOENDOPEPTIDASES (3.4.24) .	87
Figura 21 – ACOMPANHAMENTO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS MEIOS DE CULTIVO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS SELECIONADOS.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - COMPARATIVO DOS CONTEÚDOS NUTRICIONAIS DE ALIMENTOS DE CONSUMO DIÁRIO E MICROALGAS .....	15
Tabela 2 -COMPOSIÇÃO GERAL DE SPIRULINA MAXIMA.....	21
Tabela 3 - COMPOSIÇÃO APROXIMADA E PERFIL DE MINERAIS DA BIOMASSA SECA DE SPIRULINA MAXIMA (BASEADA EM PESO SECO) .....	23
Tabela 4 - - RESULTADOS DA BUSCA PRÉVIA DE ARTIGOS. ....	56
Tabela 5 - RESULTADOS DETALHADOS DA BUSCA DE ARTIGOS. ....	56
Tabela 6 - RESUMO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE SPIRULINA MAXIMA NAS DIFERENTES ETAPAS DE PROPAGAÇÃO.....	58
Tabela 7 - CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS CONSTITUINTES DO MEIO DE CULTURA AO .....	59
Tabela 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE S. MAXIMA.....	62
Tabela 10 – ENZIMAS COMERCIAIS DE REFERÊNCIA POR CLASSE ENZIMÁTICA.....	63
Tabela 8 - CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS CONSTITUINTES DO MEIO DE CULTURA DE BRECCIA.....	68
Tabela 11 – AVALIAÇÃO DA BIOMASSA SECA DA MICROALGA SPIRULINA MAXIMA EM TERMOS DE PROTEÍNA TOTAL.....	81
Tabela 13 – RESUMO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS .....	88
Tabela 14 – PROPOSTA INICIAL DE MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS .....	89
Tabela 12 – RESUMO DE REFERÊNCIAS PARA ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DE FUNGOS FILAMENTOSOS E FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO UTILIZADAS.....	91

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – CLASSIFICAÇÃO DE PROTEASES DE ACORDO COM A REAÇÃO CATALISADA E RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NO SÍTIO ATIVO..	28
Quadro 2 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DE ENDOPEPTIDASES.....	29
Quadro 3 - PRINCIPAIS PROTEASES UTILIZADAS COMERCIALMENTE E SEUS SETORES DE APLICAÇÃO.....	31
Quadro 4 - RESUMO DE METODOLOGIAS DE PROSPECÇÃO .....	42

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	13
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO .....	13
1.2	JUSTIFICATIVAS .....	14
1.3	ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO .....	16
1.4	OBJETIVOS .....	18
1.4.1	Objetivos específicos .....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1	Microalgas e o gênero <i>Spirulina</i> .....	18
2.1.1	Estrutura .....	18
2.1.2	Aplicação industrial .....	23
2.2	Proteases .....	27
2.2.1	Classificação .....	27
2.2.2	Aplicações industriais e aspectos mercadológicos .....	30
3	TÉCNICAS PROSPECTIVAS UTILIZADAS .....	38
3.1	Prospecção Tecnológica .....	38
3.1.1	Vantagens e Objetivos .....	38
3.1.2	Diversidade metodológica .....	40
3.1.3	O uso de patentes e artigos científicos como ferramentas de prospecção tecnológica .....	46
3.2	Prospecção Filogenética .....	47
4	METODOLOGIA .....	51
4.1	Mapeamento Tecnológico .....	51
4.1.1	Estratégia de busca .....	53
4.1.2	Artigos científicos .....	55
4.2	Cultivo e análises com microalga <i>Spirulina maxima</i> .....	57
4.3	Prospecção filogenética .....	61
4.3.1	Obtenção de sequências .....	61
4.3.2	Formulação da Supermatriz .....	64
4.3.3	Alinhamento de sequências .....	64
4.3.4	Confecção das árvores filogenéticas .....	65
4.4	Mapeamento dos meios de cultivo .....	66

4.5	Cultivo e análises com fungos filamentosos.....	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
5.1	Mapeamento tecnológico .....	69
5.1.1	Análise nível macro dos artigos .....	69
5.1.2	Análise nível meso dos artigos .....	73
5.1.3	Análise nível micro dos artigos .....	74
5.2	Conteúdo proteico da microalga <i>Spirulina maxima</i> cultivada.....	80
5.3	Análise das árvores filogenéticas .....	83
5.3.1	Mapeamento de meios de cultivo .....	87
5.4	Atividade proteolítica dos cultivos de fungos filamentosos.....	89
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	92
7	CONCLUSÕES .....	93
8	ETAPAS FUTURAS .....	94
9	REFERÊNCIAS.....	94

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O uso de microalgas na produção de suplementos alimentares vem tornando-se um tópico de grande popularidade e discussão em todo o mundo, já que, como evidenciado na literatura, a biomassa oriunda de microalgas apresenta efeitos biológicos promissores e elevado valor nutricional, como demonstrado em estudos *in vitro*, *in vivo* e até mesmo em humanos (JAŚKIEWICZ & RZYMSKI, 2017).

Extratos e pós de algas usados na suplementação vêm sendo chamados de produtos nutracêuticos ou alimentos funcionais por serem ricos em diversos macro e micronutrientes necessários à dieta humana, como proteínas, ácidos graxos, minerais, vitaminas, pigmentos e enzimas (CHRISTAKI *et al.*, 2011; GELLENBECK, 2012; BUONO *et al.*, 2014; WELLS *et al.*, 2016). Sendo assim, podem ser consideradas boas alternativas ao uso de suplementos animais e vegetais disponíveis no mercado, tendo um apelo maior ao público vegetariano e/ou vegano (JAŚKIEWICZ & RZYMSKI, 2017).

Outro grande benefício para criação de produtos derivados de microalgas é a facilidade de produção, visto que os gêneros comercializados são produzidos autotroficamente. Dentre as milhares de espécies de microalgas existentes, as principais comercializadas são dos gêneros *Spirulina* (*S. maxima* e *S. platensis*), *Chlorella* (*C. vulgaris* e *C. pyrenoidosa*), além de *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* (GELLENBECK, 2012). No Brasil foram realizados estudos sobre a viabilidade da produção de *Spirulina* em escala piloto para fins alimentícios. A produção da biomassa avaliada durante um ano e mostrou-se em conformidade com as normas e especificações internacionais (MORAIS *et al.*, 2009).

Como um dos objetos de estudo do presente trabalho, a microalga *S. maxima* vem sendo também alvo de vários estudos na área da nutrição e da saúde, devido à composição nutricional rica e seu potencial de auxiliar no tratamento de problemas diversos como diabetes (LEE *et al.*, 2017). Além disso, nos últimos anos, uma série de estudos clínicos vem demonstrando a capacidade da biomassa do gênero *Spirulina* de produzir efeitos antibacterianos, antioxidantes, imunomodulatórios e até mesmo antitumorais (RAMAMOORTHY & PREMAKUMARI, 1996; YAMANI *et al.*,

2009; ANWER *et al.*, 2012, 2013; KWAK *et al.*, 2012; TORRES-DURÁN *et al.*, 2012; PANAHI *et al.*, 2013; MAZOKOPAKIS *et al.*, 2014; RYU *et al.*, 2014).

Dando especial atenção a composição proteica da biomassa de *S. maxima*, que pode chegar até 80% (p/p) (DA SILVA *et al.*, 2021), é possível pensar em algumas maneiras para o aproveitamento dessas proteínas como recurso nutricional. O meio mais comum versa sobre a comercialização em tabletes ou comprimidos contendo a biomassa seca, sendo também possível sua incorporação em sopas, molhos, massas, *snack foods* e bebidas (HABIB *et al.*, 2008).

## 1.2 JUSTIFICATIVAS

As rápidas mudanças que têm ocorrido no cenário alimentício mundial trazem consigo a necessidade de introdução de novos produtos e inovações no mercado. As microalgas representam uma fonte sustentável de mercadorias, incluindo alimentos, fertilizantes, biomoléculas e até fármacos (HOSSAIN *et al.*, 2015). Concernente com essa realidade, a *Spirulina* é comercialmente produzida como alimento funcional que não mostra toxicidade humana aguda ou crônica, além de ser altamente digerível por humanos e animais sem requerer quebra celular (GUTIÉRREZ-SALMEÁN *et al.*, 2015).

Em conjunto com as novas demandas de mercado, existem também necessidades humanitárias que se aliam à narrativa deste trabalho. Com o passar dos anos, especialmente na década passada, houve um rápido crescimento da população mundial assim como do desenvolvimento industrial e tecnológico de áreas como agricultura, saúde e transporte. Porém, a crescente necessidade por alimentos, materiais e energia não foi acompanhada por um raciocínio voltado à sustentabilidade, já que grande parte dos suprimentos utilizados pelo homem ainda se originam de recursos não renováveis (GIRALDO-CALDERON *et al.*, 2018).

As microalgas do gênero *Spirulina* apresentam diversos benefícios nutricionais além de seu alto conteúdo proteico, abrangendo vitaminas, minerais e ácidos graxos. Sua produtividade anual em lagos pista pode alcançar cerca de 70 toneladas por ano e, em combinação com soluções sustentáveis nas diversas áreas concernentes ao bem-estar e qualidade da vida humana, o uso de microalgas se apresenta como um possível recurso a ser usado na resolução de problemas

humanitários como a fome, a desigualdade nutricional e a miséria (RICHMOND *et al.*, 1990; GIRALDO-CALDERON *et al.*, 2018).

A Tabela 1, a seguir, demonstra um comparativo nutricional entre alimentos consumidos diariamente e microalgas.

Tabela 1 - COMPARATIVO DOS CONTEÚDOS NUTRICIONAIS DE ALIMENTOS DE CONSUMO DIÁRIO E MICROALGAS

<b>Alimento de consumo diário vs microalgas</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Carboidratos (%)</b>	<b>Lipídeos (%)</b>
Carne bovina	43 - 74	1	12 - 34
Leite	22 - 26	35 - 38	28
Arroz	8	77 - 80	0,6 - 2
Soja	37	39	20
<i>Spirulina platensis</i>	63	15	11
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57 - 61	26	2 - 22
<i>Anabaena cylindrical</i>	43 - 56	25 - 30	4 - 7
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6 - 9
<i>Isochrysis galbana</i>	29 - 35	11 - 19	4 - 34

Fonte: Traduzido de GIRALDO-CALDERON *et al.*, 2018

Conforme citado, a biomassa de *S. maxima* já possui propriedades que permitem o aproveitamento de seus benefícios nutricionais sem necessidade de processamento. Porém, o preparo de suplementos com utilização de hidrólises enzimáticas apresenta-se como uma alternativa com benefícios mais atraentes, principalmente tratando-se de um substrato majoritariamente proteico. Os hidrolisados proteicos vêm sendo reportados como uma fonte adequada de proteínas para dieta humana já que são absorvidos de maneira mais eficaz pelo trato gastrointestinal quando comparados com a proteína intacta ou com os aminoácidos livres, além de reduzir a concentração de possíveis compostos alergênicos (MORRIS *et al.*, 2007; SCHMIDT & SALAS-MELADO, 2009; MORRIS *et al.*, 2011; TAVANO, 2013). Hidrólises enzimáticas de polímeros alimentícios são importantes processos utilizados para melhorar características físicas, químicas e



funcionais desses alimentos sem danificar seu valor nutricional (GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994).

No caso de substratos proteicos, as enzimas capazes de hidrolisá-los são chamadas de proteases e fazem parte do amplo grupo das hidrolases, sendo presentes em toda a natureza e tendo um papel de extrema importância em suas aplicações tanto fisiológicas quanto comerciais (RANI, 2012).

A biomassa de *S. maxima* e de outras microalgas é bastante reportada em estudos com foco na obtenção de hidrolisados proteicos (MORRIS et al., 2011; LISBOA et al., 2014; PEREIRA et al., 2019). Porém, sempre com utilização de proteases comerciais, produtos de alto valor agregado, atingindo valores de R\$ 3196,00 por 500 mg de protease (SIGMA, 2020)

Com o intuito de avaliar a integração entre os processos de produção de biomassa algal e produção enzimática para formulação de produtos alimentícios, a estratégia adotada para conceber o trabalho envolve inovação, mediante adoção de ferramentas de prospecção e estudo de filogenia.

Visando reconhecer o estado da arte para as aplicações de biomassa algal em produtos alimentícios, mais especificamente em bebidas, o presente trabalho faz um mapeamento tecnológico da *Spirulina maxima* focada no seu uso em produtos alimentícios líquidos. Para tanto, uma pesquisa de artigos científicos encontrados desde 2009 até 2020 dentro da base de dados SCOPUS. A base SCOPUS da editora Elsevier é usada como a maior fonte referencial de literatura técnica e científica revisada por pares, permitindo uma visão ampla de tudo que está sendo publicado cientificamente sobre um tema. Mediante o uso dos mecanismos de busca, podem ser encontradas as informações publicadas por uma determinada instituição ou um determinado autor.

### 1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Para uma melhor sistematização do presente trabalho, a organização foi feita em nove capítulos. São eles:

1. **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA** – Traz uma breve apresentação sobre o tema, bem como os objetivos, justificativa e a organização do trabalho.

2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** – Apresenta uma visão ampla sobre o tema, abordando a fundamentação teórica acerca da *Spirulina maxima* e de suas tecnologias de produção, além da obtenção de biomassa e bioprodutos. Adicionalmente, versa sobre as enzimas responsáveis pela degradação de proteínas, as proteases. São descritas suas fontes produtoras e tecnologias de produção, assim como seus usos em indústrias e mercados específicos.
3. **TÉCNICAS PROSPECTIVAS UTILIZADAS** – apresenta a fundamentação teórica dos conceitos relacionados às técnicas de prospecção utilizadas. Mais especificamente, prospecção tecnológica e prospecção filogenética.
4. **METODOLOGIA DE PESQUISA** – No capítulo são apresentadas as estratégias utilizadas para a pesquisa na base SCOPUS, e o método de seleção dos artigos, as técnicas utilizadas para a produção da biomassa de *S. maxima*, além dos artifícios computacionais colocados em uso na etapa de prospecção filogenética de proteases.
5. **RESULTADOS E DISCUSSÕES** – Este capítulo apresenta os resultados e as discussões das três etapas descritas no capítulo anterior. Prospecções tecnológica e filogenética, assim como produção de biomassa de microalgas.
6. **CONSIDERAÇÕES FINAIS** – Versa sobre as principais conclusões do trabalho em relação às etapas de prospecção tecnológica e filogenética, assim como os benefícios trazidos pelas técnicas citadas.
7. **CONCLUSÕES** – Apresenta um desfecho para o trabalho e propostas de melhorias para trabalhos futuros.
8. **ETAPAS FUTURAS** – O tópico busca direcionar as próximas etapas a serem seguidas, na linha de pensamento do trabalho, para que o objetivo final de formulação e criação de uma bebida com utilização de biomassa algal seja atingido.

9. **REFERÊNCIAS** – Discrimina as referências utilizadas no presente trabalho.

#### 1.4 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral empregar ferramentas de mapeamento tecnológico e de prospecção filogenética para subsidiar ao cultivo de *Spirulina maxima* e de produção de proteases fúngicas em escala de laboratório, visando a produção de hidrolisados proteicos.

##### 1.4.1 Objetivos específicos

- Avaliar o estado da arte no campo de “Aplicações da biomassa de *Spirulina maxima* em bebidas”, com base no Mapeamento Tecnológico de artigos científicos.
- Produzir biomassa de *Spirulina maxima*, avaliando-a quanto ao seu conteúdo proteico.
- Selecionar cepas de fungos filamentosos relatadas na literatura como produtoras de proteases e avaliá-las quanto às suas capacidades de produção dessas enzimas.
- Prospecutar dentre as cepas de fungos selecionadas as que produzem proteases mais semelhantes, com base na análise filogenética, àquelas descritas na literatura com uso na produção de hidrolisados proteicos da biomassa de *Spirulina maxima*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

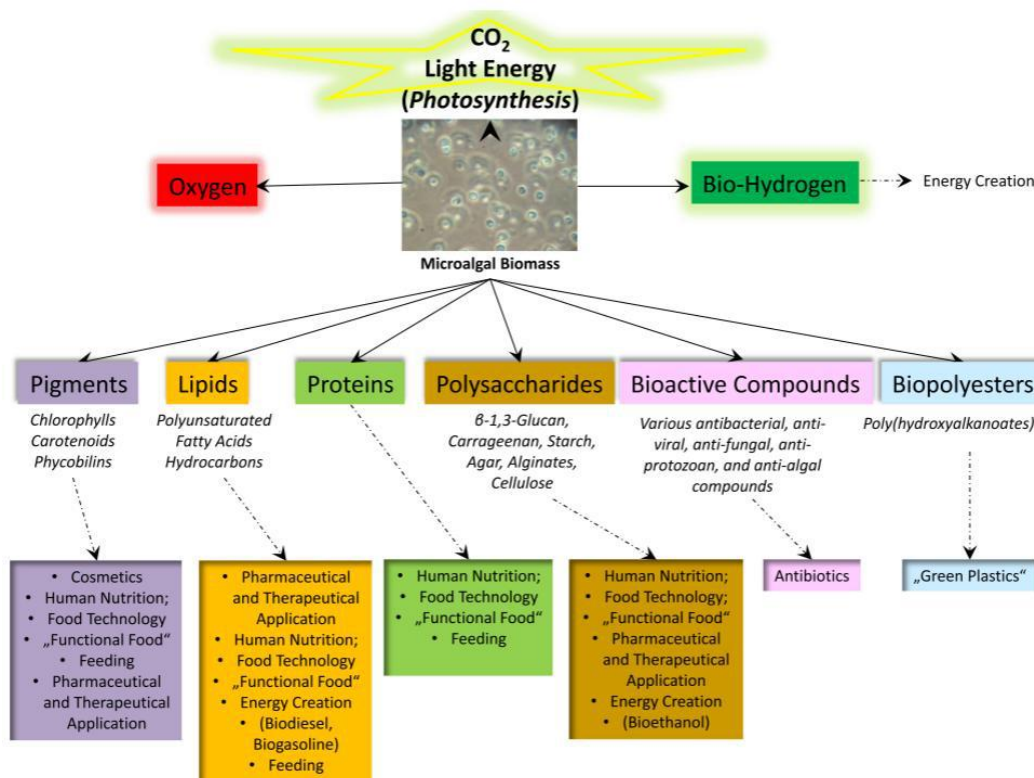
### 2.1 MICROALGAS E O GÊNERO *SPIRULINA*

#### 2.1.1 Estrutura

As microalgas são organismos unicelulares microscópicos que possuem a capacidade de converter energia solar em energia química via fotossíntese. Mais de 30.000 espécies já foram catalogadas e classificadas com menos de 100 delas estudadas até o momento e dessas, apenas um número aproximado de apenas 20 espécies são exploradas comercialmente. Sendo responsáveis pela maioria da captura de energia solar e do oxigênio produzido no planeta, as microalgas são a base da cadeia alimentar de sistemas aquáticos e um pilar fundamental para a sustentabilidade da Terra, reduzindo o aquecimento global de forma considerável (FERNANDEZ *et al.*, 2017).

O uso das microalgas pode promover um grande aumento na sustentabilidade das atividades industriais existentes, já que possuem uma grande flexibilidade nas funções em que podem ser empregadas, com usos tão amplos quanto cosméticos, fármacos, aditivos alimentares, tratamento de águas residuais e na produção de biocombustíveis. A figura 1 a seguir correlaciona os produtos provenientes de microalgas a suas respectivas áreas de atuação industrial (KOLLER *et al.*, 2014).

Figura 1 - RESUMO DAS VIAS DE OBTENÇÃO DE PRODUTOS ORIUNDOS DE MICROALGAS E SUAS RESPECTIVAS ÁREAS DE APLICAÇÃO.



Fonte: KOLLER *et al.*, 2014.

Diversos compostos bioativos podem ser extraídos de microalgas como, por exemplo, proteínas, lipídeos, carboidratos, carotenóides e vitaminas (PRIYADARSHANI & RATH, 2012). Sendo assim, o setor da nutrição é o que possui o maior potencial biotecnológico, tendo seus produtos ricos em  $\beta$ -caroteno, astaxantina, ácido docosaheptaenóico, ácido eicosaheptaenóico e pigmentos de ficobilina (VIAGANI *et al.*, 2015; PULZ & GROSS, 2004).

Além de poderem ser utilizadas em tecnologias de captura e reuso de dióxido de carbono, as microalgas vêm se tornando uma fonte sustentável de mercadorias, podendo ser utilizadas como alimentos e até possíveis fertilizantes, fármacos e biocombustíveis (HOSSAIN *et al.*, 2015). Da mesma forma, as algas verde-azuladas ou cianobactérias são ricas em antioxidantes e ficobiliproteínas (NICOLETTI, 2016). As algas do gênero *Spirulina*, o mais utilizado das cianobactérias, são uma excelente fonte de macro e micronutrientes benéficos à saúde (HOSEINI *et al.*,

2013). Em conjunto com essa realidade, as microalgas do gênero *Spirulina* não mostram toxicidade humana aguda ou crônica e vem sendo comercialmente produzida como alimento funcional, além de ser altamente digerível por humanos e animais sem requerer quebra celular (GUTIÉRREZ-SALMEÁN *et al.*, 2015).

A composição bioquímica das microalgas do gênero *Spirulina* e sua produção dependem de diversos fatores, como temperatura, intensidade luminosa, pH, agitação, método de cultura e componentes nutricionais, podendo variar com a cepa também (COLLA *et al.*, 2004; TOYOSHIMA *et al.*, 2015). Contudo, os fatores fundamentais para uma elevada produtividade são temperatura e luminosidade (TRABELSI *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2008). Por essa razão, muitos produtores têm utilizado estufas ou biorreatores para o cultivo dessas espécies (GUAN *et al.*, 2017).

As Tabelas 2 e 3, apresentadas a seguir, resumem os estudos de LEE *et al.* (2017) e Da Silva *et al.* (2021) mostrando a composição bioquímica da biomassa seca de *Spirulina maxima*. Além da grande quantidade de proteínas, é possível notar um bom perfil de vitaminas e minerais em sua composição (CAMPANELLA *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 2005). Observa-se que a *Spirulina maxima* contém todos os aminoácidos essenciais, onde de 85% a 95% são digestíveis tornando-a facilmente absorvível pelo corpo humano (CIFFERI, 1983; HABIB & PARVIN, 2008).

Tabela 2 -COMPOSIÇÃO GERAL DE SPIRULINA MAXIMA

Composição Geral	(%)	Aminoácido	(g/kg)
Umidade	3,2	Alanina	50,1
Proteínas	63,1	Arginina	30,9
Lipídeos	7,2	Ácido aspártico	59,4
Carboidratos	22,1	Cistina	1,74
Minerais (cinzas)	4,4	Ácido glutâmico	93,4
Fibras	13,2	Glicina	28,3
		Histidina	8,91
<b>Vitaminas</b>	<b>(mg/kg)</b>	Isoleucina	23,2
β-caroteno	1119	Leucina	46,7
Vitamina E	40	Lisina	24,0

Tiamina B-1	10	Metionina	10,1
Riboflavina B-2	10	Fenilalanina	23,2
Niacina B-3	144	Prolina	19,9
Vitamina K-1	78	Serina	32,2
		Treonina	28,3
<b>Ácidos graxos essenciais</b>	<b>(g/kg)</b>	Triptofano	5,9
Ácido linoleico	13	Tirosina	17,0
Ácido linoleico-γ	7,7	Valina	26,1

Fonte: (LEE *et al.*, 2017)

Tabela 3 - COMPOSIÇÃO APROXIMADA E PERFIL DE MINERAIS DA BIOMASSA SECA DE SPIRULINA MAXIMA (BASEADA EM PESO SECO)

<b>Componente</b>	<b>Conteúdo</b>
Proteínas (g/ 100 g)	80,00 ± 1,49 <sup>a</sup>
Cinzas (g/ 100 g)	11,67 ± 0,72
Lipídeos (g/ 100 g)	7,63 ± 1,87
Carboidratos (g/ 100 g)	0,69
Valor energético (kcal/ 100 g)	391,49
<b>Minerais (mg/ 100g)</b>	
Sódio	1762,1 ± 73,5
Potássio	2379,4 ± 93,5
Cálcio	51,9 ± 3,2
Magnésio	284,1 ± 23,5
Zinco	Não detectado
Cobre	Não detectado
Ferro	49,8 ± 1,6
Manganês	1,3 ± 0,04
Fósforo	1000,0 ± 102,6

Fonte: Traduzido de Da Silva *et al.* (2021).

<sup>a</sup> Valores médios seguidos de seus desvios padrões

### 2.1.2 Aplicação industrial

A biomassa de *Spirulina maxima* é usualmente reconhecida como segura (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e não tóxica, por essa razão é liberada para o uso como suplemento alimentar. Por isso, essa alga azul-esverdeada pode ser comercializada em forma de suplemento para humanos e animais ou como aditivos em cereais normais como o arroz, o trigo e o milho, já que esses cereais têm quantidade limitada de aminoácidos (ANDRADE & COSTA, 2008).



A produção chinesa de *Spirulina* é responsável por dois terços de toda a biomassa global, sendo a maior do mundo industrialmente. Desse montante, 90% são destinados ao consumo humano e o restante é destinado à alimentação da aquicultura marinha (CHEN *et al.*, 2016).

Com o intuito de unir a indústria e a pesquisa no avanço tecnológico industrial de microalgas, foi criada a *Chinese Microalgae Industry Alliance* (CMIA) (CHEN *et al.*, 2016). Em 2008, a *Spirulina* era vendida como biomassa seca de valor aproximado em US\$15–50 kg<sup>-1</sup>, dependendo da variedade mercadológica e de produção (GELLENBECK, 2012).

No norte da China está localizado um dos maiores centros comerciais de produção de microalgas do gênero *Spirulina*, tendo sua produção média ao ano de 3.000 toneladas de biomassa em pó. A microalga é cultivada em meio alcalino, normalmente 16 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato, o que minimiza contaminações por outras algas e bactérias. As Figuras 2 e 3 ilustram o cultivo de *Spirulina maxima* em “lagospista” sob estufas de plástico (CHEN *et al.*, 2016).

Figura 2 - VISTA DO SISTEMA DE LAGOS DE PRODUÇÃO DE MICROALGAS DO GÊNERO SPIRULINA NA PROVÍNCIA DE HAINAN.



Fonte: CHEN *et al.*, 2016.

Figura 3 - SISTEMA DE LAGOS PARA A PRODUÇÃO DE MICROALGAS DO GÊNERO SPIRULINA NA MONGÓLIA INTERIOR.

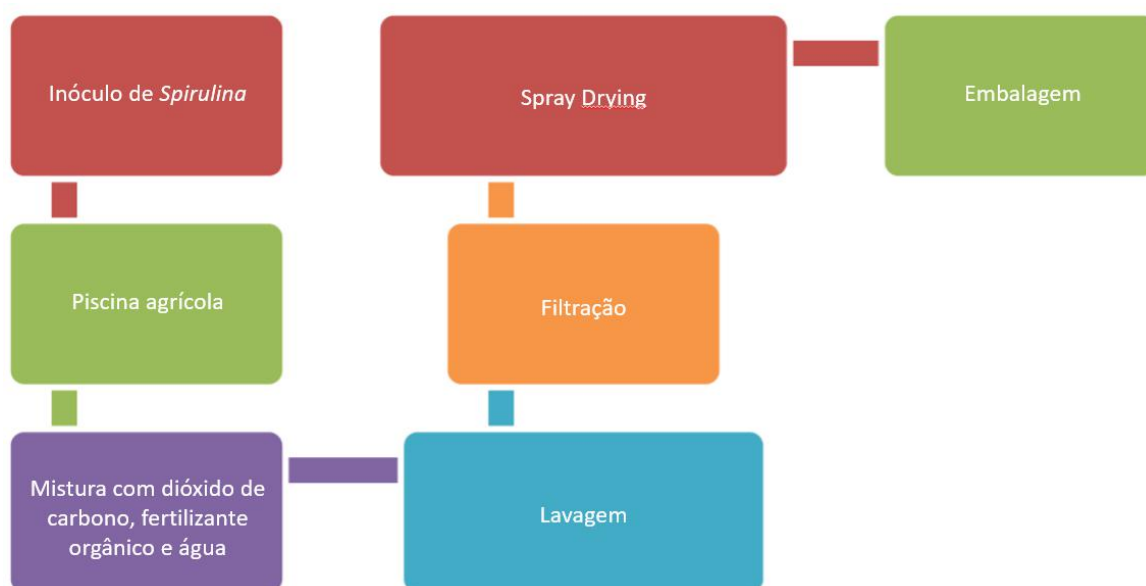


Fonte: CHEN *et al.*, 2016.

Após o cultivo, é feita a colheita, o processamento e a embalagem do produto. Esses estágios finais da produção podem ser resumidos nas seguintes etapas ilustradas na figura 4 (HABIB & PARVIN, 2008):

1. Filtração e limpeza: um filtro de *nylon* na entrada do lago de água é necessário;
2. Pré-concentração: lavagem de biomassa para reduzir a presença de sais;
3. Concentração: remove águas intersticiais localizadas entre os filamentos;
4. Neutralização: neutraliza a biomassa com a adição de solução ácida;
5. Desintegração: usa um moedor para quebrar os tricomas;
6. Desidratação com *spray* para secagem: essa operação tem importância econômica pois envolve de 20% a 30% de todo o custo de produção;
7. Embalagem: costuma usar sacos plásticos selados para evitar ação higroscópica na biomassa seca;
8. Estocagem: feita em local seco, fresco, apagado, higiênico e sem pestes para prevenir deterioração dos pigmentos presentes na biomassa (AYALA, 1998).

Figura 4 – DIAGRAMA DE BLOCOS BASAL PARA A PRODUÇÃO DE MICROALGAS DO GÊNERO SPIRULINA.



Fonte: ISLAM *et al.*, 2015.

O processo produtivo é terminado com o controle de qualidade onde são avaliados crescimentos microbianos, testes de composição química, testes para metais pesados, pesticidas e detectores de materiais estranhos como fragmentos de insetos, pelos de ratos e outros fragmentos (BELAY *et al.*, 1993).

Produtos contendo microalgas do gênero *Spirulina* podem ser encontrados em lojas de produtos naturais e de ração de peixes (PRIYADARSHANI & RATH, 2012). Os mais comumente encontrados são as cápsulas de *Spirulina maxima*, que têm promovido efeito aumento de imunidade e de redução do nível lipídico do sangue. Os suplementos de *Spirulina maxima* são opções de comida saudável para crianças, adolescentes e adultos (BECKER, 1988; BOROWITZKA, 1988; RICHMOND, 1988; RUAN *et al.*, 1988, 1990).

O setor de bebidas baseadas na suplementação com microalgas do gênero *Spirulina* ainda é restrito, sendo concentrado na produção caseira de “smoothies” a partir da biomassa seca. O principal motivo da escassez nessa área são as alterações não desejadas em características sensoriais dos produtos formulados (PATEL *et al.*, 2019).

Uma alternativa que vêm sendo estudada é a incorporação da biomassa algal em bebidas fermentadas ou probióticas, como iogurtes e leite acidófilo, na tentativa

de mascarar características organolépticas indesejadas e até aumentar a viabilidade dos produtos fermentados, baseado na contagem de microrganismos fermentadores (GULDAS & IRKIN, 2010).

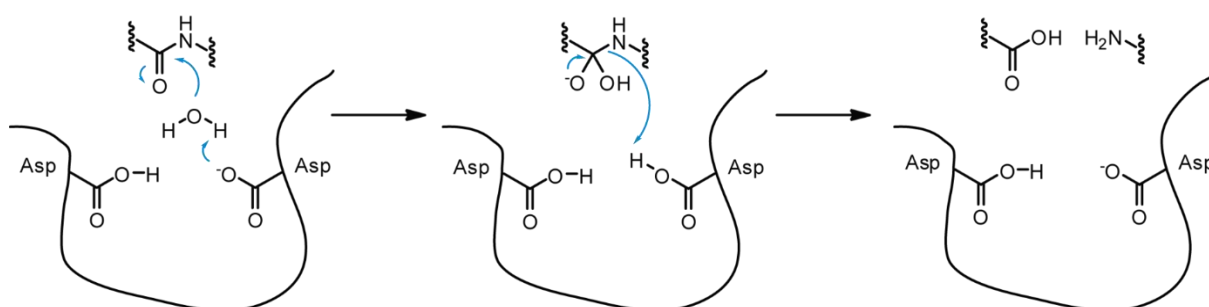
Um iogurte contendo biomassa de *Spirulina* pode oferecer uma combinação única de benefícios probióticos, um grande conteúdo proteico e de carotenóides que pode melhorar em vários aspectos a qualidade nutricional do consumidor, fato comprovado por diversos estudos que avaliaram a viabilidade e o crescimento de bactérias probióticas em produtos fermentados e iogurtes (DE CAIRE *et al.* 2000; VARGA *et al.* 2002; BEHESHTIPOUR *et al.* 2012).

## 2.2 PROTEASES

### 2.2.1 Classificação

As proteases, também conhecidas como peptidases, proteinases ou peptídeo hidrolases, são enzimas hidrolíticas responsáveis por catalisar uma reação de hidrólise das ligações peptídicas de proteínas, gerando peptídeos menores e aminoácidos livres (RAO *et al.*, 1998), como representado na Figura 5.

Figura 5 – MECANISMO SIMPLIFICADO DA AÇÃO DE UMA PROTEASE ASPÁRTICA.



Fonte: Mahajan (2010)

As proteases podem ser divididas de acordo com o seu pH de atuação, sendo ácidas (pH 2,0 – 6,0), neutras (pH 6,0 – 8,0) e alcalinas (pH 8,0 – 13,0) (RAO *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.* 2008). Podem também ser classificadas como endopeptidases ou exopeptidases, dependendo do local onde agem em determinada proteína. As endopeptidases preferencialmente atuam em regiões internas da cadeia peptídica, afastadas dos terminais amino (N) e carboxílicos (C),

enquanto as exopeptidases restringem sua atuação as regiões desses terminais N e C, geralmente liberando um único aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo. Além disso, essas duas classes de enzimas ainda são divididas em subfamílias, dependendo da composição química de seus sítios ativos. As exopeptidases são divididas em carboxipeptidase, caso atuem no terminal carboxílico, ou aminopeptidase, caso catalisem a hidrólise dos terminais amino da cadeia polipeptídica. O primeiro grupo ainda pode ser subdividido em serinoproteases, metaloproteases, cisteínoproteases, peptidil dipeptidases e dipeptidases, dependendo de quais resíduos de aminoácidos presentes em seus sítios ativos atuam na reação. Já as aminopeptidases se subdividem em dipeptidil peptidases e tripeptidil peptidases (RAO *et al.* 1998; SINGH *et al.*, 2001; GUPTA, BEG & LORENZ, 2002; VERMELHO *et al.*, 2008). Existe uma classificação a mais que diz respeito a proteases que liberam resíduos de aminoácidos substituídos, intituladas omegapeptidases. O Quadro 1, exibido a seguir ilustra melhor as classificações anteriores.

Quadro 1 – CLASSIFICAÇÃO DE PROTEASES DE ACORDO COM A REAÇÃO CATALISADA E RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NO SÍTIO ATIVO

Proteases		Número EC	
Exopeptidases	Aminopeptidases	Aminopeptidases	3.4.11
		Dipeptidil peptidases	3.4.14
		Tripeptidil peptidases	3.4.14
	Carboxipeptidases	Serina	3.4.16
		Metalo	3.4.17
		Cisteína	3.4.18
		Peptidil dipeptidase	3.4.15
		Dipeptidase	3.4.13
	Omegapeptidases		3.4.19
	Endopeptidases	Serina	3.4.21
Cisteína		3.4.22	
Aspártico		3.4.23	
Metalo		3.4.24	

As endopeptidases também podem ser classificadas de acordo com o resíduo de aminoácido reativo em seu sítio ativo envolvido com a catálise. As serinapeptidases possuem um resíduo de serina em seu sítio ativo, enquanto as asparticoproteinases têm duas unidades de ácido aspártico em seu centro catalítico. As cisteínaproteases apresentam um aminoácido cisteína e as metaloproteases dependem da presença de um íon metálico (RAO *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.*, 2008). O Quadro 2, resume algumas informações gerais sobre endopeptidases, como peso molecular, intervalos de pH ótimos para atuação e fontes de obtenção.

Quadro 2 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DE ENDOPEPTIDASES.

<b>Tipo de protease</b>	<b>Aspártico</b>	<b>Cisteína</b>	<b>Metalo</b>	<b>Serina</b>
<b>Massa molecular (kDa)</b>	30-45	34-35	19-37	18-35
<b>pH ótimo</b>	3-5	2-7	5-7	6-11
<b>Temperatura ótima (°C)</b>	40-55	40-45	65-85	50-70
<b>Resíduo ou sítio ativo</b>	Ácido aspártico	Aspartato ou cisteína	Fenilalanina ou leucina	Serina, histidina e aspartato
<b>Principais inibidores</b>	Pepstatina	Iodoacetamida, <i>p</i> -CMB	Agentes quelantes, como EDTA	Fenilmetilsulfonil fluoreto, EDTA, inibidor de tripsina, tampão fosfato, fenóis, ácido acético triamino
<b>Principais fontes</b>	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , Tecido animal (estômago)	<i>Aspergillus</i> , casca de abacaxi, papáia, <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , Tecido animal (intestino), <i>Tritirachium album</i>

### 2.2.2 Aplicações industriais e aspectos mercadológicos

As proteases se encontram em um dos mais importantes grupos de enzimas industriais com grande número de aplicações comerciais. As enzimas proteolíticas encontram extensa aplicação nos setores alimentício, de detergentes, couro, produtos farmacêuticos, seda, tratamento de resíduos e efluentes, além de um importante papel na pesquisa e desenvolvimento, sendo utilizadas em protocolos de elucidação da sequência e estrutura de proteínas e na síntese de outras (RAO *et al.*, 1998; JONHVESLY & NAIK, 2001; GUPTA *et al.*, 2002; ABIDI *et al.*, 2011; SAVITHA *et al.*, 2011).

Enzimas de origem fúngica são frequentemente exploradas na indústria, devido a algumas razões técnicas, dentre elas, a possibilidade de obtenção dessas moléculas em alta concentração no meio de cultivo, pois os fungos secretam as enzimas para o meio, facilitando as etapas de *downstream* do processamento (HAJJI *et al.*, 2010).

Na década de 90, o valor aproximado de vendas mundiais de enzimas industriais era de US\$ 1 bilhão (GODFREY, 1996). Nos anos 2000, o mesmo mercado teve faturamento de US\$ 3,7 bilhões (MONTEIRO & SILVA, 2009). Em 2014, foi estimado em US\$ 4,2 bilhões e em 2020, o mercado foi avaliado em US\$ 10,6 bilhões. Acredita-se que até 2027 o valor total chegará a US\$ 14,9 bilhões (INDUSTRIAL ENZYME MARKET, 2016; GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Em 2019, somente uma das empresas do setor de enzimas industriais teve uma receita equivalente a US\$ 2,1 bilhões (NOVOZYMES, 2019). O uso de uma única enzima terapêutica tem seu custo em torno de US\$ 5 mil/grama, sendo esse mercado enzimático tido hoje como o mais promissor para as indústrias farmacêuticas (SAID & PIETRO, 2003).

Cerca de 75% das enzimas mundialmente comercializadas são produzidas por apenas três grandes empresas localizadas na Dinamarca, Estados Unidos da América e Suíça. São elas: Novozymes, DuPont e Roche, respectivamente (LI *et al.*, 2012). Aproximadamente 200 enzimas de origem microbiana são comercializadas, sendo que em torno de 20 são produzidas em escala industrial. Sendo um mercado restrito, esse setor gira em torno de 12 grandes produtores e 400 pequenos fornecedores e é altamente competitivo, tecnologicamente intensivo e com pequenas margens de lucro, além de ser bastante concentrado. Resumindo algumas

das principais aplicações de proteases na indústria mundial, o Quadro 3 traz informações de proteases comerciais e suas áreas de aplicação, de acordo com o fabricante.

Quadro 3 - PRINCIPAIS PROTEASES UTILIZADAS COMERCIALMENTE E SEUS SETORES DE APLICAÇÃO.

<b>Enzima</b>	<b>Origem</b>	<b>Produtor</b>	<b>Indústria alvo</b>	<b>Uso Indicado pelo fabricante</b>
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozymes	Alimentícia	Hidrólise enzimática e funcionalização de proteínas vegetais
Flavourzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	Novozymes	Alimentícia	Produção de hidrolisados de peixe e carne, assim como gelatina, colágeno e ração animal
Bromelain	Caule de abacaxi	Sigma Aldrich	Alimentícia	Amaciamento de alimentos proteicos
Collupulin	<i>Carica papaya</i>	DSM	Alimentícia	Redução de opacidade em cervejas
Protamex	<i>Bacillus sp.</i>	Novozymes	Alimentícia	Hidrólise agressiva de proteínas animais para isolamento de peptídeos
Queratinase K4519	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sigma Aldrich	Cosmética / Farmacêutica	Degradação de colágeno e queratina para aplicação em cremes
Savinase	<i>Bacillus sp.</i>	Novozymes	Detergentes / Limpeza	Extração de gluxosaminoglicanas
Opticlean	<i>Bacillus alcalophilus</i>	Solvay	Detergentes / Limpeza	Formulação de detergentes líquidos
Durazym	<i>Bacillus subtilis</i>	Novozymes	Detergentes / Limpeza	Formulação de produtos de limpeza que contenham alvejantes
NovoBate	<i>Bacillus clausii</i>	Novozymes	Couro	Controle de remoção de pelos e imperfeições em couro



Fonte: (NOVOZYMES, 2021; SIGMA, 2021; DSM, 2021; SOLVAY, 2021)

### **2.2.2.1 Indústria farmacêutica e cosmética**

Em indústrias dos seguimentos biomédico, farmacêutico e cosmético, as proteases podem ser amplamente utilizadas. As queratinases, responsáveis pela hidrólise de proteínas fibrosas e insolúveis, podem ser utilizadas na remoção de queratina para tratamento de acne ou psoríase, na retirada de calos e degradação da pele queratinizada, em depilação, preparação de vacinas para terapias de dermatofitose e no tratamento de micoses causadas por fungos dermatófilos. Adicionalmente, queratinases agem na remoção de cicatrizes e regeneração de epitélios, acelerando os processos de cura e sendo utilizadas na medicina de trauma (VIGNARDET *et al.*, 2001; CHAO *et al.*, 2007; BRANDELLI *et al.*, 2010).

Na indústria cosmética, as enzimas, de um modo geral, são componentes de grande importância. A aplicação das proteases abrange a quebra de ligações peptídicas no colágeno e queratina da pele, assim como a realização de processos de *peeling* e alisamento, com atuação de enzimas como papaína e bromelina (SIM *et al.*, 2000). Proteases que apresentam atividade proteolítica em substratos como colágeno, queratina e elastina, são amplamente empregadas na indústria de cosméticos na forma de cremes esfoliantes e pomadas, já que a ação dessas enzimas está relacionada com a renovação celular, removendo células mortas presentes na epiderme (LODS *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2002).

Clinicamente, as proteases poderiam ser utilizadas no tratamento da sensibilidade ao glúten, presente no trigo, centeio e cevada. Essa condição inviabiliza condições metabólicas normais do portador, tornando-o sensível, dentre outras substâncias, à gliadina, proteína tóxica, com regiões ricas em prolina e glutamina, encontrada no glúten de trigo, principalmente. As prolilendopeptidases, pertencentes ao grupo das serinoproteases, possuem capacidade de clivagem em ligações peptídicas contendo prolina e são amplamente produzidas por bactérias, fungos, animais e plantas (SHAN *et al.*, 2002; SHAN *et al.*, 2004).

### **2.2.2.2 Indústria alimentícia**

Dando continuidade a grande variedade de usos para proteases, seu enquadramento na indústria alimentícia possui diferentes aplicações como fabricação e clarificação de cerveja, tritramento de cereais, processamento e coagulação do queijo, panificação e produção de hidrolisados proteicos (WARD, 2011). Além disso, outros usos incluem a redução na turbidez resultante das proteínas em sucos e bebidas alcoólicas, no aumento da qualidade de alimentos proteicos, no preparo de hidrolisados proteicos de soja, gelatina e caseína e na recuperação e amaciamento da proteína de carne (TOMAR *et al.*, 2008; KUMARI, SHARMA & JAGANNADHAM, 2012). Na indústria de leite, a principal aplicação das proteases é na fabricação de queijos, tendo como função a hidrólise de ligações peptídicas específicas de maneira a gerar caseína e macropeptídeos (RAO *et al.*, 1998).

Os fungos *Rizhomucor miehei* e *Endothia parasitica* vêm tendo suas proteases valorizadas pela indústria do queijo que, gradualmente, vem substituindo a renina de origem animal pelas enzimas de origem fúngica (DEMAIN & ADRIO, 2008). No processamento de carne, as enzimas proteolíticas são utilizadas no amaciamento do produto, especialmente de origem bovina, já que possuem capacidade de hidrolisar proteínas de tecido conjuntivo assim como fibras musculares (KUMAR & TAKAGI, 1999). O organismo *Aspergillus oryzae* é capaz de produzir endo e exoproteinasas usadas na alteração da estrutura de glúten de trigo no processo de panificação. Essa modificação estrutural reduz o tempo de mistura da massa de farinha (RAO *et al.*, 1998). Vários produtos derivados de soja, como molhos, por exemplo, são processados com utilização de proteases neutras e alcalinas produzidas por fungos.

O processamento enzimático de alimentos resulta em produtos com alta solubilidade, boa produção de proteína e baixo amargor. Hidrolisados proteicos são geralmente feitos a partir de caseína, proteína do soro do leite e proteína de soja, tendo aplicações diversas como produtos dietéticos e para saúde, fórmulas infantis, suplementos alimentícios, bebidas para grávidas e lactantes, alimentos para pessoas alérgicas e como agente aromatizante (RAMAMURTHY *et al.*, 1991; RAO *et al.*, 1998; KUMAR & TAKAGI, 1999).

### **2.2.2.3 Indústria de detergentes**

A maior aplicação do setor de enzimas industriais é o de aditivos para detergentes. As proteases utilizadas nos detergentes para roupas já corresponderam a aproximadamente 25% do total de vendas mundiais de enzimas, chegando a 33% em 2019 (DEMAIN & ADRIO, 2008; NOVOZYMES, 2019). A aplicação enzimática em detergentes melhora sua capacidade de remoção de manchas, tornando a lavagem mais rápida e ambientalmente segura. Atualmente, a maioria dos produtos detergentes de lavanderia contém combinações de proteases, amilases, celulasas e lipases (HMIDET *et al.*, 2009).

Proteases alcalinas adicionadas a detergentes permitem a liberação do material proteico das manchas, tendo seu desempenho influenciados por fatores como pH, temperatura da lavagem e composição do detergente. As enzimas proteolíticas usadas em detergentes geralmente devem possuir alta atividade e estabilidade dentro de uma ampla faixa de pH e temperatura, além de serem compatíveis com o restante dos componentes do produto (KUMAR & TAKAGI, 1999; JAOUADI *et al.*, 2008; SAVITHA, 2011).

#### **2.2.2.4 Indústria de couro**

As proteases têm recebido atenção do setor de produção de couro, sendo utilizadas na remoção de pelos em peles de animais para posterior processamento. Os resíduos gerados pela fabricação de couro têm consequências negativas devido aos sucessivos tratamentos químicos que o couro cru recebe, além do tingimento utilizado para finalização do produto. As proteases alcalinas desempenham um papel importante na substituição desses produtos químicos nocivos, principalmente os envolvidos na imersão, depilação e purga. Na etapa de depilação, o uso dessas enzimas não só previne problemas de poluição, mas também diminui o tempo gasto e aumenta a qualidade do couro fabricado (ZAMBARE *et al.*, 2011). Adicionalmente, proteases alcalinas dos fungos *Aspergillus flavus* e *Conidiobolus coronatus* já foram reportadas tendo seu uso bem-sucedido no curtume de peles (MALATHI & CHAKRABORTY, 1991; LAXMANAN *et al.*, 2005).

#### **2.2.2.5 Produção de proteases por fungos filamentosos**

Diversos microrganismos, incluindo os fungos filamentosos, secretam proteases na tentativa de degradar proteínas em seu meio externo e utilizar seus produtos de hidrólise como fontes de carbono ou nitrogênio para o crescimento celular (ZANPHORLIN *et al.*, 2011). Em escalas industriais, proteases extracelulares são geralmente produzidas em meios complexos contendo glicose e outros substratos. As condições de cultivo são fatores determinantes para o processo, e muitas vezes a otimização de parâmetros como pH, temperatura, agitação e composição de meio é necessária para a condução e viabilidade do processo (ABIDI *et al.*, 2011). Os principais fatores para produção de proteases são, de maneira geral, a razão carbono:nitrogênio (C/N), a presença de açúcares facilmente metabolizáveis, íons metálicos e outros fatores físicos, como aeração de meio, densidade de inóculo, pH, temperatura e tempo de incubação (JOO e CHANG, 2005).

Os Fungos, assim como microrganismos de forma geral, têm suas funções enzimáticas reguladas de acordo com o ambiente externo, sendo função da disponibilidade de substratos. Existem 4 mecanismos, descritos na literatura, que regulam a síntese e a secreção de proteases extracelulares (GEISSELER & HORWATH, 2008).

1. Presença de determinado substrato pode induzir a produção de proteases pelo microrganismo. Mais especificamente, os níveis de atividade proteolítica são determinados pela biodisponibilidade de Carbono (C) e Nitrogênio (N) e pela necessidade da célula por tais elementos. Sendo assim, o estresse metabólico gerado pela baixa disponibilidade de C e N, assim como a razão entre a concentração de C/N, induz a produção de proteases extracelulares pelos fungos.
2. Níveis elevados de produtos finais, como aminoácidos,  $\text{NH}_4^+$  e fontes de carbono facilmente metabolizáveis podem reprimir a produção.
3. A produção de proteases pode ser aumentada quando os níveis de carbono, nitrogênio e enxofre estão insuficientemente disponíveis para o microrganismo.
4. Enzimas extracelulares podem ser produzidas em baixas concentrações, independente da disponibilidade de substrato.

Arelado a esses fatores, a produção de proteases por microrganismos é influenciada pela qualidade da fonte de nitrogênio. Geralmente, fontes complexas de

nitrogênio são utilizadas na produção de enzimas proteolíticas, no entanto, e exigência de substratos específicos varia de organismo para organismo. Fungos filamentosos costumam produzir proteases na presença de fontes proteicas mais complexas do que em fontes de nitrogênio inorgânico ou de baixo peso molecular (KUCERA, 1981).

A produção enzimática utilizando fungos filamentosos possui diversas vantagens, principalmente sua fácil recuperação, dada a produção extracelular (GERMANOA *et al.*, 2003). Fungos produzem proteases ácidas, neutras e alcalinas, ativas em uma ampla faixa de pH, de 4,0 a 11,0 e atuantes em uma grande variedade de substratos. A maioria das proteases ácidas de importância industrial são produzidas por fungos e tem aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica (ALEKSIEVA & PEEVA, 2000).

Além das proteases, outros metabólitos e enzimas utilizadas em processos industriais tem origem fúngica, como amilases, amiloglicosidases, celulases, pectinases, lacases/ligninases, fitases, lipases e glicooxidases (WARD, 2011).

Outro fator atraente para produção enzimática a partir de fungos é a sua capacidade de crescer em meios de cultura de baixo custo e produzir altas quantidades de enzimas (HERNÁNDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2011). As proteases microbianas do gênero *Aspergillus* vêm sendo bastante estudadas, já que essas espécies são conhecidas pela capacidade de secretar níveis elevados de enzimas durante seu crescimento. Uma série dessas enzimas produzidas por fermentação submersa em grande escala têm sido largamente utilizadas na indústria ao longo das décadas (WU *et al.*, 2006). Exemplos de espécies pertencentes a esse gênero são *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* (MALATHI & CHAKRABORTY, 1991; O'DONNELL *et al.*, 2001; MACCHIONE *et al.*, 2008; VISHWANATHA *et al.*, 2010; KRANTI *et al.*, 2012; WAHAB *et al.*, 2018; PAPADAKI *et al.*, 2020; BELLAOUCHI *et al.*, 2021).

O gênero *Penicillium* e suas espécies possuem um grande potencial para produção enzimática. Dentre essas espécies estão *Penicillium* sp., *P. camemberti*, *P. citrinum*, *P. griseoroseum*, *P. restrictum* e *P. roqueforti*. Em sua maioria, os fungos *Penicillium* produzem proteases alcalinas em fermentação submersa, porém, *P. griseoroseum* e *P. camemberti* foram relatados por sua produção de proteases ácidas em meio líquido. O fungo *P. griseoroseum* da cepa IH-02 produziu grandes quantidades de protease ácida quando exposto a substratos de farelo de trigo e farelo de soja (IKRAM-UL-HAQ & MUKHTAR, 2007).

Dentro do gênero *Mucor*, as espécies *M. pusillus* e *M. miehei*, secretam proteases aspárticas no meio, também conhecidas como reninas. Essas enzimas possuem alta atividade de coagulação do leite e baixa atividade proteolítica, permitindo que substituam o uso da quimosina de bezerro na indústria de queijos. A espécie *M. circinelloides* apresentou a produção de proteases utilizando glicose como substrato, tendo estabilidade em pH 5,2 com pico de atividade em 25 °C (ANDRADE *et al.*, 2002).

Alguns fungos termofílicos produzem hidrolases com características interessantes, como maior estabilidade térmica, atividade máxima em temperaturas elevadas e altas taxas de hidrólise. Proteases termoestáveis podem atuar em temperaturas na faixa de 65-85 °C para conversão de proteínas em peptídeos e aminoácidos e possuem aplicações na área de panificação, fabricação cervejeira, detergentes e na indústria de couro (HAKI & RAKSHIT, 2003; MERHEB *et al.*, 2007). As espécies *Thermoascus aurantiacus* e *Thermomyces lanuginosus* foram identificadas como produtoras de proteases ácidas termoestáveis. A enzima do primeiro organismo foi produzida utilizando farelo de trigo como substrato em temperatura de 60 °C (MERHEB *et al.*, 2007). A atividade máxima em temperaturas elevadas demonstrada pelas proteases de *T. lanuginosus* foi de 70, 50 e 45 °C (LI *et al.*, 1997; JENSEN *et al.*, 2002; MACCHIONE *et al.*, 2008).

### 2.2.2.6 Processos fermentativos

O número de produtos de origem microbiana sendo comercializados vêm aumentando e causam mudanças relevantes nos cultivos em biorreatores. Alguns desses produtos podem ser de metabolismo primário como álcoois e ácidos orgânicos, metabólitos secundários como antibióticos e incluem também células e enzimas (PAMBOUKIAN, 2003).

Buscando uma melhor condução dos processos fermentativos, a execução de experimentos em *shaker*, utilizando frascos agitados, são uma importante ferramenta na determinação de parâmetros e condições que servirão de ponto de partida para extrapolações de escala na produção de bioprodutos em geral. A utilização de métodos de otimização permite que vários desses parâmetros, como temperatura, pH, concentração de nutrientes, frequência de agitação e tamanho de inóculo, sejam avaliados em diversas grandezas e combinações diferentes em

tempo reduzido quando comparado a realização de experimentos isolados (PAMBOUKIAN, 2003).

Em estudos de perfis cinéticos de um bioprocesso, vários componentes envolvidos na fermentação são avaliados em função do tempo de cultivo e outros parâmetros físico, químicos e biológicos importantes. Podem ser biomassa, metabólitos e substratos que têm suas concentrações avaliadas. Os valores obtidos experimentalmente permitem uma análise e a formulação de curvas ou superfícies de ajuste, mediante planejamentos experimentais sequenciais, que podem ser utilizados no processo de otimização e extrapolação de escala, além de serem cruciais para se alcançar valores promissores em termos de produtividade, rendimento e eficiência, seja do produto ou da biomassa celular de interesse. (HISS, 2001).

### **3 TÉCNICAS PROSPECTIVAS UTILIZADAS**

#### **3.1 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

##### **3.1.1 Vantagens e Objetivos**

KUPFER & TIGRE (2004) definiram a prospecção tecnológica “um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma relevante uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo”. Portanto, a prospecção tecnológica permite que gestores se posicionem de modo a influenciar nas trajetórias tecnológicas, o que significa lançar-se à frente, identificando oportunidades e ameaças futuras, garantindo a competitividade e a sobrevivência das instituições de P&D e dos usuários de seus resultados.

Existem diversas definições para a prospecção tecnológica como, por exemplo: “Um processo que se ocupa do exame sistemático do futuro de longo prazo da ciência, tecnologia, economia e sociedade, objetivando identificar áreas de pesquisas estratégicas e as tecnologias emergentes que tenham propensão em gerar maiores benefícios econômicos e sociais” (SECTES/CEDEPLAR, 2009). Porém, a que melhor define esse processo para o fim acadêmico voltado para criação de tecnologia é a de COSTA (2011): “Um tipo de busca, o qual faz o mapeamento da

evolução de uma tecnologia, a identificação de mercados, o rastreamento de capacitação tecnológica e a orientação para pesquisa.”

A economia mundial já viveu vários ciclos marcados pelas revoluções Agrícola e Industrial e, mais recentemente, pela Revolução da Informação. Na Revolução Agrícola, o poder político e econômico baseava-se na posse da terra. Já na Revolução Industrial, o determinante era o capital financeiro. Nela, passamos pelas eras das produções em massa, da eficiência, da qualidade, da competitividade. Agora, em plena Era da Informação, o que pesa é o conhecimento (BORSCHIVER & DA SILVA, 2016).

No mundo industrializado e globalizado, o conhecimento e o desenvolvimento tecnológico avançam em ritmo acelerado. A tecnologia tem como característica intrínseca o dinamismo, logo a organização tem que estar preparada para as mudanças que o mercado e a sociedade em geral constantemente demandam. Cada vez mais, as mudanças tecnológicas encontram-se sujeitas a forças competitivas de mercado e associadas a sistemas sociais, econômicos, políticos e ambientais complexos e desafiadores. O rápido avanço do conhecimento e o processo de globalização têm implicações sobre a forma de se fazer ciência, tecnologia e inovação atualmente (TEIXEIRA, 2013).

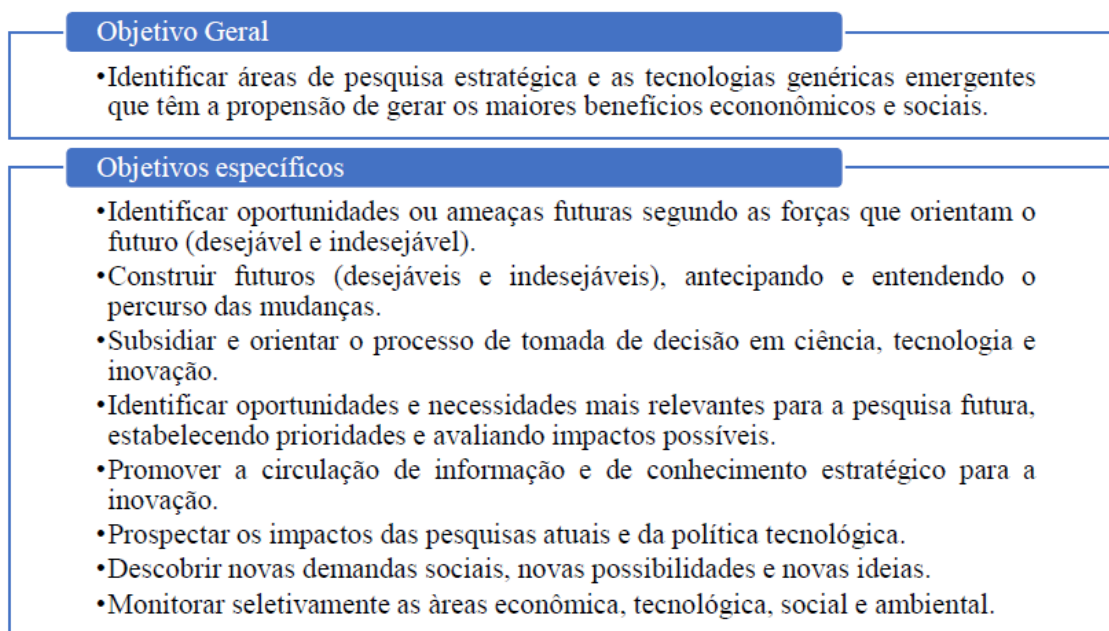
Os estudos de prospecção funcionam como uma ferramenta básica para processos de tomada de decisão em empresas e projetos. O propósito dos estudos de prospecção não é descobrir o futuro, mas sim delinear e testar visões desejáveis e realizáveis hoje, para que o futuro possa ser construído de uma forma positiva e de maneira mais consciente possível (MAYERHOFF, 2008). Tais visões podem ajudar a gerar políticas de longo prazo, além de estratégias e planos que dispõem circunstâncias futuras prováveis e desejáveis.

A inovação normalmente ocorre em um cenário de grande incerteza e tanto os desenvolvimentos futuros em conhecimento e tecnologia como mercados, demanda de produtos e usos tecnológicos podem ser altamente imprevisíveis. Por isso, a adoção de novos produtos ou processos ou a implementação de novos métodos organizacionais e de marketing também trazem alta incerteza consigo. Além disso, a busca e coleta de informações relevantes podem consumir muito tempo e muitos recursos (MANUAL DE OSLO, 2005).

De acordo com Teixeira (2013), na Figura 5 tem-se os objetivos e potenciais benéficos de uma prospecção tecnológica:



Figura 6 – OBJETIVOS DA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.



Fonte: TEIXEIRA, 2013.

Os métodos de prospecção vêm sendo usados, há várias décadas, começando nos anos 50 e se intensificando nos anos 80, por organizações públicas e privadas de diversos países, de modo a orientar os esforços empreendidos para o desenvolvimento de tecnologias (MAYERHOFF, 2008).

O estudo prospectivo envolve o uso de múltiplos métodos ou técnicas, quantitativos e qualitativos, de modo a se compensar as possíveis deficiências trazidas pelo uso de técnicas ou métodos isolados. Uma vez que não faz sentido definir uma fórmula pronta para uma metodologia de prospecção, a escolha dos métodos e técnicas e seu uso dependem de cada situação (SANTOS et al, 2004).

### 3.1.2 Diversidade metodológica

Teixeira (2013), integrante da EMPRAPA Cerrados, realizou um estudo em que foram resumidas diversas referências e metodologias de prospecção tecnológica, ressaltando a importância da implementação dessas técnicas não somente para empresas, mas para instituições governamentais, de maneira a promover um maior bem-estar social.

Existem diversos métodos de análise e técnicas de prospecção que, devido a possíveis fragilidades advindas de percepções individuais acerca de um futuro que é sempre incerto, podem ser utilizados como complementares e menos como alternativos. Segundo Coelho (2003), a literatura de estudos prospectivos comumente recomenda a utilização de mais de uma técnica, método ou ferramenta em exercícios de prospecção. O uso simultâneo e combinado de diferentes métodos ou técnicas, de modo que uma abordagem complemente a outra, ajuda a diminuir as dificuldades inerentes às atividades prospectivas e as desvantagens associadas a cada um deles isoladamente.

Segundo Kupfer e Tigre (2004), existem pelo menos três abordagens para o caso de estudos prospectivos amplamente respaldados na literatura: uma mais convencional e outras duas dentro de um espectro mais lógico.

1. A abordagem mais convencional é a baseada em inferência, cuja ideia central é que o futuro tende a reproduzir, em certo grau, os fenômenos passados, sem grandes rupturas ou discontinuidades nas trajetórias evolutivas dos objetos analisados. “A inferência pode ser realizada por ‘extrapolação de tendências’, baseada tanto em modelos teóricos ou empíricos da realidade quanto em construção por analogia dos antecedentes históricos do problema”.
2. Uma das abordagens lógicas é a geração sistemática de trajetórias alternativas, na qual o futuro é projetado por meio da construção de cenários via contraposição de determinadas variáveis e (ou) parâmetros.
3. A outra abordagem lógica é a construção do futuro por consenso, advindo da intuição ou cognição coletiva, sendo o futuro construído a partir de visões subjetivas de especialistas ou outros grupos de indivíduos dotados de capacidade de reflexão sobre os objetos do exercício de prospecção.

De acordo com Mayerhoff (2008) e Kupfer e Tigre (2004), dessas abordagens decorre uma grande variedade de metodologias de prospecção que, de modo geral, podem ser classificadas em três grupos principais:

1. Monitoramento (Assessment) – que consiste no acompanhamento da evolução dos fatos e na identificação dos fatores portadores de mudanças, realizados de forma sistemática e contínua.
2. Métodos de previsão (Forecasting) – por meio dos quais são elaboradas projeções baseadas em informações históricas e modelagem de tendências. A previsão é uma abordagem de caráter mais determinista, em que o futuro é visto como a extrapolação do passado. O método de forecasting faz a previsão probabilística do desenvolvimento futuro das tecnologias atuais por meio de quantificações e extrapolações de tendências.
3. Métodos de Visão (Foresight), que se baseiam em construções subjetivas de especialistas e sua interação não estruturada. É um método qualitativo que consiste na antecipação de possibilidades futuras com base em percepções de especialistas, cada um deles apoiados exclusivamente em seus conhecimentos e subjetividades. Na abordagem foresight, o futuro tem possibilidades alternativas de evolução a partir da conjugação de forças do presente e do passado. Esse enfoque sistêmico exploratório é um instrumento de planejamento tecnológico muito utilizado pelo setor público para estudar questões específicas.

Sendo uma área de conhecimento ainda muito recente, não há um consenso absoluto sobre a melhor metodologia para a prospecção tecnológica, prevalecendo diferentes métodos e ferramentas de análise. Os métodos formais mais usados são: monitoramento; opiniões de especialistas (método Delphi, painel de especialistas, surveys); análise e construção de cenários; análises de tendências; modelagem e simulação. Em Coelho (2003), há uma descrição detalhada dos principais métodos, técnicas e ferramentas de prospecção mais comumente usadas. No Quadro 4, apresenta-se a lista com os principais métodos, seus objetivos e vantagens e (ou) desvantagens.

Quadro 4 - RESUMO DE METODOLOGIAS DE PROSPECÇÃO

<b>Métodos de prospecção</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
------------------------------	-----------------	------------------	-------------------

Monitoramento e Sistemas de Inteligência	Inteligência Competitiva Tecnológica	Identificar ameaças potenciais, oportunidades possíveis e direção de tendências relativas à tecnologia em foco	Ajuda a moldar o cenário no qual a tecnologia e a organização inserem-se	Método deve ser complementado com outras análises prospectivas
		Manter a base de informação de interesse para a organização e tomadores de decisão		
Análise de tendências	Análise de regressão	Construir um cenário possível baseado na hipótese de que os padrões do passado serão mantidos em momentos futuros, particularmente de curto prazo	Quando há parâmetros bem quantificados, fornece previsões precisas no curto prazo	É uma análise mais vulnerável em previsões de longo prazo e quando ocorrem mudanças bruscas
	Curva S			
	Curva de aprendizado			
	Simulação			
	Análises de patentes/recursos gastos em P&D			
	Análise multicritério			
	Análises Road Map (Mapas tecnológicos)			
	Análises de conteúdo			
	Data mining/ Text mining/ Cientometria/ Bibliometria			

<b>Métodos de prospecção</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>	<b>Métodos de prospecção</b>
Opiniões de especialistas	Método Delphi	Construir uma visão de futuro baseada em informações qualitativas, utilizando-se da lógica subjetiva e de julgamento de pessoas com grande conhecimento e familiaridade com o tema em pauta	Deve ser usada quando não se pode obter informações quantitativas ou para complementar análises de tendências	Pode haver divergências entre especialistas da mesma área
	Painéis de especialistas			
	Tecnologias críticas			
	Surveys			
	Avaliação Individual			
	Seminários/ Workshops/ Comitês			
Construção de Cenários	Matriz SWOT	Ordenar sistematicamente percepções sobre ambientes futuros alternativos, com base em combinações de condicionamentos e variáveis	Incorpora uma grande variedade de informações quantitativas e qualitativas que ajudam os gestores nas tomadas de decisão	Pode ser difícil obter informações desejadas
	Matriz BCG (Boston Consulting Group)			
	GBN (Global Business Network)			
Métodos computacionais/Ferramentas analíticas	Modelagem	Incorporar diversos eventos (sociais, políticos, tecnológicos e econômico) em modelos de análise, permitindo tratamento analítico e uma grande quantidade de informações (quantitativas e qualitativas)	Uma vantagem é a facilidade e rapidez na obtenção dos resultados pelo uso de modelos computacionais	O risco no uso destas ferramentas é utilizar pressupostos essenciais aos modelos de forma inadequada à realidade e de pouca aplicabilidade

Fonte: Adaptado de Coelho (2003).

Dentre as diversas metodologias listadas, existem algumas que, segundo Borschiver e Da Silva (2016), são empregados em trabalhos de prospecção com o foco industrial, como citado por Bastos e França (2021):

- **Cenários:** representam uma descrição de uma situação futura e do conjunto de eventos que permitirão que se passe da situação original para a situação futura. Borschiver e Da Silva (2016), classificam os cenários como sendo: a) exploratórios, quando consideram tendências do passado e do presente, que por sua vez levam à criação de futuros factíveis; b) normativos ou de antecipação, que são construídos tendo como base imagens alternativas de futuro, podendo ser dividido em desejados e temidos; e c) tendencial, em que o futuro é determinado por meio da interpretação das tendências atuais das variáveis que afetam os fatores social, tecnológico, econômico, político e cultural.

- **Método Delphi:** o método Delphi desenvolvido por Olaf Helmes, na década de 1960, consiste em perguntar, de forma individual mediante questionários pré-elaborados, a um conjunto de peritos, sobre a tendência de futuro de um determinado fator crítico, sistema ou parte deste (BORSCHIVER & DA SILVA, 2016). A base do método envolve um questionário que é elaborado por uma equipe de coordenação (monitores ou facilitadores) e enviado a um grupo de especialistas participantes previamente selecionados. As perguntas são feitas em várias rodadas, são ainda analisadas e refeitas para que os especialistas possam reavaliar suas primeiras posições e tentar chegar a um consenso. Assim que estes retornam, a equipe coordenadora contabiliza as respostas, elabora um novo questionário e envia os resultados e as questões revisadas aos mesmos participantes para uma nova interação. A técnica Delphi pode ser caracterizada, portanto, por quatro pontos básicos: anonimato, interação, troca de informações e controle estatístico das respostas dadas. Métodos como este, que usam a opinião de especialistas são considerados métodos qualitativos, e devem ser usados sempre que a informação não puder ser quantificada ou quando os dados históricos não estão disponíveis ou não são aplicáveis (COELHO, 2003).

- **Matriz SWOT:** a **S**trength, **W**eakness, **O**pportunity, **T**hreaten (análise SWOT) consiste no exame dos pontos fortes e fracos de uma organização, suas oportunidades de crescimento e melhoria, e as ameaças do ambiente externo perante sua sobrevivência. Os fatores internos são denominados de forças e fraquezas, sendo força um recurso ou capacidade da organização e fraqueza suas

limitações, falhas ou defeitos que dificultam a busca de seus objetivos. Já os fatores externos são classificados como oportunidades ou ameaças. (BORSCHIVER & DA SILVA, 2016). Uma vez identificados os fatores internos e externos, estes são agrupados em uma matriz buscando-se verificar a existência de relação entre eles e, principalmente, para identificar as áreas críticas e que demandam atenção na atuação de uma organização.

- **Roadmap Tecnológico:** o Technology Roadmapping (TRM) fornece um método gráfico para se estabelecer uma relação entre as necessidades futuras do mercado, a tecnologia atual da empresa, a tendência da tecnologia no mundo, programas de pesquisa e desenvolvimento. Desta maneira, a empresa poderá tomar decisões que otimizam os investimentos de capital e P&D e que, ao mesmo tempo, estão alinhados com a estratégia da empresa. Pode-se pensar no TRM como um mapa da evolução de tecnologias e produtos que não foram ainda desenvolvidos (OLIVEIRA, 2013). Em linhas gerais, pode-se entender o roadmap como uma representação, de maneira organizada, que estabelece inter-relações das informações oriundas do estudo de um tema específico.

### **3.1.3 O uso de patentes e artigos científicos como ferramentas de prospecção tecnológica.**

De acordo com Amparo e colaboradores (2012), a fase inicial da prospecção tecnológica consiste na identificação de um tema que necessita de monitoramento, na formulação da estratégia de busca a ser utilizada pelo profissional da informação ou pelo pesquisador e na identificação, coleta e análise estruturada das informações de natureza técnica e científica.

Com a utilização da internet, diversas fontes podem ser facilmente encontradas: Bases de dados de artigos científicos, em repositórios de documentos digitais (institucionais ou temáticos) ou em sistemas agregadores de bases de dados e repositórios (UNIVERSIDADE DE AVEIRO, 2013).

Segundo Bastos e França (2021), as bases de dados são coleções de referências bibliográficas de artigos científicos que reúnem revistas de diferentes editores e constituem-se como um ponto de acesso global a grande parte da literatura científica publicada. Devido à sua abrangência, são as ferramentas mais adequadas para a realização de uma revisão bibliográfica num determinado assunto. Além disso,

tem por características o caráter internacional, o controle de qualidade dos conteúdos incluídos, informações sobre estes conteúdos e dados estatísticos sobre recorrência de citações, fator de impacto da publicação e outros aspectos relevantes em estudos prospectivos.

Com a coleta de dados concluída, é de suma importância que a avaliação crítica da relevância das informações seja realizada, levando em consideração uma interpretação adequada para extração do valor agregado das informações. Dessa forma, a metodologia pautada na prospecção tecnológica, quando realizada para gerar um monitoramento das informações e sua gestão, permite ter uma visão do estado da arte de um setor, constituindo sua trajetória passada, o seu presente e tendências futuras para seu mercado (BORSCHIVER e SILVA, 2016).

### 3.2 PROSPECÇÃO FILOGENÉTICA

A Filogenia nos conta a história genealógica de uma determinada espécie ou até mesmo de seus componentes moleculares, como proteínas e enzimas, por exemplo, e sua relação com outros organismos e ancestrais comuns. O ramo da ciência que se propõe a estudar e tentar reconstruir essas relações se chama Filogenética (HENNIG, 1966).

No contexto das sequências de proteínas e enzimas, a análise filogenética é um dos pilares da análise comparativa de sequências, tendo diversas aplicações no estudo da evolução dessas proteínas e de suas funções (ROKAS, 2011).

Árvores filogenéticas podem ser definidas simplesmente como gráficos que possuem uma estrutura hierárquica. Assim como em uma árvore real, elas possuem ramificações em sua estrutura, denominadas ramos. Um conjunto de ramos que se originam de um mesmo ponto em comum, ou seja, um nó, são chamados de clados, podendo ser internos, ou externos, caso estejam na ponta da árvore (SAKAMOTO, 2016). Diferentes informações podem ser usadas na confecção de uma árvore filogenética, como espécies, populações, genes ou proteínas. Essas informações utilizadas correspondem aos terminais da árvore e em sua inferência, sendo assim chamadas de unidades taxonômicas operacionais (SOKAL, 1966). Cada nó interno de uma árvore representa um evento evolutivo e é produto de uma inferência, que depende tanto dos métodos utilizados na construção da árvore, como das



informações utilizadas e, sendo assim, são denominadas unidades taxonômicas hipotéticas (SAKAMOTO, 2016).

Cada árvore pode assumir diferentes conformações ou topologias, impactando diretamente a interpretação dos dados e da história evolutiva do conjunto analisado. Dependendo do tipo de árvore utilizada, ou da topologia da árvore, a distância entre os ramos e suas unidades é representativa da distância evolutiva entre seus elementos (SAKAMOTO, 2016).

Alguns benefícios podem ser destacados para realização de uma metodologia de análise filogenética: Maior compreensão dos objetos de estudo de um determinado projeto; Possibilidade de identificação de diferentes organismos ou biomoléculas que tenham mecanismos e funções semelhantes; Identificação de organismos alternativos para produção de biomoléculas de interesse. Sendo assim, por ser utilizada como auxílio na tomada de decisão e no direcionamento da pesquisa, no presente trabalho, a metodologia foi chamada de “Prospecção Filogenética”.

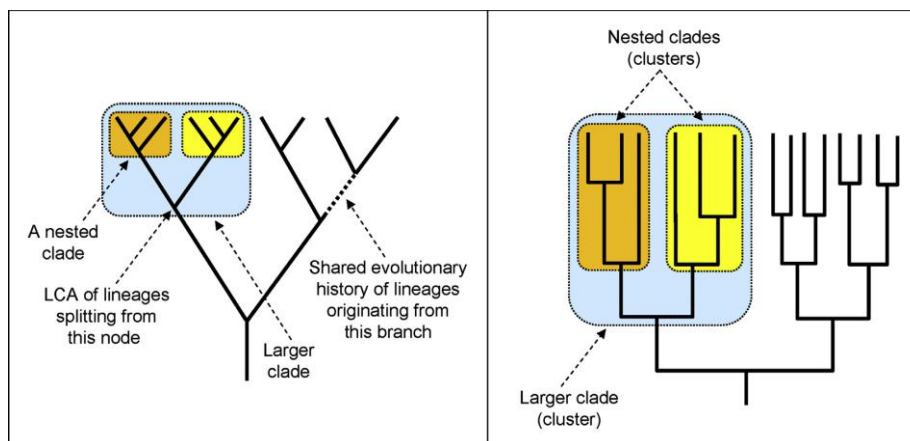
A metodologia de prospecção filogenética é facilitada pela confecção de Árvores Filogenéticas, um recurso visual que auxilia na apresentação dos resultados e a análise. Essas estruturas são representações gráficas de uma série de operações matemáticas que demonstram a história evolucionária de um grupo de organismos, genes ou moléculas (ROKAS, 2011).

Uma árvore filogenética é uma representação bidimensional do parentesco entre várias espécies biológicas. É um desenho em linha que fornece de maneira visual a informação sobre sequências ou espécies, indicando sua relação temporal e de origem. Essas árvores podem ser representadas de três formas: Filograma, Dendrograma e Cladograma (ROY, 2014). Dendrograma é a denominação genérica para qualquer um dos tipos de representações, ou seja, todo filograma é um dendrograma, porém o inverso não é verdadeiro. Cladogramas são as árvores em que o tamanho das ramificações não representa o tempo evolutivo, sendo responsáveis apenas por apresentarem uma hipótese evolutiva. Já os filogramas são aqueles em que o tamanho de cada ramo da árvore é representativo, em escala, ao tempo evolutivo.

Dentro de cada uma dessas representações, existem divisões chamadas de Clados. Um clado é definido como o grupo formado por um ancestral e todos os seus descendentes e todo e qualquer organismo pertence a pelo menos um clado

(ISPN, 2020). Uma comparação visual entre cladogramas e filogramas pode ser vista na figura 7 a seguir.

Figura 7 – ILUSTRAÇÃO COMPARATIVA ENTRE UM CLADOGRAMA (ESQUERDA) E UM FILOGRAMA (DIREITA), ASSIM COMO SEUS CLADOS.



Fonte: Choudhuri (2014)

Análises filogenéticas feitas com o uso de sequências de proteínas ou de DNA se iniciam com o alinhamento dessas sequências ortólogas e, a partir desse ponto, diferentes métodos de inferência são utilizados. Uma parte dos métodos usa o alinhamento na formulação de uma matriz de distância, que calcula uma medida de dissimilaridade entre as sequências utilizadas. A medida mais simples é chamada “*p-distance*” e calcula a porcentagem de sítios em que as sequências diferem entre si. Medidas mais complexas fazem uso de modelos evolutivos mais complexos, como os métodos de média aritmética não ponderada (UPGMA, “*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”) (SOKAL, 1958) e o método de agrupamento dos vizinhos (“*Neighbor-Joining*”) (SAITOU & NEI, 1987).

Uma outra parte dos métodos filogenéticos usa algoritmos de otimização na avaliação de diferentes topologias de árvore, escolhendo a que melhor se ajusta aos dados utilizados. Diversos métodos utilizam essa abordagem, como o de máxima parcimônia (MP), o de máxima verossimilhança (MV) e a inferência bayesiana (IB). O método de MV, utilizado no presente trabalho, se baseia na avaliação probabilística, onde essa probabilidade é calculada com um modelo de substituição de sequências em diferentes pontos da topologia da árvore. Assim, o algoritmo determina a árvore que possua um maior valor de probabilidade (SAKAMOTO, 2016).

No contexto do uso de sequências proteicas para avaliação filogenética, é possível obter informações não só evolutivas, mas preditivas em relação às funções das proteínas e a identificação e construção de genes de forma comparativa (DEY *et al.*, 2015). Proteínas com alto grau de identidade entre si tendem a possuir similaridade entre suas funções e relações evolutivas também, possibilitando sua análise no formato de árvore filogenética (ZHANG *et al.*, 2018).

Outra ferramenta essencial para uma obtenção de dados que permita uma análise confiável e completa é o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). BLAST pode ser utilizado como facilitador na triagem inicial de dados de sequências, tanto proteicas quanto de nucleotídeos e funciona identificando sequências homólogas àquela introduzida na busca, em diversas bases de dados, geralmente localizadas no NCBI. Outro benefício do BLAST é sua capacidade de tradução, ou seja, é possível procurar sequências de proteínas utilizando uma sequência de nucleotídeos e vice-versa (MCGINNIS & MADDEN, 2004).

De maneira mais aprofundada, o funcionamento do BLAST consiste em um método heurístico que primeiro procura por correspondências menores entre duas sequências, não levando em conta todo o espaço sequencial. Após isso, o algoritmo inicia alinhamentos secundários a partir dos alinhamentos iniciais e os agrupa por *score*, devolvendo assim um conjunto de sequências mais similares com a inicial (CLC BIO, 2007).

Após a obtenção de informação, existem duas abordagens diferentes de realizar a análise, conhecidas como supermatriz e superárvore. A supermatriz (QUEIROZ & GATESY, 2007) utiliza os dados de alinhamento diretamente para a confecção da árvore de espécie. Nesse método, chamado também de método de concatenação, primeiramente são combinados os dados de sequências alinhadas em um único arquivo, que posteriormente é submetido a uma das metodologias de inferência citadas anteriormente, como MV, por exemplo. Já a superárvore (SANDERSON *et al.*, 1998), diferentemente, utiliza um conjunto de árvores filogenéticas construídas de maneira independente a partir de outros conjuntos de genes. A partir desse grupamento, uma árvore consenso é formulada e interpretada por algoritmos como “*Matrix Representation using Parsimony*” (MRP) e “*Matrix Representantion using Compatibility*” (MRC) (RAGAN, 1992; ROSS & Rodrigo, 2004).

As técnicas de avaliação filogenética foram aplicadas com foco nos benefícios e características descritas neste tópico, visando à formulação de uma rota de

produção enzimática, mais especificamente, de proteases, onde diferentes organismos pudessem ser utilizados, de acordo com a disponibilidade local de cepas para cultivo. De maneira geral, caso o local de pesquisa não possua os principais microrganismos produtores das proteases de interesse, com o embasamento teórico da filogenia, é possível a escolha de outros produtores alternativos, diminuindo assim tempo gasto e recursos financeiros envolvidos na aquisição de cepas.

## 4 METODOLOGIA

De maneira a melhor organizar a execução do trabalho, a metodologia utilizada foi dividida em três seções ou estratégias. Na primeira, realizou-se um Mapeamento Tecnológico no campo de “*Spirulina maxima* para aplicação em bebidas”, no intuito de compreender e avaliar, no quesito acadêmico, a trajetória do tema em âmbito espacial e temporal, assim como reconhecer possíveis tendências de aplicação da biomassa algal em bebidas.

A segunda estratégia utilizada avaliou a produção e crescimento de *Spirulina maxima* em laboratório, tendo como base diferentes volumes de cultivo onde o conteúdo proteico da biomassa seca foi avaliado, sendo as proteínas o principal produto de interesse.

Após a avaliação dos parâmetros de produção da microalga, a terceira e última estratégia foi focada no embasamento teórico, a partir de estudos filogenéticos, para comparação de enzimas proteolíticas comerciais com proteases produzidas por fungos diferentes daqueles utilizados pela indústria. A partir das conclusões obtidas pela filogenia, foram selecionadas 4 cepas de fungos filamentosos para realização de experimentos e cultivos que tinham como objetivo avaliar a capacidade produtiva de tais microrganismos.

### 4.1 MAPEAMENTO TECNOLÓGICO

A metodologia de Mapeamento Tecnológico utiliza, em parte, conceitos descritos na proposta estratégica apresentada por BHRUTH *et al.* (2006) que apresenta quatro fases distintas para o processo de Prospecção Tecnológica,

considerando a execução, organização e conclusão dos estudos prospectivos. São elas:

- FASE 1 – PREPARATÓRIA, na qual ocorre a definição de objetivos, escopo, abordagem e metodologia;
- FASE 2 – PRÉ-PROSPECTIVA, na qual é realizado o detalhamento da metodologia e o levantamento da fonte de dados;
- FASE 3 – PROSPECTIVA, que se refere à coleta, ao tratamento e à análise dos dados;
- FASE 4 – PÓS-PROSPECTIVA, que inclui a comunicação dos resultados, a implementação das ações e o monitoramento.

Figura 8 - SEQUÊNCIA DE FASES A SEREM ADOTADAS PARA A EXECUÇÃO, ORGANIZAÇÃO E CONCLUSÃO DA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.



Fonte: BHRUTH *et al.*, 2006.

Dentre as diversas técnicas para prospecção existentes na literatura, o Monitoramento e Sistemas de Inteligência foi considerado a estratégia mais adequada para a realização do presente trabalho. Dessa maneira, o procedimento utilizado se baseia no método prospectivo realizado por OLIVEIRA (2014) e descrito por BHRUTH *et al.* (2006), porém restrito às suas etapas iniciais, referentes às Fases 1 e 2 mencionadas, sendo então nomeado de Mapeamento Tecnológico

### *Fase 1: Preparatória*

Essa fase consistiu tanto na definição da metodologia de mapeamento tecnológico como na busca das fontes de informação utilizadas para análises e fases posteriores.

O aprofundamento no assunto “*Spirulina maxima* para aplicação em bebidas” começou com o levantamento de um grande número de informações e artigos acadêmicos (com utilização da plataforma Scopus), com o intuito de se formar uma visão técnica fundamentada sobre o tema. Posteriormente, foi pensada a estrutura da metodologia de mapeamento tecnológico, separando também os artigos totais em relevantes e irrelevantes.

A metodologia de pesquisa empregada na fase de mapeamento de artigos consistiu na busca por palavras-chave por intermédio da base de dados SCOPUS® (Elsevier, Amsterdã), uma base de grande abrangência que possibilita do download de uma quantidade grande de documentos de maneira facilitada, alta relevância dos artigos científicos e análises Macro facilitadas pela própria estrutura do site. Além disso, a utilização de bases de dados padronizadas e com qualidade de informação permite tratar estatisticamente volumes de dados com reduzido risco de erros, o que agrega valor ao conhecimento disponível.

### *Fase 2: Pré-prospectiva*

Na Fase 2 Pré-Prospectiva o tema do trabalho foi detalhado e dividido em campos ou assuntos relacionados com os artigos levantados. Isso foi feito criando taxonomias (*drivers*) dentro do nível Meso, especificando e associando cada artigo a esses pontos mais importantes e recorrentes quanto ao assunto do presente trabalho.

Essa fase detalhou bem o escopo do trabalho e consistiu na avaliação temporal do desenvolvimento da tecnologia, permitindo determinação da curva de crescimento do assunto e seus principais aspectos.

#### **4.1.1 Estratégia de busca**

Como definido na Fase 1, a metodologia de pesquisa abordada na fase de mapeamento de artigos científicos dentro do contexto de “***Spirulina maxima* para aplicação em bebidas**”, consistiu em busca por palavras-chave na base de dados SCOPUS.

#### *Elaboração das análises*

As taxonomias abordadas foram subdivididas em três classes de níveis: Macro, Meso e Micro. Em vista disso, as respectivas definições de cada taxonomia são explicitadas a seguir.

### **NÍVEL MACRO**

Neste nível, os documentos são analisados de acordo com a distribuição histórica de publicações, a distribuição por países, por universidades, centros de pesquisa e empresas ligadas ao conhecimento científico e desenvolvimento da tecnologia, parcerias (internacionais e com empresas).

### **NÍVEL MESO**

Neste, os documentos são classificados de acordo com os aspectos mais relevantes em torno do tema. A seguir, as taxonomias identificadas são descritas.

- **BEBIDAS:** Esta taxonomia procurou identificar se o documento explicita a utilização da microalga *Spirulina maxima* especificamente para suplementação de bebidas de um modo geral.
- **MÉTODO DE OBTENÇÃO DE BIOMASSA:** Esta categoria busca apontar se *Spirulina maxima* é obtida por via de cultivo ou comercial.
- **PRODUÇÃO DE BEBIDA:** Categoria criada procurando saber se o artigo tratava de uma etapa de formulação ou de exposição ao público do produto.
- **FORMA DE ADIÇÃO:** Aqui procurou-se entender como a *Spirulina* seria adicionada à bebida em questão. Em forma de biomassa total, ou com emprego de outra técnica.

### **NÍVEL MICRO**

Nesta categoria são identificadas, detalhadas e analisadas as particularidades de cada taxonomia da análise Meso, visando explorá-la melhor.

As classes Micro são explicitadas a seguir de acordo com a taxonomia de classe Meso originária.

- **BEBIDAS:** Iogurte; Health Drink.
- **MÉTODO DE OBTENÇÃO DE BIOMASSA:** Biomassa Comprada; Biomassa Cultivada.
- **PRODUÇÃO DE BEBIDA:** Formulação; Análise Sensorial.
- **FORMA DE ADIÇÃO:** Biomassa Total; Microencapsulado.

#### 4.1.2 Artigos científicos

**Base:** SCOPUS

**Palavras-chave:** *Spirulina* OR *Arthrospira* AND beverage; *Spirulina* OR *Arthrospira* AND juice; *Spirulina* OR *Arthrospira* AND beer; *Spirulina* OR *Arthrospira* AND milk; *Spirulina* OR *Arthrospira* AND drink; *Spirulina* OR *Arthrospira* AND fermented; *Spirulina* OR *Arthrospira* AND yogurt.

**Campo de Busca:** *Article*

**Justificativa:** O campo de busca foi limitado a *article* em função do volume de documentos e da necessidade de recuperar estudos focados.

**Período de busca:** 1975 a 2020

##### *Estratégias de Busca de Artigos Científicos*

A busca de artigos foi realizada empregando como primeiro termo o gênero da microalga e como segundo termo uma palavra que especificasse melhor um tipo de bebida de maior interesse comercial.

Como critérios de exclusão foram adotados: Artigos focados em outras microalgas que não fosse do gênero *Spirulina*; Artigos que fugissem ao escopo de bebidas, tratando de outros tipos de alimentos ou suplementos não destinados ao público humano.

##### *Busca Prévia de Artigos Científicos – FASE 1*

A seguir, na Tabela 4, são apresentados os resultados gerais da busca prévia dos artigos de acordo com as palavras-chaves selecionadas.



Tabela 4 - - RESULTADOS DA BUSCA PRÉVIA DE ARTIGOS.

<b>Termo de busca</b>	<b>Número de documentos</b>
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND beverage	16
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND juice	16
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND beer	6
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND milk	31
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND fermented	13
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND drink	33
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND yogurt	13

Fonte: Elaboração própria a partir dos dados da Base *SCOPUS*, interstício 1975 - 2020.

Observação: as combinações foram feitas com *Spirulina* e *Arthrospira* visando coletar o máximo de informações existentes, pois a última é comumente utilizada como “sinônimo” de *Spirulina*.

A Tabela 5 apresenta os resultados de buscas de forma mais detalhada.

Tabela 5 - RESULTADOS DETALHADOS DA BUSCA DE ARTIGOS.

<b>Termo de busca</b>	<b>Número de documentos</b>	<b>Artigos relevantes<sup>a</sup></b>
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND beverage	16	1
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND juice	16(1)	0
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND beer	6(2)	0
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND milk	31(1)	1
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND drink	13(5)	0
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND fermented	33(8)	5
<i>Spirulina</i> OR <i>Arthrospira</i> AND yogurt	13(4)	9

---

**TOTAL**

128(21)

16

---

 Fonte: Elaboração a partir dos dados da Base SCOPUS, interstício 1975 - 2020.
Os números entre parênteses são documentos repetidos. <sup>a</sup>: excluídos os repetidos.

Em função da especificidade do tema em questão, a busca global de artigos gerou poucos resultados, sendo dentre estes, uma quantidade menor ainda relevante ao mapeamento. Dos 128 artigos totais presentes na pesquisa, 21 eram repetidos, resultando em 107 artigos. Desse grupo, apenas 16 foram considerados relevantes como embasamento na construção do mapeamento tecnológico focada em *Spirulina maxima* para aplicação em bebidas.

#### 4.2 CULTIVO E ANÁLISES COM MICROALGA *SPIRULINA MAXIMA*

Este estudo foi realizado com a cepa *Spirulina maxima* (LEAF046) disponível no Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. As células de *S. maxima* foram cultivadas em bateladas simples utilizando meio de cultura AO (Aiba & Ogawa, 1977), como apresentado na Tabela 6. Inicialmente, as células foram cultivadas durante 7 dias com agitação orbital a 150 rpm (Shaker, Lab-Line Instruments Inc. ®), com temperatura de  $30 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12:12h e densidade do fluxo de fótons de  $120 \text{ mol de fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  com densidade óptica (DO) inicial de 0.1 medida em 750 nm. A iluminação foi proporcionada por lâmpadas brancas fluorescentes dispostas ao redor do cultivo (Philips ®, 23W) com distância apropriada para fornecer a densidade de fótons desejada. Após os 7 dias, quando a cultura apresentou uma DO = 1.0, um volume de 500mL da cultura foi transferido para 4500mL de meio de cultura fresco. O volume de 5000mL de cultura foi cultivado em carboy com capacidade de 9L, onde foram mantidas as mesmas condições de cultivo, exceto pelo sistema de agitação, que foi proporcionado por um compressor de ar eletromagnético (Boyu® ACQ 012). Após 14 dias, quando o cultivo alcançou DO = 1,0, todo o volume foi utilizado como inóculo para um tanque de cultivo, com volume útil de 50L. Para o cultivo em tanque de 50 L, o crescimento celular de *S. maxima* foi avaliado a cada 5 dias a partir do acompanhamento da DO no tanque, utilizando alíquotas de 3 mL retiradas com auxílio de pipeta e com realização da

leitura de absorvância em 750 nm. A partir dos valores obtidos, uma curva de crescimento do cultivo em tanque foi construída para determinação das fases de cultivo e da taxa de crescimento específico ( $\mu$ ), utilizando os valores de DO em escala logarítmica.

Tabela 6 - RESUMO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE SPIRULINA MAXIMA NAS DIFERENTES ETAPAS DE PROPAGAÇÃO

<b>Etapa de cultivo</b>	<b>Volume do recipiente</b>	<b>Volume de cultivo</b>	<b>Fotoperíodo</b>	<b>Intensidade luminosa</b>
Erlenmeyer	500 mL	250 mL	12:12 horas	120 $\mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2*\text{s}$
Carboi	9 L	5 L	12:12 horas	120 $\mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2*\text{s}$
Tanque de cultivo	70 L	50 L	12:12 horas	90 $\mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2*\text{s}$

Tabela 7 - CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS CONSTITUINTES DO MEIO DE CULTURA AO

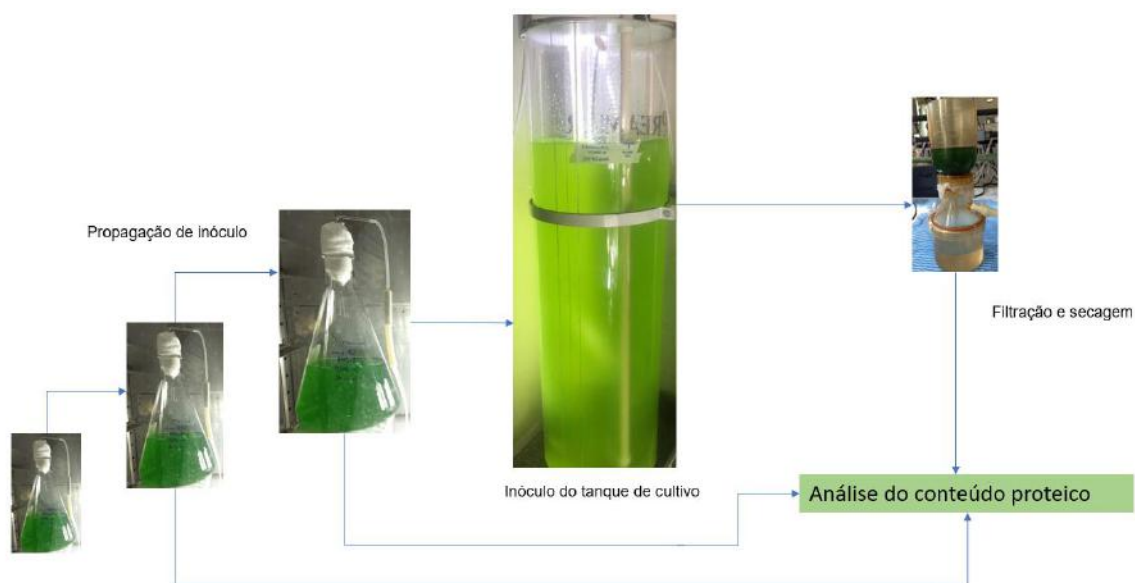
<b>Componentes</b>	<b>Volume da Solução</b>	<b>Massa ou Volume</b>	<b>Concentração Final (M)</b>
Solução I	500 mL	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	13,61 g	1,62 x 10 <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	4,03 g	3,80 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,50 g	2,87 x 10 <sup>-3</sup>
Solução II	500 mL	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	2,5 g	2,94 x 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	1,0 g	5,74 x 10 <sup>-3</sup>
NaCl	-	1,0 g	1,71 x 10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,2 g	8,11 x 10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,04 g	2,72 x 10 <sup>-4</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,01 g	3,60 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	-	0,08 g	2,15 x 10 <sup>-4</sup>
Solução elementos traço	-	1 mL	-
<b>Elementos traço</b>	<b>Solução Estoque (g.L-1 H<sub>2</sub>O)</b>	<b>Massa ou Volume</b>	<b>Concentração Final (M)</b>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	-	0,8 g	2,15 x 10 <sup>-6</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,7 g	2,52 x 10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1	1 mL	3,48 x 10 <sup>-9</sup>
MnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2	1 mL	8,97 x 10 <sup>-9</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	1 mL	1,62 x 10 <sup>-7</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1	1 mL	3,44 x 10 <sup>-9</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1	1 mL	4,13 x 10 <sup>-9</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005	1 mL	2,00 x 10 <sup>-11</sup>
<b>Vitaminas</b>	-	<b>Massa</b>	<b>Concentração Final (M)</b>
Cianocobalamina (B12)	-	5 mg	3,69 x 10 <sup>-9</sup>

Fonte: AIBA &amp; OGAWA, 1977; SCHLÖSSER, 1994

As células de *S. maxima* foram filtradas utilizando bomba de vácuo através de uma membrana de nylon (100% NBC GIVE) com diâmetro de poro de 0,47  $\mu\text{m}$  após finalizados os cultivos. Depois disso, as células filtradas foram colocadas em uma placa de Petri e secas a  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  até peso constante. Após a pesagem, o material foi armazenado em dessecadores até análise posterior. A figura 9 ilustra, de maneira simplificada, as etapas envolvidas no cultivo e nas análises referentes à biomassa de *S. maxima*.

As proteínas totais foram determinadas em triplicata, utilizando alíquotas das 3 fases distintas de cultivo, em Erlenmeyer, Carboi e referente ao reator de 50 L, segundo o método de Lowry *et al.* (1951) modificado de acordo com Mota (2015), de maneira a avaliar a reprodutibilidade do processo no quesito de obtenção de proteínas. Para tal, triplicatas de 5 mg da biomassa seca de três amostras foram colocadas em *ependorfs* e adicionados 0,5 mL de água destilada seguido de 0,5 mL de solução SDS (1 g de SDS + 1,5 g de glicerol + 10 mL de água destilada). As amostras foram homogeneizadas e colocadas em banho-maria ( $100^\circ\text{C}$  / 5 minutos), sendo homogeneizadas novamente. Após alcançarem a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 5.500 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi recolhido e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram retiradas e diluídas 50x.

A uma alíquota de 1,0 mL de cada amostra diluída foi adicionado 5,0 mL do reagente C, constituído pela mistura de 50 volumes do reagente A (2,0%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , m/v, em 0,1N NaOH) para cada 1 volume do reagente B (1 ml de  $\text{CuSO}_4$  0,5%, m/v, + 1 ml de  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1,0%, m/v), para cada 1,0 mL da amostra diluída. Dez minutos depois da adição do reagente C, as amostras foram filtradas com auxílio de microfiltradores (com membranas de fibra de vidro previamente incineradas) acoplados a seringas de 5,0 mL e transferidas para tubos de ensaio. Posteriormente, foi adicionado a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído com  $\text{H}_2\text{O}$  (1:2, v/v) e, após 35 min, foram feitas as leituras espectrofotométricas à 750 nm. Para a determinação do conteúdo proteico das amostras utilizou-se albumina de soro bovino como padrão.

Figura 9 - DIAGRAMA SIMPLIFICADO DE ETAPAS DO CULTIVO DE *S. MAXIMA*

### 4.3 PROSPEÇÃO FILOGENÉTICA

A metodologia utilizada nessa etapa do trabalho foi baseada naquela descrita por Hall (2013) utilizando o software *MEGA* (TAMURA *et al.*, 2011). Dentro dos conceitos abordados anteriormente, no presente trabalho foi utilizado o método da supermatriz, sendo posteriormente submetida ao teste de inferência de máxima verossimilhança (MV).

As principais etapas desse método envolvem: 1) A obtenção de sequências de proteínas, ou de nucleotídeos, dependendo do estudo; 2) O tratamento de dados, remoção de caracteres estranhos (números, pontuações, quebras de texto, etc.) ao arquivo da supermatriz; 3) Alinhamento das sequências; 4) Construção da árvore filogenética; 5) Análise de resultados.

#### 4.3.1 Obtenção de sequências

A coleta inicial de dados é a etapa mais crucial nessa metodologia e, quando bem-feita, torna o restante dos passos mecânicos (HALL, 2013). Para iniciar essa etapa, foi necessária a definição de proteínas alvo, ou seja, aquelas que seriam utilizadas como referência para que o algoritmo de BLAST localizasse outras semelhantes. Sendo assim, o critério de escolha para essas enzimas foi: Proteases já descritas na literatura com uso na hidrólise de biomassa de *Spirulina maxima*. A

Tabela 9 mostra o resultado de um levantamento bibliográfico, assim como da origem de cada enzima utilizada no estudo e de seu rendimento, medido em grau de hidrólise. Vale ressaltar que o foco do presente trabalho é o uso de enzimas de origem microbiana, dados os benefícios que essas proteases apresentam, já explorados anteriormente no texto.

Tabela 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE S. MAXIMA

<b>Enzima utilizada</b>	<b>Origem</b>	<b>Maior grau de hidrólise</b>	<b>Referência</b>
Alcalase/ Flavourzyme/ Tripsina	Bacteriana/ Fúngica/ Animal	65% (Alcalase)/ 73%(Flavourzyme)	Alzahrani <i>et al.</i> , 2017
Alcalase	Bacteriana	>80%	Astolfi <i>et al.</i> , 2020
Tripsina/ Pepsina/ Papaína/ Alcalase/ Protamex	Bacteriana	34,1% (Protamex)	Fan <i>et al.</i> , 2018
Alcalase	Bacteriana	67,7%	Lu <i>et al.</i> , 2010
Alcalase / Flavourzyme	Bacteriana/ Fúngica	36,5 %/ 31,8%	Verdasco-Martín <i>et al.</i> , 2019
Alcalase/ Papaína	Bacteriana/ Vegetal	44,6% (sequencial)	Wang <i>et al.</i> , 2016
Alcalase/ Tripsina/ Papaína	Bacteriana/ Animal/ Vegetal	24,39%	Wang <i>et al.</i> , 2016
Alcalase/ Tripsina/ Papaína/ Pepsina	Bacteriana/ Animal/ Vegetal	38,5% (Tripsina)	Zhang <i>et al.</i> , 2013
Flavourzyme/ Protamex/ Collupulin	Fúngica/ Bacteriana/ Vegetal	Não informado	Bae <i>et al.</i> , 2020
Alcalase/ Flavourzyme	Bacteriana/ Fúngica	87,5% (consórcio)	Kim <i>et al.</i> , 2014

A partir desses dados, foram selecionadas as enzimas comerciais “Alcalase” de origem bacteriana e a enzima “Flavourzyme” de origem fúngica. Além de

possuírem a origem desejada, possuem também os maiores rendimentos dentre os artigos avaliados.

Após a etapa anterior, foi necessário a obtenção da sequência de aminoácidos propriamente dita, para as duas enzimas. A enzima alcalase, produzida por *Bacillus licheniformis* foi sequenciada e descrita a primeira vez na década de 1980 por Jacobs (1985), sendo bem conhecida e se enquadrando na classe enzimática das Serinoendopeptidases, número EC 3.4.21.

Quanto a enzima comercial *Flavourzyme*, produzida por *Aspergillus flavus*, o levantamento bibliográfico mostrou que na verdade se trata de um conjunto de enzimas proteolíticas de diferentes funções enzimáticas. Merz (2015) realizou o mapeamento e sequenciamento dessas enzimas, atribuindo a cada uma delas sua função enzimática. Na mistura enzimática existem 4 classes enzimáticas distintas de proteases e uma enzima da classe das alfa-amilases, abrangendo Aminopeptidases, Dipeptidil-peptidases, Serinoendopeptidases e Metaloendopeptidases. Por fugir ao escopo do estudo de proteases, a enzima amilolítica não foi considerada para as etapas futuras. Na Tabela 10 é possível ver a relação entre as enzimas, suas classes enzimáticas e seus códigos referentes a base de dados UniProt.

Origem	Enzima	Cód. UniProt	Número EC	Classe enzimática
	$\alpha$ -amilase A tipo 3	P0C1B4	3.2.1.1	alfa-amilase
	leucino aminopeptidase A	Q2U1F3	3.4.11	aminopeptidase
	leucino aminopeptidase 2	Q2ULM2	3.4.11	
Flavourzyme	dipeptidil peptidase 4	Q2UH35	3.4.14.5	dipeptidil-peptidase
	dipeptidil peptidase 5	Q9Y8E3	3.4.14	
	protease neutra 1	Q2U1G7	3.4.24	metaloendopeptidase
protease neutra 2	P46076	3.4.24.39		
	protease alcalina	P12547	3.4.21.63	serinoendopeptidase
Alcalase	subtilisina Carlsberg	P00780	3.4.21	

Tabela 9 – ENZIMAS COMERCIAIS DE REFERÊNCIA POR CLASSE ENZIMÁTICA

Fonte: Elaboração própria



Com o código referente a cada uma das enzimas na base de dados Uniprot, é possível então coletar a sequência de aminoácidos de cada uma delas, seguindo então para o próximo passo: O BLAST de cada uma das sequências, buscando por enzimas homólogas e seu posterior agrupamento por classe enzimática. Para a formulação de uma árvore filogenética, as enzimas precisam ser da mesma classe enzimática, para garantir uma comparação efetiva entre a proximidade de seus produtores e uma inferência que faça sentido entre a proximidade de suas atividades enzimáticas.

#### **4.3.2 Formulação da Supermatriz**

A construção da base de sequências de aminoácidos foi feita utilizando a ferramenta BLASTp, voltada para a busca de proteínas. Vale ressaltar que a busca foi filtrada para fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, visto que esses fungos são os mais conhecidos como produtores de enzimas. Além disso, as cepas disponíveis para teste no laboratório são, em sua maioria, desses dois gêneros. A partir de cada sequência das enzimas comerciais, o mecanismo de busca retornou uma quantidade de sequências homólogas que foi avaliada quanto a elementos repetidos e então agrupada em um arquivo de texto para cada classe enzimática. Dessa forma, foram formuladas 4 árvores filogenéticas, sendo uma para cada classe de proteases ou número EC (3.4.11 - aminopeptidase; 3.4.14 - dipeptidil-peptidase; 3.4.21 – serinoendopeptidase; 3.4.24 – metaloendopeptidase).

O formato de texto utilizado foi FASTA, no qual para cada aminoácido da sequência, uma letra do alfabeto é utilizada como código.

#### **4.3.3 Alinhamento de sequências**

O software *MEGA* utilizado para as etapas de alinhamento e construção de árvore conta com diversos mecanismos de alinhamento. Dentre eles, foi utilizado o alinhamento *CLUSTALW*. Esse algoritmo utiliza um alinhamento progressivo, começando pelas sequências que melhor se alinham, reduzindo o tempo de processamento (TAMURA *et al.*, 2011).

A figura 10 mostra os parâmetros utilizados pelo software nessa etapa do trabalho.

Figura 10 – PARÂMETROS DE ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS

ClustalW Options

▼ Alignment

**Pairwise Alignment**

Gap Opening Penalty: 10.00

Gap Extension Penalty: 0.10

**Multiple Alignment**

Gap Opening Penalty: 10.00

Gap Extension Penalty: 0.20

► Weight

**Use Negative Matrix**: OFF

**Delay Divergent Cutoff (%)**: 30

Keep Predefined Gap

No file chosen

Specify Guide Tree

? Help    X Cancel    ✓ OK

Done Loading

Fonte: Elaboração a partir do software MEGA

Para essa etapa, nenhum dos parâmetros utilizados foi modificado, sendo mantidos como os *default* do *software*.

#### 4.3.4 Confeção das árvores filogenéticas

Após as sequências alimentadas pela supermatriz foram alinhadas, um novo arquivo é gerado pelo software, seguindo para etapa seguinte de criação das árvores filogenéticas. Dentre os diversos métodos de inferência disponíveis, aquele utilizado no presente estudo foi o de Máxima Verossimilhança. Por ser um algoritmo baseado em otimização e probabilística, permite uma análise mais robusta de um grande conjunto de dados (TAMURA *et al.*, 2011).

Dentre os parâmetros listados na figura 11 abaixo, é importante destacar o “*Number of bootstrap replications*”. Esse número determina o número de iterações, ou seja, o número de árvores diferentes que o algoritmo constrói e compara estatisticamente, escolhendo assim aquela que mostra maior probabilidade de ser verdadeira.

Figura 11 – PARÂMETROS DE ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS

Option	Setting
<b>ANALYSIS</b>	
Statistical Method →	Maximum Likelihood
<b>PHYLOGENY TEST</b>	
Test of Phylogeny →	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications →	100
<b>SUBSTITUTION MODEL</b>	
Substitutions Type →	Amino acid
Model/Method →	Jones-Taylor-Thornton (JTT) model
<b>RATES AND PATTERNS</b>	
Rates among Sites →	Uniform Rates
No of Discrete Gamma Categories →	Not Applicable
<b>DATA SUBSET TO USE</b>	
Gaps/Missing Data Treatment →	Use all sites
Site Coverage Cutoff (%) →	Not Applicable
<b>TREE INFERENCE OPTIONS</b>	
ML Heuristic Method →	Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)
Initial Tree for ML →	Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
Initial Tree File →	Not Applicable
Branch Swap Filter →	None
<b>SYSTEM RESOURCE USAGE</b>	
Number of Threads →	7

Fonte: Elaboração a partir do *software* MEGA

O restante dos parâmetros foi mantido como o *default* do programa.

Após a geração do arquivo gráfico que representa a árvore filogenética, se inicia a etapa de análise de proximidade entre as enzimas comerciais usadas como referência e as demais localizadas durante o processo. Quanto mais próximas duas proteínas se encontram na árvore, mais próximas estruturalmente elas são, e por consequência, maior é a probabilidade de que as enzimas tenham atividades semelhantes (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003).

#### 4.4 MAPEAMENTO DOS MEIOS DE CULTIVO

Com o intuito de melhor embasar as futuras etapas experimentais do trabalho, um breve levantamento foi feito no que diz respeito aos meios de cultivos utilizados

para produção das enzimas de referência, na busca de um padrão de substratos que pudessem ser utilizados em laboratório.

Para isso, a busca foi feita na própria plataforma Uniprot. Dentro da página de cada uma das enzimas usadas como referência, encontram-se as referências utilizadas no sequenciamento. A partir dessas referências foi feito um resumo de fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, tanto orgânicas como inorgânicas, o pH do meio de cultivo e sua temperatura.

#### 4.5 CULTIVO E ANÁLISES COM FUNGOS FILAMENTOSOS

A propagação e manutenção dos esporos dos quatro fungos escolhidos com base nos resultados da prospecção filogenética (*A. niger*, *A. awamori*, *A. clavatus* e *T.reesei*) foi realizada em placas de ágar batata-dextrose (PDA), por um período de 4 a 7 dias, sendo posteriormente raspadas utilizando alça T e solução de NaCl 0,9% (p/v). A fração líquida resultante é centrifugada e o sobrenadante é descartado, sendo o precipitado ressuspenso com a solução de glicerol 20% (v/v) na proporção de 1:5 de volume de esporos por volume de solução e armazenados a -20 °C.

Para obtenção dos inóculos utilizados nos experimentos de determinação de atividade enzimática foram realizados primeiramente pré-inóculos de 15 mL com a mesma composição do meio de cultivo preparados e inoculados com 1% da solução de esporos em glicerol (150 µL) e mantidos em agitação constante de 200 rpm e 30 °C em shaker. Essa etapa é realizada de maneira que a fase lag do cultivo final possa ser a menor possível. O cultivo utilizado para avaliação da produção de proteases consistia de 150 mL em que 15 mL vinham do pré-inóculo e o restante do volume era composto de meio de Breccia modificado, seguindo a composição exposta na Tabela 8:

Tabela 10 - CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS CONSTITUINTES DO MEIO DE CULTURA DE BRECCIA

Componente	Solução estoque (g/L)	Quantidade utilizada (para 1 L)
NO <sub>3</sub>	-	1,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	3,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	6,0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,05 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,2 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5	0,4 mL
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	20	0,8 mL
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,6	3,125 mL
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,4	1,0 mL
Extrato de levedura	-	7,0 g
Peptona	-	7,0 g
Farelo de Aveia	-	20,0 g

Fonte: (BRECCIA *et al.*, 1995).

Observação: No experimento foi utilizado farelo de aveia na composição do meio de cultivo. Isso foi feito com base na informação de que a aveia possui maior concentração de proteínas do que o trigo (PETERSON, 1992; KUMAR *et al.*, 2011). Logo, a hipótese utilizada na formulação do meio leva em consideração que uma maior concentração proteica pode induzir uma maior produção de proteases.

O método utilizado para avaliação da atividade proteolítica foi aquele descrito por Christen e Marshall (1984) modificado, utilizando uma solução de azocaseína 0,5% (p/v) em tampão acetato de sódio-ácido acético pH 6,0 como substrato. A atividade proteolítica é calculada com a seguinte fórmula:

$$Ap = \frac{A_{440} * Fd}{t * Va} \text{ Equação (1)}$$

Onde:

$A_{440}$ : absorvância a 440 nm

Fd: fator de diluição;

$$Fd = \frac{\text{Volume final}}{\text{Volume inicial}} = \frac{50 \mu\text{L amostra} + 500 \mu\text{L azocaseína} + 1000 \mu\text{L HCl}}{50 \mu\text{L amostra}} = 31$$

*Equação (2)*

Onde:

t = tempo (minutos) = 5 min

Va = volume inicial de amostra (mL) = 0,05 mL

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

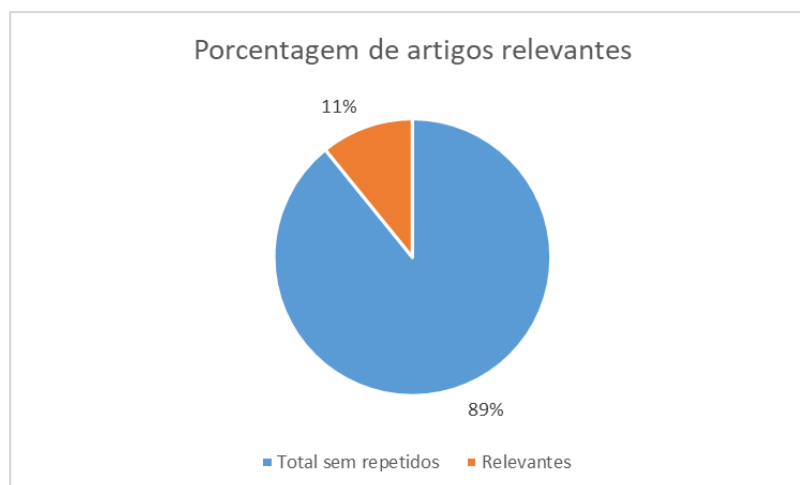
### 5.1 MAPEAMENTO TECNOLÓGICO

Seguindo a linha de estudo temporal cronológico do trabalho, foram discutidas mais profundamente as fases 1 (Preparatória) e 2 (Pré-prospectiva) da metodologia de mapeamento apontada por BARUTH *et al.* (2006).

#### 5.1.1 Análise nível macro dos artigos

A Figura 12 mostra o percentual de artigos classificados como relevantes e como irrelevantes, sem considerar as repetições, relativos ao total obtido após a pré-seleção baseada nos critérios do método de pesquisa. Os artigos descartados ou irrelevantes foram aqueles sem foco relacionado à temática “*Spirulina maxima* para aplicação em bebidas”, fugindo do escopo de bebidas, mesmo que focados em alguma aplicação para a biomassa de *S. maxima*.

Figura 12 – PORCENTAGEM DE ARTIGOS CONSIDERADOS RELEVANTES OU DESCARTADOS



Fonte: base SCOPUS, período 1975 - 2020.

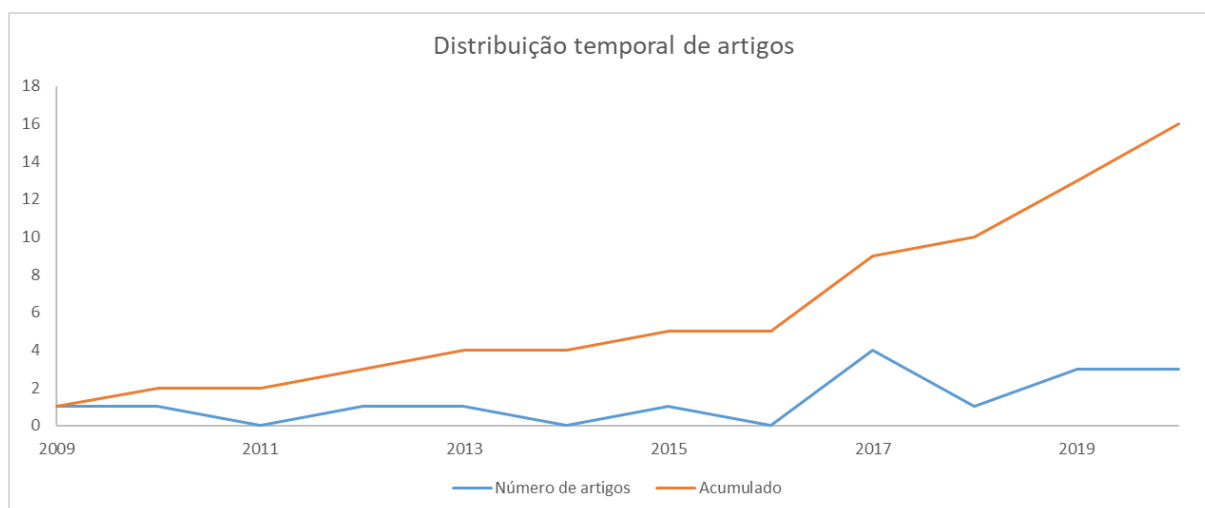
A partir do gráfico da figura 12, observa-se que apenas 11% dos artigos pré-selecionados, ou seja, 16 artigos, apresentaram abordagem direcionada e foram relevantes para o mapeamento. 89% dos artigos foram considerados irrelevantes e descartáveis dado o elevado volume de artigos focados em utilizações irrelevantes da *Spirulina*. Desse modo, a partir dos artigos relevantes foi possível fazer um levantamento tecnológico em âmbito mundial dentro da área do presente trabalho.

A título de exemplificação, o artigo lituanês “*Influence of blue algae spirulina platensis on the productivity of sows*” foi selecionado como irrelevante mesmo tendo a *Spirulina maxima* como microalga em foco. Como o título deixa explícito, trata-se de um artigo onde a biomassa da microalga foi utilizada para a alimentação de porcas grávidas e avaliação de possíveis efeitos nos porcos nascidos, o que foge ao escopo de “aplicação em bebidas” do presente trabalho. Igualmente irrelevante, o artigo indiano “*Evaluating the impact of vegetal and microalgae protein sources on proximate composition, amino acid profile, and physicochemical properties of fermented Spanish “chorizo” sausages*” avaliou as propriedades físicas e químicas da tradicional linguiça *chorizo* quando adicionada de biomassa de *Spirulina*, novamente, saindo do escopo do trabalho.

A Figura 13 apresenta um gráfico temporal em que há a comparação anual quanto à quantidade de publicações de artigos focados na *Spirulina maxima* para

aplicação em bebidas. Lembrando que esses artigos são oriundos da base SCOPUS e foram utilizados para a elaboração do mapeamento tecnológico.

Figura 13 - NÚMERO DE ARTIGOS RELEVANTES POR ANO DE PUBLICAÇÃO.



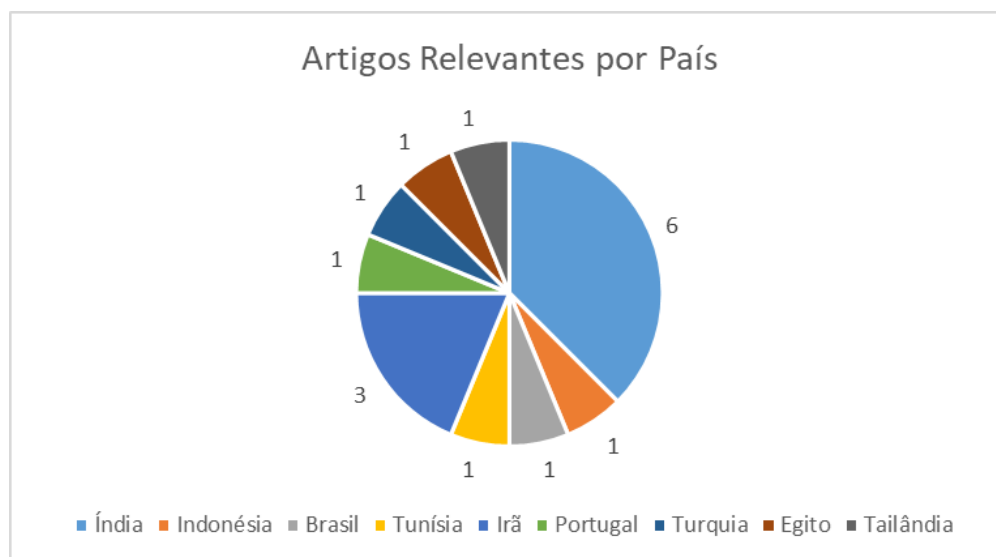
Fonte: base SCOPUS, interstício 2009 - 2020.

Ao analisar o gráfico acima, o auge de artigos com relevância para o mapeamento tecnológico ocorreu no ano de 2017, com 4 publicações para esse ano. No ano seguinte houve somente 1 publicação com aumento para 3 publicações no ano de 2019 e manutenção desse número em 2020.

Em termos participativos associados aos países dos artigos, a Índia, o Irã, o Brasil, a Tunísia, a Indonésia, Portugal, a Turquia, o Egito e a Tailândia foram os nove países com publicações relevantes ao escopo da pesquisa, sendo 6 (37,5 %) vindos da Índia, 3 (18,6 %) do Irã e 1 artigo por cada um dos países restantes, como demonstrado na figura 14.



Figura 14 - PAÍSES COM MAIS ARTIGOS PUBLICADOS.



Fonte: base SCOPUS; período 1975 - 2019.

Embora a China seja a maior e mais antiga produtora de microalgas do gênero *Spirulina* (CHEN *et al.*, 2016), o país não contribuiu com nenhum artigo relevante ao tema pesquisado. Nesse contexto, a Índia mostrou-se uma crescente potência em P&D de posse de 37,5 % dos artigos analisados e o México, apesar da abundância natural de *Spirulina maxima* nesse país, também não contribuiu com publicações relevantes.

O Brasil se mostrou presente com 1 publicação proveniente da Universidade Regional de Blumenau (URB) em parceria com a Universidade Federal de Rio Grande (UFRG) empatado com Tunísia, Indonésia, Portugal, Turquia, Egito e Tailândia, o que nos mostra que uma nova área de desenvolvimento pode estar surgindo nesses países. O artigo brasileiro “*Evaluation of Adding Spirulina to Freeze-Dried Yogurts Before Fermentation and After Freeze-Drying*” focava diretamente na temática de bebidas, atuando na formulação e avaliação de iogurtes contendo biomassa de *S. maxima sp. LEB 18*. O estudo caracterizava a bebida quanto seu conteúdo proteico, ácidos graxos e contagem de células bacterianas, comparando a formulação do produto confeccionado com adição de biomassa em dois momentos diferentes, antes e depois do processo de liofilização. Como etapa final do trabalho, uma análise sensorial utilizando a escala hedônica de 9 pontos foi realizada com 50 indivíduos não treinados, tendo como resultado uma aceitação média de 82,4% enquanto 72% dos panelistas afirmaram que consumiriam com frequência o produto.

Estudos nacionais sobre a temática proposta ainda são pouco presentes na literatura, em comparação ao volume total de artigos relevantes. Porém, é possível notar uma alta aprovação e intenção de consumo de um produto formulado com biomassa algal, mostrando que o uso de *S. maxima* em bebidas apresenta espaço para inovação e aproveitamento.

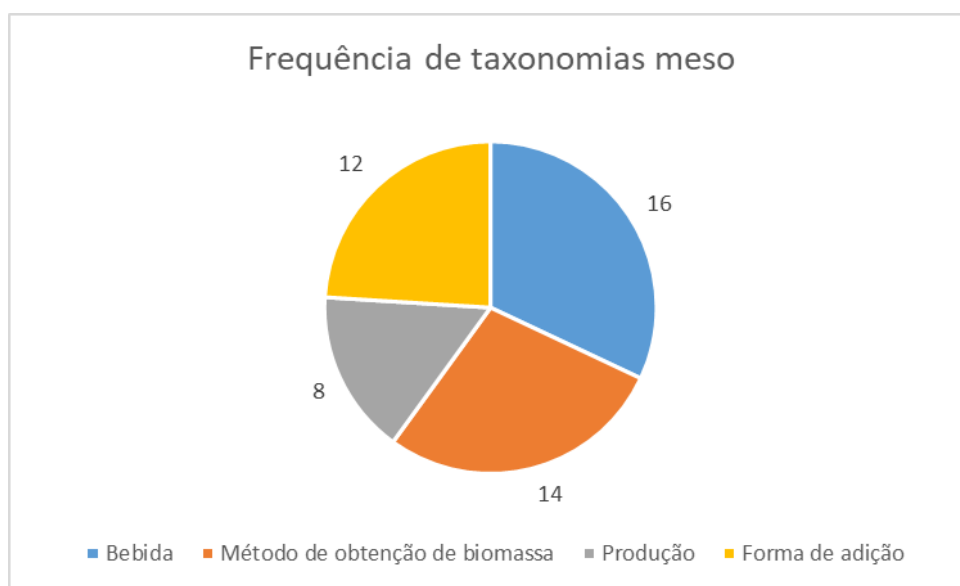
### 5.1.2 Análise nível meso dos artigos

Nesta fase foram adotadas algumas taxonomias para a realização da análise Meso, as quais também foram utilizadas posteriormente para a elaboração da fase de análise Micro. É importante enfatizar que um mesmo documento pode ter mais de uma classificação Meso, ou seja, um artigo pode abordar ao mesmo tempo mais de uma das taxonomias definidas como: **“Bebidas”**, **“Método de Obtenção de Biomassa”**, **“Produção de Bebida”** e **“Forma de Adição”**.

A taxonomia de classe Meso mais presente nos artigos estudados foi **“Bebidas”**, já que todos os artigos relevantes tratavam de alguma maneira sobre o assunto, conforme ilustrado na Figura 16. Dentre os demais, o *driver* **“Método de Obtenção de Biomassa”** pôde ser observado em 14 artigos, **“Forma de Adição”** em 12 e **“Produção de Bebida”** em 8.

Comparativamente, é possível notar que a cada nova etapa para a formulação de uma possível bebida (obtenção de matéria prima, aplicação da matéria e confecção do produto), o número de artigos diminui. A partir de tal análise, pode-se inferir que a tecnologia e o processo de formulação de bebidas utilizando biomassa algal ainda se encontra, majoritariamente, em seus estágios iniciais. Tal realidade demonstra que o campo ainda está em desenvolvimento, sendo uma possibilidade de entrada para mais pesquisas originais e possíveis inovações em termos de novos produtos, processos e investimentos.

Figura 15 – PARTICIPAÇÃO DE ARTIGOS DAS TAXONOMIAS DA ANÁLISE MESO.



Fonte: base SCOPUS; interstício 2009 - 2020.

Com base nos resultados exibidos na figura 15, conclui-se que os artigos selecionados e analisados atenderam de maneira satisfatória as taxonomias propostas para a análise nível Meso, mas por outro lado apresentaram maior preocupação com o método de obtenção e aplicação do bioproduto do que com a escalabilidade para processos industriais.

Por tratar-se de uma nova proposta de produto, os métodos de produção observados, assim como as formas de aplicação, encontram-se em seus estágios iniciais de desenvolvimento, como discorrido na análise de nível micro no tópico a seguir. As etapas de produção de biomassa analisadas ainda atuam em escala de laboratório, quando realizadas. Porém, em sua maioria, os artigos utilizavam biomassa comprada externamente, não cultivada especificamente para uma pesquisa, mostrando pouca integração entre produção e aplicação da matéria prima. A forma de adição mais frequente foi a aplicação da biomassa integralmente na bebida, sem etapas de processamento que não fossem filtração, secagem e trituração.

### 5.1.3 Análise nível micro dos artigos

A última etapa da análise prospectiva é a Micro, que consiste em aprofundar os itens obtidos na análise Meso. Na análise Micro, cada taxonomia

da análise Meso foi detalhada em subdivisões para melhor identificar e apontar as tecnologias utilizadas em “*Spirulina maxima* com fins nutracêuticos”. Além disso, é importante ressaltar que na análise nível Micro cada artigo pode estar presente em até mesmo todas as subdivisões de uma mesma Meso, ou seja, as taxonomias Micro não são necessariamente excludentes. Dessa forma, as taxonomias Mesos e suas respectivas subdivisões Micros foram:

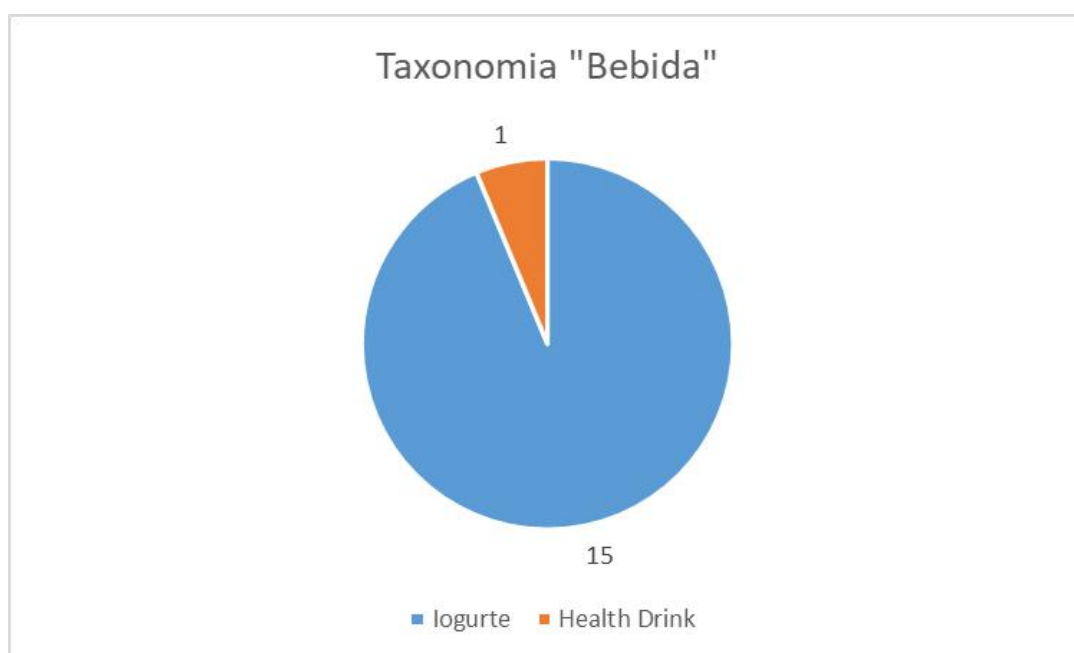
- **Bebidas:** Iogurte; Health Drink.
- **Método de Obtenção de Biomassa:** Biomassa Comprada; Biomassa Cultivada.
- **Produção:** Formulação; Análise Sensorial.
- **Forma de adição:** Biomassa Total; Microencapsulado.

### *BEBIDAS*

Nesta taxonomia de Classe Meso foi analisado se o artigo científico apresentava a *Spirulina* ou algum componente seu como aditivo ou suplemento em algum tipo de bebida consumida em larga escala.

Com o contexto apresentado, as bebidas escolhidas como níveis micro foram: Iogurte e Health Drink, uma categoria presente em um dos artigos que não havia sido cogitada previamente.

Figura 16 – QUANTIDADE DE DOCUMENTOS PRESENTES NAS TAXONOMIAS DE NÍVEL MICRO PROVENIENTES DE “BEBIDAS”.



Fonte: base SCOPUS; interstício 2009 - 2020.

Nota-se na figura 16 uma total predominância do tipo de bebida “iogurte” nos artigos. Isso pode ter acontecido visto a facilidade de incorporação da biomassa de *Spirulina* em uma matriz mais opaca e densa, características que podem ajudar a mascarar o gosto e a textura da microalga, tornando iogurtes mais atrativos por esse ponto de vista.

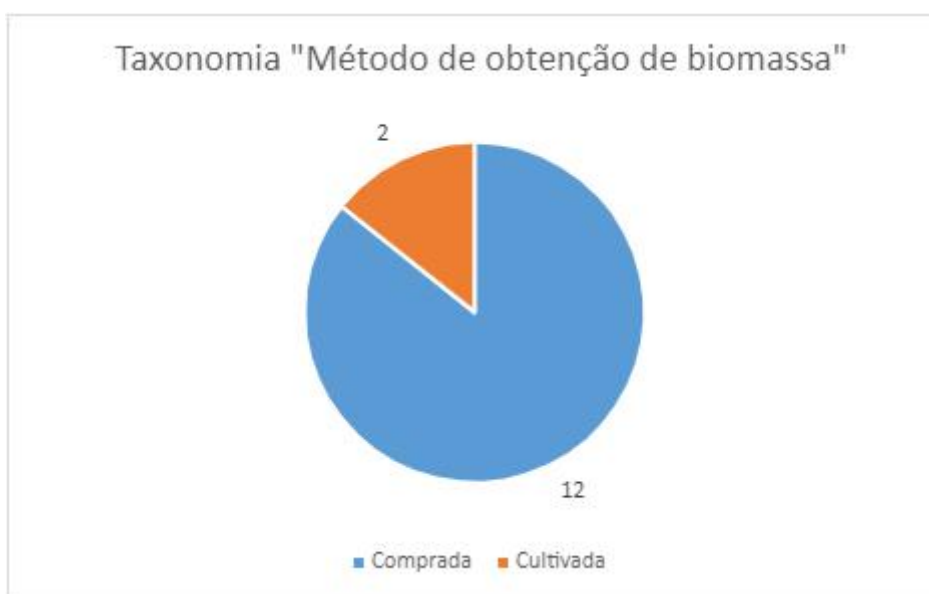
Outros tipos de bebidas, como cervejas e sucos não se apresentaram em nenhum dos artigos gerados pela busca, nos mostrando duas possibilidades: Essas matrizes podem apresentar dificuldades quanto a adição de biomassa algal, como pH impróprio para algumas propriedades sensoriais resultantes ou elevada turbidez da matriz após adição de *Spirulina*. Em uma perspectiva mais positiva, nos mostra um possível novo mercado para expansão de produtos com adição de microalgas.

A taxonomia relativa a “*Health Drink*” foi adicionada mesmo estando presente em um único artigo indiano intitulado “*Formulation of multifaceted Spirulina health drink with the aim of targeting diabetic population*”. Apesar disso, por ser a única outra forma de bebida mostrada pelo mapeamento, foi considerada como relevante para que o trabalho não se focasse somente em uma única variedade.

## MÉTODO DE OBTENÇÃO DE BIOMASSA

A taxonomia “**Método de Obtenção de Biomassa**” de Nível Meso abrange as no Nível Micro: Biomassa Comprada e Biomassa Cultivada.

Figura 17 - QUANTIDADE DE ARTIGOS POR TAXONOMIA REPRESENTANDO O NÍVEL MESO “MÉTODO DE OBTENÇÃO DE BIOMASSA”.



Fonte: base SCOPUS; interstício 2009 - 2020.

Os resultados demonstrados na figura 17 mostram que 12 artigos ou 85,7 % das pesquisas realizadas ocorreram com biomassa comprada comercialmente e que apenas 2 artigos mencionavam o cultivo próprio de microalgas.

Novamente, a baixa presença de artigos que realizem a produção de biomassa demonstra a baixa integração entre as etapas de obtenção de biomassa e aplicação do bioproduto.

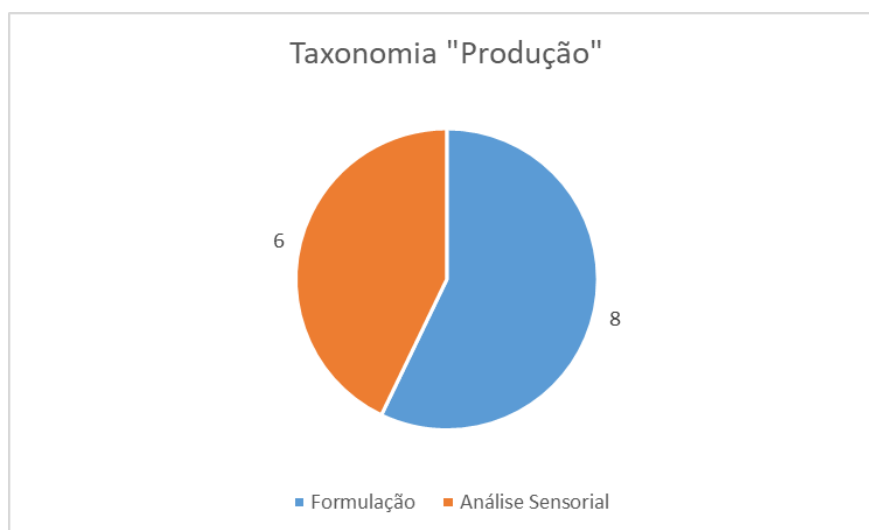
A integração entre processos, de maneira geral, é algo desejável para a formulação de um produto. Porém, em etapas iniciais de desenvolvimento de uma nova oportunidade, a obtenção da matéria prima pode ser feita externamente por diversos motivos. No caso da biomassa de *S. maxima*, tem-se um produto amplamente disponível devido a presença de grandes produtores, como a China. Concernente ao descrito, as despesas para obtenção de matéria prima podem ser menores quando comprada pronta do que quando produzida em escala de

laboratório, onde geralmente são utilizados meios de cultivo complexos contendo reagentes, sais e nutrientes de maior custo.

### PRODUÇÃO DE BEBIDAS

A Figura 18 ilustra a divisão e participação das duas classificações oriundas da taxonomia Meso “Produção de Bebidas”. A primeira, “*Formulação*” foi observada em 8 artigos e agrupava os que de alguma maneira mostravam novas receitas para produtos contendo *Spirulina* e não produtos já prontos em que a biomassa era somente adicionada à fórmula já existente. Em caráter de exemplificação, o artigo indiano “*Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of Spirulina and its characterization*” realizava o preparo do iogurte no laboratório e com receita própria, enquanto o trabalho originado em Portugal, “*Spray-dried Spirulina platensis as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions*”, utilizava um iogurte comprado em supermercado para adição de *Spirulina*.

Figura 18 - FREQUÊNCIA DAS TAXONOMIAS PARTICIPANTES DA MESO “PRODUÇÃO”.



Fonte: base SCOPUS; período 1975 - 2020.

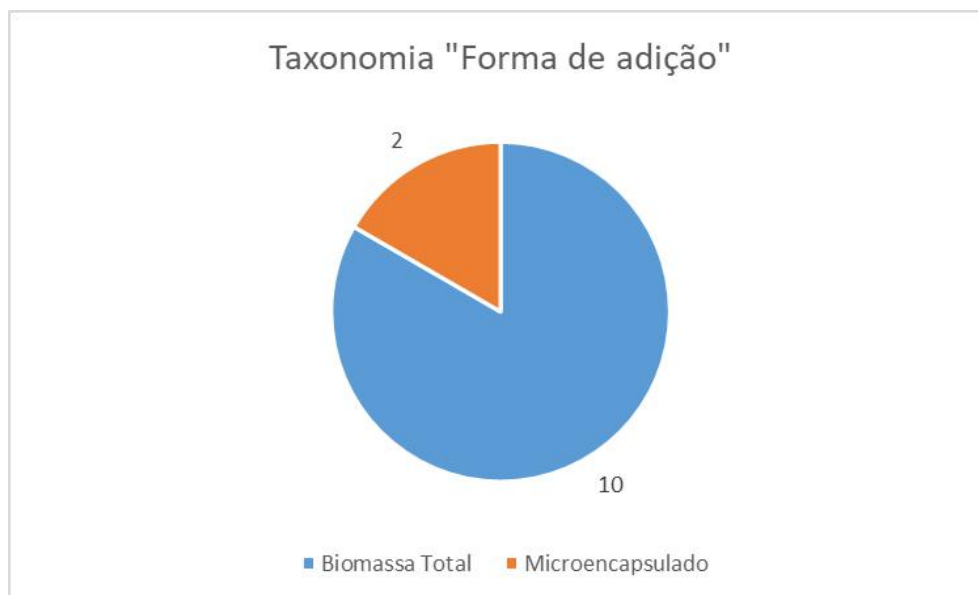
Já “*Análise Sensorial*” foi focada em artigos que realizaram avaliações com público para determinação de características sensoriais como gosto, cheiro, aspecto e textura do produto estudado. Como exemplo, o artigo iraniano “*Effects of Chlorella vulgaris and Arthrospira platensis addition on viability of probiotic bacteria*

*in yogurt and its biochemical properties*” realizou testes sensoriais, aleatórios e em duplicata com indivíduos treinados pelo *National Nutrition and Food Technology Research Institute* (Tehran, Irã), seguidos de análise estatística dos resultados. Nos estudos que aplicavam esse tipo de avaliação, foram obtidos resultados semelhantes, onde o produto teve boa recepção até determinada concentração de biomassa adicionada, que variava caso a caso, e para concentrações maiores era rejeitado.

### FORMA DE ADIÇÃO

A presente Meso foi dividida em dois níveis de classe Micro: "Biomassa Total" e "Microencapsulado". De acordo com a Figura 19, os níveis compartilharam a participação na presente Meso com 10 (83,3 %) arquivos para "Biomassa Total", e 2 (16,7 %) artigos para "Microencapsulado".

Figura 19 – COMPARAÇÃO DA ATUAÇÃO DE CADA TAXONOMIA NA MESO “FORMA DE ADIÇÃO”.



Fonte: base SCOPUS; interstício 2009 - 2020.

Como ilustrado, percebe-se que a maior tendência para adição de *Spirulina* em bebidas é simplesmente a forma de biomassa total seca, enquanto o microencapsulamento se mostrou um método relativamente novo na área. Nesse contexto, é possível dizer que, apesar da facilidade da adição total de biomassa,



essa técnica mostra alguns obstáculos sensoriais para aceitação do produto. Sendo assim, conclui-se que é viável a introdução de mais produtos utilizando a biomassa encapsulada como forma de inovação e de contornar as dificuldades citadas anteriormente.

Conforme citado, o aproveitamento de uma biomassa altamente proteica em bebidas traz consigo uma série de desafios sensoriais. Bebidas em geral, passam por diversas condições durante todo seu processo produtivo, desde a linha de produção, até a disponibilização nas prateleiras. Por serem expostos a diferentes temperaturas e condições de irradiação luminosa durante as várias etapas de transporte, os produtos necessitam de alta estabilidade em sua composição, para que entreguem ao consumidor as características desenvolvidas em fábrica.

Em produtos que envolvem a presença de proteínas em fase líquida, a estabilidade seria o principal gargalo para a entrega dos benefícios e características desejadas para as bebidas. Dada a alta sensibilidade que a solubilidade de proteínas possui em relação à temperatura e pH, um processo de produção e transporte que possua grandes variações de exposição ao calor e luminosidade levaria a entrega de bebidas com textura, gosto e visual alterados devido a precipitação das macromoléculas proteicas.

## 5.2 CONTEÚDO PROTEICO DA MICROALGA *SPIRULINA MAXIMA* CULTIVADA

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para análise de proteína total da biomassa algácea. A análise foi feita em triplicata e a média mostra que a biomassa apresenta aproximadamente 70% de proteína na biomassa seca.

Tabela 11 – AVALIAÇÃO DA BIOMASSA SECA DA MICROALGA SPIRULINA MAXIMA EM TERMOS DE PROTEÍNA TOTAL.

<b>Etapa de cultivo</b>	<b>Composição proteica (g/ 100 g de biomassa)</b>
Propagação de inóculo em Erlenmeyer de 250 mL	69,8
Propagação de inóculo em Carboi de 7 L	69,9
Cultivo em tanque aerado de 50 L	69,9
<b>Média</b>	<b>69,87 ± 0,06</b>

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média ± desvio padrão de três amostras oriundas de cultivos independentes.

É possível notar que o valor se manteve praticamente inalterado em amostras de cultivos distintos, mostrando que o procedimento de obtenção de biomassa tem certa reprodutibilidade no quesito de produção de proteína total, fator importante para elaboração de um processo de maior escala.

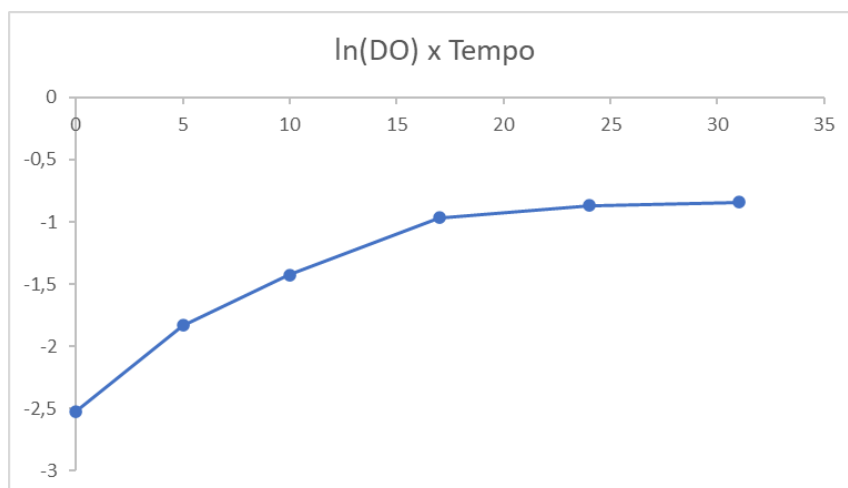
O cultivo realizado em tanque aerado de 50 L foi analisado também quanto ao seu crescimento, sendo esse avaliado em curva de  $\ln(DO)$  x tempo, onde foi calculada sua taxa específica de crescimento ( $\mu$ ).

Durante o experimento, a DO referente ao cultivo em tanque aerado tornou-se estacionária por volta do 25º dia em um valor de 0,45, estando muito distante do valor de 1,0 esperado (Da Silva, 2019; De Souza, 2021). Tal fato foi refletido na figura 20, onde o valor final esperado para o cultivo em termos de  $\ln(DO)$  era 0. As causas para a estagnação do crescimento celular no tanque requerem mais experimentos para investigação, porém podem estar relacionadas a um controle deficiente de temperatura do meio, assim como devido à baixa aeração do sistema. Outro possível impacto ao crescimento pode ter sido causado por intensidade luminosa insuficiente no reator.

Apesar do crescimento celular não ter atingido o valor esperado, nota-se a partir da análise do conteúdo proteico que a concentração de proteínas não se alterou entre os cultivos realizados em escalas menores, indicando que as possíveis falhas

listadas impactam a cinética do crescimento sem alterar a produção de proteína pelas células.

Figura 20 – CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *SPIRULINA MAXIMA* EM MEIO AO E VOLUME DE CULTIVO DE 50 L, A 30 °C E SOB IRRADIÂNCIA DE 120  $\mu\text{MOL FÓTONS} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$  NA DENSIDADE CELULAR INICIAL (DOI) 0,1



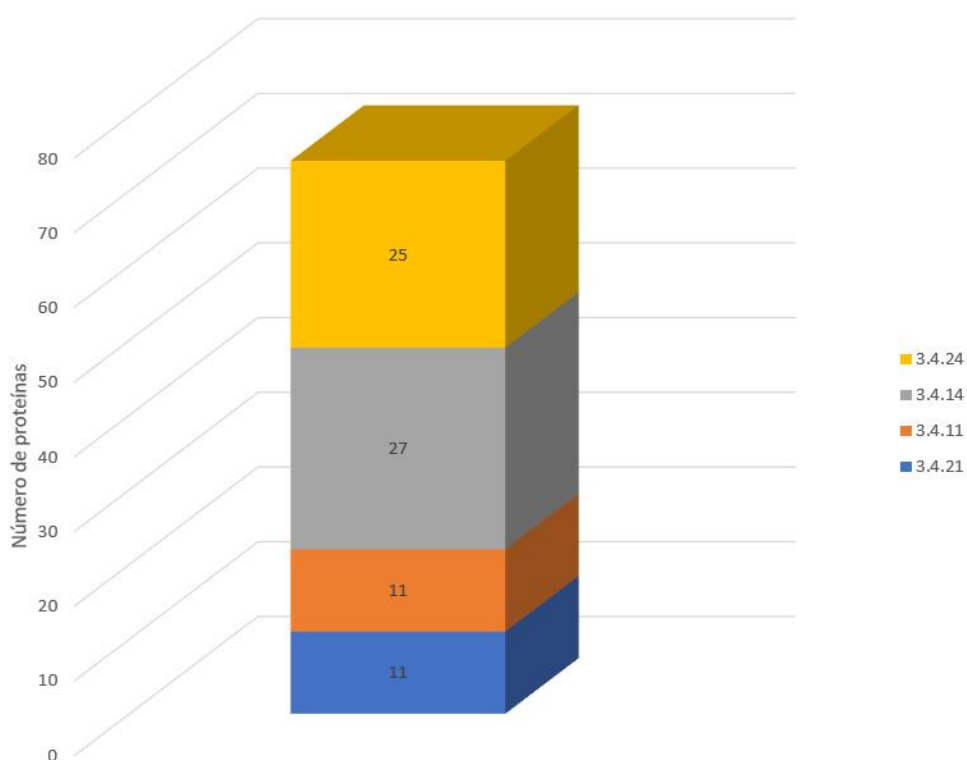
A partir do cálculo da tangente nos pontos de crescimento exponencial do gráfico apresentado na figura 20, foi possível a avaliação da taxa específica de crescimento  $\mu$  ( $\text{dia}^{-1}$ ) durante a fase exponencial de crescimento, sendo estimada como 0,16  $\text{dia}^{-1}$ . O gráfico mostra que não houve fase LAG, o que revela que os pré-inóculos foram eficientes nesse quesito. Os primeiros cinco dias de cultivo correspondem a fase exponencial do crescimento, sendo que após o quinto dia, iniciou-se a fase de desaceleração, onde o crescimento diminuiu gradualmente. Como indicado, após o 30º dia, o cultivo atinge sua fase estacionária, sendo então cessado o crescimento celular.

Em caráter adicional, caso uma planta de produção de biomassa fosse projetada com base nos dados obtidos para o crescimento, o tempo de cultivo escolhido para o cálculo do número de dornas na instalação seria 15 dias. Tal valor representa a transição entre a fase de desaceleração e a fase estacionária, com a estabilização do crescimento. Para aumentar a precisão na escolha do tempo utilizado, o experimento pode ser refeito com acompanhamento diário em contrapartida aquele realizado a cada 5 dias.

### 5.3 ANÁLISE DAS ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Como descrito anteriormente, 4 árvores filogenéticas foram formuladas, sendo uma para cada classe enzimática presente no mapeamento inicial. Sendo assim, a figura 22 resume a quantidade de proteínas em cada árvore, por número de classe enzimática. É possível notar uma predominância de enzimas da classe das dipeptidil-peptidases (3.4.14) e metaloendoproteases (3.4.24).

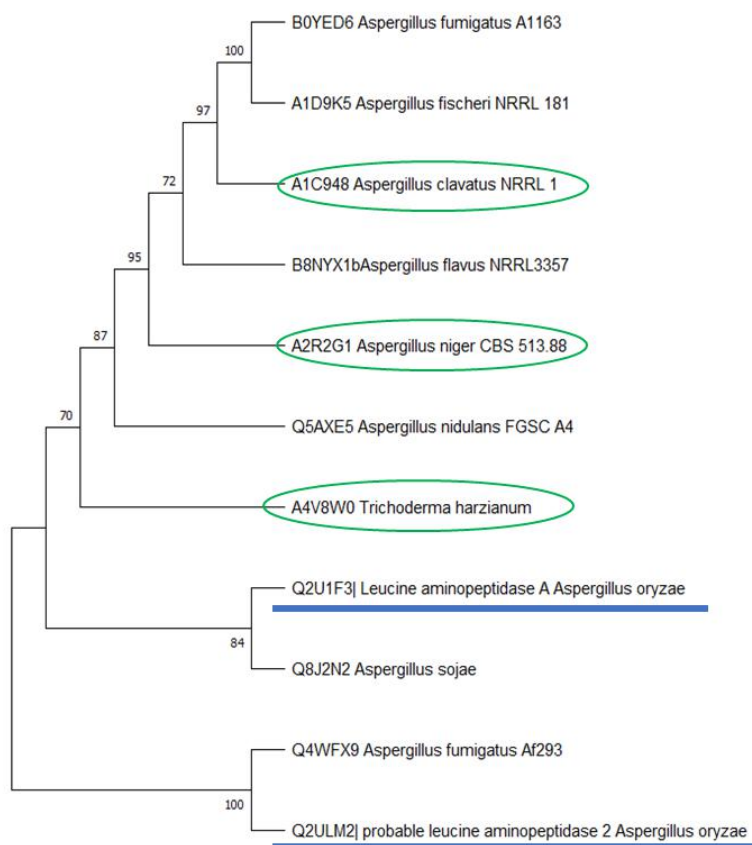
Figura 21 – NÚMERO DE PROTEÍNAS ANALISADAS POR ÁRVORE FILOGENÉTICA



Partindo para a análise das árvores filogenéticas, a figura 23 representa as enzimas enquadradas no EC number 3.4.11 (Aminopectidases). Para facilitar a interpretação, tanto da árvore a seguir como das próximas, as enzimas de referência foram sublinhadas de azul, enquanto as disponíveis para teste em laboratório estão envolvidas em verde. Os elementos de cada árvore foram representados pelo nome

de seu organismo produtor, de maneira a facilitar a comparação com o banco de dados do laboratório.

Figura 22 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE AMINOPEPTIDASES (3.4.11)



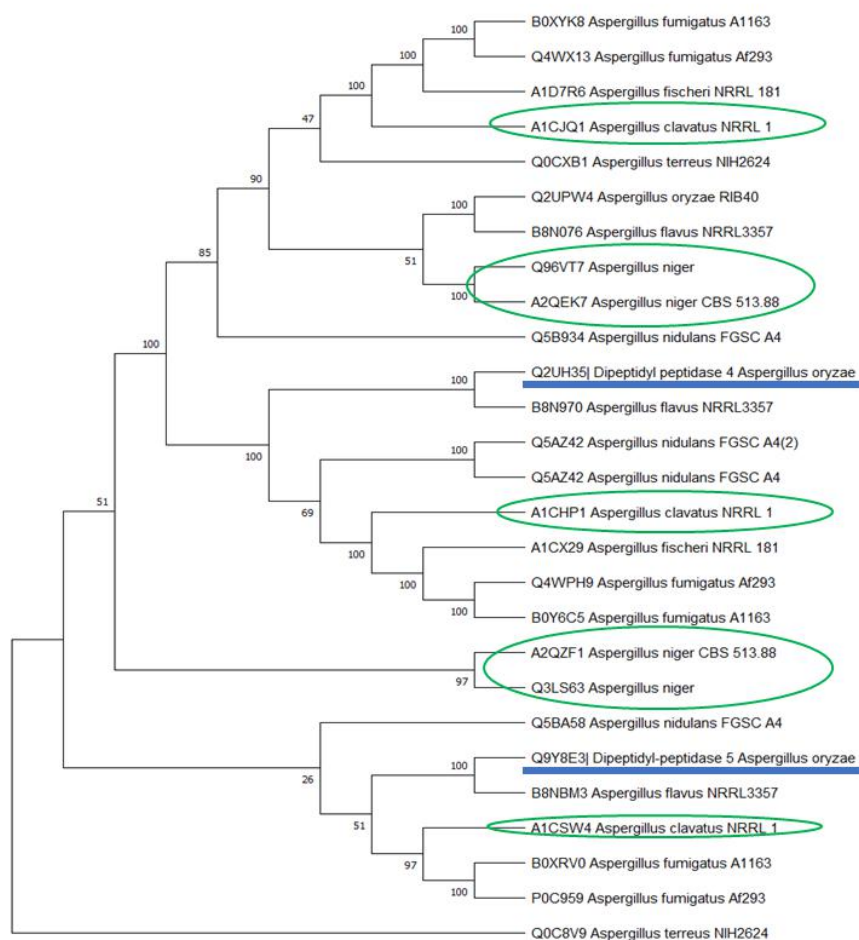
Fonte: Elaboração própria

Para essa classe enzimática, os organismos produtores que se destacam pela proximidade com aqueles geradores das enzimas comerciais são: *Aspergillus sojae* e *Aspergillus fumigatus*. O segundo não poderia ser considerado para etapas posteriores, mesmo que disponível em laboratório, já que é um fungo patógeno causador de aspergilose (LATGÉ, 1999).

Os fungos produtores disponíveis em laboratório com maior probabilidade de possuírem atividades enzimáticas semelhantes às comerciais, para a classe das aminopeptidases são: *A. clavatus*; *A. niger*; *T. harzianum*.

Para a árvore seguinte, representativa da classe de dipeptidil-peptidases (3.4.14) temos o seguinte cenário na figura 24:

Figura 23 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE DIPEPTIDIL-PEPTIDASES (3.4.14)

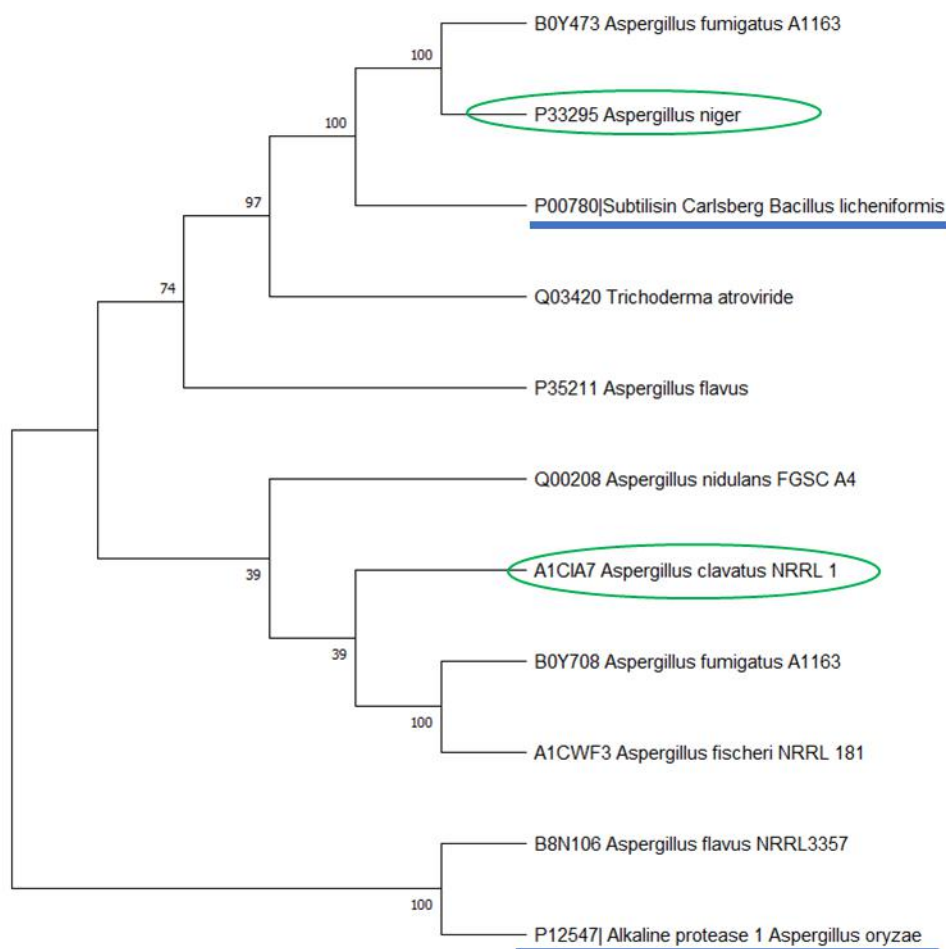


Fonte: Elaboração própria

Nesse caso, as enzimas com possível atividade enzimática mais próxima das comerciais são ambas produzidas por *A. flavus*. Das cepas disponíveis em laboratório, aquelas que possuem maior probabilidade de terem atividade sobre o substrato de interesse são oriundas de *A. niger* e *A. clavatus*.

Continuando a análise para enzimas da classe de serinoendopeptidases (3.4.21), a figura 25 representa a distribuição dos 11 componentes dessa árvore:

Figura 24 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE SERINOENDOPEPTIDASES (3.4.21)

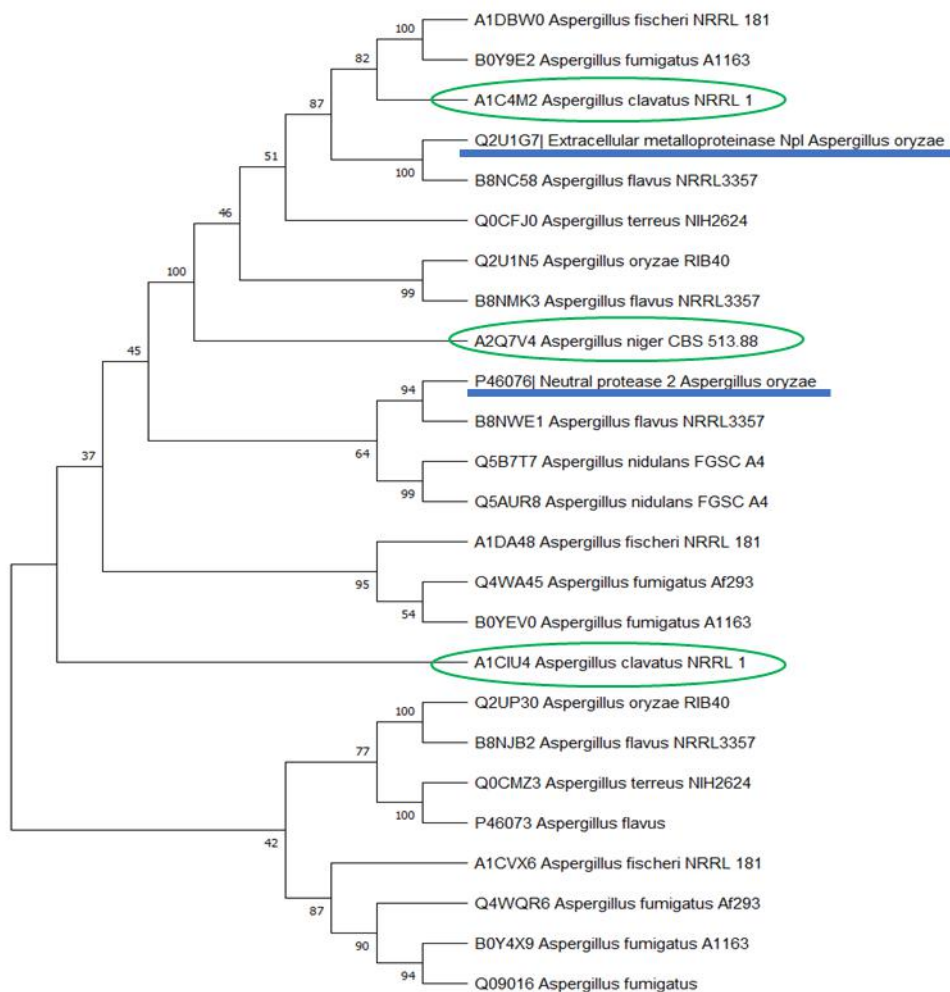


Fonte: Elaboração própria

Para a árvore mostrada, as proteases mais semelhantes sendo produzidas novamente pelo organismo *A. flavus* além de *A. niger*. É interessante notar que para essa classe, um dos organismos disponíveis em laboratório é o *A. niger*, um dos produtores mais próximos daqueles comerciais, como ilustrado. Além dele, existe a disponibilidade de utilização de *A. clavatus*.

Seguindo para a última árvore, englobando a classe enzimática 3.4.24 (metaloendopeptidases), temos 25 elementos presentes, como mostra a figura 26.

Figura 25 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE METALOENDOPEPTIDASES (3.4.24)



Fonte: Elaboração própria

Para a última classe enzimática analisada, as duas enzimas de referência se encontram mais próximas daquelas produzidas por *A. clavatus* e *A. niger*. Isso é um ponto positivo, já que ambos se apresentam disponíveis para ensaios em laboratório.

Em resumo às conclusões obtidas com o estudo filogenético,

### 5.3.1 Mapeamento de meios de cultivo

Como mencionado, a partir dos organismos produtores de enzimas comerciais e de suas enzimas sequenciadas, foi realizado um levantamento sobre



os meios de cultivo usados. A Tabela 13 resume os dados encontrados, categorizando em fontes de carbono e nitrogênio.

Tabela 12 – RESUMO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS

Protease	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	pH	Temperatura	Referência
<b>P00780</b>	glicose	caseinato de sódio; farinha de soja; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	6,8	39,5 °C	Van Putten, 1996
<b>Q2U1F3</b>	glicose	extrato de levedura; polipeptona; $\text{NaNO}_3$	5,5	não informada	Matsushita-Morita, 2011
<b>Q2ULM2</b>	maltodextrina	farinha de soja	6,5	34 °C	Blinkovsky, 2000
<b>Q2UH35</b>	dextrose	glúten de trigo; hidrolisado de glúten de trigo; $\text{NaNO}_3$	6,5	36 °C	Doumas, 1998
<b>Q9Y8E3</b>	não informada	colágeno	não informada	não informada	Beauvais, 1997
<b>Q2U1G7</b>	glicose	extrato de levedura; $\text{NaNO}_3$	não informada	30 °C	Punt, 1992
<b>P46076</b>	farelo de trigo	soja prensada desengordurada	não informada	31 °C	Tatsumi, 1991
<b>P12547</b>	não informada	soja prensada desengordurada	não informada	não informada	Tatsumi, 1989

A partir do levantamento de informações, foi possível notar que, em sua maioria, as fontes de carbono utilizadas para produção de enzimas proteolíticas são de natureza simples, como glicose ou dextrose. Em contrapartida, as fontes de nitrogênio utilizadas, tem caráter mais complexo, como glúten, extrato de levedura ou peptona. Esse padrão indica que, para maior produção de proteases, o

organismo precisa se encontrar em um ambiente com baixa disponibilidade imediata de nitrogênio, induzindo assim maior produção dessas enzimas. Em caráter adicional, o pH descrito na literatura se encontra na faixa ácida, variando entre 5,5 e 6,5, e sua temperatura variando entre 30 e 40°C.

Com base nessas informações, a Tabela 11 mostra a proposta de meio de cultivo inicial para as futuras etapas experimentais de planejamento experimental.

Tabela 13 – PROPOSTA INICIAL DE MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS

<b>Componente do meio de cultivo</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Nitrato de Sódio ( $\text{NaNO}_3$ )	1,2
Fostato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	3,0
Fostato dibásico de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	6,0
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,2
Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,05
Sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,0016
Sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,0014
Sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,005
Cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,020
<b>Peptona + Extrato de levedura</b>	<b>14 (7+7)</b>
<b>Glicose</b>	<b>20</b>

Fonte: BRECCIA *et al.*, 1995 (modificado)

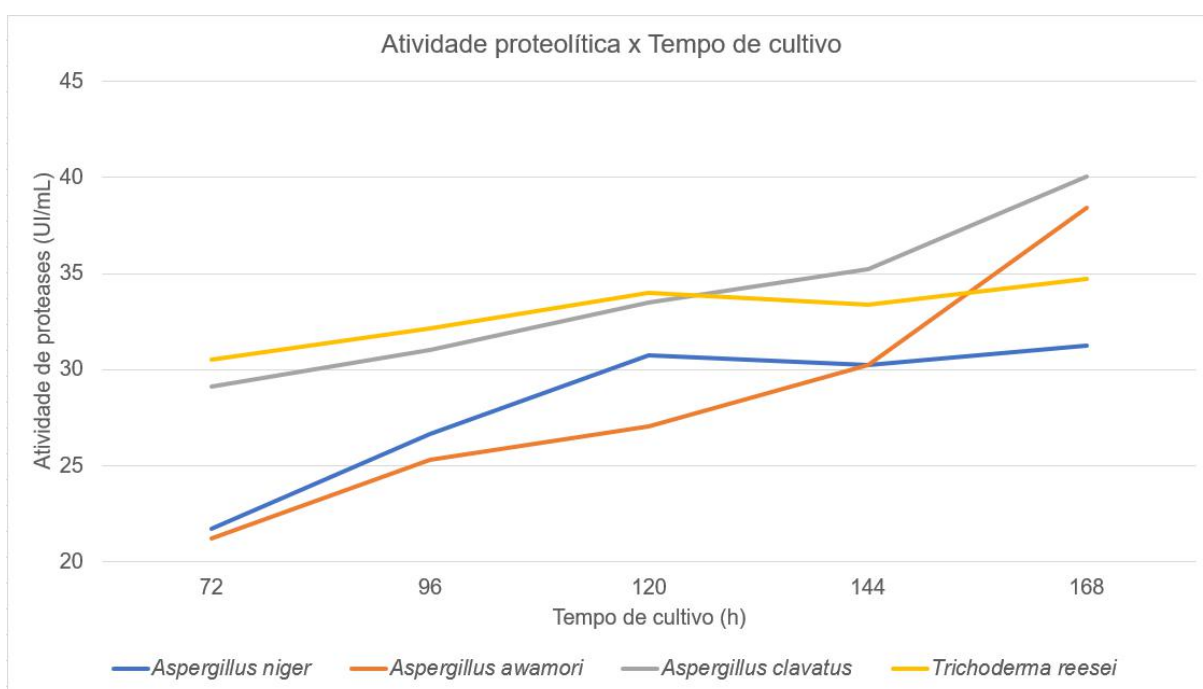
#### 5.4 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS CULTIVOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Seguindo a lógica apresentada no capítulo introdutório do trabalho, a biomassa de *S. maxima* foi cultivada com o objetivo de ser armazenada e tornar-se insumo

para um processo de hidrólise enzimática utilizando proteases de origem fúngica. A produção de tais enzimas neste trabalho foi obtida com os resultados expostos a seguir.

Durante os 7 dias de cultivo avaliados dos quatro fungos selecionados, alíquotas foram retiradas diariamente e analisadas de acordo com o protocolo mencionado no capítulo anterior. Os resultados foram dispostos na figura 21, a seguir.

Figura 26 – ACOMPANHAMENTO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS MEIOS DE CULTIVO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS SELECIONADOS



Ao analisar o gráfico, é possível notar algumas diferenças entre os perfis de atividade. Os cultivos de *A. niger* e *T. reesei* aparentam ter atingido um patamar de atividade proteolítica e, por consequência, de produção de enzimas proteolíticas. Em contrapartida, os cultivos de *A. awamori* e *A. clavatus* indicam que mais dias de análise seriam necessários para determinar o tempo de maior produtividade enzimática.

Os valores máximos de atividade obtidos em cada um dos quatro cultivos foram: 31,2 U/mL (*A. niger*); 38,4 U/mL (*A. awamori*); 40,1 U/mL (*A. clavatus*); 34,7 U/mL (*T. reesei*). A cepa utilizada do fungo *A. niger* apresenta-se como candidata para produção de proteases no processo final da obtenção de bebidas. Alguns

fatores que determinam a escolha feita são: Os resultados obtidos a partir da análise filogenética mostram que as proteases produzidas pelo *A. niger* possuem proximidade estrutural com as enzimas comerciais utilizadas no processamento de *S. máxima*, resultando em uma maior probabilidade de possuírem atividade sobre a biomassa; As proteases produzidas pelo *A. niger* possuem autorização da organização estadunidense *Food and Drugs Administration* (FDA) para aplicação em alimentos, representando uma menor barreira para requisitos legais na formulação de alimentos; Apesar de não apresentar a maior atividade enzimática dentre os quatro cultivos realizados, o cultivo de *A. niger* atingiu o patamar de produção para as condições utilizadas no menor tempo, sendo um fator determinante para o cálculo de produtividade de uma planta industrial.

De Souza (2015) encontrou valores de atividade para fungos diversos em meio de cultivo não otimizado, dentre eles *A. foetidus* apresentou o maior valor de atividade, chegando a 40,13 U/mL. Esse número pode ser utilizado como um valor de comparação, já que a maioria dos fungos utilizados no presente trabalho são do gênero *Aspergillus* e o substrato utilizado para determinação da atividade também foi azocaseína. Com isso, é possível concluir que os resultados encontrados se enquadram com aqueles demonstrados na literatura, sendo o próximo passo a utilização de métodos estatísticos para otimização do meio de cultivo utilizado, de maneira a aumentar a produtividade de proteases.

Com o intuito de obter uma maior variedade de comparação para as atividades obtidas, um levantamento de referências foi realizado, tomando como base os artigos produzidos pelo grupo do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM/UFRJ), já que o protocolo de dosagem de atividade proteolítica utilizado no presente estudo é o mesmo utilizado por esse grupo de pesquisa. A Tabela 12 resume os dados obtidos.

Tabela 14 – RESUMO DE REFERÊNCIAS PARA ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DE FUNGOS FILAMENTOSOS E FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO UTILIZADAS

<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Fontes C/N</b>	<b>Referência LABIM</b>
56	<i>Streptomyces sp. 540</i>	Melaço/Casitona	Azeredo <i>et al.</i> , 2003

99	<i>Streptomyces</i> <i>sp. 594</i>	Melaço/Casitona	Azeredo <i>et al.</i> , 2004
12	<i>Bacillus subtilis</i>	Azeite/Extrato de levedura/Peptona	Soares <i>et al.</i> , 2005
13,4	<i>Streptomyces</i> <i>sp. 594</i>	Licor de maceração do milho/Farinha de penas	Azeredo <i>et al.</i> , 2006
7,2	<i>Streptomyces</i> <i>sp. 594</i>	Extrato de levedura/Farinha de penas	Azeredo <i>et al.</i> , 2006
6,91	<i>Aspergillus</i> <i>awamori</i>	Torta de babaçu (SSF)	de Castro <i>et al.</i> , 2011
23,17	<i>Aspergillus</i> <i>awamori</i>	Torta de babaçu (SSF)	de Castro <i>et al.</i> , 2014

---

Fonte: Elaboração própria com base nas referências apontadas

Com os números acima, é possível identificar uma faixa de atividades entre 6,91 e 99 U/mL. As atividades obtidas nos cultivos realizados se encontram dentro desses valores, sendo inclusive mais próximas dos valores de 56 e 99 U/mL apresentados. Esses dois valores tratam de artigos de otimização de meio de cultivo, o que nos mostra que o meio utilizado nos ensaios preliminares pode se encontrar próximo de um meio otimizado, sendo um bom ponto de partida para futuras etapas experimentais de planejamento experimental.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- De maneira geral, concluiu-se com o mapeamento tecnológico que a área de aplicação de *Spirulina maxima* em bebidas ainda está em seus estágios iniciais de desenvolvimento, dada a baixa presença de publicações. Em acordo com a afirmação, tem-se um campo rico em oportunidades para o aproveitamento dos diversos benefícios de uma biomassa rica em conteúdo nutricional, principalmente proteico.
- A evolução dos métodos de sequenciamento de DNA e de proteínas tem possibilitado novas abordagens para as inferências de árvores. A maior disponibilidade de sequências de vários organismos em bases

confiáveis, como NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), banco de dados de genomas, e o UNIPROT, para estudos utilizando sequências proteicas, permite que os estudos filogenéticos caminhem em um ritmo cada vez mais acelerado, tornando melhor a compreensão dos conceitos evolutivos.

- Tais informações permitiram a escolha de cepas de fungos filamentosos para as etapas futuras do trabalho com embasamento teórico, direcionando os experimentos com as cepas disponíveis em laboratório. A determinação das espécies de fungos a serem usadas a partir da utilização da análise filogenética aumenta as probabilidades de que as proteases produzidas terão a atividade desejada sobre o substrato de biomassa algal, reduzindo os recursos gastos com experimentos de tentativa e erro.

## 7 CONCLUSÕES

- Pouca presença na literatura de artigos relacionando o uso de *Spirulina maxima* em bebidas;
- Índia na liderança dos artigos publicados sobre o tema;
- Predominância de artigos sobre produção de iogurtes com aplicação da biomassa seca diretamente na matriz;
- Em sua maioria, os estudos utilizam biomassa comprada e são de pequena escala;
- Biomassa cultivada apresenta o mesmo nível proteico em diferentes cultivos, chegando a 69,9 % na biomassa seca;
- Banco de dados contendo 74 enzimas com possível atividade proteolítica sobre biomassa de *Spirulina*;
- Enzimas mais semelhantes às comerciais e com maior probabilidade de possuírem atividade semelhante foram produzidas por: *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. sojae* e *A. niger*;
- Organismos mais semelhantes disponíveis em laboratório: *A. clavatus*, *A. niger* e *T. harzianum*;
- Ensaios preliminares já mostraram a capacidade de produção de proteases por dois dos três fungos disponíveis;

- Produção de proteases atingiu valores máximos de 38,4 U/mL (*A. awamori*) e 40,1 U/mL (*A. clavatus*) para as condições utilizadas;
- A partir da análise feita sobre os meios de cultivo reportados na literatura para a produção de proteases fúngicas, notou-se que, foram utilizadas fontes de carbono utilizadas simples e fontes de nitrogênio complexas, de maneira a favorecer a produção de proteases;
- Em relação as condições de cultivo, foram observados os intervalos de temperatura entre 30 °C e 40 °C e pH ácido de 5,5 a 6,8.

## 8 ETAPAS FUTURAS

- Avaliação de parâmetros que afetam o crescimento de *Spirulina maxima* em tanques aerados de 50 L para melhorar crescimento de biomassa;
- Realização de metodologias de planejamentos experimentais sequenciais ou fracionados (Plackett-Burman - PB e DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional) para aumentar a produtividade de enzimas pelos fungos selecionados;
- Purificação e caracterização enzimática para determinação de seus parâmetros cinéticos, físico-químicos e bioquímicos;
- Aplicação das enzimas purificadas sobre biomassa de *S. maxima* e avaliação do grau de hidrólise;
- Formulação de bebida e condução de análises sensoriais para avaliar aceitação do público.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABIDI, F. *et al.* Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochem**, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- AIBA, Shuichi; OGAWA, Takahira. Assessment of growth yield of a blue—green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. **Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 179-182, 1977.
- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enzym Microb Technol**, v. 26, p. 402–405, 2000.
- ALZHRANI, M. A. J.; PERERA, C. O.; HEMAR, Y. Production of bioactive proteins and peptides from the diatom *Nitzschia laevis* and comparison of their in vitro antioxidant activities with those

- from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 676–682, 2018.
- AMPARO, K. K. S.; RIBEIRO, M. C. O.; GUARIEIRO, L. L. N. Estudo de caso utilizando mapeamento de mapeamento tecnológico como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 195-209, dez. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-99362012000400012>.
- ANDRADE, V. *et al.* Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Braz J Microbiol**, v. 33, p. 106-110, 2002.
- ANDRADE, M. DA R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551–1556, 2008.
- ANWER, R. *et al.* *Spirulina*: possible pharmacological evaluation for insulin-like protein. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 883–889, 2013.
- ANWER, R.; KHURSHEED, S.; FATMA, T. Detection of immunoactive insulin in *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 583–591, 2012.
- ASTOLFI, A. L.; REMPEL, A.; CAVANHI, V. A. F.; ALVES, M.; DEAMICI, K. M.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Simultaneous saccharification and fermentation of *Spirulina* sp. and corn starch for the production of bioethanol and obtaining biopeptides with high antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 301, 2020.
- AYALA, F. Guía sobre el cultivo de *Spirulina*. In: **Biotecnología de Microorganismos Fotoautótrofos**. Motril, Granada, España. p. 3-20, 1998.
- BAE, G. Y.; NOH, D. O.; SUH, H. J. Phycocyanin extraction from spirulina platensis using enzymes. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 4, p. 370–376, 2020.
- BAHRUTH, E. B.; ANTUNES, A. M. S.; BOMTEMPO, J. V. Mapeamento tecnológico na priorização de atividades de CeT. In: **Gestão em Biotecnologia**. Editora E-papers. Rio de Janeiro. p. 300–324, 2006.
- BASTOS, I., FRANÇA, J. V. **Mapeamento tecnológico de microalgas do gênero *Arthrospira* na produção de ficocianina para a indústria**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2021.
- BEAUVAIS, A. *et al.* Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6238–6244, 1997.
- BEHESHTIPOUR, H. *et al.* Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 4, p. 719–728, 2012.
- BELAY, A. *et al.* Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235–241, 1993.
- BELLAOUCHI, R., ABOULOIFA, H., ROKNI, Y. Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **J Genet Eng Biotechnol** 19, 50 (2021)
- BLINKOVSKY, A. M. *et al.* A non-specific aminopeptidase from *Aspergillus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1480, n. 1–2, p. 171–181, 2000.



- BORSCHIVER, S. **TECHNOLOGY ROADMAP – PLANEJAMENTO ESTRATÉGICO PARA ALINHAR MERCADO-PRODUTO-TECNOLOGIA**. Rio de Janeiro: Interciência, 2016.
- BOYLE, M. O. **Mapeamento tecnológico de *Spirulina maxima* para fins nutracêuticos**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2016.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D.J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2010.
- BRECCIA, J. D. *et al.* Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 469-472, 1995.
- BUONO, S.; LANGELLOTTI, A. L.; MARTELLO, A.; RINNA, F.; FOGLIANO, V. Functional ingredients from microalgae. **Food Funct.**, v. 5, n. 8, p. 1669-1685, 2014.
- CAMPANELLA, L.; RUSSO, M. V.; AVINO, P. Free and total amino acid composition in blue-green algae. **Annali Di Chimica**, v. 92, n. 4, p. 343–352, 2002.
- CASTRO, A.M.G. de *et al.* **Cadeias produtivas e sistemas naturais – mapeamento tecnológico**. Brasília: Embrapa. p. 564, 1998.
- CASTRO, A.M.G. de; LIMA, S.M.V.; FREITAS FILHO, A. Estratégias para a institucionalização de mapeamento de demandas tecnológicas na Embrapa. Organizações Rurais e Agroindustriais. **Revista de Administração da UFLA**. v.1, n.2, 1999.
- CHAO *et al.* Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. **J Environ Sci**, v.19, n. 9, p. 1125-1128, 2007.
- CHEN, J. *et al.* Microalgal industry in China: challenges and prospects. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 715–725, 2016.
- CHOUDHURI, S. **Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools**. Academic Press, Estados Unidos da América, 2014.
- CHOUDHURI, S. Fundamentals of Molecular Evolution. **Bioinformatics for Beginners**, p. 27–53, 2014.
- CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P.; & BONOS, E. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 794-799, 2011.
- CHRISTEN, G. L. & MARSHALL, R. T. Selected Properties of Lipase and Protease of *Pseudomonas fluorescens* Produced in Four Media. **J. of Dairy Science**, v. 67, p. 1680-1687, 1984.
- CIFERRI, O. *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 551–578, 1983.
- CLC BIO. **Bioinformatics explained: BLAST**. p. 10, 2007. Disponível em <[www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)>. Acesso em 25 jan. 2021
- COELHO, G. M. Mapeamento tecnológico: metodologias e experiências nacionais e internacionais. Rio de Janeiro: INT, 2003.
- COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 59, n. 1–2, p. 55–59, 2004.
- COSTA, E. S. Tutorial de busca de informação tecnológica em bases de patentes. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS. 86 slides (acompanha texto), 2011.

- DA SILVA JÚNIOR, L. R. Construção e escalonamento de diferentes sistemas de agitação para cultivo de *Spirulina maxima*. 2019. 72 f. Monografica (Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.
- DE AZEREDO, L. A. I. *et al.* Thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 in submerged and solid-state fermentations using feather meal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 641–647, 2006.
- DE AZEREDO, L. A. I. *et al.* Protease Production by *Streptomyces* sp. Isolated from Brazilian Cerrado Soil. **Biotechnology for Fuels and Chemicals**, v. 105, n. 1, p. 749–755, 2003.
- DE AZEREDO, L. A. I. *et al.* Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 3–4, p. 354–358, 2004.
- DE AZEREDO, L. A. I. *et al.* A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. **Current Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 335–339, 2006.
- DE CASTRO, A. M. H. *et al.* Multiresponse optimization of inoculum conditions for the production of amylases and proteases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.
- DE CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Multivariate Optimization and Supplementation Strategies for the Simultaneous Production of Amylases, Cellulases, Xylanases, and Proteases by *Aspergillus awamori* Under Solid-State Fermentation Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1588–1602, 2014.
- DE OLIVEIRA, S. D. Mapeamento tecnológico da produção do ácido succínico a partir de fontes renováveis: perspectivas e desafios. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2014.
- DE SOUZA, P. M. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro. 2015. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2015.
- DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol Biotechnol**, v. 38, n. 1, p. 41-55, 2008.
- DEY, G.; MEYER, T. Phylogenetic Profiling for Probing the Modular Architecture of the Human Genome. **Cell Systems**, v. 1, n. 2, p. 106–115, ago. 2015.
- DOUMAS, A. *et al.* Characterization of the prolyl dipeptidyl peptidase gene (dppIV) from the Koji mold *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4809–4815, 1998.
- FAN, X. *et al.* Purification and identification of anti-obesity peptides derived from *Spirulina platensis*. **Journal of Functional Foods**, v. 47, n. November 2017, p. 350–360, 2018.
- FERNANDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Microalgae: the basis of mankind sustainability. In: MOYA, B. L.; DE GRACIA, M. D. S; MAZADIEGO, L. F. (Eds.). **Case Study of Innovative Projects - Successful Real Cases**. [s.l.] InTech, 2017.
- GAO, C. *et al.* Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 3, p. 437–440, 2008.
- GEISSELER, D.; HORWATH, W. R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. **Soil Biol Biochem**, v. 40, p. 3040-3048, 2008.

- GELLENBECK, K. W. Utilization of algal materials for nutraceutical and cosmeceutical applications — what do manufacturers need to know? **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 309–313, 2012.
- GERMANOA, S. *et al.* Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 246–251, 2003.
- GODFREY, T.; WEST S. **Industrial enzymology**, 1996. 2nd ed. New York, N.Y: Macmillan Publishers Inc. p 609.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M. Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 523-528, 1994.
- GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 - 2027. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesso em: 23 de setembro de 2021.
- GUAN, J. *et al.* Biomass and terpenoids produced by mutant strains of *Arthrospira* under low temperature and light conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, 2017.
- GULDAS, M.; IRKIN, R. Influence of *Spirulina platensis* powder on the microflora of yoghurt and acidophilus milk. **Mljekarstvo**, v. 60, n. 4, p. 237–243, 2010.
- GUPTA, R. *et al.* An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 4, p. 381-95, 2002.
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.
- GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G.; FABILA-CASTILLO, L.; CHAMORRO-CEVALLOS, G. Aspectos nutricionales y toxicológicos de *Spirulina (Arthrospira)*. **Nutricion Hospitalaria**, n. 1, p. 34–40, 2015.
- HABIB, M. A. B.; PARVIN, M. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2008.
- HAJJI, M. *et al.* Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 79, n. 6, p. 915-23, 2008.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour Technol**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.
- HALL, B. G. Building phylogenetic trees from molecular data with *MEGA*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1229–1235, 2013.
- HENNIG, W. *Phylogenetic systematics*. Urbana: **University of Illinois Press**, 1966.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. *et al.* Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2001–2006, 2011.
- HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher, v.2, 2001. cap. 6.

- HMIDET, N. *et al.* Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, p. 71–79, 2009.
- HOSSAIN, M. N. B.; BASU, J. K.; MAMUN, M. The production of ethanol from microalgae *Spirulina*. **Procedia Engineering**, v. 105, p. 733–738, 2015.
- HOSSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231–1237, 2013.
- IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, H. Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH-02 in solid-state fermentation. **Pak. J. Bot.**, v. 39, n. 7, p. 2717-2724, 2007.
- ISLAM, J. M. M. *et al.* Boosting the food functionality (in vivo and in vitro) of *Spirulina* by gamma radiation: an inspiring approach. **International Journal of Food Engineering**, v. 11, n. 4, 2015.
- ISPN, Internacional Code of Phylogenetic Nomenclature, 2020. Acesso < <http://phylonames.org/code/chapters/1/#article-2.1> > em 24/12/2020 às 11:26.
- JACOBS, M. *et al.* Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 24, p. 8913–8926, 1985.
- JAOUADI, B. *et al.* Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. **Biochim**, v. 90, n. 9, p. 1291-305, 2008.
- JENSEN, B. *et al.* Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnol Lett**, v. 24, p. 41-45, 2002.
- JOHNVESLY, B.; NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochem**, v. 37, p. 139–144, 2001.
- JOO, H.; CHANG, C. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1263–1270, 2005.
- KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BIEN, P. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 373–379, 2005.
- KIM, N. H. *et al.* Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 91–95, 2014.
- KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52–63, 2014.
- KRANTHI, V. S.; RAO, D. M.; JAGANMOHAN, P. Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. **Int J Microbiol Res**, v. 3, n. 1, p. 12-15, 2012.
- KUCERA, M. The Production of Toxic Protease by the Entomopathogenous Fungus *Metarhizium anisopliae* in Submerged Culture. **J Invertebr Pathol**, v. 38, p. 33-38, 1981.
- KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol Adv**, v. 17, p. 561–594, 1999.
- KUMAR, S. *et al.* Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochem**, v. 40, p. 1701–1705, 2005.

- KUMAR, P. *et al.* Nutritional Contents and Medicinal Properties of Wheat: A Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 2011, p. 1-10, 2011.
- KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food Chem**, v. 131, p. 1295–1303, 2012.
- KUPFER, D.; TIGRE, P. B. Mapeamento tecnológico. In: **Modelo SENAI de mapeamento: documento metodológico**. CARUSO, L. A.; TIGRE, P. B. (Coord.) Montevideo: CINTERFOR/OIT (Papeles de la Oficina Técnica, 14). p. 77, 2004.
- KWAK, J. H. *et al.* Beneficial immunostimulatory effect of short-term *Chlorella* supplementation: enhancement of Natural Killer cell activity and early inflammatory response (Randomized, double-blinded, placebo-controlled trial). **Nutrition Journal**, v. 11, n. 1, 2012.
- LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310–350, 1999.
- LAXMANAN, S. *et al.* CD40: a mediator of pro- and anti-inflammatory signals in renal tubular epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 9, p. 2714-23, 2005.
- LEE, J. *et al.* *Spirulina* extract enhanced a protective effect in type 1 diabetes by anti-apoptosis and anti-ROS production. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1363, 2017.
- LI, D.; YANG, Y.; SHEN, C. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycol. Res.**, v. 101, n. 1, p. 18-22, 1997.
- LI *et al.*, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Comput Struct Biotechnol J**, 2012. 2:1–11.
- LISBOA, C. R. *et al.* Utilisation Of *Spirulina* sp. And *Chlorella pyrenoidosa* Biomass For The Production of Enzymatic Protein Hydrolysates. **Int. Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 5, p. 29-38, 2014.
- LODS *et al.*, The future of enzymes in cosmetics, 2000. Apr. **Int J Cosmetic. Sci.**; 22(2):85-94.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LU, J. *et al.* Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7166–7171, 2010.
- MACCHIONE, M. M. *et al.* Protease production by different thermophilic fungi. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 146, n. 1-3, p. 223-30, 2008.
- MAHAJAN, Raghunath Totaram; BADGUJAR, Shamkant Bhaskar. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. **Journal Of Pharmacy Research**, Maharashtra, India, v. 3, n. 9, p. 2048-2068, set. 2010.
- MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, n. 3, p. 712-6, 1991.
- MATSUSHITA-MORITA, M. *et al.* Overexpression and characterization of an extracellular Leucine Aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 557–564, 2011.
- MAYERHOFF, Z.D.V.L. **Uma análise sobre os estudos de Mapeamento tecnológico**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Propriedade Industrial, 2008.

- MAZOKOPAKIS, E. E. *et al.* The hypolipidaemic effects of Spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation in a Cretan population: a prospective study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 432–437, 2014.
- MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W20–W25, 1 jul. 2004.
- MERHEB, C. W. *et al.* Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chem**, v. 104, p. 127–131, 2007.
- MERZ, M. *et al.* Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5682–5693, 2015.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, 2009. Jan – Jun. v 3. p. 9-23. SENAI.
- MORAIS, M. G. *et al.* Pilot scale semicontinuous production of Spirulina biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60–64, 2009.
- MORRIS, H. J. *et al.* Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 456-460, 2007.
- MORRIS, H. J. *et al.* Oral Administration of an Enzymatic Protein Hydrolysate from the Green Microalga *Chlorella vulgaris* Enhances the Nutritional Recovery of Malnourished Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1583-1589, 2011.
- MOTA, M. F. S. *et al.* Colorimetric protein determination in microalgae (Chlorophyta): association of milling and SDS treatment for total protein extraction. **Journal of phycology**, v. 54, n. 4, p. 577-580, 2015.
- NICOLETTI, M. Microalgae nutraceuticals. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 54, 2016.
- The Novozyme's Report 2019. 2019. Disponível em < <https://report2019.novozymes.com/>>. Acesso em 12 out. 2020
- NOVOZYME. **Novozymes – Repensando o amanhã.** Disponível em: <<http://www.novozymes.com/pt/novozymes-in-latinamerica>>. Acesso em: 15 nov. 2020.
- O'DONNELL, D. *et al.* Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. **Biochem Eng J**, v. 8, p. 187–193, 2001.
- OCDE, **Manual de Oslo**: Diretrizes para a coleta e interpretação de dados sobre inovação tecnológica. 3ª Edição, OECD Publications, Paris, 2005.
- PAMBOUKIAN, C. R. D. **Produção do antitumoral rentamicina por *Streptomyces olindenses* em processos descontínuos.** 2003. (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia, USP
- PANAHI, Y. *et al.* Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* supplementation on the modulation of oxidative stress in apparently healthy smokers. **Clinical Laboratory**, v. 59, n. 5–6, p. 579–587, 2013.
- PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, K. N.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 309, p. 123317, ago. 2020. Elsevier BV.

- PATEL, P. *et al.* Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of *Spirulina* and its characterization. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 8, p. 3721–3731, 2019.
- PEREIRA, A. M. *et al.* Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions. **J. Food Sci. Technol.**, v. 56, p. 4543-4551, 2019.
- PETERSON, D. M. Composition and Nutritional Characteristics of Oat Grain and Products. **Oat Science and Technology**, v. 33, p. 265-292, 1992.
- PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae – A review. **J. Algal Biomass Utiln.**, v.3, n. 4, p. 89–100, 2012.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.
- VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J.; VAN GORCOM, R. F. M. Production of extracellular proteins by the filamentous fungus *Aspergillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 61, n. 2, p. 153–160, fev. 1992.
- QUEIROZ, Alan De; GATESY, John. The supermatrix approach to systematics. **Trends in Ecology & Evolution**, PMID: 17046100, 17046100, v. 22, n. 1, p. 34–41, 1 jan. 2007.
- QING, L. *et al.* Commercial proteases: Present and future. **Febs Letters**, 2013.
- RAMAMOORTHY, A.; PREMAKUMARI, S. Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients. **JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY - MYSORE-**, v. 33, n. 2, p. 124–127, 1996.
- RAMAMURTHY, V.; UPADHYAY, C. M.; KOTHARI, R. M. An optimized protocol for the preparation and application of acid protease. **J Biotechnol**, v. 21, p. 187-196, 1991.
- RANI, K. *et al.* Review on latest overview of proteases. **International Journal of Current Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 12-18, 2012.
- RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAGAN, M. A. Phylogenetic inference based on matrix representation of trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, PMID: 1342924, v. 1, n. 1, p. 53–58, mar. 1992.
- RICHMOND, A. *et al.* Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. **Journal Of Applied Phycology**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 195-206, set. 1990. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02179776>.
- ROKAS, A. Phylogenetic analysis of protein sequence UNIT 19.11 data using the Randomized Accelerated Maximum likelihood (RAXML) program. **Current Protocols in Molecular Biology**, n. SUPPL.96, p. 1–14, 2011.
- ROSS, Howard A.; RODRIGO, Allen G. An Assessment of Matrix Representation with Compatibility in Supertree Construction. **Computational Biology**. Springer Netherlands, 2004. p. 35–63.
- ROY, S. S.; DASGUPTA, R.; BAGCHI, A. A Review on Phylogenetic Analysis: A Journey through Modern Era. **Computational Molecular Bioscience**, v. 04, n. 03, p. 39–45, 2014.
- RYU, N. H. *et al.* Impact of daily *Chlorella* consumption on serum lipid and carotenoid profiles in mildly hypercholesterolemic adults: a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, 2014.

- RZYMSKI, P.; JAŚKIEWICZ, M. Microalgal food supplements from the perspective of Polish consumers: patterns of use, adverse events, and beneficial effects. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 4, p. 1841–1850, 2017.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**, Editora Eventos: Rio de Janeiro, 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, PMID: 3447015, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1 jul. 1987.
- SAKAMOTO, T. Ferramentas para análise filogenética e de distribuição taxonômica de genes ortólogos. **Dissertações e Teses**, p. 114, 2016.
- SANDERSON, M. J.; PURVIS, A.; HENZE, C. Phylogenetic supertrees: Assembling the trees of life. **Trends in Ecology & Evolution**, PMID: 21238221, v. 13, n. 3, p. 105–109, mar. 1998.
- SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. DE. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.
- SANTOS, M. *et al.* Mapeamento de tecnologias de futuro: métodos, técnicas e abordagens. **Parcerias Estratégicas**, n. 19, p. 189-229, 2004.
- SAVITHA, S. *et al.* Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **J Taiwan Inst Chem Eng**, v. 42, p. 298–304, 2011.
- SCHLÖSSER, U. G. SAG - Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen Catalogue of Strains 1994. **Botanica Acta**, v. 107, n. 3, p. 113–186, jun. 1994.
- SCHMIDT, C. G. & SALAS-MELADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1144-1150, 2009.
- SECTES/CEDEPLAR. **Metodologia de Mapeamento tecnológico** – Projeto oportunidades ao desenvolvimento sócio-econômico e desafios da ciência, tecnologia e da inovação em Minas Gerais. Belo Horizonte – MG, 2009.
- SHAN, L. *et al.* Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **Biochem J**, v. 383, n. Pt 2, p. 311-8, 2004.
- SHAN, L. *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, n. 5590, p. 2275-9, 2002.
- SIGMA-ALDRICH. Catálogo de proteases. 2020. Disponível em <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=protease&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt&region=BR&focus=product>>. Acesso em 02 de maio de 2020.
- SILVA, S, P.; VALLE, A. F.; PERRONE, D. Microencapsulated Spirulina maxima biomass as an ingredient for the production of nutritionally enriched and sensorially well-accepted vegan biscuits. **Lwt**, [S.L.], v. 142, p. 110997, maio 2021. Elsevier BV.
- SIM *et al.*, Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. **Biotechnol Lett**, 2000. Jan. v 22, Issue 2, pp 137–140.
- SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 781–785, 2001.
- SOARES, V. F. *et al.* High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 121, n. 1–3, p. 311–319, 2005.



- SOKAL, R. R. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Univ Kans SciBull**, v. 38, p. 1409–1438, 1958.
- SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. *Scientific American*, v. 215, p. 106–116, 1966.
- SOUZA, P. M. DE. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro. p. 125, 2015.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 1 out. 2011.
- TATSUMI, H. *et al.* Cloning and expression in yeast of a cDNA clone encoding *Aspergillus oryzae* neutral protease II, a unique metalloprotease. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 228, n. 1–2, p. 97–103, ago. 1991.
- TATSUMI, H. *et al.* A full-length cDNA clone for the alkaline protease from *Aspergillus oryzae*: Structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 219, n. 1–2, p. 33–38, out. 1989.
- TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.
- TEXEIRA, L. P. Mapeamento tecnológico: importância, métodos e experiências da Embrapa Cerrados. **Embrapa Cerrados - Documentos 317 (INFOTECA-E)**, p. 34, 2013.
- TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M. V. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 4, p. 1479–87, 2008.
- TORRES-DURÁN, P. V. *et al.* Effect of *Spirulina maxima* on postprandial lipemia in young runners: a preliminary report. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 8, p. 753–757, 2012.
- TOYOSHIMA, M. *et al.* A pilot-scale floating closed culture system for the multicellular cyanobacterium *Arthrospira platensis* NIES-39. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 6, p. 2191–2202, 2015.
- TRABELSI, L. *et al.* Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 1, p. 27–31, 2009.
- Universidade de Aveiro. **Seleção de fontes de informação científica**. 2013. Disponível em: &lt;<https://www.ua.pt/ReadObject.aspx?obj=28385&gt;>;
- VAN PUTTEN, A. B. *et al.* Improvement of the production of subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 49, n. 1–3, p. 83–93, 1996.
- VARGA, L. *et al.* Influence of a *Spirulina platensis* biomass on the microflora of fermented ABT milks during storage (R1). **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1031–1038, 2002.
- VERDASCO-MARTÍN, C. M.; ECHEVARRIETA, L.; OTERO, C. Advantageous preparation of digested proteic extracts from *Spirulina platensis* biomass. **Catalysts**, v. 9, n. 2, 2019.
- VERMELHO, A. B. *et al.* Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: INTERCIÊNCIA (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. , 2008. p.273-287.
- VIGANI, M. *et al.* Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, n. 1, p. 81–92, 2015.

- VIGNARDET *et al.*, Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **Int J Pharm**, 2001.
- VISHWANATHA, K. S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 6, p. 1849-59, 2010.
- WAHAB, W. A. A.; AHMED, S. A. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 115, p. 447-458, ago. 2018. Elsevier BV.
- WANG, Z.; ZHANG, X. Characterization and antitumor activity of protein hydrolysates from *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) using two-step hydrolysis. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 6, p. 3379–3385, 2016.
- WANG, Z.; ZHANG, X. Inhibitory effects of small molecular peptides from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* on cancer cell growth. **Food and Function**, v. 7, n. 2, p. 781–788, 2016.
- WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, 2011.
- WELLS, M. *et al.* Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 2, p.949-982, 2016.
- WU, T. Y. *et al.* Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. **Enzym Microb Technol**, v. 39, p. 1223-1229, 2006.
- YAMANI, E. *et al.* Use of *Spirulina* supplement for nutritional management of HIV-infected patients: study in Bangui, Central African Republic. **Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial**, v. 69, n. 1, p. 66–70, 2009.
- ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **N Biotechnol**, v. 28, n. 2, p. 173-81, 2011.
- ZANPHORLIN, L. M. *et al.* Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2137–2143, 2011.
- ZHANG, B.; ZHANG, X. Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from *Spirulina platensis*. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1230–1238, 2013.
- ZHANG, Y. Y.; WEN, J.; YAU, S. S. T. Phylogenetic analysis of protein sequences based on a novel k-mer natural vector method. **Genomics**, v. 111, n. 6, p. 1298–1305, 2019.