



GABRIEL COSTA LIMA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BINÔMIO CONCENTRAÇÃO
DE SOLVENTE X TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE
PIGMENTOS DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM
REGIME AUTOTRÓFICO**

GABRIEL COSTA LIMA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BINÔMIO CONCENTRAÇÃO
DE SOLVENTE X TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE
PIGMENTOS DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM
REGIME AUTOTRÓFICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Curso da Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof(a). Dr(a) Annamaria D. S. Vidotti

São Luís
2019

Costa Lima, Gabriel.

Avaliação do efeito do binômio concentração de solvente x temperatura na extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris* / Gabriel Costa Lima. - 2019.

54 f.

Orientador(a): Annamaria Dória Souza Vidotti.

Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2019.

1. Extração. 2. Microalgas. 3. Pigmentos. I. Dória Souza Vidotti, Annamaria. II. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). ANNAMARIA DÓRIA SOUZA VIDOTTI
Orientador – COEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS DALTRO DE FREITAS
COEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. VALTER NUNES TRINDADE JÚNIOR
COEQ/CCET/UFMA

12 de dezembro de 2019

DADOS CURRICULARES**Gabriel Costa Lima**

NASCIMENTO 08/05/1995 – SÃO LUÍS / MA

FILIAÇÃO José de Ribamar Lima Filho
Silvana Silva Costa

2014/2019 Curso de Graduação
Engenharia Química - Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho aos meus pais, por serem meu firme alicerce e inspiração em todas as escolhas da minha vida.
A minha família pela motivação e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por iluminar o meu caminho e por todas as graças e realizações diárias.

Aos meus pais, Silvana e José, por todo amor incondicional, orientação, confiança, motivação e apoio.

A minha irmã, Glória, pelo amor, carinho, companheirismo e incentivo.

A minha namorada, Laís, pelo grande amor, paciência, companheirismo, motivação nos momentos mais difíceis, por me aceitar como sou.

As minhas segundas mães Luzia e Rosa, por todo amor, carinho e referência.

A minha tia, Luce Maria, pelo amor, acolhimento e carinho.

As minhas primas Muranna, Sárvia, Monik e Thágira, por serem minhas irmãs de coração, me aceitando como sou e me ajudando nos momentos mais difíceis com muito amor e carinho.

Aos meus primos, Antônio e Lucas, por serem os irmãos que escolhi para a vida toda com muito amor e carinho.

A minha amiga, Camila, por viver comigo os momentos mais difíceis da vida e do curso, com muito amor e paciência.

Ao meu amigo Lucas, por todo companheirismo, auxílio e afeto.

A minha orientadora, Annamaria Vidotti, pela paciência, direcionamento, suporte, confiança e esperança nos trabalhos desenvolvidos.

Aos meus professores, Antônio Daltro e Valter Trindade, pelo exemplo de profissionais, incentivo e direcionamento.

Aos meus amigos de turma, por compartilhar todos os obstáculos durante a vida acadêmica.

“Tudo o que acontece no universo tem uma razão de ser; um objetivo. Nós como seres humanos, temos uma só lição na vida: seguir em frente e ter a certeza de que apesar de as vezes estar no escuro, o sol vai voltar a brilhar.”

Santa Irmã Dulce

LIMA, G. C. **Avaliação do efeito do binômio concentração de solvente x temperatura na extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris***. 2019. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

RESUMO

O cultivo de microalgas vem ganhando destaque devido à grande aplicabilidade dos seus componentes de biomassa, como os pigmentos, na indústria alimentícia, de medicamentos, e cosmética. Diante desse cenário, este trabalho visa a avaliação da influência da concentração de etanol e temperatura do banho na extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris*, por meio da aplicação do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Para a produção de biomassa usada na extração, foram utilizados três fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas, iluminação artificial e meio de cultivo BBM. Todo cultivo foi avaliado de acordo com a curva de crescimento e os parâmetros cinéticos. Ao fim do ensaio, toda biomassa microalgal obtida foi separada do meio líquido através de centrifugação, sendo realizado posteriormente o processo extrativo baseado nas condições de temperatura do banho e concentração de etanol determinadas pelo DCCR submetido. Os parâmetros cinéticos encontrados foram: $P_{x_{máx}} = 0,003 \pm 0,000$ g/L.h, $\mu_{máx} = 0,010$ h⁻¹ $\pm 0,003$ e $t_g = 74,37 \pm 19,86$ h. A análise dos resultados estatísticos do processo extrativo de pigmentos mostrou que a concentração de etanol promove efeitos lineares significativos, a 95% de confiança, na concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides. Já a temperatura, apresentou-se como significativa na obtenção de clorofila *a*. Esses efeitos foram representados graficamente através da metodologia de superfície de resposta, sendo possível determinar visualmente as faixas dos parâmetros que melhoram a extração de pigmentos. As faixas encontradas demonstraram que altas temperaturas (60°C e 100°C), para o caso de clorofila *a*, e altas quantidades de etanol (80% e 100%) são capazes de aumentar o rendimento das clorofilas e carotenoides.

Palavras-chave: Microalgas. Pigmentos. Extração

LIMA, G. C. **Evaluation of the effect of binomial concentration of solvent x temperature in the extraction of pigments from microalga *Chlorella vulgaris***. 2019. 54 f. Graduate Work (Graduate in Chemical Engineering) – Curso de Engenharia do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

ABSTRACT

Microalgae cultivation has gained prominence due to the great applicability of its biomass components, such as pigments, food industry, medicines and cosmetics. Given this scenario, this work aims to evaluate the influence of ethanol concentration and bath temperature on the extraction of pigments from *Chlorella vulgaris* microalgae, through the application of the Central Rotational Composite Design (DCCR). For the production of biomass used in the extraction, three bubble column photobioreactors, artificial lighting and BBM culture medium were used. All cultivation was evaluated according to a growth curve and kinetic parameters. At the end of the test, all the biomass microalgae used was used in the liquid medium by centrifugation, and the extractive process was performed afterwards based on the bath temperature conditions and the ethanol concentration used by the submitted DCCR. The kinetic parameters found were: $P_{X_{\text{máx}}} = 0,003 \pm 0,000 \text{ g/L.h}$, $\mu_{\text{máx}} = 0,010 \text{ h}^{-1} \pm 0,003$ e $t_g = 74,37 \pm 19,86\text{h}$. An analysis of the statistical results of the pigment extraction process showed that the ethanol concentration promotes applied linear effects, 95% confidence, in the concentration of chlorophyll a, chlorophyll and carotenoids. The temperature, on the other hand, shows how significant it is in detecting chlorophyll a. These effects were graphically represented by the response surface methodology and it was possible to visually determine as ranges of the parameters that improve pigment extraction. As displayed ranges demonstrated at high temperatures (60 °C and 100 °C), for chlorophyll a cases, and high ethanol temperatures (80% and 100%), they are able to increase the yield of chlorophylls and carotenoids.

Keywords: Microalgae. Pigments. Extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microalga <i>Chlorella</i> sp. sob visão microscópica	05
Figura 2 – Sistemas de tanques abertos – <i>raceway</i> (a); Lagoa circular com agitação (b).....	12
Figura 3 – Fotobiorreator de coluna	13
Figura 4 – Fases de crescimento	14
Figura 5 – Vista superior do esquema de trabalho	17
Figura 6 – Curva padrão do experimento	22
Figura 7 – Curva de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	23
Figura 8 – Ensaio ao final do cultivo	24
Figura 9 – pH do cultivo.....	25
Figura 10 – Gráfico de Pareto para clorofila <i>a</i>	28
Figura 11 – Gráfico de Pareto para clorofila <i>b</i>	28
Figura 12 – Gráfico de Pareto para carotenoides	28
Figura 13 – Superfície de resposta para clorofila <i>a</i> - 3D (a); 2D (b).....	29
Figura 14 – Superfície de resposta para clorofila <i>b</i> - 3D (a); 2D (b).....	30
Figura 15 – Superfície de resposta para carotenoides - 3D (a); 2D (b).....	30
Figura 16 – Valores preditos vs observados para clorofila <i>a</i>	32
Figura 17 – Valores preditos vs observados para clorofila <i>b</i>	32
Figura 18 – Valores preditos vs observados para carotenoides.....	32
Figura 19 – Valores preditos vs residuais para clorofila <i>a</i>	33
Figura 20 – Valores preditos vs residuais para clorofila <i>b</i>	34
Figura 21 – Valores preditos vs residuais para carotenoides.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nutrientes necessários para o cultivo de microalgas	09
Tabela 2 – Meio BBM modificado	15
Tabela 3 – Solução traço	16
Tabela 4 – Parâmetros cinéticos	18
Tabela 5 – Matriz do DCCR para as condições de concentração de etanol e temperatura com seus respectivos valores codificados	20
Tabela 6 – Valores obtidos para a curva padrão.....	21
Tabela 7 – Concentrações médias durante o cultivo	22
Tabela 8 – Parâmetros cinéticos de crescimento	24
Tabela 9 – Concentrações médias da clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides.....	26
Tabela 10 – p-valor e coeficientes do modelo para clorofila <i>a</i>	27
Tabela 11 – p-valor e coeficientes do modelo para clorofila <i>b</i>	27
Tabela 12 – p-valor e coeficientes do modelo para carotenoides.....	27

SUMÁRIO

	FOLHA DE APROVAÇÃO.....	iv
	DADOS CURRICULARES.....	v
	DEDICATÓRIA.....	vi
	AGRADECIMENTOS.....	vii
	EPÍGRAFE.....	viii
	RESUMO.....	ix
	ABSTRACT.....	x
	LISTA DE FIGURAS.....	xi
	LISTA DE TABELAS.....	xii
	SUMÁRIO.....	xiii
1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVOS.....	03
2.1	Objetivos gerais.....	03
2.2	Objetivos específicos.....	03
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3.1	Microalgas.....	04
3.1.1	<i>CHLORELLA SP</i>	05
3.2	Regimes metabólicos.....	05
3.2.1	FOTOAUTOTRÓFICO.....	06
3.2.2	HETEROTRÓFICO.....	06
3.2.3	MIXOTRÓFICO.....	06
3.3	Pigmentos microalgais.....	07
3.3.1	CLOROFILAS.....	07
3.3.2	CAROTENOIDES.....	08
3.4	Fatores que influenciam o crescimento das microalgas.....	08
3.4.1	FONTE DE CO ₂	08
3.4.2	NUTRIENTES.....	09
3.4.3	INTENSIDADE DE LUZ.....	10
3.4.4	TEMPERATURA.....	10
3.4.5	pH.....	10
3.4.6	AGITAÇÃO.....	11
3.5	Sistemas de cultivo de microalgas.....	11

3.5.1	ABERTO.....	11
3.5.2	FECHADO.....	12
3.6	Curva de crescimento.....	14
4	MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1	Local de pesquisa.....	15
4.2	Meio de cultivo.....	15
4.3	Preparo do inóculo.....	16
4.4	Preparo do ensaio e condições de cultivo.....	16
4.5	Métodos analíticos.....	17
4.6	Parâmetros cinéticos.....	18
4.7	Extração de pigmentos.....	19
4.8	Análise estatística.....	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1	Estimativa de peso seco.....	21
5.2	Curva padrão.....	21
5.3	Curva de crescimento.....	22
5.4	Parâmetros cinéticos.....	24
5.5	pH.....	25
5.6	Análise estatística.....	26
5.6.1	GRÁFICO DE PARETO.....	26
5.6.2	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	29
5.6.3	COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS PREDITOS E OBSERVADOS.....	31
5.6.4	COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS PREDITOS E RESIDUAIS.....	33
6	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos microscópicos presentes não somente no ambiente aquático, como também na superfície de determinados tipos de solo, representando uma grande diversidade de espécies. Elas obtêm nutrientes dos habitats aquáticos, absorvem luz solar e capturam CO₂ do ar, gerando uma complexa biomassa celular que abrange vários compostos bioquímicos importantes usados como matéria-prima para produtos de alto valor agregado (RIZWAN et al., 2018).

Microalgas contêm alta quantidade de proteínas, lipídios e carboidratos em sua biomassa. Elas são cultivadas em lagoas abertas ou em sistemas fechados que envolvem processos de mistura e concentração. Esses processos exigem um alto controle e o aproveitamento máximo da biomassa de microalgas usando energia mínima continua sendo o foco principal (CHEW et al., 2017).

Todos os conteúdos intra e extracelulares fazem com que as microalgas sejam consideradas uma das fontes mais potenciais em várias aplicações industriais, algumas das quais incluem biocombustível, biofertilizante, bioeletricidade, suplemento alimentar essencial, estabilizadores e tratamento de águas residuais (ENAMALA et al., 2018).

Além de toda aplicabilidade em produtos industriais de grande atrativo, a captura biológica de dióxido de carbono usando microalgas mostrou-se promissora, pois elas fixam CO₂ durante seu crescimento. A captura de CO₂ dos fluxos de gás de combustão é uma tecnologia importante para a mitigação de gases de efeito estufa (DURÁN et al., 2018).

Por serem microrganismos fotossintéticos, as microalgas são ricas fontes de pigmentos, como clorofilas e carotenóides. Numerosos estudos foram conduzidos com foco no aumento do crescimento de biomassa e otimização de processos para obter produtos de microalgas como os pigmentos, utilizados em diversas aplicações nutraceuticas (KULKARNI et al., 2018).

Existem muitas metodologias relatadas na literatura sobre a extração de pigmentos. Normalmente, utilizam-se solventes como meio extrativo, que geralmente são colocados em contato direto com a biomassa. Essa metodologia pode utilizar solventes orgânicos como o metanol, etanol, acetona, acetato de etila, n-hexano e suas misturas (VENTURA et al., 2017).

Com base no controle dos parâmetros de crescimento (pH, luz, temperatura), nos níveis de rendimento celular e valor de mercado atual, os pigmentos de microalgas constituem-se em grandes candidatos a co-produtos, especialmente se eles são extraídos de forma seletiva e barata. Dessa forma, um dos obstáculos a ser superado é identificar a concentração de solvente

e a temperatura ideal na extração de pigmentos microalgal, visando otimizar o processo extrativo, que pode maximizar o valor da matéria-prima de microalgas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analizar o processo de extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris*, através da aplicação do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para as variáveis concentração de etanol e temperatura do banho.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em um fotobiorreator do tipo coluna de bolhas.
- Calcular os parâmetros cinéticos de crescimento celular com base nos dados do cultivo fotoautotrófico.
- Utilizar a técnica de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de segunda ordem com dois fatores e duas repetições no ponto central, para o processo extrativo de pigmentos de microalgas fotoautotróficas, variando temperatura e concentração de solvente.
- Com base na metodologia DCCR, determinar a influência das variáveis concentração de solvente e temperatura de extração na variável resposta concentração de pigmento.
- Determinar as condições ótimas do processo de extração aplicando a metodologia de superfície de respostas e o ajuste dos modelos por análise de variância (ANOVA).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintéticos unicelulares procariontes (cianobactérias) ou eucariontes que podem crescer e viver em condições adversas devido à sua estrutura simples. Todos os ecossistemas existentes, compreendendo ambos os elementos aquáticos e terrestres, são compostos por eles. A luz solar é usada por essas algas para converter o dióxido de carbono em biocombustíveis potenciais através do processo de fotossíntese similar ao das plantas (TANDON; JIN, 2017).

A fotossíntese é a principal rota de fixação de carbono das microalgas, e através dela, os nutrientes são convertidos em matéria orgânica celular, liberando oxigênio. Os nutrientes necessários para a realização da fotossíntese são uma fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, ferro e alguns outros oligoelementos (WOJCIECHOWSKI et al., 2013).

As células microalgais possuem uma composição química variável, em que estão presentes altas quantidades de lipídios, proteínas e carboidratos. Essa composição é variável, e depende da espécie e das condições de crescimento. A formação de cada composto no interior da célula de microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ- POPIEL, 2016).

O crescimento das microalgas ocorre sob diferentes regimes metabólicos, nomeadamente os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. O metabolismo autotrófico ocorre através da fotossíntese, com a assimilação do CO₂. Já o crescimento heterotrófico de microalgas, ocorre por meio da absorção de compostos orgânicos. O terceiro tipo, crescimento mixotrófico, incorpora características de ambos os regimes metabólicos anteriores (KLEIN; BONOMI; FILHO, 2017).

Ao longo da história, as microalgas vêm sendo utilizadas para diversas finalidades, em que a mais antiga é a alimentação de humanos e animais. Atualmente, esses microrganismos são usados como matéria-prima para combustíveis, cosméticos, pigmentos, biofertilizantes para extração de moléculas de alto valor, isótopos bioquímicos estáveis e para a síntese de drogas antimicrobianas, antivirais, antibacterianas e anticâncer (RIZWAN et al., 2018).

Outra importante finalidade é a capacidade desses microrganismos de biofixar o dióxido de carbono (CO₂). O emprego de microalgas em processos de mitigação de poluentes e produção de biomassa foi sugerido há muitos anos. A grande e importante habilidade destes organismos em degradar compostos poluentes associados à formação de uma biomassa com

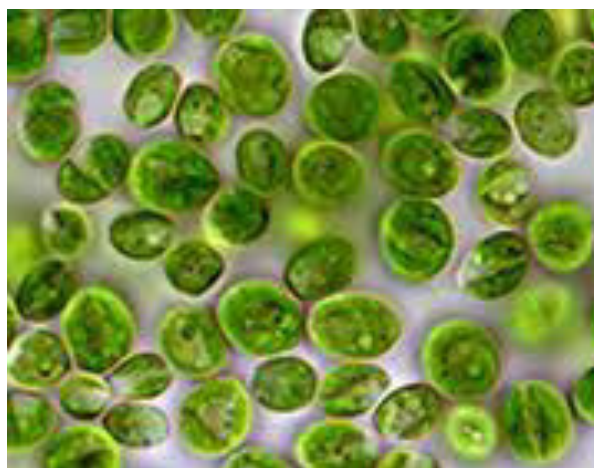
importantes características comerciais tem sido avaliada amplamente ao longo dos anos (VIDOTTI, 2012).

3.1.1 *CHLORELLA SP.*

Pertencente à classe *Chlorophyceae*, a espécie *Chlorella sp.* é uma microalga verde, esférica, unicelular e dulciaquícola. Além disso, é autotrófica e pode acumular pigmentos fotossintéticos como a clorofila a e clorofila b, que estão localizados em seus cloroplastos (SILVA et al., 2018).

Devido ao seu alto teor protéico e riqueza em carotenóides, vitaminas e minerais, a *Chlorella sp.* tem sido amplamente utilizada como fonte de alimentos saudáveis, assim como na indústria de cosmético e farmacêutica. Possui altas produtividades, o que a caracteriza um dos organismos mais comumente utilizado na produção de biomassa de algas (DANTAS, 2013). A Figura 1 apresenta uma imagem da *Chlorella sp.* sob visão microscópica, demonstrando sua forma esférica e coloração esverdeada.

Figura 1 – Microalga *Chlorella sp.* sob visão microscópica.



Fonte: Hamada et al., (2018)

3.2 Regimes metabólicos

As microalgas são capazes de obter energia a partir de múltiplas vias metabólicas sob diferentes condições ambientais. Os diferentes processos metabólicos influenciam significativamente nas características de crescimento e composição celular destes microrganismos (CHEW et al., 2018).

3.2.1 FOTOAUTOTRÓFICO

O crescimento fotoautotrófico envolve a utilização da luz visível como fonte de energia, que é convertida em energia química por meio da fotossíntese, tendo o carbono inorgânico como fonte de carbono. As microalgas que utilizam essa via metabólica produzem polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos através do processo fotossintético, possuindo altas de crescimento (RAZZAK et al., 2017).

O cultivo fotoautotrófico possui a grande vantagem de produzir uma valiosa biomassa utilizando luz solar e artificial, além disso, reduz significativamente a concentração de CO₂ de gases do efeito estufa, contribuindo para melhores mudanças climáticas (MOZUMDER et al., 2016).

3.2.2 HETEROTRÓFICO

O metabolismo heterotrófico é caracterizado pelo uso de uma fonte orgânica externa para obtenção de carbono e energia. Diversas fontes de carbono orgânico, como sacarose, glicose, lactose, galactose, glicerol e frutose, podem ser consumidas pelas microalgas durante o crescimento (CHEW et al., 2018).

Microalgas com esse tipo de regime metabólico não realizam fotossíntese, e por isso, não necessitam de energia luminosa. No entanto, algumas microalgas fotoautotróficas são capazes de oxidar compostos orgânicos para obter energia. O que difere essas microalgas das heterotróficas é a origem destes compostos orgânicos. Nas fotoautotróficas, o carbono orgânico tem origem do processo interno de fotossíntese, enquanto que nas heterotróficas, o carbono orgânico é capturado do meio externo (ANGELO et al., 2014)

3.2.3 MIXOTRÓFICO

O regime de crescimento microalgal mixotrófico é uma mistura de mecanismos de heterotrofia e autotrofia. Em um primeiro estágio, é realizado o metabolismo heterotrófico, devido à grande concentração de carbono orgânico presente no meio. O carbono orgânico é consumido até certo nível, induzindo a fotossíntese e promovendo a assimilação de CO₂ (ZHAN et al., 2016).

Conforme Angelo et al., (2014), as microalgas mixotróficas possuem um aparato celular capaz de permitir o crescimento sob metabolismo heterotrófico e autotrófico, e para isso, suas enzimas da rota heterotrófica não podem ser inibidas pela presença de luz.

3.3 Pigmentos microalgais

Os pigmentos naturais microalgais desempenham um papel importante no metabolismo fotossintético e na pigmentação das algas. Além disso, eles têm atividades biológicas benéficas, como antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, anti-obesidade, antiangiogênica e neuroprotetora (D'ALESSANDRO et al., 2015).

De acordo com Chew et al. (2017), três classes básicas de pigmentos naturais em microalgas devem ser enfatizadas: carotenoides, clorofilas e ficobiliproteínas. Estes pigmentos foram aplicados como precursores de vitaminas na alimentação humana e animal, aditivos, cosméticos, indústrias farmacêuticas, corantes alimentares e biomateriais.

3.3.1 CLOROFILAS

As clorofilas são pigmentos fotossintéticos lipossolúveis responsáveis pela conversão da energia luminosa em energia química. As microalgas possuem predominantemente clorofila *a*, mas algumas podem ter clorofila *b* e *c* (D'ALESSANDRO et al., 2015).

Pigmentos como a clorofila são excelentes fotorreceptores devido à presença de ligações simples e duplas interconectadas, permitindo o deslocamento do elétron em sua estrutura. O deslocamento eletrônico permite a absorção de luz e o início de uma reação de transferência de elétrons que, enfim, é transferida para o dióxido de carbono (SAINI et al., 2018).

O método tradicional que tem sido aplicado na extração de clorofila envolve o uso de solventes orgânicos como, metanol, etanol e acetona. Nesse tipo de extração, o solvente orgânico penetra através da membrana celular, dissolvendo os lipídios, assim como as lipoproteínas das membranas dos cloroplastos. Algumas formas de ruptura celular melhoram significativamente a eficácia da extração de clorofila como, moagem, homogeneização, ultrasons ou sonicação (HOSIKIAN et al., 2010).

Considerando essa técnica orgânica de extração, alguns fatores, como tipo e concentração de solvente, pressão, temperatura, eficiência do contato biomassa-solvente e

tempo de extração devem ser avaliados, buscando otimizar o processo extrativo (VENTURA et al., 2017).

3.3.2 CAROTENOIDES

Os carotenoides são substâncias naturais lipossolúveis com cores variando de marrom, vermelho, laranja a amarelo, que desempenham papéis fundamentais na fotossíntese. Esses pigmentos absorvem a luz em regiões do espectro visível, nas quais a clorofila não absorve eficientemente e, além disso, são capazes de fotoprotoger os sistemas fotossintéticos, removendo os estados mais energéticos da clorofila, resultantes da absorção excessiva de radiação luminosa (D'ALESSANDRO et al., 2015).

As microalgas são uma rica fonte de carotenoides, como no caso da *Chlorella*, que contém até 0,2%. Os carotenoides identificados nestas microalgas são astaxantina, zeaxantina, violaxantina e luteína, que podem ser utilizados na fabricação de uma variedade de produtos alimentícios e cosméticos (SILVA et al., 2018).

A aplicação industrial dos carotenoides ainda é um pouco deficiente, devido aos altos custos dos processos de extração e purificação aplicados. Uma das técnicas mais utilizadas na extração desses pigmentos envolve o emprego de solventes orgânicos como meio extrativo. Os solventes orgânicos mais comumente aplicados são o etanol, metanol, acetato de etila e acetona (VENTURA et al., 2017).

3.4 Fatores que influenciam o crescimento das microalgas

Existem diversos fatores que influenciam o crescimento de microalgas: fatores abióticos como intensidade luminosa, temperatura, fonte de CO₂, potencial hidrogeniônico (pH) e concentração de nutrientes que incluem nitratos, fosfatos, carboidratos e outros oligoelementos. Os demais fatores são de ordem operacional, como a agitação. Todos esses parâmetros devem ser mantidos e controlados para serem efetivos nas taxas de crescimento microalgal (ENAMALA et al., 2018).

3.4.1 FONTE DE CO₂

Um componente chave dos sistemas de produção de biomassa microalgal em grande escala é o CO₂. Algumas microalgas de alta eficiência fotossintética conseguem crescer

rapidamente sob altas concentrações de gás carbônico, e por isso são comumente utilizadas na mitigação de carbono em gases poluentes (ANYANWU et al., 2018).

As microalgas são capazes de fixar o carbono contido em várias fontes: CO₂ atmosférico; CO₂ contido em gases de exaustão industriais; CO₂ fixado na forma de carbonatos solúveis em água (KUMAR et al., 2010).

3.4.2 NUTRIENTES

Além do carbono, outros nutrientes são muito importantes para o crescimento das microalgas, como O₂, H₂, N, K, Mg, Ca, Fe, S, P e minerais vestigiais (ENAMALA et al., 2018). Conforme o Quadro 1, vários elementos químicos são assimilados pelas microalgas em diferentes fases de seu crescimento.

Tabela 1 - Nutrientes necessários para o cultivo de microalgas

Elemento	Forma usual na natureza	Forma química fornecida em meio de cultura
Carbono (C)	CO ₂ , compostos orgânicos	Glicose, malato, acetato, entre outros
Hidrogênio (H)	H ₂ O, compostos orgânicos	H ₂ O, compostos orgânicos
Oxigênio (O)	H ₂ O, O ₂ , compostos orgânicos	H ₂ O, O ₂ , compostos orgânicos
Nitrogênio (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ e compostos orgânicos nitrogenados	NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂
Fósforo (P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Enxofre (S)	H ₂ S, SO ₄ ²⁻	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, entre outros.
Potássio (K)	K ⁺ em solução ou sais de K	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnésio (Mg)	Mg ²⁺ em solução ou sais de Mg	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sódio (Na)	Na ⁺ em solução ou sais de Na	NaCl
Cálcio (Ca)	Ca ²⁺ em solução ou sais de Ca	CaCl ₂
Ferro (Fe)	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ ou sais de Fe	FeCl ₃ , FeSO ₄ , Fe ³⁺ EDTA

Fonte: Andrade (2014)

Existem ainda nutrientes, os quais são necessários em concentrações mais baixas, mas possuem sua importância dentro do metabolismo celular das microalgas. Os principais micronutrientes são: Zn, Cu, Mn, Co, Mo e B (WOJCIECHOWSKI et al., 2013).

3.4.3 INTENSIDADE DE LUZ

Por serem microrganismos fotossintéticos, a luz é um fator indispensável na produtividade das microalgas. O papel vital da luz é a assimilação do dióxido de carbono e controle do crescimento (ANYANWU et al., 2018).

Dentro do processo fotossintético, existem organizações de pigmentos e complexos protéicos (chamados fotossistemas) responsáveis pela absorção e a estocagem da energia luminosa. Entre os pigmentos presentes, podem-se citar as clorofilas, que absorvem comprimentos de onda na região do azul e do vermelho, conferindo, assim, a cor verde as microalgas (KLEIN, 2013).

O metabolismo fotoautotrófico é altamente dependente da luz, tornando esse fator de crescimento um dos principais pilares do cultivo de microalgas, necessitando de um alto controle e de uma atenção especial. No entanto, o excesso de luz causado por uma exposição prolongada a grandes intensidades luminosas pode acarretar danos, normalmente reversíveis, à aparelhagem fotossintética. Esse fenômeno é denominado de fotoinibição, e afeta o rendimento de biomassa microalgal (CORRÊA, 2015).

3.4.4 TEMPERATURA

A temperatura é uma variável ambiental que afeta o crescimento das microalgas, pois influencia em diversas atividades bioquímicas, como difusão e transporte através de membranas, transporte de elétrons fotossintético e respiratório e atividades enzimáticas (GARCIA-GONZALEZ et al., 2014). Segundo Enamala et al. (2018), uma elevação na temperatura pode causar uma diminuição no volume celular microalgal. As temperaturas ótimas de crescimento geralmente variam entre 20°C e 30°C.

3.4.5 pH

O pH é um dos fatores mais importantes no cultivo de microalgas. Ele determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio e influencia direta ou indiretamente o

metabolismo das algas. O pH depende de vários fatores, como composição e capacidade tamponante do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura (que determina a solubilidade do CO₂) e atividade metabólica das células (MARINHO et al., 2009).

Um indicativo do crescimento microalgal é a elevação gradativa do pH no meio de cultivo. O aumento de pH é consequência da atividade biológica das células, o que produz uma redução no conteúdo de carbono inorgânico dissolvido através do consumo necessário ao crescimento celular (ANDRADE, 2014).

3.4.6 AGITAÇÃO

A agitação do meio de cultivo microalgal é uma variável relevante, pois permite a homogeneização das células, melhora a transferência dos gases, impede a estratificação térmica e auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes. O processo de agitação mantém as células em suspensão, evitando que algumas células fiquem depositadas no fundo, enquanto outras que permanecem na superfície recebam luz em excesso. Assim, a agitação pode otimizar todos os fatores essenciais relacionados à produção de biomassa de microalgas (VIEIRA, 2013).

3.5 Sistemas de cultivo de microalgas

Independentemente da aplicação da biomassa microalgal produzida, é muito importante que o processo de produção apresente todas as condições para que as microalgas cresçam e se multipliquem a uma maior velocidade de crescimento possível, e por isso, a escolha do sistema de cultivo é um aspecto importante (MATA et al., 2010).

3.5.1 ABERTO

Em escala industrial, os sistemas abertos são os mais utilizados no cultivo de microalgas, uma vez que são de baixo custo e com um design fácil de construir, além de possuírem uma maior facilidade de operação em relação aos fotobiorreatores fechados (FBRs). Os tanques podem ser escavados e revestidos com materiais impermeáveis ou podem ser construídos com paredes, e normalmente é utilizado um sistema de pás para realizar a agitação (MAGRO et al., 2016).

Esses sistemas são constituídos por lagos, lagoas naturais e lagoas artificiais, como as circulares, as inclinadas e as do tipo *raceway*. Dentre as lagoas artificiais, as do tipo *raceway*

são as mais comumente empregadas, pois as lagoas circulares são menos atrativas por apresentarem estruturas em concreto caras, alto consumo de energia para agitação, complexidade mecânica para injeção de CO₂ e uso ineficiente da terra (KLEIN, 2013). A Figura 2 apresenta esses dois tipos de sistema aberto.

Figura 2 - Sistemas de tanques abertos – *raceway* (a); Lagoa circular com agitação (b).



Fonte: Anyanwu et al., (2018)

Segundo Klein (2013), os sistemas abertos apresentam certas desvantagens, apesar de serem de construção barata, possuírem baixos requerimentos energéticos e manutenção mínima. O fato de existirem grandes perdas de água por evaporação, flutuação da temperatura no meio de cultivo, penetração limitada de luz e baixa eficiência de utilização de CO₂ acarretam baixas produtividades e baixas concentrações de biomassa colhida. Além disso, por serem abertos à atmosfera, existe uma alta possibilidade de contaminação do cultivo por outras espécies de microrganismos.

Todas essas desvantagens, além de estimular o desenvolvimento de fotobiorreatores fechados, fazem com que os tanques abertos sejam adequados para um pequeno número de espécies de algas que podem tolerar as condições ambientais extremas. Tais espécies de algas incluem crescimento rápido, como a *Chlorella*, que prospera em ambientes altamente alcalinos ou salinos (MAGRO et al., 2016).

3.5.2 FECHADO

A fim de superar a ineficiência dos sistemas abertos, buscando maiores produtividades sem comprometer a integridade física das algas, estimularam-se o desenvolvimento dos fotobiorreatores (FBRs). Cultivos realizados nos FBRs permitem atingir alta densidade celular,

devido à estrutura fechada, condições ambiente relativamente controláveis, grande área de iluminação e menores problemas de contaminação. Os recipientes de cultivo podem ser construídos com vidro ou plástico transparente, orientados horizontal e verticalmente (MAGRO et al., 2016).

Os fotobiorreatores utilizados para o cultivo de microalgas são iluminados natural ou artificialmente. Sistemas de cultivo de algas com luz natural necessitam de grandes áreas superficiais iluminadas. Normalmente, em escala laboratorial, os fotobiorreatores são iluminados artificialmente com lâmpadas fluorescentes ou outras (FRÉ, 2016).

A escolha do fotobiorreator é um fator importante, que afeta significativamente o custo do processo de produção de biomassa microalgal. Diferentes tipos de *design* de fotobiorreatores já foram estudados e implantados em grande escala. As diferentes configurações oferecem vantagens e desvantagens, que associadas ao tipo de microalga a ser cultivada, oferece maior ou menor eficiência frente a parâmetros de estudo. Os principais designs de FBRs incluem fotobiorreatores tubulares, de coluna e de placa (KOCHEM, 2010).

De acordo com Klein (2015), um fotobiorreator tubular consiste em um arranjo de tubos retos e transparentes, normalmente de plástico ou vidro. Os tubos apresentam geralmente um diâmetro igual ou inferior a 0,1 m, já que diâmetros maiores acabam afetando a aquisição de luz para que a fotossíntese ocorra.

Os fotobiorreatores de coluna são semelhantes aos tubulares, uma vez que são compostos basicamente por um tubo vertical onde se faz o cultivo de microalgas, conforme a Figura 3. Este *design* apresenta agitação eficiente, as maiores taxas volumétricas de transferência de massa e as condições de crescimento de mais fácil controle entre os FBRs, além de terem baixo custo e serem compactos e de fácil operação. A injeção de ar no fundo do equipamento permite a aeração do meio de cultivo, evitando igualmente a sedimentação das microalgas (BRENNAN et al., 2010).

Figura 3 – Fotobiorreator de coluna.



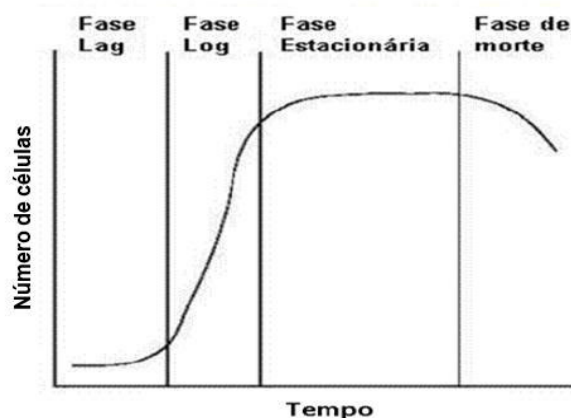
Fonte: Anyanwu et al., (2018)

Segundo Klein (2013), os FBRs apresentam certas desvantagens: superaquecimento; *biofouling*, o crescimento de microalgas nas paredes do fotobiorreator que diminui a penetração de luz no meio de cultivo; acúmulo de O₂ gerado pela fotossíntese e altas tensões de cisalhamento sobre as células.

3.6 Curva de crescimento

Ao se encontrarem no meio de cultura favorável ao desenvolvimento, sob condições controladas, as microalgas apresentam um comportamento característico, em que a concentração celular varia com o tempo de diferentes maneiras em diferentes fases durante o cultivo, constituindo a curva típica de crescimento. Uma curva de crescimento é formada por 4 fases: Adaptação, Exponencial, Estacionária e Declínio (BORZANI; SCHMIDELL; AQUARONE, 2001). A Figura 4 apresenta o perfil dessas fases.

Figura 4 - Fases de crescimento.



Fonte: Wojciechowski, (2012).

Na Figura 4, segundo Andrade (2014), tem-se:

1. Fase lag: período de adaptação metabólica ao meio, em que a célula sintetiza as enzimas necessárias ao crescimento.
2. Fase exponencial: a velocidade de crescimento é máxima, constante e diretamente proporcional a concentração.
3. Fase estacionária: há um balanço entre taxa de crescimento e taxa de morte de microrganismo.
4. Fase de declínio: a velocidade de diminuição da concentração celular excede a velocidade de produção de novas células.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de pesquisa

A presente pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde as etapas experimentais foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa do Curso de Engenharia Química (LEPEQ), na Central Analítica do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) e no Laboratório de Processos Químicos (Curso de Engenharia Química).

4.2 Meio de cultivo

O meio de cultivo microalgal sintético utilizado na presente pesquisa foi proposto por Stein (1973), e é denominado de BBM modificado (bold's basal medium modified), apresentando uma composição detalhada nas Tabelas 2 e 3. A solução traço presente no meio possui originalmente $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em sua composição, no entanto, foi necessário substituí-lo por $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ como fonte de molibdênio.

Tabela 2 - Meio BBM modificado

Composto	Solução estoque	*ml/L
1. KH_2PO_4	8,75 g/500 ml	10
2. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12,5 g/500 ml	1
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37,5 g/500 ml	1
4. NaNO_3	125 g/500 ml	1
5. K_2HPO_4	37,5 g/500 ml	1
6. NaCl	12,5 g/500 ml	1
7. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 g/L	1
KOH	6,2 g/L	1
8. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,98 g/L	1
H_2SO_4 (conc.)	1 ml/L	1
9. Solução "traço"	Tabela 3	1
10. H_3BO_3	5,75 g/500 ml	0,7

*mililitro (ml) da solução estoque por Litro (L) de meio.

Fonte: Stein (1973)

Tabela 3 - Solução traço

Substância	g/L
1. H ₃ BO ₃	2,86
2. MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
3. ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
4. (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,88
5. CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,07
6. NaCl	0,0494

Fonte: Stein (1973).

4.3 Preparo do inóculo

A espécie de microalga utilizada durante todo o estudo foi a *Chlorella vulgaris*. Inicialmente, a cepa microalgal foi mantida em ágar inclinado consistindo de meio BBM modificado. A posterior propagação das microalgas em erlenmeyers deu-se através de procedimentos de repique, que consistiram na transferência de uma quantidade de microrganismos em ágar inclinado para meio sintético líquido.

Antes da manipulação, todo o material, vidrarias e meio de cultivo foram autoclavados à 121° C por 20 minutos. Além disso, durante o repique foram adotados procedimentos assépticos, como a utilização de alças de inoculação descartáveis e abertura de vidrarias próximas a uma lamparina, adaptação do bico de bunsen. Os inóculos foram mantidos em meio líquido na presença de luz artificial e à temperatura ambiente.

4.4 Preparo do ensaio e condições de cultivo

Para a preparação do ensaio foram construídos três fotobiorreatores idênticos de vidro transparente com as seguintes dimensões: diâmetro igual a 7 cm e altura igual a 24 cm. Cada fotobiorreator foi submetido a um sistema de aeração composto por um compressor (marca Vigor Ar Panther) com capacidade de até 40L, conectado a uma mangueira de silicone contendo uma pedra porosa na extremidade.

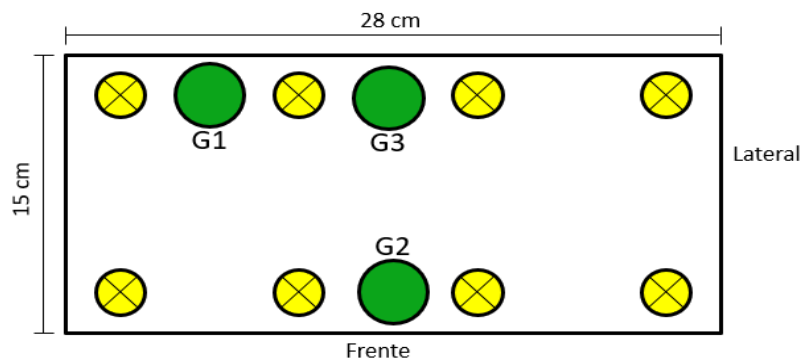
Como aparato experimental para a realização do ensaio, foi utilizado um móvel de plástico com duas bases retangulares (28 cm x 15 cm), sustentadas por 4 colunas plásticas cilíndricas. Suas laterais e a parte traseira foram fechadas com isopor, impedindo qualquer influência da luz externa. A parte dianteira foi preenchida com material do tipo EVA de cor

branca para facilitar o acesso aos fotobiorreatores e a retirada de amostras. Um aparelho de ar condicionado manteve a temperatura ambiente na faixa entre 25°C e 30°C.

Os três fotobiorreatores receberam a mesma concentração de inóculo. Em cada fotobiorreator, o volume total de trabalho foi de 700 ml, sendo 660 ml de meio e 40 ml de inóculo. Todos eles foram submetidos à mesma intensidade luminosa proveniente de duas lâmpadas (11 W D.L.) fluorescentes durante todo o cultivo.

Os cultivos e as lâmpadas foram dispostos no móvel de acordo com a Figura 5. Os círculos amarelos representam as lâmpadas igualmente espaçadas, e os círculos verdes entre elas representam os fotobiorreatores. Os espaços vazios não foram utilizados em vista da presença de outro experimento que ocorria paralelamente.

Figura 5 - Vista superior do esquema de trabalho



Fonte: Próprio do autor (2019).

4.5 Métodos analíticos

A concentração celular do inóculo foi determinada através da estimativa de peso seco. Para isso, inicialmente, três tubos foram preenchidos com 40 ml de alíquota do inóculo, e em seguida, foi realizada uma centrifugação, a 2500 rpm, da biomassa durante 4 minutos. Após a retirada do sobrenadante, a biomassa resultante de cada tubo foi centrifugada com 10 ml de água destilada, para promover a dissolução dos sais presentes.

Antes de cada pesagem do material centrifugado, realizou-se a secagem em estufa a 60 °C, para a retirada da umidade residual. As pesagens foram feitas a cada 24h, até que o peso da amostra se mantivesse constante. A massa média obtida foi determinada pela diferença de peso entre o tubo vazio e o tubo com amostra. Dividindo a massa média pelo volume de inóculo correspondente de 40 ml em cada tubo, chegou-se à concentração celular.

Em seguida, partindo dessa quantificação e de diluições da amostra de inóculo, foram

realizadas medidas da turbidez da cultura com leitura a 680 nm em espectrofotômetro digital, permitindo a construção de uma curva padrão, que relaciona absorvância e concentração celular. Dessa forma, durante o experimento, todas as leituras em espectrofotômetro das amostras dos cultivos foram convertidas em biomassa (g/L), sendo elaboradas ao final as curvas de crescimento celular em relação ao tempo (VIDOTTI, 2015).

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) dos cultivos foi realizada através de leitura direta na amostra em peagâmetro digital (marca Hanna). Para a leitura, foram retiradas amostras com um volume na faixa entre 10 ml e 15 ml. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico do pH em função do tempo.

Todo o ensaio teve duração de 11 dias. Houve apenas 8 dias de coleta de amostras, devido à indisponibilidade de acesso ao laboratório nos finais de semana. Foram realizados três cultivos, sob as mesmas condições experimentais, a fim de se obter a triplicata biológica. As análises das absorvâncias foram realizadas em triplicata técnica, para o cálculo de desvio padrão. À medida que eram coletadas as absorvâncias, os dados eram plotados na curva padrão. As amostras foram submetidas a diluições quando havia a possibilidade de extrapolação da curva já construída.

4.6 Parâmetros cinéticos

Baseando-se nos dados experimentais coletados, foram calculados os seguintes parâmetros cinéticos: densidade celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$); velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$); tempo de geração (t_g); tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima ($t_{Xm\acute{a}x}$) e máxima produtividade celular ($P_{Xm\acute{a}x}$). Todos estes parâmetros estão representados e relacionados segundo as equações presentes na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos

Parâmetro	Equação	Número da equação
Tempo de geração (t_g)	$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{m\acute{a}x}}$	1
Máxima produtividade celular ($P_{Xm\acute{a}x}$)	$P_{Xm\acute{a}x} = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{t_{m\acute{a}x} - t_0}$	2

Sendo: X – biomassa (g/L); t – tempo (h).

Fonte: Borzani et al., (2001).

A velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtida através do coeficiente angular da equação da reta $\ln(X) \times t$, considerando a fase exponencial de crescimento.

4.7 Extração de pigmentos

Ao fim do cultivo, toda biomassa microalgal obtida foi separada do meio líquido através de centrifugação a 2500 rpm durante 4 minutos. Posteriormente, antes de iniciar o processo extrativo de pigmentos, as células de *Chlorella vulgaris* foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições, com 10 ml de água destilada, promovendo a retirada dos sais solúveis residuais.

Após as centrifugações, as células foram misturadas a 2 mL de etanol com diferentes concentrações, conforme a matriz determinada através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) realizado. Em seguida, a suspensão biomassa/etanol foi agitada em vórtex por 30 segundos (VIDOTTI, 2015).

Como etapa seguinte à agitação, armazenou-se a suspensão no congelador por 16 h. Completado esse período de resfriamento, a mistura foi descongelada à temperatura ambiente, sofreu nova agitação em vórtex por 30 segundos e em seguida foi colocada mais uma vez para congelar durante 22 horas. Após os dois ciclos de congelamento/descongelamento, necessários para o rompimento das células, a suspensão foi levada para ser aquecida no banho maria (marca Tecnal) durante 12 minutos, variando a temperatura do banho de acordo com a matriz obtida por meio do DCCR.

Posteriormente ao banho, as amostras foram resfriadas em água fria e centrifugadas a 2500 rpm durante 4 minutos. As absorbâncias do sobrenadante foram lidas nos comprimentos de onda aplicados nas Equações (Kaczmar et al., 2004) 3, 4, e 5 a fim de determinar a concentração ($\mu\text{g/mL}$) de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides extraídos da biomassa microalgal.

$$\text{Clorofila } a(\mu\text{g/mL}) = (11,64A_{663} - 2,16A_{645} - 0,1A_{630})v/(lV) \quad (3)$$

$$\text{Clorofila } b(\mu\text{g/mL}) = (20,97A_{645} - 3,94A_{663} - 3,66A_{630})v/(lV) \quad (4)$$

$$\text{Carotenoides}(\mu\text{g/mL}) = (4A_{480})v/(lV) \quad (5)$$

Nas equações, os valores de A representam a absorvância nos comprimentos de onda, em nm, indicados em cada índice (480, 630, 645 e 663), após a subtração da absorvância da amostra a 750nm. A variável v é o volume de etanol utilizado (ml), l é o comprimento da célula espectrofotométrica (cm) e V é o volume da amostra (ml).

4.8 Análise estatística

Realizou-se um planejamento experimental através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com o objetivo de se determinar a melhor condição de temperatura e a concentração ideal de etanol, otimizando a extração dos pigmentos microalgais. Esse planejamento estatístico foi implementado com o auxílio da ferramenta computacional Statistica.

Dentro da implementação, foram avaliadas a concentração de etanol e a temperatura do banho com duas repetições no ponto central. A análise permitiu a realização de 10 experimentos (10 combinações experimentais entre concentração e temperatura.), tendo como variáveis de resposta as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ de pigmento (clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides) extraído. A Tabela 5 representa a matriz de planejamento com as devidas condições a serem estudadas.

Tabela 5 - Matriz do DCCR para as condições de concentração de etanol e temperatura com seus respectivos valores codificados.

Experimento	Concentração (%)	Valores codificados	Temperatura (°C)	Valores codificados
1	45	-1,00	40	-1,00
2	45	-1,00	90	1,00
3	90	1,00	40	-1,00
4	90	1,00	90	1,00
5	35,7	-1,41	65	0,00
6	99	1,41	65	0,00
7	67,5	0,00	29,6	-1,41
8	67,5	0,00	100,4	1,41
9 (PC)	67,5	0,00	65	0,00
10 (PC)	67,5	0,00	65	0,00

(PC) – Ponto Central. Fonte: próprio autor (2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estimativa de peso seco

Com o objetivo de construir a curva padrão, realizou-se inicialmente a determinação da concentração celular do inóculo por meio do método de peso seco, chegando-se a um valor médio de 0,0270 g de biomassa presente em 40 ml de amostra. Dessa forma, chegou-se a uma concentração celular de 0,68 g/L.

5.2 Curva padrão

Para acompanhar os perfis de crescimento das microalgas utilizando espectrofotômetro, foi necessário a construção da curva padrão a partir de diferentes diluições do inóculo, resultando em diferentes concentrações e suas respectivas absorvâncias. A Tabela 6 apresenta as médias das leituras no espectrofotômetro, as diluições realizadas e as concentrações correspondentes.

Tabela 6 - Valores obtidos para a curva padrão

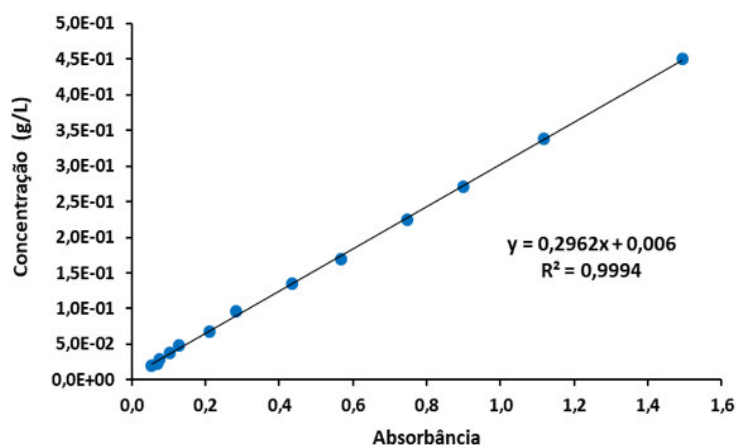
Volume de amostra	Volume de água	Leitura média	Diluição (D)	Concentração
2	2,0	1,119	2,0	0,34
1	2,0	0,747	3,0	0,23
1	3,0	0,568	4,0	0,17
1	4,0	0,434	5,0	0,14
1	6,0	0,282	7,0	0,10
1	9,0	0,210	10,0	0,07
1	13,0	0,129	14,0	0,05
1	17,0	0,102	18,0	0,04
1	23,0	0,075	24,0	0,03
1	28,0	0,069	29,0	0,02
1	34,0	0,054	35,0	0,02
1	1,5	0,900	2,5	0,27
2	1,0	1,493	1,5	0,45

Volume de amostra (ml); Volume de água (ml); Concentração (g/L).

Fonte: próprio autor (2019).

A partir dos resultados obtidos da Tabela 6, pôde-se construir a curva padrão (Figura 6), que representa a relação entre a absorvância e concentração celular.

Figura 6 - Curva padrão do experimento.



Fonte: Próprio autor (2019).

A equação da reta representada na Figura 6 foi obtida por meio de uma regressão linear, e permitiu quantificar todas as concentrações das amostras dos ensaios durante todo o experimento a partir de suas respectivas absorbâncias, gerando, assim, as curvas de crescimento.

5.3 Curva de crescimento

A construção da curva de crescimento foi feita baseada nos valores médios das absorbâncias colhidos em espaços regulares de tempo ao longo do experimento, com exceção dos dias em que o acesso ao laboratório foi indisponível. Todos esses valores foram convertidos em suas respectivas concentrações médias de biomassa através da equação linear da curva de calibração. Os resultados médios das concentrações e seus respectivos desvios estão representados na Tabela 7.

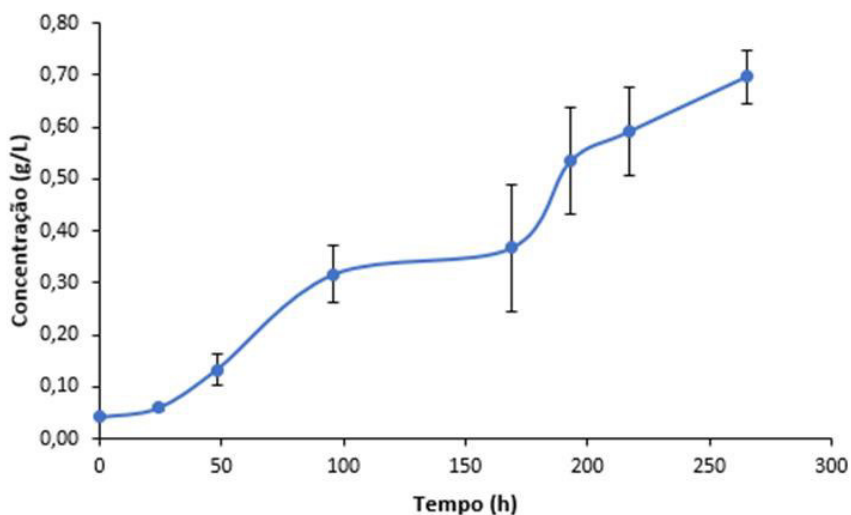
Tabela 7 - Concentrações médias durante o cultivo.

Tempo	Concentração
0	0,04 ± 0,00
24	0,06 ± 0,00
48	0,13 ± 0,03
96	0,32 ± 0,06
169	0,37 ± 0,12
193	0,53 ± 0,10
217	0,59 ± 0,09
265	0,70 ± 0,05

Tempo (h); Concentração (g/L);

Com base nos dados apresentados na Tabela 7, construiu-se a curva de crescimento evidenciada na Figura 7.

Figura 7 - Curva de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*.



Fonte: Próprio autor (2019).

A análise do gráfico da Figura 7 permite considerar que houve fase de latência (lag) entre os dois primeiros pontos, com um aumento pouco significativo da concentração de biomassa. O período de adaptação das células ao novo meio de cultivo teve duração pouco pronunciada, com intervalo de tempo de 24 h. Isso pode ser atribuído à inoculação com as microalgas na fase exponencial de crescimento.

A partir de 24 h, ainda de acordo com o gráfico, inicia-se a fase exponencial (log) de crescimento, em que as células microalgais estão adaptadas às novas condições ambientais e apresentam uma alta taxa de crescimento. Esse aumento representativo da concentração celular se manteve até 96 h. No período de tempo entre 96 h e 169 h, observou-se uma descontinuidade da fase log, com baixo crescimento celular. Este período encontrou-se no final de semana, em que não houve coleta de amostras, e um possível entupimento do sistema de aeração de um dos cultivos foi verificado.

Após 169 h, voltando a análise da Figura 7, houve um novo aumento considerável da concentração de biomassa até 193 h de cultivo. Daí em diante, a partir de 193 h, as microalgas iniciaram gradualmente a fase estacionária, em que há uma certa equivalência entre o número de células que se divide e as células que morrem, ocasionando uma redução no crescimento líquido de biomassa. O cultivo foi interrompido, aproximadamente, com 265 h, a fim de se

obter a maior quantidade de biomassa possível para ser utilizada no processo de extração. A Figura 8 ilustra os ensaios ao final do tempo de cultivo.

Figura 8 - Ensaio ao final do cultivo



Fonte: Próprio autor (2019).

5.4 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados baseando-se nos dados da curva de crescimento, e estão apresentados na Tabela 8. Para a obtenção da velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), foi necessário a construção de uma reta que representa a relação semilogarítmica da concentração de biomassa média da fase exponencial da curva de crescimento com o respectivo tempo de cultivo.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de crescimento

$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	tg (h)	$P_{\text{xmáx}} \text{ (g/L.h)}$
$0,010 \pm 0,003$	$74,37 \pm 19,86$	$0,003 \pm 0,000$

Onde: $P_{\text{xmáx}}$ - máxima produtividade celular; tg - tempo de geração; $\mu_{\text{máx}}$ - velocidade máxima específica;

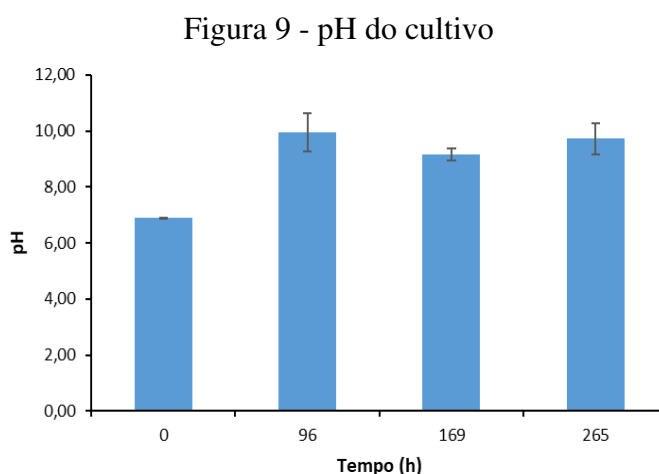
Fonte: Próprio autor (2019).

Em trabalhos como o de Blair et al. (2014), uma produtividade de 0,002 g/L.h foi alcançada sob condições experimentais próximas, com $\mu_{\text{máx}} = 0,016 \text{ h}^{-1}$ e tg = 43,32 h, mostrando melhor desempenho cinético. Uma melhor atividade cinética também foi obtida no estudo feito por Soares et al., (2019): $P_{\text{xmáx}} = 0,002 \text{ g/L.h}$, $\mu_{\text{máx}} = 0,0480 \text{ h}^{-1}$ e tg = 14,44 h. Os

resultados cinéticos (Tabela 8) inferiores aos dos outros trabalhos podem refletir a influência dos problemas causados ao sistema de aeração, gerando baixas ao cultivo.

5.5 pH

Os valores médios de pH encontrados foram utilizados na construção do gráfico ilustrado na Figura 9. Foram realizadas quatro medidas de pH durante o ensaio para cada cultivo e calculadas as suas médias. O monitoramento do pH identifica o crescimento, já que interfere diretamente no metabolismo microalgal e na disponibilidade de nutrientes.



Fonte: Próprio autor (2019).

A análise do perfil médio de pH dos cultivos apresentado na Figura 9 mostrou uma alcalinização do meio no tempo de 96 h. Essa alcalinização ocorreu na fase de grande atividade metabólica microalgal, com alto crescimento celular e alta eficiência fotossintética. Segundo Molazadeh et al., (2019), há maior dissociação de bicarbonato e consequente fixação de CO_2 durante a fotossíntese. A dissociação faz com que a acidez seja reduzida, ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (OH^-) no meio, resultando em um aumento do pH.

Ainda de acordo com a Figura 9, houve uma redução do pH médio em 169 h. Esse comportamento não era esperado, e contradiz a literatura, já que houve aumento na concentração de biomassa média entre 96 h e 169 h. Dessa forma, esse perfil descontínuo de pH nesse intervalo de tempo foi associado a erros de medição.

Ao analisar o perfil de pH, notou-se que a microalga *Chlorella vulgaris* cresceu em uma faixa de pH variando de 6 a 10 ao longo do experimento, com maior produtividade de biomassa em meio alcalino. Esses resultados obtidos são próximos de resultados de outro

trabalho, como o de Viana et al. (2014), que demonstraram um comportamento ideal da *Chlorella vulgaris* para a absorção do nitrogênio amoniacal necessário para seu crescimento e desenvolvimento sob valores de pH entre 7 e 9.

5.6 Análise estatística

Partindo de uma biomassa obtida sob as mesmas condições do cultivo, foi realizado o processo extrativo de acordo com as condições de temperatura e concentração de etanol determinadas pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os valores das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) médias de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, obtidos segundo as Equações 3, 4 e 5, respectivamente, estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentrações médias de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides.

Concentração (%)	Temperatura (°C)	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenoides
45	40	0,078±0,001	0,071±0,000	0,040±0,000
45	90	0,090±0,000	0,063±0,001	0,044±0,000
90	40	0,192±0,000	0,085±0,000	0,064±0,000
90	90	0,258±0,000	0,103±0,001	0,094±0,000
35,7	65	0,050±0,000	0,036±0,001	0,027±0,000
99	65	0,210±0,000	0,085±0,000	0,075±0,000
67,5	29,6	0,140±0,000	0,073±0,000	0,049±0,000
67,5	100	0,170±0,001	0,072±0,000	0,053±0,000
67,5	65	0,147±0,000	0,074±0,001	0,054±0,000
67,5	65	0,135±0,001	0,069±0,001	0,051±0,000

Fonte: Próprio autor (2019).

5.6.1 GRÁFICO DE PARETO

Baseando-se nos resultados obtidos no processo de extração, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), considerando como variáveis independentes a concentração de etanol e a temperatura, e como variável dependente o efeito na concentração de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides). A análise foi efetuada considerando um intervalo de confiança de 95%. Os resultados encontrados para p-valor e os coeficientes de regressão resultantes da ANOVA estão apresentados nas Tabelas 10, 11 e 12. Os coeficientes de regressão constituem os modelos matemáticos, que representam os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes.

Tabela 10 - p-valor e coeficientes do modelo para clorofila *a*

Fator	p	Coeficiente
Mean/Interc.		0,140979
(1)Concentração (%)(L)	0,000259	0,063786
Concentração (%)(Q)	0,765653	-0,002214
(2)Temperatura (°C)(L)	0,044341	0,015129
Temperatura (°C)(Q)	0,217809	0,010138
1L by 2L	0,139454	0,013571

Fonte: Próprio autor (2019). (L) - Efeito linear; (Q) - Efeito quadrático;

Tabela 11 - p-valor e coeficientes do modelo para clorofila *b*

Fator	p	Coeficiente
Mean/Interc.		0,071343
(1)Concentração (%)(L)	0,01366	0,015478
Concentração (%)(Q)	0,71965	-0,001884
(2)Temperatura (°C)(L)	0,78334	0,001083
Temperatura (°C)(Q)	0,44066	0,004181
1L by 2L	0,27312	0,006594

Fonte: Próprio autor (2019). (L) - Efeito linear; (Q) - Efeito quadrático;

Tabela 12 - p-valor e coeficientes do modelo para carotenoides

Fator	p	Coeficiente
Mean/Interc.		0,052312
(1)Concentração (%)(L)	0,003968	0,017594
Concentração (%)(Q)	0,673053	0,001780
(2)Temperatura (°C)(L)	0,165725	0,004994
Temperatura (°C)(Q)	0,666209	0,001821
1L by 2L	0,204579	0,00630

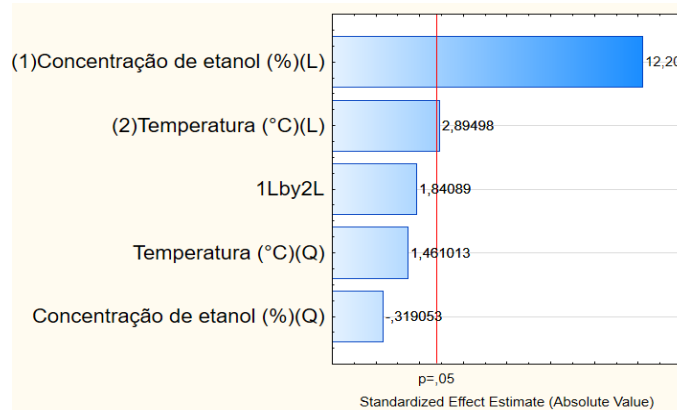
Fonte: Próprio autor (2019). (L) - Efeito linear; (Q) - Efeito quadrático

A análise de variância representada pelos dados obtidos nas tabelas anteriores e baseada na matriz DCCR, mostrou que houve influência significativa dos fatores concentração de etanol (L) e temperatura (L) na concentração de pigmentos extraída. As variáveis são consideradas significativas quando $p < 0,05$, e nesse caso, verificou-se que os fatores, independentemente, produziram efeitos na concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides.

A visualização gráfica e numérica dos efeitos de cada parâmetro, além de suas interações, foi realizada por meio do gráfico de Pareto, construído também pelo software Statistica. A influência de cada variável é representada por uma barra na horizontal, em que a ultrapassagem do p-valor de 0,05 mostra relevância estatística. Os gráficos de Pareto foram

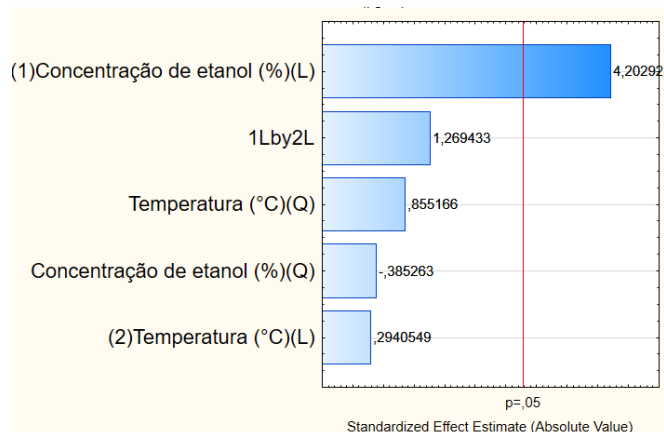
produzidos para as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, escolhidas como variáveis de resposta, e estão apresentados nas Figuras 10, 11 e 12, respectivamente.

Figura 10 - Gráfico de Pareto para a concentração de clorofila *a*



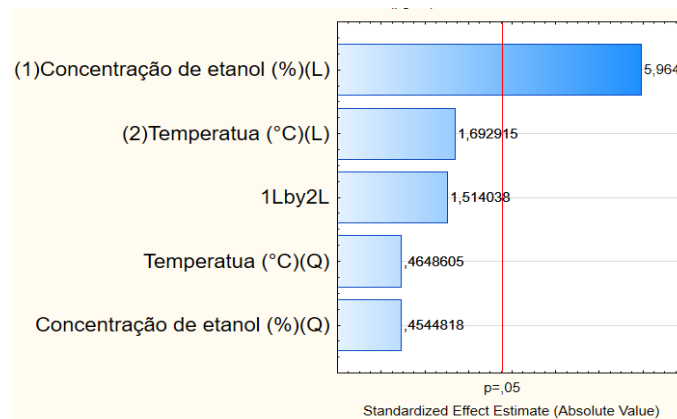
Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 11 - Gráfico de Pareto para a concentração de clorofila *b*



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 12 - Gráfico de Pareto para a concentração de carotenoides



Fonte: Próprio autor (2019).

A sensibilidade das variáveis (concentração de etanol e temperatura) sobre a concentração de clorofila *a* pode ser visualizada através do diagrama presente na Figura 10. De acordo com diagrama, foi possível observar que o efeito linear (L) da concentração de etanol e temperatura apresentou importância estatística, influenciando significativamente na concentração de clorofila *a*. Os efeitos lineares positivos indicam que o aumento da concentração de etanol ou da temperatura resulta em um aumento linear da quantidade de clorofila *a* extraída.

Ainda de acordo com a Figura 10, verificou-se que não houve efeito significativo da interação linear (1Lby2L) entre concentração de etanol e temperatura, assim como, o efeito quadrático (Q) desses dois fatores.

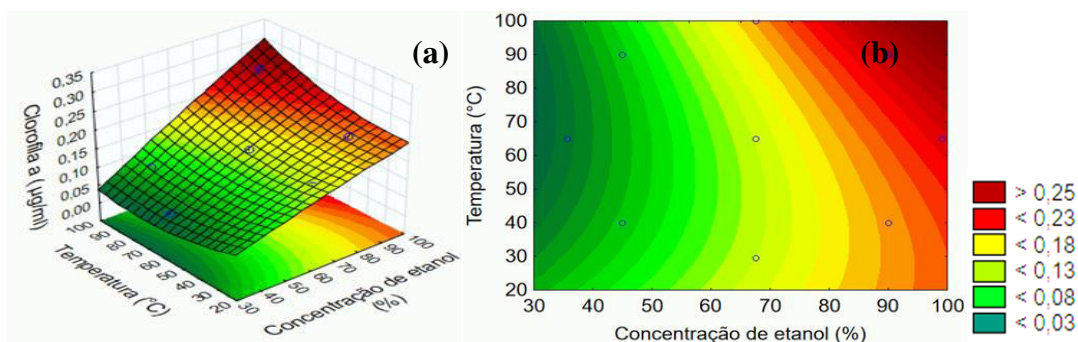
A Figura 11 apresenta o gráfico de Pareto construído para a clorofila *b*. Observou-se que apenas o efeito linear da concentração de etanol apresentou significância estatística. Seu efeito positivo está associado a um aumento da concentração de clorofila *b*, sem qualquer interação significativa com a temperatura, seja ela linear ou quadrática.

A influência dos fatores sobre a concentração de carotenoides está apresentada no gráfico da Figura 12. Assim como a clorofila *b*, apenas a concentração de etanol foi capaz de produzir efeito, linearmente, sobre a quantidade de carotenoides extraída.

5.6.2 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

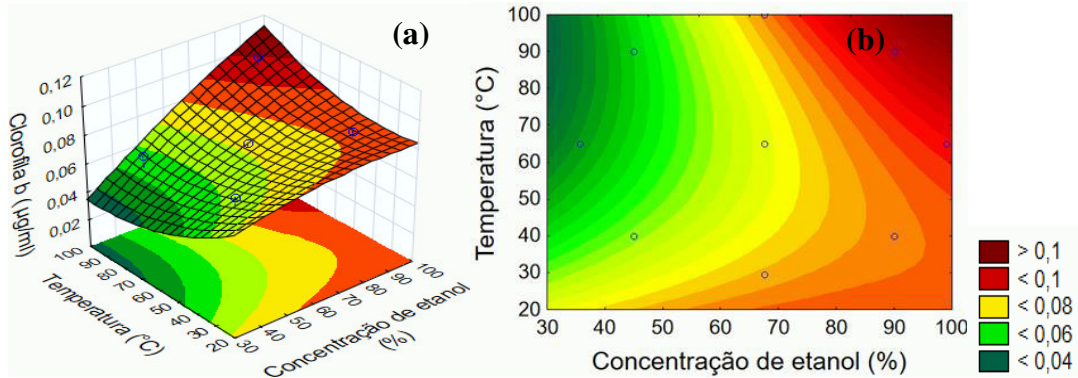
A partir dos resultados de concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, foram gerados os modelos que definem os efeitos dos fatores estudados e que permitem a construção das superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 13, 14 e 15. Os gráficos de superfície de resposta descreveram como as variáveis em teste afetaram as respostas, sendo úteis para determinar as melhores condições de extração.

Figura 13 - Superfície de resposta para clorofila *a* - 3D (a); 2D (b).



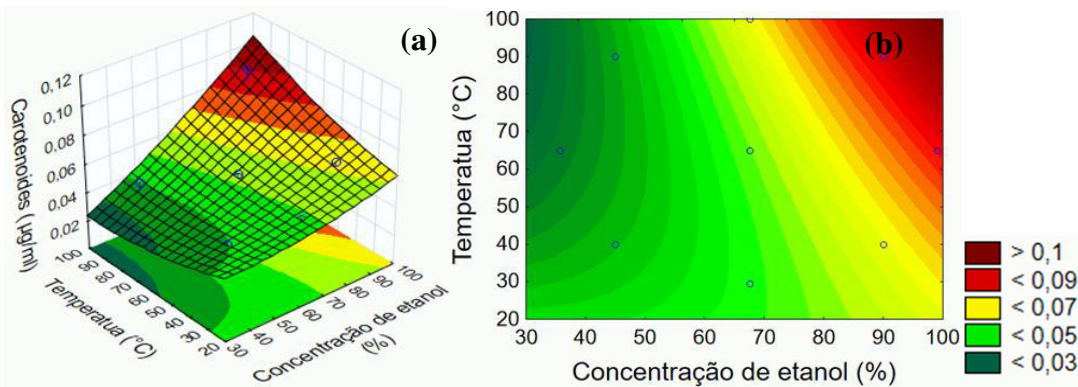
Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 14 - Superfície de resposta para clorofila *b* - 3D (a); 2D (b).



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 15 - Superfície de resposta para carotenoides - 3D (a); 2D (b).



Fonte: Próprio autor (2019).

A superfície de resposta ilustrada na Figura 13 apresenta graficamente o efeito linear da concentração de etanol e temperatura sobre a concentração de clorofila *a*. A uma temperatura de extração definida, o rendimento de clorofila *a* extraída cresceu com o aumento da concentração de etanol, podendo chegar a um valor máximo estimado de 0,30 µg/ml de pigmento. A uma concentração de etanol definida, as maiores concentrações de clorofila *a* foram observadas para altas temperaturas. A análise do gráfico (b), na Figura 13, mostrou que a faixa de temperatura encontrou-se, aproximadamente, entre 60 °C e 100 °C. Já a faixa de concentração de etanol, situou-se, aproximadamente, entre 80% e 100%.

Baseando-se nos coeficientes estimados da Tabela 10, foi definido o modelo que representa os efeitos dos parâmetros sobre a clorofila *a*. No modelo codificado, expresso pela Equação 6, Y representa a concentração de clorofila *a*, x representa a concentração de etanol e T, a temperatura do banho.

$$Y = 0,140979 + 0,063786x - 0,002214x^2 + 0,015129T + 0,010138T^2 + 0,013571xT \quad (6)$$

A Figura 14 mostra a superfície de resposta que representa graficamente a influência linear significativa da concentração de etanol na concentração de clorofila *b*. Por meio do gráfico, verificou-se que o aumento da concentração de etanol conduziu a maiores quantidades de clorofila *b*, independente da temperatura. A não significância estatística da temperatura no processo de obtenção de clorofila *b* demonstrou que pode ser possível a utilização do intervalo de temperatura estabelecido na extração. A melhor faixa de concentração de etanol foi encontrada, aproximadamente, entre 80% e 100%.

Através dos coeficientes presentes na Tabela 11, foi expresso o modelo codificado (Equação 7) de regressão múltipla ajustado para os dados de clorofila *b*.

$$Y = 0,071343 + 0,015478x - 0,001884x^2 + 0,001083T + 0,004181T^2 + 0,006594xT \quad (7)$$

A superfície de resposta gerada pelo modelo que representa a influência linear da concentração de etanol sobre a concentração de carotenoides encontra-se ilustrada na Figura 15. O perfil de tal superfície, assim como clorofila *a* e *b*, mostrou que o aumento da porcentagem de etanol afetou de maneira positiva na produção de carotenoides. A faixa com melhores condições de concentração de etanol situou-se entre 90% e 100%.

A partir dos coeficientes estimados da Tabela 13, determinou-se o modelo codificado (Equação 8) que representa numericamente o perfil da superfície de resposta para carotenoides.

$$Y = 0,052312 + 0,017594x - 0,001780x^2 + 0,004994T + 0,001821T^2 + 0,00630xT \quad (8)$$

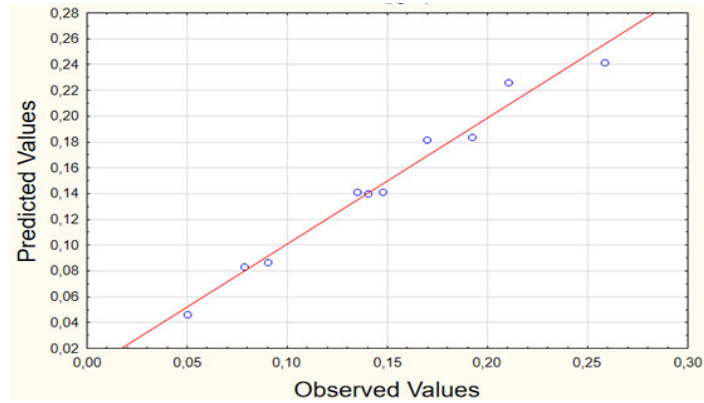
Estes resultados podem ser comprovados por trabalhos como o de Kong et al., (2012), que estudaram estatisticamente as melhores condições de temperatura e concentração de etanol na extração de clorofila total da *Chlorella vulgaris*. Segundo estes autores, o aumento da concentração de etanol e da temperatura, dentro de um certo limite, pode aumentar o rendimento de clorofila total. A máxima concentração de clorofila total encontrada por eles ocorreu sob uma concentração de etanol de 79,4% e temperatura de 61,4 °C.

5.6.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS PREDITOS E OBSERVADOS

Com base nos dados de concentração obtidos para cada pigmento, sob as condições estudadas, foram construídos os gráficos estatísticos que mostram a relação entre os valores preditos pelos modelos e os valores observados, e ilustram o grau de ajuste do modelo aos dados

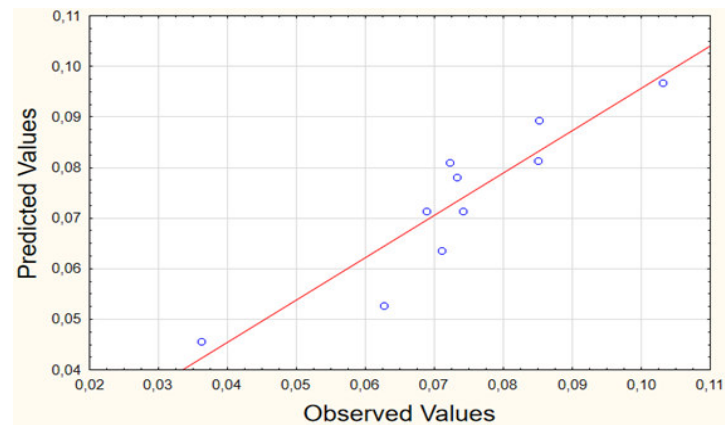
experimentais. As Figuras 16, 17 e 18 apresentam os gráficos criados para cada variável de resposta.

Figura 16 - Valores preditos vs observados para clorofila *a*



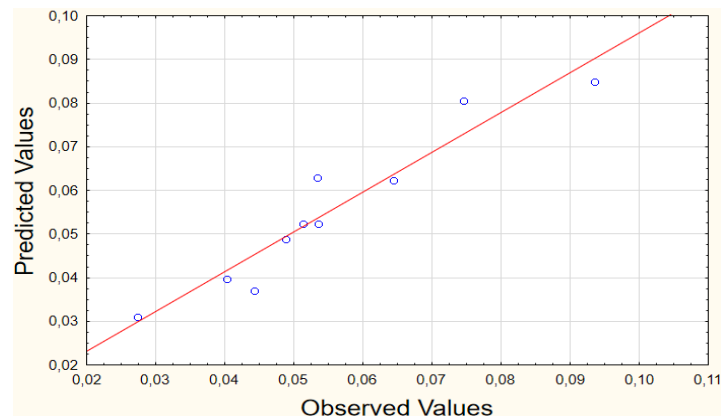
Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 17 – Valores preditos vs observados para clorofila *b*



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 18 - Valores preditos vs observados para carotenoides



Fonte: Próprio autor (2019).

A análise da Figura 16 mostrou que os pontos de dados estão próximos da reta de regressão ajustada, revelando um bom ajuste do modelo e uma proximidade entre os valores preditos e observados. Essa proximidade representa graficamente o bom valor de $R^2=0,976$ encontrado para os dados experimentais de clorofila *a*. Observou-se no gráfico que o ajuste satisfatório foi ainda mais evidente no ponto de concentração 0,140 $\mu\text{g/ml}$, sob parâmetros de 67,5 % e 29,6 °C (Tabela 9), mostrando que essas condições encontram-se situados na faixa proposta pelo modelo.

A Figura 17 representa a relação entre os valores preditos e observados para clorofila *b*. A análise gráfica dessa relação mostrou um ajuste razoável do modelo, em que alguns pontos apresentaram o mesmo comportamento da reta. O valor de $R^2=0,839$ mostra que, aproximadamente, 84% dos dados foram ajustados.

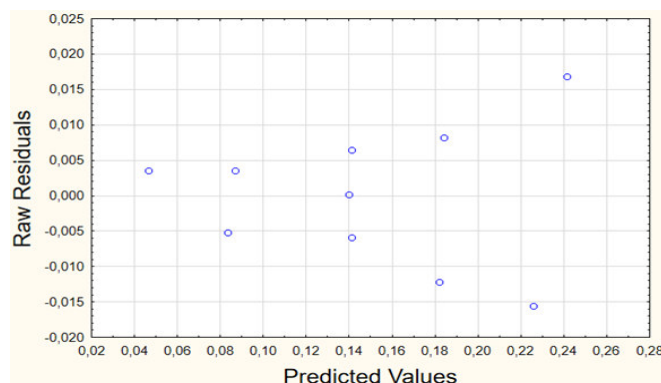
O gráfico da Figura 18 apresenta o grau de ajuste do modelo para os dados experimentais de carotenoides. Observou-se que o modelo prediz alguns valores próximos aos observados, evidenciando graficamente o bom valor de $R^2= 0,911$.

A porcentagem de dados experimentais não ajustada está associada a erros experimentais e dos modelos empíricos (Equações 3, 4 e 5) utilizados na determinação da concentração de pigmentos e carotenoides.

5.6.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS PREDITOS E RESIDUAIS

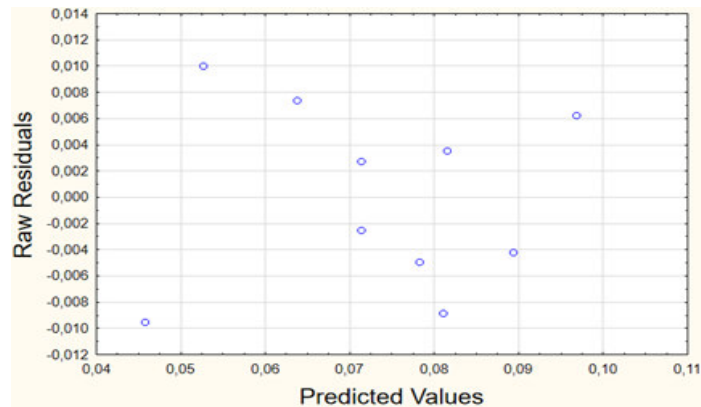
Para avaliar a qualidade de ajuste dos modelos, foram construídos os gráficos (Figuras 19, 20 e 21) que mostram a relação entre os valores preditos e residuais, verificando se a hipótese de variância constante dos resíduos é satisfeita. Os valores residuais representam a diferença entre valores preditos e observados.

Figura 19 - Valores preditos vs residuais para clorofila *a*



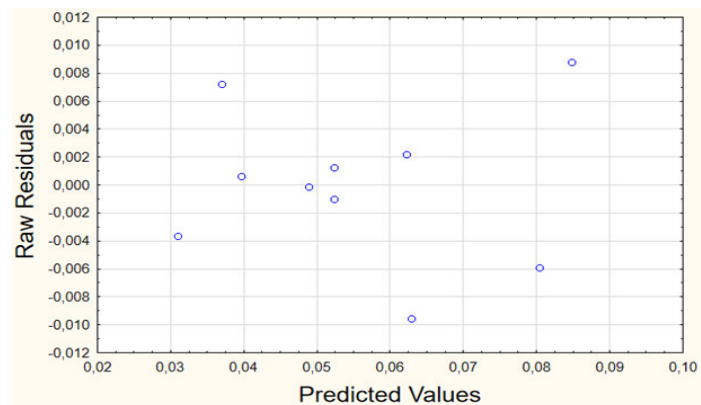
Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 20 - Valores preditos vs residuais para clorofila *b*



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 21 - Valores preditos vs residuais para carotenoides



Fonte: Próprio autor (2019).

A análise das Figuras 19, 20 e 21 mostra que os resíduos, em algumas regiões, não apresentam uma variância constante em torno de 0, indicando uma configuração de heterocedasticidade. Na Figura 19, os pontos se concentram em torno de 0, mas, aparentemente, a variabilidade aumenta no lado direito do gráfico. Essa descontinuidade indica a porcentagem de dados que não é explicada pelo modelo. Já nas Figuras 20 e 21, a descontinuidade foi observada no lado direito e esquerdo do gráfico.

Esses resultados gráficos podem indicar que os modelos gerados para descrever a influência da concentração de etanol e temperatura sobre a concentração de pigmentos extraídos são confiáveis.

6 CONCLUSÃO

O estudo do crescimento da *Chorella vulgaris* em um fotobiorreator do tipo coluna de bolhas foi feito através da construção da curva de crescimento e análise dos parâmetros cinéticos ($P_{X_{m\acute{a}x}} = 0,003 \pm 0,000$ g/L.h, $\mu_{m\acute{a}x} = 0,010$ h⁻¹ $\pm 0,003$ e $t_g = 74,37 \pm 19,86$ h). Esse estudo permitiu estimar uma concentração de biomassa ideal, e conseqüentemente uma satisfatória concentração de pigmentos a serem extraídos. A análise do perfil de pH do cultivo ajudou a monitorar o crescimento, sob uma faixa ótima de pH (6 - 10).

Baseando-se na metodologia DCCR e nas concentrações de pigmentos obtidas, as análises estatísticas mostraram numérica e graficamente as melhores condições de extração. As variáveis de resposta (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) sofreram influências significativas e lineares da concentração de etanol. O efeito linear da temperatura mostrou significância estatística apenas na extração de clorofila *a*.

Os perfis das superfícies de resposta, geradas pelos modelos que representam matematicamente os efeitos dos parâmetros sobre cada variável de resposta, evidenciaram graficamente as melhores condições de extração de cada pigmento. Altas concentrações de etanol, entre 80% e 100% podem promover significativamente a extração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides. Já altos valores de temperatura, sob uma faixa de 60°C e 100°C, podem permitir a obtenção de maiores concentrações de clorofila *a*. Dessa forma, as superfícies de resposta ofereceram uma abordagem eficiente e viável para a análise das melhores condições de extração.

A aplicação das condições de concentração de etanol e temperatura, além da técnica de extração estabelecida, foram cuidadosamente avaliadas, levando em consideração as estruturas e propriedades dos pigmentos. Os resultados experimentais obtidos e as análises estatísticas posteriores podem melhorar o desenvolvimento e a implementação adequada de processos mais eficientes e economicamente viáveis.

As sugestões subseqüentes para trabalhos futuros envolvem a decodificação dos modelos encontrados através de métodos computacionais, buscando determinar as condições ótimas de extração que permitam a obtenção de maiores concentrações de pigmentos. Além disso, a realização de um estudo do processo extrativo, sob as condições encontradas, se faz necessário, visando a validação dos resultados determinados.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. M. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas**. São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 141 p. Dissertação (Doutorado), 2014.

ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 125-136, jul./dez. 2014.

ANYANWU, R. C.; RODRIGUEZ, C.; DURRANT, A.; OLABI, A. G. Microalgae Cultivation Technologies. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, 2018.

BLAIR, M. F.; KOKABIAN, B.; GUDE, V. G. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Mississippi, v. 2, p. 665 - 674, 2013.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial. Fundamentos**, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 543 p. V.2, 2001.

BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

CHEW, K. W.; CHIA, S. R.; SHOW, P. L.; YAP, Y. J.; LING, T. C.; CHANG, J. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Selangor, v. 91, p. 332-344, 2018.

CHEW, K. W.; CHIA, S. R.; SHOW, P. L.; YAP, Y. J.; LING, T. C.; CHANG, J.; LEE, J.; JUAN, J. C. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, Selangor, v. 229, p. 53-62, 2017.

CORRÊA, D. O. **Desenvolvimento e caracterização do cultivo de microalgas em fotobiorreator alimentado por emissões gasosas de motores**. 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

D'ALESSANDRO, E. B.; FILHO, N. R. A. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Goiânia, v. 58, p. 832-841, 2015.

DANTAS, D. M. M. **Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas**. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE.

DURÁN, I.; RUBIERA, F.; PEVIDA, C. Microalgae: Potential precursors of CO₂ adsorbents. **Journal of CO₂ Utilization**, Oviedo, v. 26, p. 454–464, 2018.

ENAMALA, M. K.; ENAMALA, S.; CHAVALI, M.; DONEPUDI, J.; YADAVALLI, R.; KOLAPALLI, M.; ARADHYULA, T. V.; VEUPURI, J.; KUPPAM, C. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Andhra Pradesh, v. 94, p. 49-68, 2018.

FRÉ, N. C. **Influência das condições de cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* na produção de carotenoides e lipídios**. 2016. 82 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

GARCIA-GONZALEZ, L.; MOZUMDER, M. S. I.; DUBREUIL, M.; VOLCKE, E. I. P.; DE WEVER, H. Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO₂ using a two-stage cultivation system. **Catalysis Today**, Mol, v. 257, p. 237–245, 2014.

HAMADA, M.; SCHRÖDER, K.; BATHIA, J.; KÜRN, U.; FRAUNE, S.; KHALTURIN, K.; SHINZATO, C.; SATOH, N.; BOSCH, T. Metabolic co-dependence drives the evolutionarily ancient Hydra-*Chlorella* symbiosis. **eLIFE**, New Jersey, v. 7, p. 1-37, 2018.

HOSIKIAN, A.; LIM, S.; HALIM, R.; DANQUAH, M. K. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, Victoria, v. 2010, p. 1-11, 2010.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oslo, v. 75, p. 692-709, 2016.

KACZMAR **Phytoplankton pigments**. 2004. Disponível em: <<http://water.iopan.gda.pl/~kaczmar/bdo/pigments.htm>>. Acesso em: 20 de set. de 2019.

KLEIN, A. P. **Avaliação de diferentes fotobiorreatores para microalgas**. 2015. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2015.

KLEIN, B. C. **Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração**. 2013. 128 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; FILHO, R. M. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Campinas, v. 82, p. 1376-1392, 2017.

KOCHEM, L. H. **Caracterização de fotobiorreator air-lift para cultivo de microalgas**. 2010. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2010.

KONG, W.; LIU, N.; ZHANG, J. YANG, Q.; HUA, S.; SONG, H.; XIA, C. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, Índia, v. 51, p. 2006 - 2013, 2012.

KULKARNI, S.; NIKOLOV, Z. Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, Texas, v. 35, p. 185–193, 2018.

KUMAR, A., ERGAS, S., YUAN, X., SAHU, A., ZHANG, Q., DEWULF, J., MALCATA, F. X., VAN LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

MAGRO, F. G. Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 159-174, jan./jun. 2016.

MARINHO, Y. F., SANTOS, A. P. F., SANTOS, L. B. G. ; VASCONCELOS, R. F. L., KALAZANS, N. K. F., NASCIMENTO, R. D. M., DANTAS, D. M. M., GÁLVEZ A. O. **Avaliação do Crescimento da *Chlorella vulgaris* em Diferentes pH Objetivando sua Inserção na Matéria prima do Biodiesel**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

MATA, T. M., ANTONIO, A. M., NÍDIA S. C. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renew Sustainable Energy**, v.14, p.217-232, 2010.

MOLAZADEH, M.; AHMADZADEH, H.; POURIANFAR, H. R.; LYON, S.; RAMPELOTTO, P. H.; The use of microalgae for coupling wastewater treatment with CO₂ biofixation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1-12, 2019.

MOZUMDER, M. S. I.; GARCIA-GONZALEZ, L.; DE WEVER, H.; VOLCKE, E. I. P. Model-based process analysis of heterotrophic-autotrophic poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production. **Biochemical Engineering Journal**, Gent, v. 114, p. 202–208, 2016.

RAZZAK, S. A.; ALI, S. A.; HOSSAIN, M. M.; DELASA, H. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Dhahran, v. 76, p. 379-390, 2017.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, M. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Jamshoro, v. 92, p. 394-404, 2018.

SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. L. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and Chemical Toxicology**, Haryana, v. 120, p. 616-624, 2018.

SILVA, J.; ALVES, C.; PINTEUS, S.; REBOLEIRA, J.; PEDROSA, R.; BERNARDINO, S. Chlorella. **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**, Peniche, p. 187-193, 2018.

SOARES, E. J.; SILVA, N. F.; COSTA, A. M. M.; RAMOS, A. N.; FERREIRA, A. B. Biotecnologia na Produção de Combustíveis: influência da luminosidade para o desenvolvimento e produção lipídica da microalga *Chlorella vulgaris*. **Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências**, Campina Grande, p. 1-8, 2019.

STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements**. London: Cambridge University Press, 1973.

TANDON, P.; JIN, Q. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Shanghai, v. 80, p. 1089-1099, 2017.

VENTURA, S. P. M.; NOBRE, B. P.; ERTEKIN, F.; HAYES, M.; GARCÍA-VAQUERO, M.; VIEIRA, F.; KOC, M.; GOUVEIA, L.; AIRES-BARROS, M. L.; PALAVRA, A. M. F. Extraction of value-added compounds from microalgae. **Microalgae-based biofuels and bioproducts**, Lisboa, v. 19, p. 461-483, 2017.

VIANA, C. R. Avaliação do cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* em efluente doméstico. **II Simpósio de Bioenergia e Biocombustíveis do Mercosul**, Foz do Iguaçu, p. 1-10, 2014.

VIDOTTI, A. D. S. **Análise proteômica, crescimento e composição celular da microalga *Chlorella vulgaris* sob autotrofia, mixotrofia e heterotrofia**. 2015. 191 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

VIDOTTI, A. D. S. **Cultivo heterotrófico axênico de *Chlorella vulgaris*: inibição por substrato**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

VIEIRA, T. Q. **Uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella sp* com potencial para a produção de biocombustíveis**. 2013. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Sanitária e Ambiental) -Universidade Estadual da Paraíba – UEP, Campina Grande, 2013.

WOJCIECHOWSKI, J.; STRAUBE, A.; CAVALCANTE, K. P.; MIRANDA, F. E. Isolamento e cultivo de microalgas. **Researchgate**, Paraná, 2013.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal of Hydrogen Energy**, Wuhan, v. 42, p. 8505-8517, 2016.