



LAÍS FERREIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BINÔMIO TEMPO X
TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS DA
MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM REGIME
FOTOAUTOTRÓFICO**

LAÍS FERREIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BINÔMIO TEMPO X
TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS DA
MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM REGIME
FOTOAUTOTRÓFICO**

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. Dra. Annamaria D. S. Vidotti

São Luís
2019

Sousa, Laís Ferreira de.

Avaliação do efeito do binômio tempo x temperatura na extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris* em regime fotoautotrófico / Laís Ferreira de Sousa. - 2019. 64 f.

Orientador(a): Annamaria Dória Souza Vidotti.

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

1. Carotenoides. 2. Clorofila a. 3. Clorofila b. 4. Delineamento Composto Central Rotacional. 5. Microalgas. I. Vidotti, Annamaria Dória Souza. II. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. ANNAMARIA DÓRIA SOUZA VIDOTTI
Orientadora – DEEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS DALTRO DE FREITAS
DEEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. JAIVER EFREN JAIMES FIGUEROA
DEEQ/CCET/UFMA

12 de dezembro de 2019

DADOS CURRICULARES**Laís Ferreira de Sousa**

NASCIMENTO	14/04/1997 – SÃO LUÍS / MA
FILIAÇÃO	Waldemir José Carvalho de Sousa Eliene da Cruz Ferreira de Sousa
2014/2019	Curso de Graduação Engenharia Química - Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho ao Bom Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que me criou e me sustenta a todo instante, que se entregou na cruz em favor da minha salvação e que é a causa primeira e o fim último de tudo, em geral, e de minha vida, em particular.

À Virgem Maria Santíssima, Senhora minha, que sempre rogou por esta sua filha pecadora junto a Jesus Cristo e que nunca me desamparou, como Mãe que é.

Aos meus queridos pais, Waldemir e Eliene, por todo o amor destinado a mim desde antes do meu nascimento, fazendo inúmeros sacrifícios em favor do meu desenvolvimento e por terem sempre acreditado que eu era capaz. Devo minha vida a vocês e os amo de todo o coração.

Ao meu amor, Gabriel, por sua constante companhia e seu apoio incondicional, por ter trilhado todo esse caminho comigo, me ouvindo pacientemente e compartilhando os momentos felizes e os mais tristes ao meu lado. Também por todas dúvidas tiradas, trabalhos e estudos feitos sempre juntos. Te amo, meu bem.

À minha tia e madrinha, Maria da Cruz, e à minha vizinha, Teresinha, pelo carinho, preocupação e apoio, assim como a toda a minha família.

À minha amiga Camila, por todo o suporte e companhia nesses anos de graduação. Não conseguiria sem você.

À minha orientadora, professora Annamaria Vidotti, pelo o tempo dedicado, o suporte, a paciência e as dúvidas tiradas nos anos de trabalhos desenvolvidos.

Aos professores participantes da banca de defesa, Antônio de Freitas e Jaiver Figueroa, e a todos os professores que encontrei durante o curso, por todo o conhecimento transmitido.

A todos os colegas da graduação, pelas alegrias e momentos difíceis compartilhados.

“Nada te perturbe,
nada te assuste.
Tudo passa.
Deus não muda.
A paciência tudo alcança.
Quem a Deus tem nada lhe falta.
Só Deus basta!”

Santa Teresa D'Ávila

SOUSA, L. F. **Avaliação do efeito do binômio tempo x temperatura na extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris* em regime fotoautotrófico.** 2019. 64 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

A biomassa de microalgas possui uma série de aplicações em virtude de conter moléculas atrativas industrialmente, como lipídios, proteínas, carboidratos e pigmentos, os quais possuem propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, ação antioxidante, entre outros benefícios que chamam a atenção do setor industrial. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as melhores condições de tempo e temperatura do banho no processo de extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo fotoautotrófico, aplicando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Para isso, a microalga foi cultivada em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas, sob agitação, aeração e iluminação artificial, utilizando meio BBM modificado. Construiu-se a curva de crescimento do microrganismo e foram calculados seus parâmetros cinéticos. Para promover a extração dos pigmentos, utilizou-se etanol 95% (v/v) e testaram-se diferentes condições de tempo e temperatura, determinando as concentrações extraídas de clorofila *a*, *b* e carotenoides através de técnica de espectrofotometria. A microalga passou pelas fases de latência, exponencial e início da estacionária durante o cultivo. Os parâmetros cinéticos encontrados foram: densidade celular máxima de $0,758 \pm 0,137$ g/L, velocidade máxima específica de crescimento de $0,0085 \pm 0,0005$ h⁻¹, tempo de geração com valor de $82,06 \pm 4,94$ h e produtividade máxima de $0,0021 \pm 0,0004$ g/L.h. Avaliando a extração de pigmentos, para clorofila *a*, temperatura quadrática e tempo linear foram os efeitos significativos. No caso da clorofila *b*, além desses fatores, também obteve relevância a temperatura linear. Já para os carotenoides, apenas temperatura linear foi significativa. As máximas concentrações de pigmento indicadas pelos modelos foram obtidas entre 50°C e 80°C e acima de 48 minutos para clorofila *a*, entre 55°C e 75°C e acima de 50 minutos para clorofila *b* e acima de 95°C em toda a faixa de tempo estudada no caso dos carotenoides.

Palavras-chave: Microalgas. Clorofila *a*. Clorofila *b*. Carotenoides. Delineamento Composto Central Rotacional.

SOUSA, L. F. **Evaluation of the effect of time x temperature binomial on the extraction of microalgae *Chlorella vulgaris* pigments under photoautotrophic regime.** 2019. 64 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 biomass has a number of applications because it contains industrially attractive molecules such as lipids, proteins, carbohydrates and pigments. These molecules have anti-inflammatory and anticancer properties, antioxidant action, among other benefits that attract the attention of industrial sector. From this, the objective of this work was to evaluate the best conditions of time and temperature of the water bath in the process of pigment extraction from microalgae *Chlorella vulgaris* in photoautotrophic cultivation, applying a Central Composite Rotational Design (CCRD). For this, microalgae was cultivated in bubble column photobioreactor, with agitation, aeration and artificial lighting, using modified bold's basal medium (BBM). The microalgae growth curve was constructed and its kinetic parameters were calculated. To promote the extraction of the pigments, 95% (v/v) ethanol was used and different time and temperature conditions were tested, determining the concentrations extracted of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids by spectrophotometric technique. The microalgae went through lag, exponential and early stationary phases during cultivation. The kinetic parameters found were: maximum cell density of 0.758 ± 0.137 g/L, specific maximum growth speed of 0.0085 ± 0.0005 h⁻¹, generation time with a value of 82.06 ± 4.94 h and maximum productivity of 0.0021 ± 0.0004 g/L.h. Evaluating pigment extraction for chlorophyll *a*, quadratic temperature and linear time were the significant effects. In the case of chlorophyll *b*, besides these factors, the linear temperature was also relevant. For carotenoids, only linear temperature was significant. The maximum pigment concentrations indicated by the models were obtained between 50°C and 80°C and above 48 minutes for chlorophyll *a*, between 55°C and 75°C and above 50 minutes for chlorophyll *b* and above 95°C throughout time range studied in the case of carotenoids.

Keywords: Microalgae. Chlorophyll *a*. Chlorophyll *b*. Carotenoids. Central Composite Rotational Design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> vista ao microscópio	06
Figura 2 – Ultraestrutura esquemática da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> representando diferentes organelas	07
Figura 3 – Estrutura química das clorofilas <i>a</i> e <i>b</i>	09
Figura 4 – Estrutura química de alguns carotenoides	11
Figura 5 – Exemplos de cultivo aberto de microalgas: tanques de fibra de vidro (a) e do tipo raceway (b)	14
Figura 6 – Exemplos de cultivo fechado de microalgas (fotobiorreatores)	15
Figura 7 – Fases de crescimento microbiano	16
Figura 8 – Esquema do experimento	19
Figura 9 – Aparato experimental geral (a) e destaque para fotobiorreatores deste trabalho (b)	19
Figura 10 – Etapas de agitação (a), banho maria (b) e centrifugação (c) das amostras na fase de extração dos pigmentos	22
Figura 11 – Curva padrão do experimento	25
Figura 12 – Perfil de crescimento celular da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	26
Figura 13 – Fotobiorreatores no início (a) e ao final do cultivo (b)	27
Figura 14 – pH do cultivo ao longo do experimento	29
Figura 15 – Diagrama de Pareto para clorofila <i>a</i>	31
Figura 16 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de clorofila <i>a</i> extraída	32
Figura 17 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para clorofila <i>a</i>	33
Figura 18 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para clorofila <i>a</i>	34
Figura 19 – Diagrama de Pareto para clorofila <i>b</i>	35
Figura 20 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de clorofila <i>b</i> extraída	36
Figura 21 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para clorofila <i>b</i>	37
Figura 22 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para clorofila <i>b</i>	37
Figura 23 – Diagrama de Pareto para carotenoides	38
Figura 24 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de carotenoides extraída	39
Figura 25 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para carotenoides	40

Figura 26 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para carotenoides 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio BBM modificado	17
Tabela 2 – Composição da solução traço	18
Tabela 3 – Parâmetros cinéticos	21
Tabela 4 – Matriz do DCCR para as condições de tempo e temperatura do banho maria	23
Tabela 5 – Peso (amostra + tubo) durante secagem (metodologia do peso seco)	24
Tabela 6 – Absorbâncias e concentrações para construção da curva padrão	25
Tabela 7 – Valores de concentração celular durante o cultivo para triplicata biológica	26
Tabela 8 – Parâmetros cinéticos do cultivo da microalga	28
Tabela 9 – Concentrações de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides para diferentes condições de tempo e temperatura do banho	30
Tabela 10 – p-valores e coeficientes do modelo para fatores testados na extração de clorofila <i>a</i>	31
Tabela 11 – p-valores e coeficientes do modelo para fatores testados na extração de clorofila <i>b</i>	35
Tabela 12 – p-valores e coeficientes do modelo para fatores testados na extração de carotenoides	38

SUMÁRIO

	RESUMO.....	viii
	ABSTRACT.....	ix
	LISTA DE FIGURAS.....	x
	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
3.2	<i>Chlorella vulgaris</i>	05
3.3	Pigmentos microalgais	07
3.3.1	Clorofila	08
3.3.2	Carotenoides	10
3.4	Extração de pigmentos	12
3.5	Tipos de cultivo	13
3.6	Sistemas de cultivo de microalgas	14
3.7	Curva de crescimento microbiano	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Local da pesquisa	17
4.2	Meio de cultivo	17
4.3	Preparo do inóculo	18
4.4	Aparato experimental	18
4.5	Métodos analíticos utilizados	20
4.6	Parâmetros cinéticos	21
4.7	Extração dos pigmentos celulares	21
4.8	Planejamento experimental	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1	Curva padrão	24
5.2	Curva de crescimento da microalga	25

5.3	Parâmetros cinéticos do cultivo	28
5.4	pH do cultivo	29
5.5	Extração de pigmentos	30
5.5.1	Clorofila <i>a</i> extraída	31
5.5.2	Clorofila <i>b</i> extraída	34
5.5.3	Carotenoides extraídos	38
6	CONCLUSÃO.....	41
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares que produzem biomassa de forma mais eficiente que as plantas superiores, através da utilização de energia solar e dióxido de carbono (ARAÚJO, 2011). Esses microrganismos podem ser encontrados em água salgada ou doce e também na superfície de alguns tipos de solos (LOPES, 2017). Silveira (2015) aponta que o gênero de microalga mais cultivado comercialmente é o *Chlorella*, que possui grande capacidade fotossintética e é rico em micronutrientes, além de ter alto teor de sais minerais, proteínas, ácidos graxos e clorofila (COSTA et al., 2006).

Costa et al. (2006) apontaram que o cultivo de microalgas tem algumas vantagens, a exemplo da simplicidade de nutrientes necessários, da possibilidade de duplicação da biomassa em um curto período de tempo e da existência de manipulações em suas condições que aumentam a produção de um metabólito específico. Esses pontos positivos atraem a atenção dos estudos para esse grupo de microrganismos.

As microalgas são consideradas fontes potenciais de nutrientes de alto valor, como pigmentos, proteínas, carboidratos e lipídios (KHANRA et al., 2018). Dessa forma, possuem características únicas que dão a esses microrganismos importância industrial, uma vez que sua biomassa é usada em inúmeros produtos: na nutrição humana e animal, como biofertilizantes e bioquímicos de isótopos estáveis e para a síntese de drogas antimicrobianas, antivirais, antibacterianas e anticâncer (RIZWAN et al., 2018). Também é possível citar o emprego de microalgas na produção de biocombustíveis e na biorremediação de ambientes poluídos.

Outra aplicabilidade das microalgas está relacionada à extração e obtenção de seus pigmentos. Esses microrganismos são capazes de produzir uma grande variedade das referidas moléculas, como clorofila e carotenoides. Esses e outros pigmentos obtidos a partir de microalgas são usados na indústria de cosméticos como colorantes, em cremes antienvhecimento, produtos refrescantes ou regeneradores e para reparação de peles danificadas (KHANRA et al., 2018).

A busca por produzir pigmentos a partir de microalgas se justifica, além de suas propriedades químicas benéficas, pela necessidade de substituir corantes artificiais por naturais, uma vez que muitos dos primeiros são tóxicos. Além disso, Silva (2008) apresentou certas vantagens em se produzir pigmentos por microalgas em relação aos similares de vegetais e animais: o cultivo contínuo e a rápida manipulação desses microrganismos.

A extração de produtos microalgais intracelulares é desafiadora, uma vez que as células das microalgas são pequenas, cobertas por uma parede celular relativamente espessa e

seus produtos estão localizados em glóbulos ou ligados a membranas celulares (GÜNERKEN et al., 2015). Em relação aos pigmentos, muitas técnicas vêm sendo desenvolvidas para realizar a sua extração, como a utilização de solventes. Verifica-se que, quando temperaturas mais elevadas são empregadas no processo, a capacidade do solvente alcançar os locais em que o produto intracelular está localizado é aumentada. Entretanto, altas temperaturas também podem provocar a degradação dos pigmentos (MENDONÇA, 2014).

Dessa forma, é extremamente importante estudar o efeito da temperatura e do tempo aos quais a biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* deve ser exposta na extração de pigmentos por solvente, podendo, assim, contribuir para a otimização do processo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as melhores condições do processo de extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo fotoautotrófico, aplicando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas;
- Determinar os parâmetros cinéticos de crescimento celular com base nos dados obtidos experimentalmente;
- Extrair pigmentos a partir da biomassa de microalga produzida;
- Estudar o binômio tempo x temperatura do banho-maria no processo de extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris* utilizando a metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- A partir do planejamento empregado, determinar qual das variáveis estudadas exerce maior influência sobre o rendimento da extração de pigmentos microalgais;
- Definir, utilizando o DCCR, as características ótimas operacionais para maximizar o processo de extração de pigmentos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

O termo microalgas está relacionado a algas de dimensões microscópicas e a maioria possui hábitos planctônicos, ou seja, é capaz de se manter suspensa na coluna d'água, embora existam algumas espécies bentônicas, as quais são associadas ao fundo dos oceanos e sistemas aquáticos continentais, como rios e lagos, e terrestres (ambientes úmidos) (GORGÔNIO, 2013).

As microalgas são reconhecidas como uma das formas mais antigas de vida do planeta Terra e consistem em uma ampla gama de organismos autotróficos que crescem pela fotossíntese, a exemplo do que fazem as plantas superiores (MIYAWAKI, 2014). A maioria é unicelular, como *Chlorella sp.*, porém algumas espécies podem formar colônias ou apresentar estrutura filamentosa, como ocorre com os gêneros *Scenedesmus* e *Spirulina*, respectivamente (SUGAI, 2012).

Presentes em praticamente todos os ecossistemas existentes na terra, as microalgas representam uma grande variedade de espécies vivas em diferentes condições ambientais. Apesar da quantidade de espécies existentes não ser conhecida exatamente, são encontrados relatos de 200.000 até alguns milhões de representantes. Essa grande diversidade caracteriza as microalgas como fonte ilimitada de bioprodutos. Porém, apenas um número limitado já foi estudado até os dias de hoje (MIYAWAKI, 2014).

As microalgas vêm sendo empregadas como fonte de muitos produtos, incluindo químicos (vitaminas, pigmentos e antioxidantes), óleos (ácido graxo ômega 3), proteínas, alimentação humana e animal, além de biomassa para produção de etanol e metanol (CHEN et al., 2018), entre outras aplicabilidades.

O cultivo de microalgas em larga escala iniciou-se a partir da metade do século XX. Miyawaki (2014) mostrou que, na década de 50, a ideia de utilizar microalgas para tratamento de águas residuais começou a ser explorada, e, em 1960, a atenção foi voltada para o desenvolvimento de alimentos para astronautas. Dessa forma, a produção comercial de *Chlorella* como um novo alimento no Japão e Taiwan foi um sucesso. Em 1970, a produção de biomassa de microalgas começou a ser estudada como fonte de combustível e fertilizante. Já em 1980, uma nova tendência foi a utilização desses microrganismos como fonte de produtos químicos.

No Brasil, entretanto, a produção comercial de microalgas ainda tem maior foco na utilização da biomassa como ração na aquicultura de peixes marinhos, moluscos e crustáceos (SUGAI, 2012).

Segundo Procópio (2014), as microalgas são mais eficientes que as plantas terrestres na conversão da luz solar em energia bioquímica. Isso é feito através da produção de compostos orgânicos via processo fotossintético. Também é apontado que a maioria das espécies microalgais apresenta crescimento mais rápido que os vegetais superiores, possibilitando maior rendimento de biomassa. Além disso, as microalgas podem ser cultivadas em meios salinos simples e têm uma produção de lipídios pelo menos quinze vezes maior, por exemplo, que a da palma (*Elaeis guineensis*), um dos vegetais com maior rendimento e produtividade (RADMANN; COSTA, 2008).

Sugai (2012) aponta uma série de outras vantagens das microalgas para aplicações comerciais:

- Maior eficiência de absorção de luz solar, utilizando até 10% da luz disponível, enquanto que plantas superiores utilizam apenas 4%. Esse fator tem como consequência para as microalgas maior velocidade de crescimento e produtividade por área ocupada;
- Safra de maior duração;
- Facilidade de separação e purificação de compostos;
- Possibilidade da utilização de resíduos, emissões gasosas e efluentes agroindustriais, o que reduz o custo e a demanda por água;
- Dependendo da espécie, possibilidade de uso da água do mar;
- Utilização de terras não agricultáveis;
- Opção de obter mais de um produto no mesmo processo, seguindo o conceito de biorrefinaria.

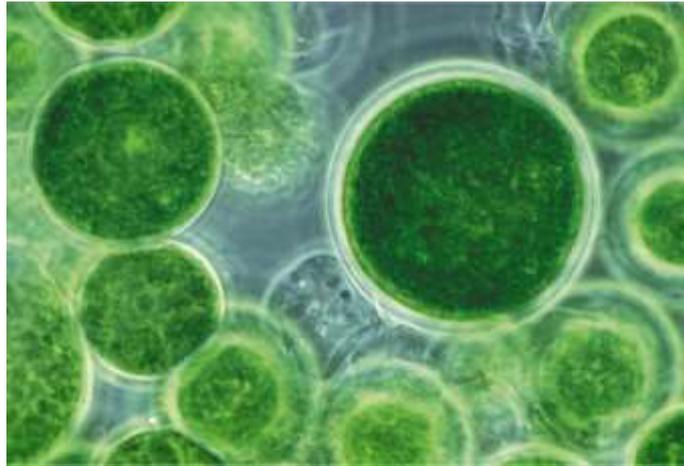
Apesar dessas vantagens, o custo dos processos envolvendo microalgas é muito alto para a maioria das aplicações, como para produção de biocombustíveis, se comparado àqueles que utilizam plantas superiores. Uma das alternativas que se apresentam para viabilizar o cultivo em larga escala de microalgas é agregar, em uma biorrefinaria, a produção de biodiesel à de produtos de alto valor agregado (SUGAI, 2012), como os pigmentos.

3.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris (Figura 1) é uma microalga eucariótica verde pertencente ao domínio Eukaryota, reino Protista, filo Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales, família Chlorellaceae, gênero *Chlorella* e espécie *Chlorella vulgaris*. Foi

descoberta em 1890 pelo pesquisador holandês Martinus Willem Beijerinck como a primeira microalga com um núcleo bem definido. O nome *Chlorella* vem da junção da palavra grega *chloros* (Χλωρός), que quer dizer verde, com o sufixo latino *ella*, o qual se refere ao seu tamanho microscópico (SAFI et al., 2014).

Figura 1 – Microalga *Chlorella vulgaris* vista ao microscópio



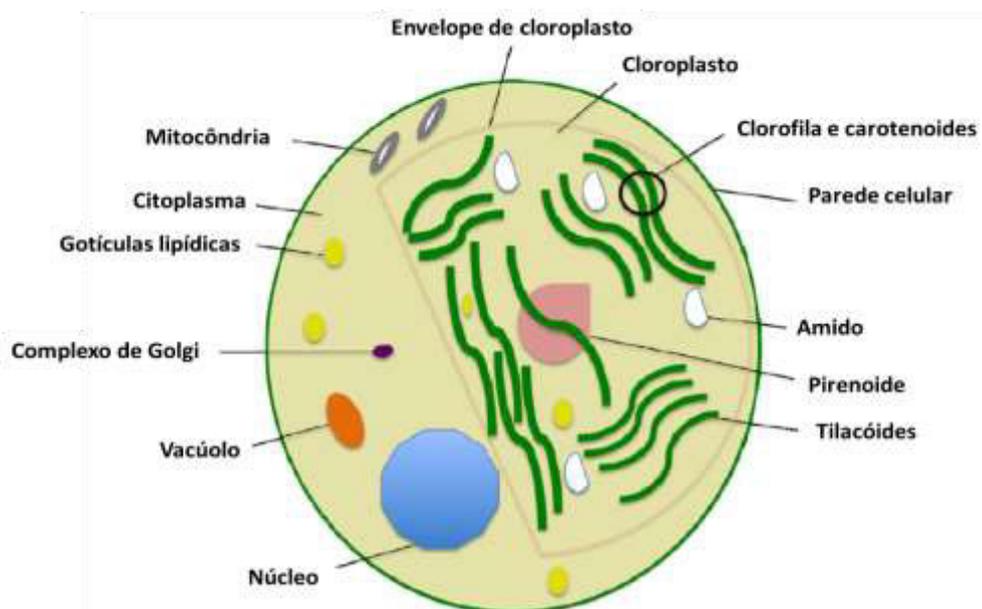
Fonte: Sugai (2012).

Essa microalga é unicelular, com diâmetro variando entre 2 μm e 12 μm e tem forma esférica, globular ou elipsoidal, podendo ser encontrada em água doce ou marinha (RODRIGUES, 2017). A Figura 2 apresenta um esquema da *Chlorella vulgaris*, evidenciando que a microalga possui vários elementos estruturais semelhantes às plantas.

A microalga *Chlorella vulgaris* tem a capacidade de crescer de forma autotrófica, em que as células captam energia solar e usam gás carbônico como fonte de carbono, heterotrófica, quando são utilizados compostos orgânicos para o crescimento, ou mixotrófica, quando o dióxido de carbono e o carbono orgânico são assimilados simultaneamente e os metabolismos respiratório e fotossintético operam de forma concorrente (SILVEIRA, 2015).

Além disso, esse microrganismo é rico em micronutrientes, possui alto teor de clorofila, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos (COSTA et al., 2006). Segundo Kulkarni e Nikolov (2018), é uma boa fonte de proteína e carotenoides. O conteúdo proteico da *C. vulgaris* pode chegar a 58% do peso seco da célula. Sua parede celular é geralmente rígida e composta predominantemente por hemicelulose e sacarídeos, o que dificulta a liberação de material intracelular, como os pigmentos (ZHENG et al., 2011).

Figura 2 – Ultraestrutura esquemática da microalga *Chlorella vulgaris* representando diferentes organelas



Fonte: Safi et al. (2014) (modificado).

3.3 Pigmentos microalgais

As microalgas têm sido consideradas como potenciais biocatalisadores em reações de conversão. Possuem a capacidade de gerar bioprodutos de natureza intracelular e metabólitos extracelulares passíveis de utilização como insumos intermediários ou produtos finais de uma série de consumíveis (RODRIGUES, 2014).

Dessa forma, uma vez que, segundo Weber et al. (2017), todos os componentes gerados a partir da biomassa de microalgas possuem alto valor para a geração de produtos aplicáveis em diversos setores industriais, as microalgas vêm sendo direcionadas como foco dos processos de biorrefinaria economicamente viáveis. Cherubini (2010), Octave e Thomas (2009) denominam biorrefinaria como uma nova abordagem de obtenção de matérias primas e produtos renováveis em um processo integrado de forma sustentável.

Segundo Prasanna, Jaiswal e Kaushik (2008), as microalgas foram identificadas como um dos grupos mais promissores de organismos para isolar produtos naturais e ativos bioquímicos de alto valor agregado. Elas possuem a capacidade de sintetizar, metabolizar, acumular e secretar uma significativa quantidade de compostos orgânicos diversos, os quais possuem alto valor agregado com potencial de aplicação em indústrias como a farmacêutica, a alimentícia e a cosmética (YAMAGUCHI, 1996).

Dentre os produtos obtidos a partir de microalgas e que apresentam possíveis propriedades bioativas encontram-se os pigmentos. Esses compostos naturais têm importância terapêutica e uma vasta gama de aplicações, o que lhes confere alto valor econômico. Algumas de suas propriedades físico-químicas dão aos pigmentos a capacidade de participar de uma série de reações e desempenhar papéis essenciais em diversas atividades a nível celular e em sistemas alimentícios. Além disso, são atribuídas aos pigmentos presentes nas microalgas, como clorofila, carotenoides e ficocianinas, propriedades anti-inflamatórias, imunossupressoras e hepatoprotetoras (RODRIGUES, 2014). O quadro 1 apresenta os principais pigmentos presentes na microalga *Chlorella vulgaris* sob diferentes condições de crescimento.

No metabolismo das microalgas, a luz é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes (unidades fotossintéticas). Cada tipo dessas moléculas difere entre si por sua composição química e apresenta diferente capacidade de absorver luz em determinado comprimento de onda. A luz utilizada pelas algas fotossintetizantes encontra-se na faixa espectral da radiação solar de 400 a 700 nm, que corresponde à radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (SOARES, 2010).

Quadro 1 – Teor de potenciais pigmentos na *C. vulgaris* sob diferentes condições de crescimento

Pigmento	$\mu\text{g/g}$ (peso seco)
β -caroteno	7-12000
Astaxantina	550000
Cantaxantina	362000
Luteína	52-3830
Clorofila <i>a</i>	250-9630
Clorofila <i>b</i>	72-5770
Feofitina <i>a</i>	2310-5640
Feofitina <i>b</i>	Não disponível
Violaxantina	10-37

Fonte: Safi et al. (2014).

3.3.1 CLOROFILA

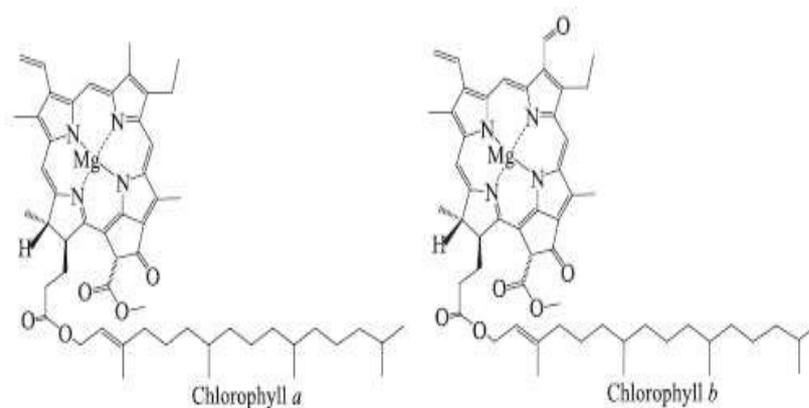
Clorofilas são pigmentos verdes e lipossolúveis com um anel de porfirina, responsáveis por converter energia solar em energia química na fotossíntese (D'ALLESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016). Esse tipo de pigmento está presente em

plantas, algas e cianobactérias (KHANRA et al., 2018). O nome clorofila foi proposto por Pelletier e Caventou, em 1818, para designar a substância verde que se podia extrair das folhas com o auxílio do álcool (STREIT et al., 2005).

A maioria das microalgas tem clorofila *a* em sua composição, mas algumas podem ter também clorofila *b* e *c* (D'ALLESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016). A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético). Já a clorofila *b*, assim como a clorofila *c* e a clorofila *d*, é um pigmento acessório, que auxilia na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação (STREIT et al., 2005).

A estrutura das clorofilas é macrocíclica assimétrica totalmente insaturada e constituída por quatro anéis de pirrol. Além disso, possui como átomo central o magnésio. As clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos substituintes do carbono C-3. Na clorofila *a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) no C-3 e, na clorofila *b*, contém um grupo aldeído (-CHO). A clorofila *b* é sintetizada através da oxidação do grupo metil da clorofila *a* para um grupo aldeído e pode ser convertida em clorofila *a* novamente através de uma enzima chamada clorofila *a* oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metil ao grupo aldeído (STREIT et al., 2005). A Figura 3 mostra a estrutura química das clorofilas *a* e *b*.

Figura 3 – Estrutura química das clorofilas *a* e *b*



Fonte: D'Allessandro e Antoniosi Filho (2016).

A clorofila está situada nos tilacóides dos cloroplastos da microalga *Chlorella vulgaris*, sendo o seu pigmento mais abundante, uma vez que pode representar de 1% a 2% do peso seco do microrganismo (SAFI et al., 2015). Com base nisso, *Chlorella sp.* é conhecida

como a fonte primária da produção de clorofila e é chamada “Emerald food” (comida esmeralda), em virtude do alto conteúdo desse pigmento (KHANRA et al., 2018).

Quando isolada como um co-produto, a clorofila pode fornecer um fluxo de receita (KULKARNI; NIKOLOVI, 2018). Esse pigmento é atualmente empregado como corante natural em indústrias farmacêuticas e de alimentos, além de estar vinculado a propriedades nutracêuticas em atividades funcionais de promoção à saúde (RODRIGUES, 2014).

Como exemplos dos benefícios promovidos pela clorofila, Kulkarni e Nikolovi (2018) citaram a estimulação do sistema imunológico, a desintoxicação do sangue e do fígado e o alívio da sinusite, de erupções cutâneas e do acúmulo de fluidos. Também é possível associar à clorofila ação antimutagênica e a anticarcinogênica (D’ALLESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016) e efeitos estimulantes no crescimento de tecido, atuando como uma substância promotora da multiplicação de fibroplastos, células do tecido conjuntivo responsáveis pelo processo de cicatrização (BERTOLDI; SANT’ANNA; OLIVEIRA, 2008).

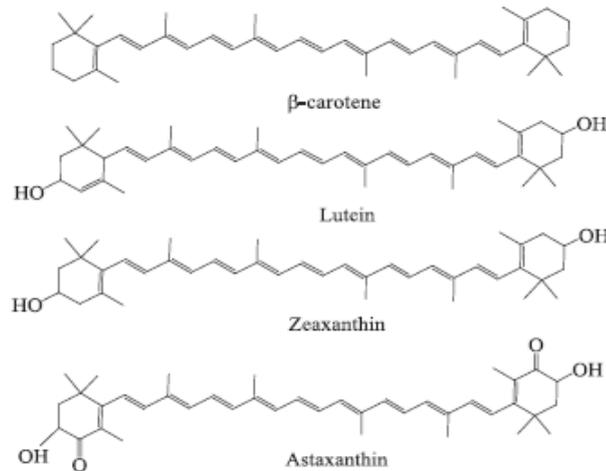
3.3.2 CAROTENOIDES

Carotenoides são os pigmentos mais abundantes e amplamente distribuídos na Terra, perdendo apenas para a clorofila (HU et al., 2018). Pertencem à classe dos tetraterpenos, com oito unidades de isopreno, e ocorrem nos cloroplastos e cromoplastos. Como a clorofila, os carotenoides também participam do processo de fotossíntese, absorvendo nas regiões de luz azul, verde e violeta no espectro visível da luz e refletindo os comprimentos de onda do amarelo, vermelho e laranja (VENTURA et al., 2017).

A estrutura básica desse tipo de pigmento consiste em um esqueleto linear e simétrico com uma série de ligações duplas conjugadas, que gera um sistema de ressonância de elétrons π e corresponde ao cromóforo. Além da cor, essa característica estrutural é responsável pelas funções e atividades dos carotenoides, como reatividade química, forma molecular e a capacidade de desativar espécies reativas (RODRIGUES, 2014).

A variedade estrutural para os vários carotenoides é fornecida pelo número e posição das ligações duplas conjugadas, pela ciclização de uma ou de ambas as extremidades e pela oxigenação da estrutura (HU et al., 2018). Os carotenos, como o β -caroteno, consistem apenas em átomos de carbono e hidrogênio. Já as xantofilas, tendo a luteína como a mais comum, possuem um ou mais átomos de oxigênio (DAMERGI et al., 2017). A Figura 4 mostra a estrutura química de alguns carotenoides.

Figura 4 – Estrutura química de alguns carotenoides



Fonte: D'Allessandro e Antoniosi Filho (2016).

Os carotenoides desempenham dois papéis-chave na fotossíntese: absorver a luz em regiões do espectro visível nas quais a clorofila não tem uma absorção eficiente e promover a fotoproteção dos sistemas fotossintéticos. Os mecanismos de fotoproteção removem os estados mais energéticos da clorofila, resultantes da absorção excessiva da radiação luminosa. Isso dificulta a formação de espécies reativas de oxigênio, fazendo com que os carotenoides sejam bons antioxidantes (D'ALLESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016).

Esse tipo de pigmento é essencial para a sobrevivência da microalga, pois protege as células de espécies reativas de oxigênio geradas na fotossíntese e pela incidência de alta intensidade luminosa, além de dissipar o excesso de luz como calor pelo ciclo da xantofila (HU et al., 2018).

Dentre as fontes naturais de carotenoides, as microalgas são as mais promissoras (CERÓN-GARCÍA et al, 2018). Segundo Hu et al. (2018), os principais carotenoides de interesse comercial provenientes de biomassa microalgal são β-caroteno, astaxantina e luteína, todos encontrados na *Chlorella vulgaris*.

Os carotenoides têm propriedades que os tornam importantes tanto em alimentos, quanto na saúde humana, sendo considerados como uma das principais áreas de exploração biotecnológica de microalgas, com uma ampla gama de aplicações. Do ponto de vista industrial e comercial, esses pigmentos têm um mercado maduro e estável e suas aplicações incluem corantes naturais, destinados a produtos alimentícios e ração para animais, além de cosméticos e suplementos (RODRIGUES, 2014), dentre outros.

De acordo com Rodrigues (2014), as principais fontes de carotenoides são a síntese química e a extração a partir de plantas e microalgas. Entretanto, carotenoides naturais são

preferidos aos componentes sintéticos, em virtude de a forma dos primeiros ser uma mistura de isômeros *cis* e *trans*, que apresentam atividade anticancerígena. As formas sintéticas, porém, são usualmente completamente isômeros *trans* (CERÓN-GARCÍA et al, 2018).

3.4 Extração de pigmentos

Apesar das vantagens que possuem, as microalgas também têm limitações. Para extrair produtos intracelulares desses microrganismos, como os pigmentos, são necessárias certas ações que muitas vezes se tornam complicadas e dispendiosas. As células microalgais são pequenas, protegidas por uma parede celular muitas vezes rígida, tornando a extração de pigmentos desafiadora. Além disso, a estrutura da parede celular das microalgas é complexa e pobremente compreendida e é sabido que ela tem um efeito importante na eficiência da ruptura (GÜNERKEN et al., 2015).

Dessa forma, a proteção física e mecânica do interior da célula microalgal promovida por essa organela apresenta-se como uma barreira importante a ser considerada e a *Chlorella vulgaris* encaixa-se nesse cenário. Essa microalga possui uma parede celular resistente, que se apresenta como a principal barreira para a digestibilidade e os processos de extração (SAFI et al., 2014).

A parede celular da microalga varia de acordo com cada fase de crescimento pela qual o microrganismo passa. Durante sua formação inicial, a parede permanece frágil, formando uma camada unilaminar de 2 nm de espessura fina de elétrons. A parede celular da célula filha aumenta gradualmente de espessura até atingir de 17 nm a 21 nm depois da maturação, em que uma camada microfibrilar semelhante à quitosona é formada, a qual é composta de glucosamina, responsável por sua rigidez (SAFI et al., 2014).

Uma vez que a parede celular da microalga é uma estrutura multicamada que age como uma barreira física à entrada, por exemplo, do solvente, ela se apresenta como o principal item responsável pelo isolamento do núcleo intracelular da célula. Dessa forma, entender os mecanismos de ruptura da parede é importante e vem sendo bem revisado nos últimos tempos (VENTURA et al., 2017).

Ventura et al. (2017) também apontaram que a gama de técnicas, tecnologias e processos relacionados à extração é extensa e pode ser classificada em métodos mecânicos e não-mecânicos, os quais podem ser usadas isoladamente ou de forma combinada. A boa escolha do método de extração é importante, uma vez que a qualidade da molécula-alvo extraída é susceptível à diferente técnica de ruptura da parede celular utilizada (SAFI et al., 2014).

Os métodos mecânicos destroem a parede celular de uma forma não específica e são conseguidos por forças mecânicas, tais como forças de cisalhamento sólido (moinho, homogeneização a alta velocidade), forças de cisalhamento líquido (homogeneização a alta pressão, microfluidização), transferência de energia por ondas (ultrasonificação, micro-ondas), correntes (campo elétrico pulsado) ou calor (termólise, autoclavagem) (GÜNERKEN et al., 2015), entre outras. Sob esse ponto de vista, é sabido que a parede celular das células é rompida com tratamento térmico a altas temperaturas (SPIDEN et al., 2015), como com a utilização de banho-maria.

Os métodos não-mecânicos, por sua vez, envolvem a lise celular utilizando agentes químicos, enzimas ou choque osmótico. Essas técnicas são percebidas como mais “benignas” do que os processos mecânicos, já que as células geralmente são apenas perfuradas ou permeabilizadas, em vez de serem trituradas (GÜNERKEN et al., 2015). Assim, a ruptura da parede celular depende de uma interação seletiva do químico com a parede ou com os componentes da membrana (PHONG et al., 2018).

O uso de solvente se insere nessa última categoria e é comumente empregado, por promover uma extração rápida e eficiente que reduz a degradação. Um número grande de solventes, como etanol, hexano, acetona, éter de petróleo, éter dietílico e diclorometano, vem sendo testado para avaliar sua capacidade de extração de pigmentos a partir de células de microalgas (CERÓN-GARCÍA et al.; RIZWAN et al., 2018).

3.5 Tipos de cultivo

Sabe-se que as características de crescimento e a composição das microalgas dependem significativamente das condições de cultivo (BENAVENTE-VALDÉS et al., 2016). É possível elencar três tipos diferentes: fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico.

Segundo Benavente-Valdés et al. (2016), o cultivo fotoautotrófico ocorre quando a microalga usa luz, a exemplo da solar, como fonte de energia e carbono inorgânico (por exemplo, dióxido de carbono) como fonte de carbono para produzir energia química através da fotossíntese. Essa é a condição de cultivo mais comum usada para o crescimento de microalgas.

Já no cultivo heterotrófico, as microalgas não possuem os sistemas de produção de moléculas orgânicas dos organismos fotoautotróficos e, portanto, necessitam de algum substrato orgânico para o seu crescimento e sobrevivência (DANTAS, 2013).

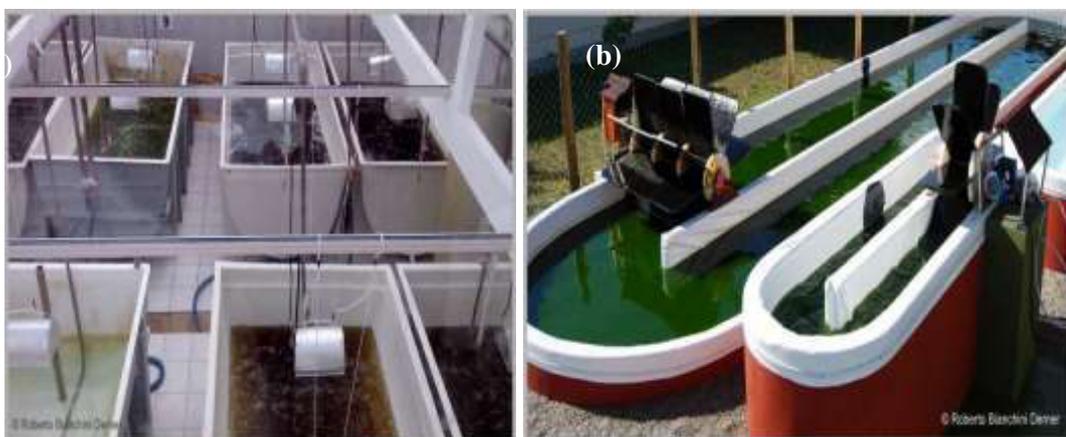
No regime mixotrófico, por sua vez, as microalgas conseguem, simultaneamente, realizar a fotossíntese e consumir carbono inorgânico e orgânico, o que permite aumentar a sua produtividade (LOURES, 2016).

3.6 Sistemas de cultivo de microalgas

Segundo Dantas (2013), para se estabelecer o cultivo de microalgas, as populações devem ser mantidas vivas em condições ambientais favoráveis, a fim de se obter um aproveitamento econômico da biomassa final. Inicialmente, as microalgas são mantidas em pequenos tubos de vidro ou placas e em ambiente livres de contaminação por outros microrganismos, o que influencia na qualidade do cultivo posteriormente. À medida que ocorre a multiplicação das células, estas são transferidas gradativamente para volumes maiores.

A produção de microalgas em larga escala tem a possibilidade de ser realizada em diferentes tipos de sistemas, que podem ser abertos ou fechados. De forma geral, os sistemas abertos são projetados para locais que tenham disponibilidade de área e radiação solar, no entanto favorecem contaminações através de agentes externos e oferecem menor controle sobre as condições de cultivo (LOPES, 2017). A maioria das algas não pode ser mantida por muito tempo em sistemas abertos devido a riscos de contaminação por fungos, bactérias, protozoários e competição com outras microalgas que tendem a dominar a espécie original usada como inóculo. A Figura 5 apresenta alguns exemplos de cultivo aberto para microalgas: tanques de fibra de vidro com fundo elíptico (Figura 5a) e tanques do tipo *raceway* (Figura 5b).

Figura 5 – Exemplos de cultivo aberto de microalgas: tanques de fibra de vidro (a) e do tipo *raceway* (b)



Fonte: Derner (2017).

Entre as limitações do cultivo de microalgas em sistema aberto, destacam-se a utilização de pouca luz pelas células, perdas por evaporação, difusão do CO₂ para a atmosfera e exigência de grandes áreas de terra. Além disso, suas taxas de transferência de massa são muito pobres, devido aos mecanismos de agitação em sistemas de cultivo aberto serem menos eficientes, resultando em uma baixa produtividade de biomassa (LOURES, 2016).

Os sistemas fechados ou fotobiorreatores, por sua vez, foram desenvolvidos para superar as limitações existentes em relação aos abertos, potencializando a produtividade de biomassa (LOPES, 2017). Um fotobiorreator consiste basicamente em um biorreator que incorpora algum tipo de fonte de luz. Um tanque coberto com uma estufa poderia ser considerado um fotobiorreator. Dado que estes sistemas são fechados, é necessário introduzir as fontes necessárias para o crescimento que as microalgas necessitam: CO₂, água, luz e nutrientes (LIRA, 2011).

Segundo Lira (2011), nos fotobiorreatores, é possível controlar condições de cultivo, como quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH, dentre outros. Isso implica em elevada produtividade, viabilizando, assim, a obtenção de produções comerciais. Esses sistemas fechados, entretanto, apresentem um maior custo de construção e operação do que os sistemas abertos (DANTAS, 2013).

Apesar dos custos de ajuste e operação de um fotobiorreator serem mais elevados do que os de tanques abertos, Lira (2011) apontou que a eficiência e os rendimentos são significativamente maiores. Assim, o impacto do custo inicial pode ser amortizado, em médio ou longo prazo, com o funcionamento do sistema. Na Figura 6 estão alguns exemplos de fotobiorreatores.

Figura 6 – Exemplos de cultivo fechado de microalgas (fotobiorreatores)



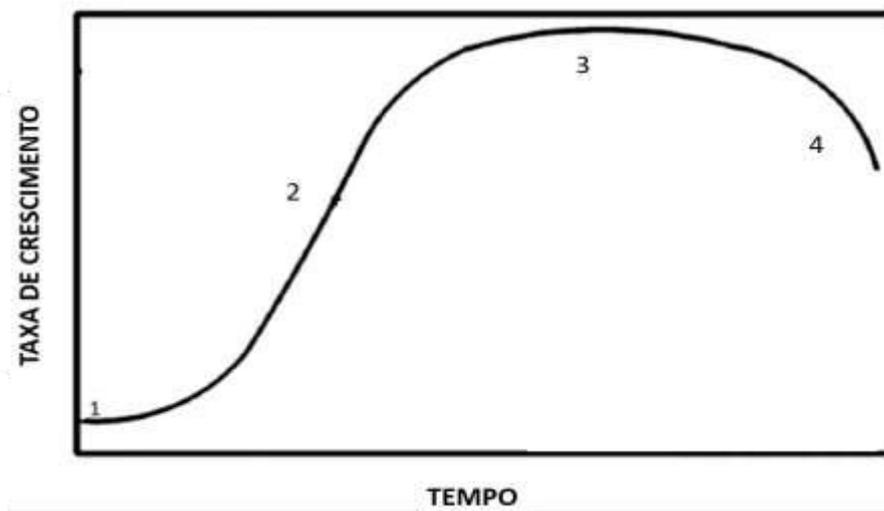
Fonte: (a) PESQUISA..., 2017; (b) Bronzato (2012).

3.7 Curva de crescimento microbiano

Como afirma Viddoti (2012), as microalgas tipicamente descrevem as fases de crescimento (Figura 7) indicadas abaixo, cujas características são apontadas por Borzani et al. (2001).

- Fase “lag” ou de latência: segue-se imediatamente após a inoculação do meio com o microrganismo e representa um período de adaptação no qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes. Como nesta fase ainda não há reprodução celular, a densidade celular permanece constante;
- Fase logarítmica ou exponencial: nesta etapa, a velocidade específica de crescimento é constante e máxima;
- Fase estacionária: a densidade celular atinge um valor máximo e constante e há um balanço entre a velocidade de crescimento e a de morte do microrganismo;
- Fase de declínio ou morte: a concentração celular diminui a uma velocidade maior que a de produção de novas células.

Figura 7 – Fases de crescimento microbiano



Em que: (1) fase lag; (2) fase exponencial ou fase logarítmica; (3) fase estacionária; (4) fase de declínio ou morte. Fonte: Tandon e Jin (2017) (modificado).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada nos seguintes laboratórios da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus Bacanga: Laboratório de Otimização de Processos Químicos e Bioquímicos, localizado no prédio Laboratório de Ensino e Pesquisa – Engenharia Química (LEPEQ), Laboratório de Processos do Curso de Engenharia Química e Central Analítica, localizados no Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET).

4.2 Meio de cultivo

Foi utilizado meio de cultivo BBM modificado proposto por Stein (1973) na manutenção da microalga *Chlorella vulgaris* na fase anterior ao início do experimento, na preparação do inóculo e na realização do ensaio, cuja composição é mostrada nas Tabelas 1 e 2. Na solução traço, que faz parte da composição do referido meio, substituiu-se $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, composto originalmente proposto por Stein (1973), por $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,88 g/L) como fonte de molibdênio.

A fim de garantir a esterilidade do meio, esse foi submetido à esterilização em autoclave à temperatura de 121 °C por 15 minutos.

Tabela 1 – Composição do meio BBM modificado

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

* mL de solução estoque por litro de meio. Fonte: Stein (1973).

Tabela 2 – Composição da solução traço

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

Fonte: Stein (1973) (modificado).

4.3 Preparo do inóculo

A microalga utilizada neste trabalho foi a *Chlorella vulgaris*. O microrganismo foi mantido em ágar inclinado (meio BBM modificado adicionado de ágar-ágar, na concentração de 15 g/L) e também em soluções líquidas de meio BBM modificado, na presença de luz artificial e à temperatura ambiente.

Utilizou-se a técnica de repique para propagação da microalga e preparação do inóculo. O procedimento consistiu na transferência de alçadas de biomassa para erlenmeyers contendo meio BBM modificado.

Durante esse processo, foram tomadas medidas para garantir a assepsia das amostras, como a utilização de alças de inoculação descartáveis e álcool etílico 70% para higienização das mãos e bancada antes do procedimento. Além disso, todo o processo foi realizado dentro da zona estéril próxima à chama e com flambagem da região superior das vidrarias depois de abri-las e antes de fechá-las.

4.4 Aparato experimental

Para o ensaio, usaram-se três fotobiorreatores cilíndricos com 7 cm de diâmetro e 24 cm de altura, feitos de vidro para permitir a passagem de luz. Foram utilizados 40 mL de inóculo e 660 mL de meio BBM modificado nos fotobiorreatores, preenchendo 70% de sua capacidade.

Além do meio de cultivo, foram oferecidas aeração e luz às microalgas, a fim de garantir seu crescimento. A aeração foi promovida por um compressor com capacidade de 40 L (marca Vigor Ar Panther), conectado a uma mangueira de plástico, a qual continha pedra porosa em sua extremidade. Utilizou-se divisor de mangueira acoplado ao sistema, a fim de que um compressor alimentasse dois fotobiorreatores, ou seja, ½ de aeração para cada bioreator. Já

a iluminação veio de oito lâmpadas fluorescentes de 11 W. Os fotobiorreatores foram fechados com tampão de algodão. Realizou-se o experimento em sala mantida à temperatura de, aproximadamente, 24°C, através de aparelhos de ar condicionado.

Construiu-se também um aparato para conter os fotobiorreatores, o qual era composto por duas bases de plástico (28 cm x 15 cm), conectadas por colunas do mesmo material. As laterais e a parte traseira da estrutura foram fechadas com isopor e a parte da frente com material EVA (acetato-vinilo de etileno) para facilitar o acesso ao experimento. Essas medidas garantiram que a luz ambiente não interferisse nas condições do ensaio.

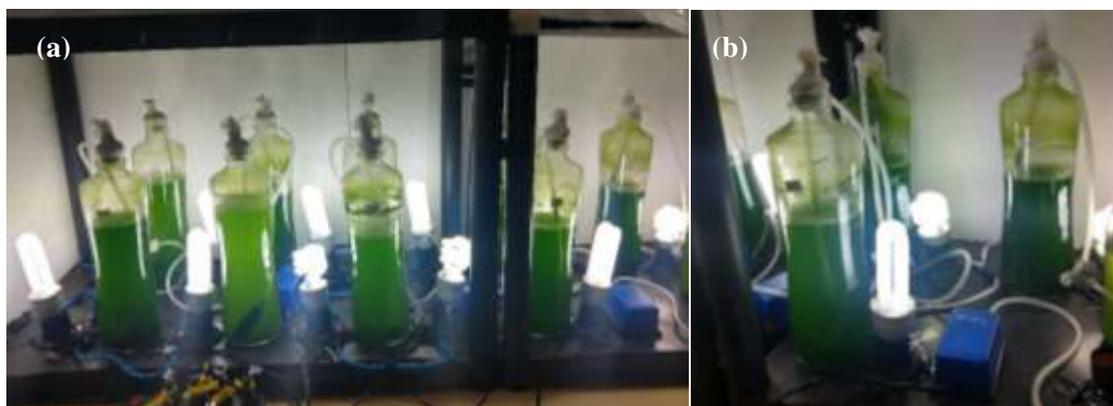
A Figura 8 mostra um esquema do aparato experimental construído. Os locais em branco do esquema representam os espaços destinados a fotobiorreatores de experimentos concomitantes. A Figura 9, por sua vez, apresenta uma foto geral do aparato (Figura 9a) e um destaque dos fotobiorreatores deste trabalho (Figura 9b)

Figura 8 – Esquema do experimento



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 9 – Aparato experimental geral (a) e destaque para fotobiorreatores deste trabalho (b)



Fonte: Próprio autor (2019).

4.5 Métodos analíticos utilizados

Para determinação da concentração celular do inóculo, utilizou a técnica de peso seco. Foi retirada uma alíquota de 40 mL do cultivo, centrifugando-a 2500 rpm por quatro minutos (Macro Centrífuga da marca Benfer, modelo BMC). O sobrenadante foi descartado e o pelet lavado com 2 mL de água destilada, com o objetivo de retirar os sais restantes do meio.

Em seguida, centrifugou-se a amostra novamente sob as mesmas condições. O produto de fundo foi submetido então à secagem em estufa controlada a 60°C até ser obtido peso constante (VIDOTTI, 2015). Esse fato foi verificado por pesagens diárias do conjunto amostra e tubo, através de balança eletrônica (marca Tecnal, modelo Mark 2200, classe II).

O peso seco alcançado demonstrou que a umidade havia sido retirada. A partir disso, foi possível encontrar a massa de microalga contida no volume inicial da amostra (g microalga/L de meio) através da diferença entre o peso da amostra seca com o tubo e o do tubo vazio. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

Logo em seguida, tomando-se outra amostra do cultivo, fez-se uma série de diluições, a fim medir a absorbância em espectrofotômetro digital (modelo UV-M51), no comprimento de onda de 680 nm e construir a curva padrão (VIDOTTI, 2015). Essa foi usada para, posteriormente, converter os valores de absorbância em concentração e construir a curva de crescimento correspondente ao experimento.

A construção da curva padrão ocorreu pela técnica de turbidimetria: durante o ensaio, diariamente retirou-se de cada fotobiorreator uma amostra, a qual, se necessário, era diluída, e a absorbância medida em triplicata técnica utilizando espectrofotômetro. A presença de três fotobiorreatores independentes com as mesmas condições de cultivo e com biomassa crescendo concomitantemente permitiu também ser realizada triplicata biológica das concentrações.

O ensaio teve duração de 15 dias, com dez medidas de absorbância realizadas, uma vez que o acesso ao laboratório não foi possível em alguns dias, como nos fins de semana que ocorreram durante período de realização do experimento. Dessa forma, utilizando a curva padrão construída, obteve-se a curva de crescimento da cultura em questão.

No período de duração do experimento, também foram realizadas medidas de pH em phmetro digital (marca Hanna), a fim de acompanhar esse parâmetro durante o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*.

4.6 Parâmetros cinéticos

A partir dos dados experimentais, calcularam-se os seguintes parâmetros cinéticos para o cultivo: densidade celular máxima ($X_{máx}$), velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{máx}$), tempo de geração (t_g) e máxima produtividade celular ($P_{X_{máx}}$).

A densidade celular máxima representa a máxima concentração celular atingida durante o cultivo e a velocidade máxima específica de crescimento é o coeficiente angular do gráfico de $\ln X$ em função do tempo na fase exponencial. Já o tempo de geração representa o intervalo de tempo necessário para dobrar o valor de concentração celular (BORZANI et al., 2001). As formulações (Equações 1 e 2) para o tempo de geração e a máxima produtividade celular estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos

Parâmetro cinético	Equação	Nº da equação
Tempo de geração (t_g)	$t_g = \ln 2 / \mu_{máx}$	1
Máxima produtividade celular ($P_{X_{máx}}$)	$P_{X_{máx}} = \frac{(X_{máx} - X_0)}{(t_{x_{máx}} - t_0)}$	2

Fonte: Borzani et al. (2001).

4.7 Extração dos pigmentos celulares

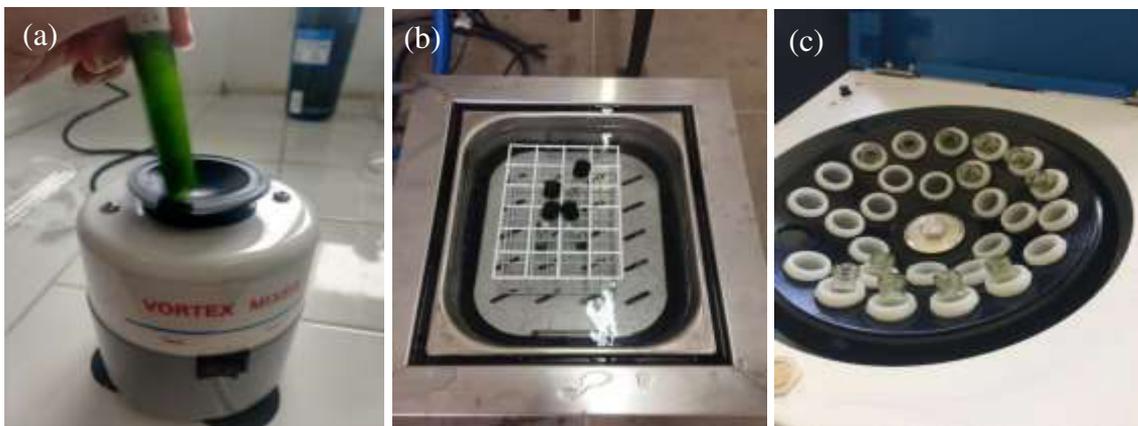
A fim de promover a extração dos pigmentos presentes nas células da microalga *Chlorella vulgaris*, ao final do cultivo, a biomassa foi distribuída em tubos de ensaio e centrifugada a 2500 rpm por quatro minutos. Descartou-se o sobrenadante e ao produto de fundo foram adicionados 2 mL de água destilada para retirar os sais do meio que estivessem restantes. Centrifugou-se novamente a biomassa, a qual, logo depois, foi suspensa em 2 mL de etanol 95% (v/v) (95 ° GL) P.A, como indica Ventura et al. (2017). Agitaram-se os tubos em vórtex mixer por 30 segundos (VIDOTTI, 2015). Em seguida, armazenou-se a biomassa no congelador por 16 horas. Após esse tempo, as células foram postas para descongelar à temperatura ambiente por uma hora, agitadas novamente por 30 segundos utilizando o vórtex e colocadas mais uma vez para congelar por 22 horas.

Após os dois ciclos de congelamento/descongelamento, a biomassa foi levada a banho maria ultratermostalizado (marca Limatec, modelo LT BMU 10), variando o binômio tempo de imersão x temperatura do banho conforme a matriz obtida através do Delineamento Composto

Central Rotacional (DCCR) realizado (Tabela 4). Após terminado o tempo a dada condição, o respectivo tubo foi retirado do banho maria e imediatamente posto em água fria. Em seguida, centrifugaram-se as amostras a 2500 rpm por quatro minutos com o objetivo de separar a biomassa do pigmento extraído.

A Figura 10 mostra a biomassa sendo agitada em vórtex (Figura 10a), colocada em banho-maria (Figura 10b) e centrifugada logo após (Figura 10c).

Figura 10 – Etapas de agitação (a), banho maria (b) e centrifugação (c) das amostras na fase de extração dos pigmentos



Fonte: Próprio autor (2019).

Logo depois, as absorbâncias do sobrenadante foram lidas nos comprimentos de onda de 480 nm, 630 nm, 645 nm, 663 nm e 750 nm e aplicadas nas Equações semiempíricas 3, 4 e 5 para encontrar, respectivamente, as concentrações (μg de pigmento/mL de meio) de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides extraídas das células microalgais, conforme indica Kczmar (2004).

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

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

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/mL}) = 4,0 A_{480} \cdot v / (l \cdot V) \quad (5)$$

Onde: *v* é o volume de solvente utilizado (2 mL), *l* é o comprimento da célula espectrofotométrica (1 cm), *V* é o volume da amostra (30 mL) e A_{xxx} apresenta-se como a subtração entre as absorbâncias nos respectivos comprimentos de onda (480 nm, 630 nm, 645 nm, 663 nm) e aquelas a 750 nm.

4.8 Planejamento experimental

A fim de otimizar o processo de extração de pigmentos, encontrando as condições combinadas de tempo de imersão no banho maria e temperatura do banho mais favoráveis, foi realizado um planejamento experimental através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *Statistica*.

No DCCR, avaliaram-se duas variáveis independentes (tempo e temperatura), com duas repetições do ponto central. Isso totalizou 10 experimentos, cujas condições são apresentadas na matriz do planejamento na Tabela 4, assim como a respectiva codificação dos valores. As variáveis de resposta foram as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides extraídas ($\mu\text{g/mL}$).

Tabela 4 – Matriz do DCCR para as condições de tempo e temperatura do banho maria

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (valores codificados)	Temperatura (valores codificados)
1	10	40	-1,00	-1,00
2	10	90	-1,00	1,00
3	50	40	1,00	-1,00
4	50	90	1,00	1,00
5	1,7	65	-1,41	0,00
6	58,3	65	1,41	0,00
7	30	29,6	0,00	-1,41
8	30	100,4	0,00	1,41
9 (PC)	30	65	0,00	0,00
10 (PC)	30	65	0,00	0,00

(PC) – ponto central. Fonte: próprio autor (2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva padrão

Utilizando metodologias de peso seco e turbidimetria, foi construída a curva padrão a fim de determinar uma relação entre absorvância e concentração celular. A Tabela 5 apresenta as massas aferidas diariamente em triplicata da amostra de inóculo juntamente com o tubo que a continha, durante o período de secagem na estufa até se atingir peso constante.

Tabela 5 – Peso (amostra + tubo) durante secagem (metodologia do peso seco)

Tempo de secagem (h)	Massa (g)			Massa média (g)
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	
24	11,7025	11,3218	11,6579	11,5607 ± 0,2081
72	11,7011	11,3203	11,6564	11,5593 ± 0,2082
96	11,7010	11,3202	11,6562	11,5591 ± 0,2081
192	11,7009	11,3200	11,6562	11,5590 ± 0,2082

Fonte: próprio autor (2019).

Observando a Tabela 5, percebe-se que a diferença entre o peso aferido às 192 horas e o encontrado às 96 horas de secagem encontra-se dentro da margem de erro da balança. Dessa forma, a diferença de 10^{-4} entre esses valores foi tomada como critério de parada para a secagem, indicando que o peso constante havia sido atingido, ou seja, que a umidade da amostra foi retirada após o tempo na estufa.

Assim, se tomou esse valor como a massa do tubo com a amostra sem umidade, o qual foi subtraído pelo peso do tubo vazio ($11,5320 \pm 0,2057$ g). O resultado da subtração representa a massa de microalga presente na amostra de 40 mL de inóculo, $0,0270 \pm 0,0028$ g. Portanto, a concentração do inóculo era de $0,6758 \pm 0,0700$ g/tL.

A partir disso, fez-se uma série de diluições da amostra do inóculo e as absorvâncias foram medidas a 680 nm em espectrofotômetro (VIDOTTI, 2015), cujos valores foram convertidos em concentração celular, como mostra a Tabela 6. Correlacionando valores de absorvância com concentração, construiu-se a curva padrão apresentada na Figura 11.

Através da curva padrão da Figura 11, obteve-se a Equação 7, que relaciona absorvância e concentração celular em g/L. O coeficiente de determinação encontrado (R^2) foi de 0,9994, mostrando um bom ajuste da equação.

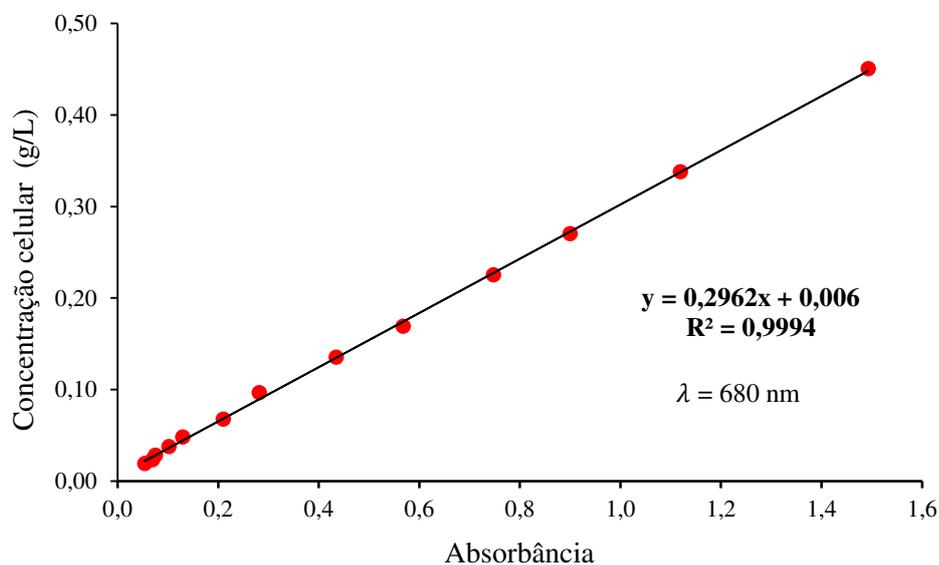
$$\text{Concentração celular (g/L)} = 0,2962 \cdot \text{Absorbância}_{(\lambda 680 \text{ nm})} + 0,006 \quad (7)$$

Tabela 6 – Absorbâncias e concentrações para construção da curva padrão

Volume de amostra (mL)	Volume de água (mL)	Média das absorbâncias	Fator de diluição	Concentração com diluição (g/L)
2	2	1,1190 ± 0,0020	2	0,338
1	2	0,7473 ± 0,0012	3	0,225
1	3	0,5677 ± 0,0006	4	0,169
1	4	0,4343 ± 0,0006	5	0,135
1	6	0,2817 ± 0,0006	7	0,097
1	9	0,2100 ± 0,0000	10	0,068
1	13	0,1290 ± 0,0000	14	0,048
1	17	0,1020 ± 0,0000	18	0,038
1	23	0,0750 ± 0,0000	24	0,028
1	28	0,0690 ± 0,0000	29	0,023
1	34	0,0540 ± 0,0000	35	0,019
1	2	0,8997 ± 0,0006	2,5	0,270
2	1	1,4930 ± 0,0000	1,5	0,451

Fonte: próprio autor (2019).

Figura 11 – Curva padrão do experimento



Fonte: próprio autor (2019).

5.2 Curva de crescimento da microalga

As medidas de absorbância realizadas durante o cultivo para a triplicata biológica foram convertidas em concentração celular, cujos valores são mostrados na Tabela 7. Essa

conversão se deu por meio da Equação 7.

Tabela 7 – Valores de concentração celular durante o cultivo para triplicata biológica

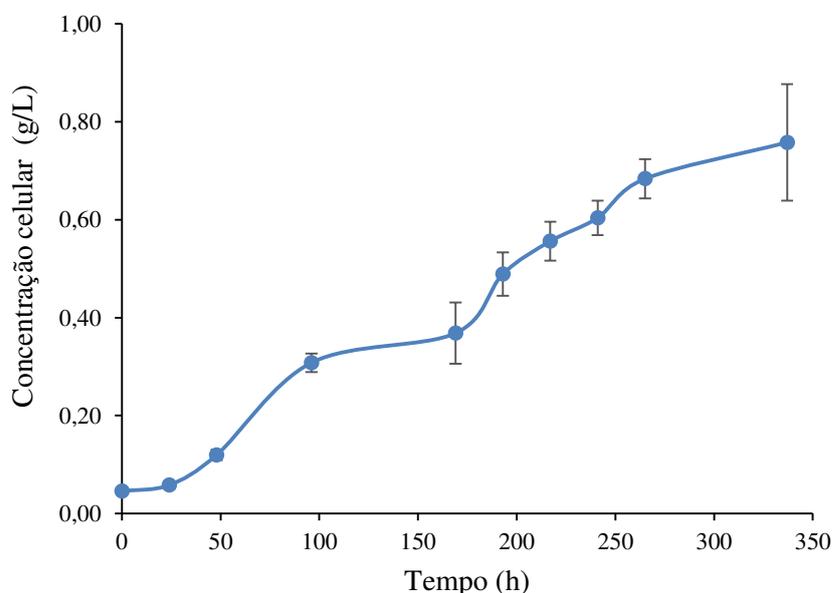
Tempo (h)	Concentração média (ensaio 1) (g/L)	Concentração média (ensaio 2) (g/L)	Concentração média (ensaio 3) (g/L)	Concentração média (g/L)
0	0,0489 ± 0,0000	0,0418 ± 0,0000	0,0460 ± 0,0000	0,0456 ± 0,0031
24	0,0617 ± 0,0000	0,0487 ± 0,0000	0,0638 ± 0,0000	0,0580 ± 0,0071
48	0,1158 ± 0,0002	0,1094 ± 0,0000	0,1337 ± 0,0000	0,1196 ± 0,0109
96	0,2849 ± 0,0000	0,3102 ± 0,0000	0,3286 ± 0,0003	0,3079 ± 0,0190
169	0,3803 ± 0,0005	0,2908 ± 0,0000	0,4339 ± 0,0009	0,3683 ± 0,0626
193	0,5052 ± 0,0005	0,4318 ± 0,0005	0,5298 ± 0,0000	0,4890 ± 0,0442
217	0,5852 ± 0,0007	0,5031 ± 0,0007	0,5801 ± 0,0014	0,5561 ± 0,0399
241	0,6322 ± 0,0007	0,5576 ± 0,0007	0,6219 ± 0,0007	0,6039 ± 0,0350
265	0,6591 ± 0,0012	0,6547 ± 0,0007	0,7372 ± 0,0036	0,6837 ± 0,0403
337	0,6725 ± 0,0014	0,6851 ± 0,0000	0,9162 ± 0,0012	0,7579 ± 0,1138

Os valores apresentados resultam de média obtida entre os três cultivos independentes da triplicata biológica.

Fonte: próprio autor (2019).

A partir dos valores médios de concentração, construiu-se o perfil de crescimento microalgal apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Perfil de crescimento celular da microalga *Chlorella vulgaris*



Os valores apresentados resultam de média obtida entre os três cultivos independentes da triplicata biológica. Fonte: próprio autor (2019).

A curva de crescimento da Figura 12 apresentou um comportamento próximo ao sigmoidal. A análise do perfil de crescimento mostra que, no início do cultivo, a microalga

passou por uma fase de latência (fase lag), na qual o aumento da concentração celular foi mínimo. Essa fase durou, aproximadamente, 24 horas e é marcada pela adaptação do microrganismo ao meio, produzindo as enzimas necessárias ao seu crescimento. A presença de uma fase de latência na cinética microalgal pode ter se dado pelo fato do inóculo não ter sido retirado na fase exponencial quando do início do cultivo.

Logo após passar pela fase lag, a microalga entrou na fase exponencial de crescimento (fase log), de forma a aumentar significativamente sua biomassa com o tempo, passando de $0,0580 \pm 0,0071$ g/L às 24 horas de cultivo para $0,6837 \pm 0,0403$ g/L no tempo de 265 horas, quando começou uma desaceleração no crescimento. Dessa forma, a fase logarítmica durou em torno de 241 horas.

Ao observar a curva (Figura 12), também se nota a presença de uma redução da velocidade de crescimento entre 96 e 169 horas. Nesse período, o acompanhamento do cultivo não foi possível, podendo ter ocorrido algum problema com as condições do experimento, como interrupção da aeração ou da iluminação, provocando o referido comportamento. Em seguida, a microalga voltou a crescer exponencialmente.

A desaceleração observada a partir de 265 horas deu indícios de que a cultura estava iniciando a fase estacionária. Dessa forma, o experimento foi interrompido, a fim de obter o máximo de biomassa para a etapa de extração de pigmentos.

A Figura 13 apresenta os cultivos da triplicata biológica no tempo t_0 de início do experimento (Figura 13a) e no tempo 337 horas, ao final do cultivo (Figura 13b). Pode-se perceber a mudança de coloração, que indica o aumento da concentração de células.

Figura 13 – Fotobiorreatores no início (a) e ao final do cultivo (b)



Fonte: Próprio autor (2019).

5.3 Parâmetros cinéticos do cultivo

A partir dos dados experimentais, foram calculados os parâmetros cinéticos para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, como mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros cinéticos do cultivo da microalga

$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	t_g (h)	$P_{X_{\text{máx}}}$ (g/L.h)	$X_{\text{máx}}$ (g/L)
$0,0085 \pm 0,0005$	$82,06 \pm 4,94$	$0,0021 \pm 0,0004$	$0,758 \pm 0,137$

Em que: $\mu_{\text{máx}}$ - velocidade máxima específica de crescimento; t_g – tempo de geração; $P_{X_{\text{máx}}}$ - produtividade celular máxima; $X_{\text{máx}}$ - densidade celular máxima. Fonte: próprio autor (2019).

O cálculo da velocidade máxima específica de crescimento foi realizado a partir do coeficiente angular da regressão de $\ln(x)$ x tempo entre os pontos de maior crescimento celular, dentro da fase logarítmica. No ensaio 1 da triplicata biológica, esse intervalo se deu entre 169 e 241 horas. Já para os ensaios 2 e 3, calculou-se $\mu_{\text{máx}}$ entre 48 e 217 horas.

Os parâmetros cinéticos encontrados para o cultivo deste trabalho (Tabela 8) apresentaram-se inferiores aos obtidos por De Melo et al. (2018), os quais atingiram $0,91 \pm 0,02$ g/L de concentração celular máxima, $0,0121 \pm 0,00$ h^{-1} como velocidade máxima específica de crescimento e produtividade de $0,0033 \pm 0,0008$ g/L.h. no estudo de *Chlorella vulgaris* em meio BBM sob regime de autotrofia.

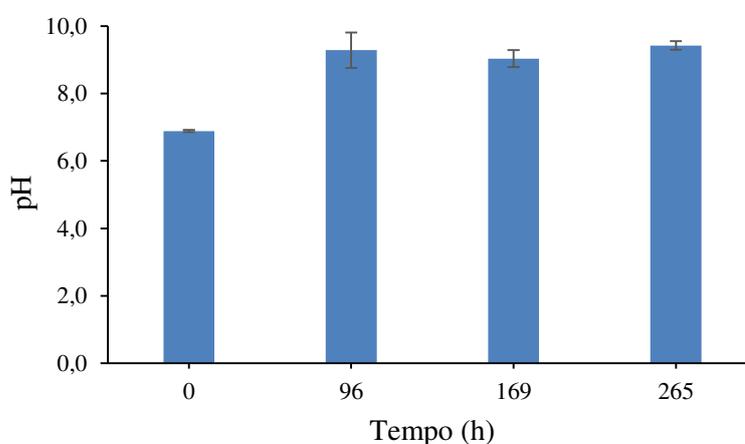
A referida diferença pode ter se dado em virtude da redução de velocidade ocorrida dentro da fase exponencial, já discutida na seção 5.2 deste trabalho. Assim, a eficiência cinética do cultivo foi prejudicada. Um exemplo disso é que, em outras pesquisas (SOUSA, 2019) realizadas no laboratório no qual se desenvolveu este trabalho, já foi possível obter densidades celulares de até 1,175 g/L, sob as mesmas condições de cultivo.

Entretanto, se comparados com os resultados obtidos por Freitas (2012), que cultivou *Chlorella vulgaris* em meio MBM (meio bristol modificado) com redução em 50% da quantidade de nitrogênio e 1% de pentose, os encontrados neste trabalho (Tabela 8) apresentaram-se mais promissores, com exceção da velocidade máxima de crescimento. Isso porque Freitas (2012) obteve $X_{\text{máx}}$ de $0,366 \pm 0,012$ g/L, $\mu_{\text{máx}}$ de $0,0089 \pm 0,006$ h^{-1} e $P_{X_{\text{máx}}}$ de $0,0013 \pm 0,0007$ g/L.h.

5.4 pH do cultivo

A Figura 14 apresenta as medidas médias de pH em função do tempo para o cultivo, aferidas durante o experimento. Foram tomadas quatro medidas de potencial hidrogeniônico ao longo do tempo para cada cultivo independente da triplicata biológica e calculadas as suas médias. O pH ao final do cultivo não pôde ser medido em função de problemas no equipamento phmetro utilizado.

Figura 14 – pH do cultivo ao longo do experimento



Os valores apresentados resultam de média obtida entre os três cultivos independentes da triplicata biológica. Fonte: próprio autor (2019).

Os dados apresentados na Figura 14 mostram que o pH do meio iniciou com média de $6,887 \pm 0,032$ no tempo t_0 e apresentou um aumento até o tempo de 96 horas, conforme a quantidade de biomassa também cresceu (Figura 12). A alcalinização do meio durante o crescimento microalgal é esperada, uma vez que a presença de mais células proporciona maior consumo de gás carbônico. A dissociação ocorrida promove liberação de íons hidroxila no meio, alcalinizando-o (TREVISAN et al., 2013). Esse comportamento também foi observado por Vidotti (2015) e Lam et al. (2017) no cultivo de *Chlorella vulgaris* em regime autotrófico.

Após 96 horas, observa-se uma estagnação do pH do meio (Figura 14), que coincide com a redução na velocidade de crescimento ocorrida entre 96 e 169 horas (Figura 12). Entretanto, após esse período de tempo, a microalga voltou a crescer exponencialmente. Dessa forma, era esperado que o pH voltasse a ser alcalinizado, em virtude do maior número de células presente no meio, mas a Figura 14 mostra que o pH às 265 horas permaneceu estagnado.

Esse fato pode ter ocorrido em virtude de problemas com o equipamento, os quais

foram observados quando da tentativa de novas amostragens desse parâmetro no decorrer do experimento após as 265 horas.

5.5 Extração de pigmentos

A partir da biomassa obtida através do cultivo, foram extraídos pigmentos das células (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) variando as condições de extração em relação ao tempo e à temperatura do banho conforme mostrado pelo DCCR da Tabela 4, mantendo a concentração de etanol fixa em 95%.

As absorbâncias foram medidas nos comprimentos de onda de 480 nm, 630 nm, 645 nm, 663 nm e 750 nm e convertidas em concentrações desses pigmentos ($\mu\text{g/mL}$) através das Equações 3, 4 e 5, como é mostrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides para diferentes condições de tempo e temperatura do banho

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração carotenoides ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	40	0,2707 \pm 0,0000	0,0962 \pm 0,0000	0,1032 \pm 0,0000
2	10	90	0,3117 \pm 0,0001	0,1074 \pm 0,0010	0,1147 \pm 0,0000
3	50	40	0,3133 \pm 0,0000	0,1068 \pm 0,0002	0,1133 \pm 0,0000
4	50	90	0,3277 \pm 0,0000	0,1116 \pm 0,0000	0,1165 \pm 0,0000
5	1,72	65	0,3138 \pm 0,0000	0,1089 \pm 0,0000	0,1168 \pm 0,0000
6	58,28	65	0,3538 \pm 0,0000	0,1164 \pm 0,0002	0,1232 \pm 0,0000
7	30	29,64	0,2488 \pm 0,0001	0,0973 \pm 0,0010	0,1012 \pm 0,0002
8	30	100,36	0,2645 \pm 0,0004	0,1011 \pm 0,0006	0,1375 \pm 0,0002
9 (PC)	30	65	0,3385 \pm 0,0005	0,1105 \pm 0,0002	0,1208 \pm 0,0000
10 (PC)	30	65	0,3074 \pm 0,0001	0,1125 \pm 0,0012	0,1147 \pm 0,0000

(PC) – ponto central. Fonte: próprio autor (2019).

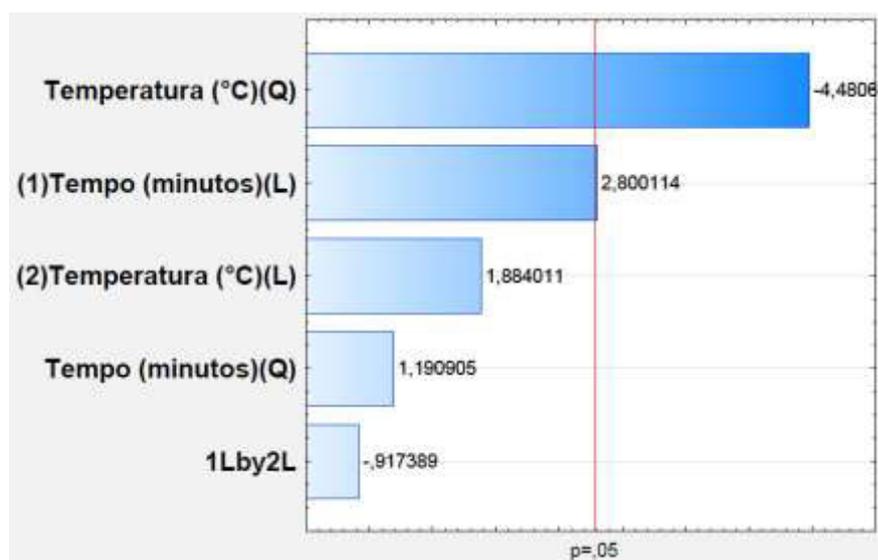
Comparando-se as concentrações obtidas para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides presentes na Tabela 9, percebe-se que as maiores extrações, em todas as condições testadas, foram obtidas para o primeiro pigmento. Isso pode ter acontecido em virtude das células da *Chlorella vulgaris* conterem mais clorofila *a* do que os outros pigmentos citados, como afirmam Safi et al., 2015.

5.5.1 CLOROFILA A EXTRAÍDA

A fim de analisar os dados experimentais encontrados para concentração de clorofila *a* extraída, foi construído o Diagrama de Pareto (Figura 15) a partir do software Statistica, que permitiu avaliar gráfica e numericamente a significância dos efeitos testados, assim como da interação entre eles, na extração do pigmento. Cada efeito é representado no gráfico como uma barra e foi aplicado um nível de confiança de 95%.

A Tabela 10, por sua vez, apresenta dados obtidos através de análise de variância (ANOVA), contendo p-valores e coeficientes do modelo para os fatores testados. Aqueles que obtiveram p-valor menor que 0,05, nível de significância adotado, apresentaram significância estatística na extração e estão destacados em vermelho na Tabela 10.

Figura 15 – Diagrama de Pareto para clorofila *a*



Em que: (L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos. Fonte: próprio autor (2019).

Tabela 10 – p-valores e coeficientes do modelo para fatores testados na extração de clorofila *a*

Fator	P	Coefficientes codificados
Mean/intercessão	-	0,322913
(1) Tempo (min) (L)	0,048806	0,014403
Tempo (min) (Q)	0,299530	0,008105
(2) Temperatura (°C) (L)	0,132665	0,009689
Temperatura (°C) (Q)	0,010984	-0,030479
1L by 2L	0,410847	-0,006673

(L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos. Fonte: Próprio autor (2019).

O diagrama de Pareto da Figura 15 e a Tabela 10 demonstraram que, a intervalo de confiança de 95%, a temperatura quadrática e o tempo linear foram os fatores que tiveram efeitos significativos na concentração desse pigmento extraído da microalga, com p-valores iguais a 0,048806 e 0,010984, respectivamente.

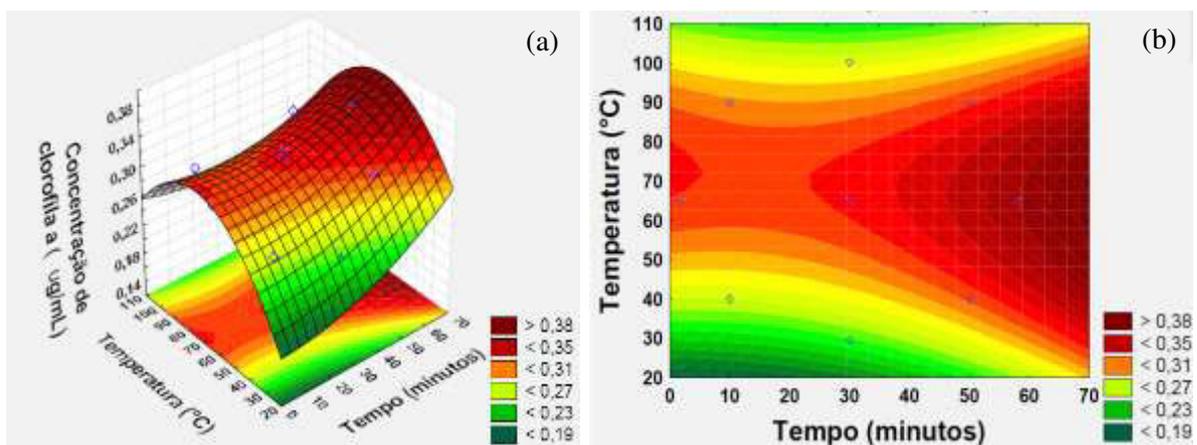
A temperatura quadrática apresentou o maior efeito negativo, o que demonstra um comportamento curvilíneo convexo na superfície de resposta, além de apontar a predominância de tal efeito sobre o de tempo linear, apesar desse último também ter sido significativo, mas em proporções mais baixas.

Ademais, a Figura 15 e a Tabela 10 mostraram que não houve significância estatística dos efeitos de temperatura linear, tempo quadrático e nem da interação entre temperatura e tempo (1L by 2L), considerando o nível de confiança de 95%.

O valor de R^2 encontrado foi 0,91695, o que indica que o modelo se ajustou e pode explicar aproximadamente 91,7% dos casos. Os erros encontrados podem estar relacionados àqueles provenientes da equação semiempírica (Equação 3) e a erros experimentais.

Na Figura 16 são mostrados os gráficos de superfície de resposta (Figura 16a) e de contorno (Figura 16b) para as concentrações de clorofila *a* extraídas.

Figura 16 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de clorofila *a* extraída



Fonte: Próprio autor (2019).

Ao analisar a Figura 16, percebe-se um efeito quadrático da temperatura na extração da clorofila *a*, fato evidenciado pelo abaulamento da curva e já indicado pelo efeito significativo negativo desse fator presente no Diagrama de Pareto (Figura 16). Isso significa que, a um valor de tempo fixo, o aumento da temperatura leva à maior extração do pigmento, até que se atinja um ponto máximo a partir do qual o acréscimo de temperatura leva a menores concentrações

de clorofila *a* extraída. Nesse caso, o gráfico (Figura 16) mostrou maiores taxas de extração na faixa entre 50°C a 80°C e em tempos maiores que 48 minutos.

Isso pode ter acontecido em virtude do fato da temperatura auxiliar na ruptura da parede celular, de forma a liberar mais pigmento para o exterior da célula. Porém, a clorofila é um tipo de pigmento sensível a altas temperaturas, podendo ser destruído sob essas condições, o que leva à redução das taxas de clorofila extraída (ZHAO et al., 2018). Esses autores observaram o decaimento da concentração de clorofila *a* temperaturas do banho maiores que 65°C.

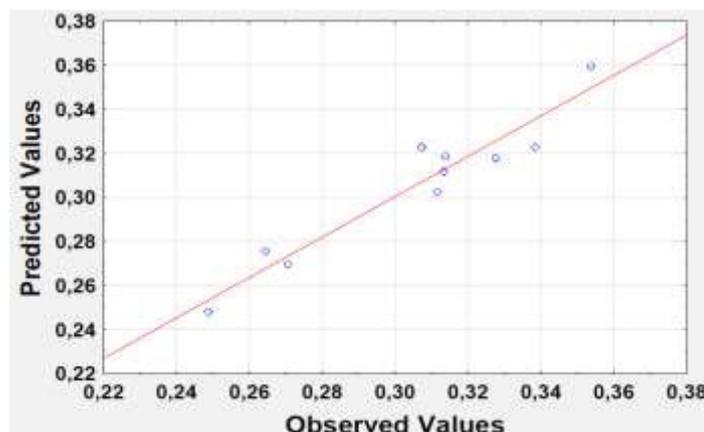
Além disso, observa-se também na Figura 16 o efeito significativo linear do tempo, de forma que a extração da clorofila *a* aumenta linearmente à medida que se submete as células da microalga *Chlorella vulgaris* a mais tempo no banho-maria, tomando uma temperatura fixa.

A partir dos coeficientes estimados da Tabela 10, foi encontrado o modelo de regressão múltipla ajustado expresso na Equação 6, em que *t* é o tempo de exposição das células ao banho-maria e *T*, a temperatura do banho. Os coeficientes mostrados estão codificados pelo programa e aqueles em vermelho são os que obtiveram significância estatística, enquanto que os de preto, não.

$$y = 0,322913 + 0,014403.t + 0,009689.T + 0,008105.t^2 - 0,030479.T^2 - 0,006673.t.T \quad (6)$$

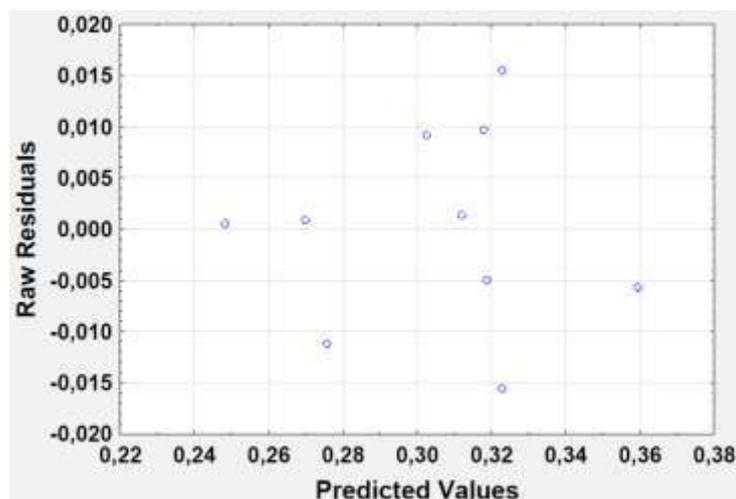
Para avaliar a adequabilidade do modelo proposto, foram construídos no software *Statistica* os gráficos dos valores preditos vs. observados e dos valores residuais vs. preditos, presentes das Figuras 17 e 18, respectivamente. Resíduos são a diferença entre as variáveis resposta preditas e as variáveis resposta observadas.

Figura 17 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para clorofila *a*



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 18 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para clorofila *a*



Fonte: Próprio autor (2019).

A análise da Figura 17 mostra que os pontos seguiram o comportamento da reta, não se distanciando consideravelmente dela. Isso é um indício de bom ajuste do modelo, ao mostrar que os valores preditos foram bastante próximos dos observados.

A Figura 18, por sua vez, apresenta os pontos distribuídos aleatoriamente em torno do 0, o que indica a homocedasticidade da variância dos resíduos. Isso quer dizer que os erros entre os valores observados e aqueles modelados foram constantes.

5.5.2 CLOROFILA *B* EXTRAÍDA

Utilizando os dados obtidos para clorofila *b* (Tabela 9), também foi construído o Diagrama de Pareto (Figura 19) e obtidos os p-valores e coeficientes do modelo por análise de variância (ANOVA). Para esse pigmento, mais uma vez foi adotado o patamar de 95% de confiança e 0,05% de nível de significância.

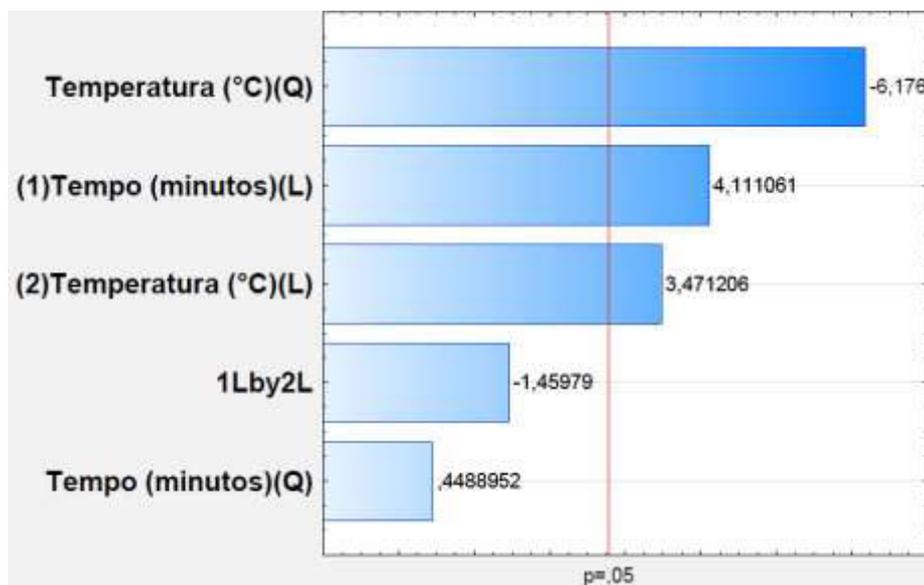
A análise da Figura 19 e da Tabela 11 indicou que os efeitos significativos na extração da clorofila *b* foram a temperatura quadrática, o tempo linear e a temperatura linear. Observou-se esse fato através dos p-valores obtidos, 0,003490, 0,014719 e 0,025556, respectivamente, que se encontraram abaixo de 0,05.

O maior efeito na extração da clorofila *b* foi ocasionado pela temperatura quadrática, cujo valor negativo aponta, assim como na clorofila *a*, uma curvatura convexa no perfil do gráfico. Em seguida, tem-se os efeitos do tempo e da temperatura lineares.

Os fatores tempo quadrático e interação entre tempo e temperatura não apresentaram significância estatística ao nível de confiança de 95% adotado. Além disso, R^2 do modelo foi

de 0,95293, o que indica seu ajuste a 95,3% dos casos. Novamente, os erros apresentados podem ser resultado da interação entre os erros inerentes à equação utilizada para medir a concentração de pigmento extraído (Equação 4) e aqueles associados ao experimento.

Figura 19 – Diagrama de Pareto para clorofila *b*



Em que: (L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos. Fonte: próprio autor (2019).

Tabela 11 – p-valores e coeficientes do modelo para fatores testados na extração de clorofila *b*

Fator	P	Coefficiente
Mean/intercessão	-	0,111523
(1) Tempo (min) (L)	0,014719	0,003161
Tempo (min) (Q)	0,676753	0,000457
(2) Temperatura (°C) (L)	0,025556	0,002668
Temperatura (°C) (Q)	0,003490	-0,006280
1L by 2L	0,218123	-0,001587

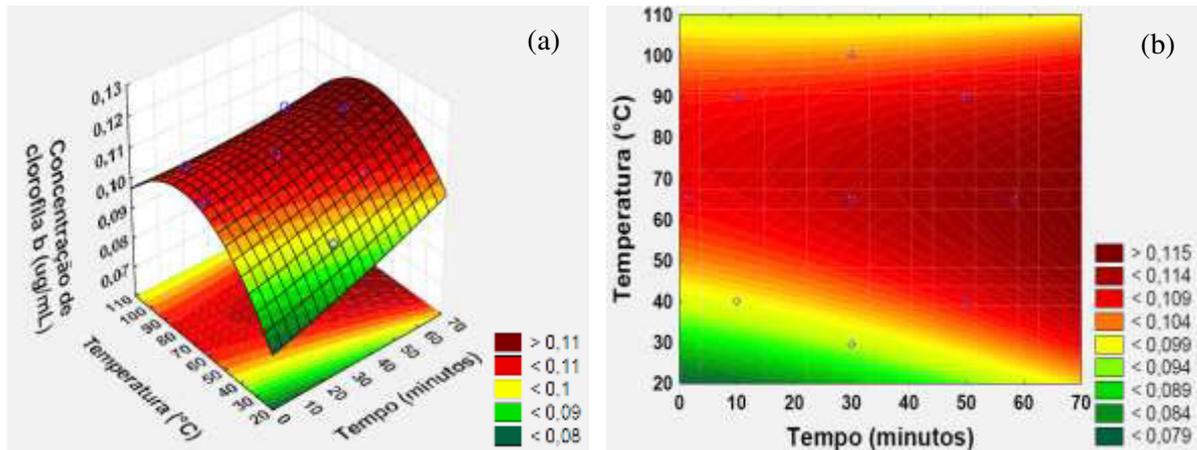
(L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos. Fonte: Próprio autor (2019).

A Equação 7 apresenta a equação codificada proposta pelo modelo a partir dos dados experimentais e dos coeficientes encontrados para a extração de clorofila *b*, de forma que os números vermelhos são os significativos e os de preto não o são.

$$y = 0,111523 + 0,003161.t + 0,002668.T + 0,000457.t^2 - 0,006280.T^2 + 0,001587.t.T \quad (7)$$

Apresenta-se, então, na Figura 20, a superfície de resposta e o gráfico de contorno construído a partir do modelo.

Figura 20 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de clorofila *b* extraída



Fonte: Próprio autor (2019).

Analisando a Figura 20a, percebe-se o abaulamento da curva, provocado pelo efeito significativo da temperatura quadrática e já indicado pelo sinal negativo mostrado no diagrama de Pareto (Figura 19). Dessa forma, assim como para a clorofila *a*, na extração de clorofila *b* da microalga, escolhendo um tempo de banho fixo, o aumento de temperatura provoca um acréscimo na concentração extraída até que o inverso comece a acontecer, ou seja, temperaturas mais altas iniciem a reduzir a extração. As condições de maior extração mostradas foram entre 55°C e 75°C e tempos de exposição ao banho maiores que 50°C.

O abaulamento da curva para a clorofila *b* foi mais suave que aquele observado para clorofila *a*. Isso pode ter sido reflexo do efeito linear da temperatura, que também foi significativo na extração da clorofila *b*.

Também fica evidente, pelos gráficos da Figura 20, a influência linear do tempo na extração, isto é, quanto maior o tempo, maior a concentração de clorofila *b* obtida, ao se manter a temperatura de extração fixa. Com base nisso, a extração a baixas temperaturas provavelmente só deve ocorrer quando aumentado o tempo de banho-maria ao qual são submetidas as células (Figura 20b).

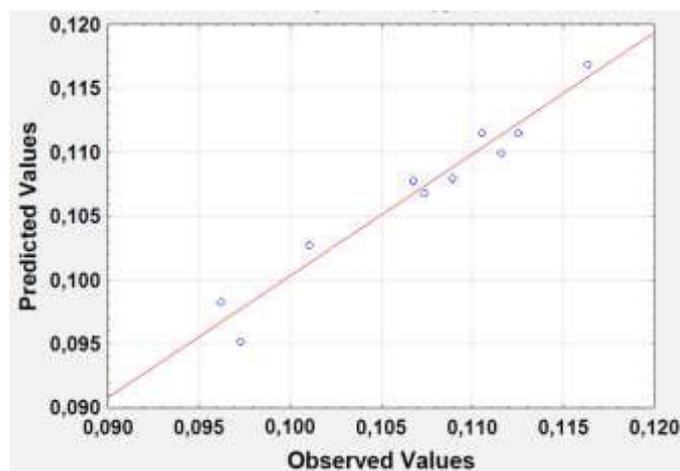
Kong et al. (2012), estudando a influência da temperatura e do tempo na extração de clorofila da microalga *Chlorella vulgaris*, também observaram um comportamento curvilíneo convexo na superfície de resposta em relação à temperatura, obtendo o efeito quadrático desse

fator como significativo. Além disso, assim como neste trabalho, os referidos autores observaram a significância da temperatura e do tempo lineares em seus modelos. Dessa forma, encontraram a máxima extração do pigmento a 61,4°C e 78,7 minutos.

Outro ponto a se destacar é que, em comparação com os resultados para clorofila *a*, no caso do tipo *b* desse pigmento, boas extrações são conseguidas em temperaturas mais altas quando os valores de tempo são também menores.

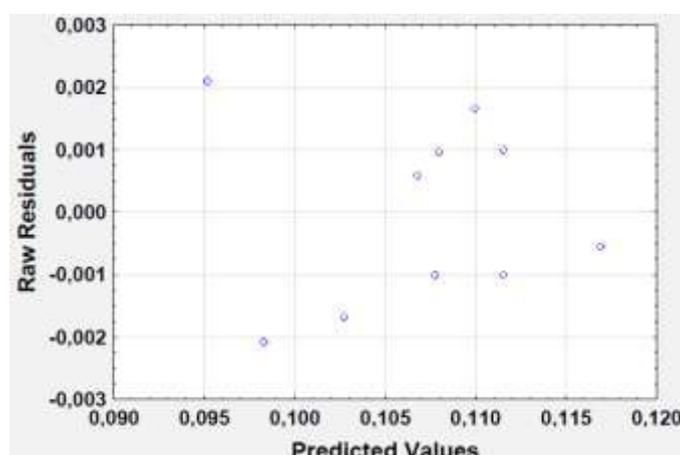
As Figuras 21 e 22, por sua vez, apresentam os gráficos dos valores preditos vs. observados e dos valores residuais vs. preditos, respectivamente, para o pigmento em questão. Observa-se que os pontos, assim como para clorofila *a*, permaneceram bem próximos da reta (Figura 21), demonstrando bom ajuste do modelo. Já a Figura 22 apresenta os pontos com tendência de deslocamento para a direita, mostrando crescimento na variância residual.

Figura 21 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para clorofila *b*



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 22 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para clorofila *b*

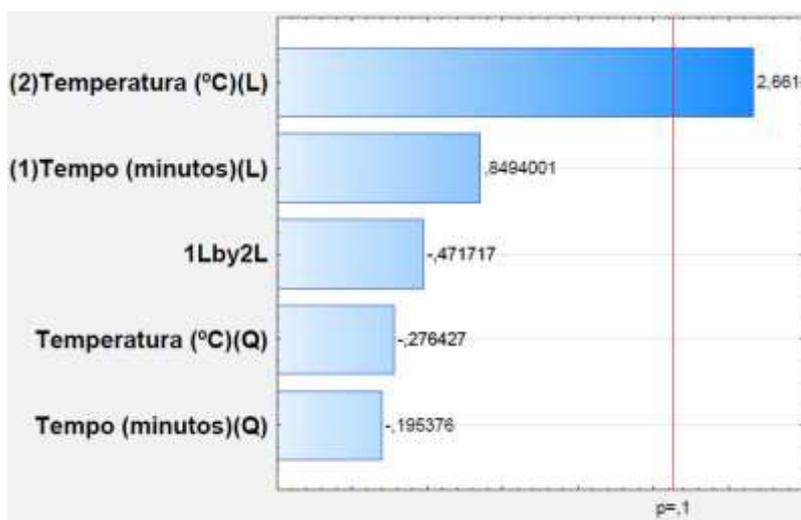


Fonte: Próprio autor (2019).

5.5.3 CAROTENOIDES EXTRAÍDOS

A fim de analisar a influência da temperatura e do tempo na extração de carotenoides da microalga *Chlorella vulgaris*, mais uma vez foram construídos o Diagrama de Pareto e obtidos p-valores e coeficientes do modelo através de análise de variância, mostrados na Figura 23 e na Tabela 12.

Figura 23 – Diagrama de Pareto para carotenoides



Em que: (L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos. Fonte: próprio autor (2019).

Tabela 12 – p-valores e coeficientes do modelo para fatores testados na extração de carotenoides

Fator	P	Coefficiente
Mean/intercessão	-	0,117733
(1) Tempo (min) (L)	0,443507	0,002632
Tempo (min) (Q)	0,854621	-0,000801
(2) Temperatura (°C) (L)	0,056311	0,008244
Temperatura (°C) (Q)	0,795915	-0,001133
1L by 2L	0,661709	-0,002067

(L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos. Fonte: Próprio autor (2019).

Uma vez que, com um nível de confiança de 95%, não se encontrou efeito significativo para a extração de carotenoides, foi empregado para esse pigmento 90% de confiança. Além disso, a significância foi determinada para p-valores menores que 0,1. Dessa forma, apenas a temperatura linear mostrou-se significativa na concentração de carotenoides extraída (p-valor

igual a 0,056311).

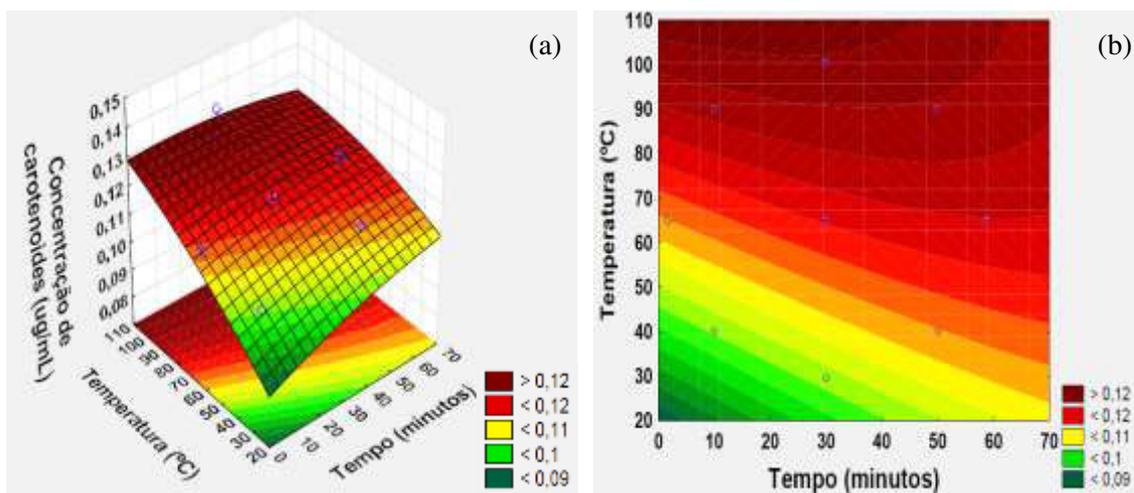
O modelo obtido foi o da Equação 8 (fator significativo em vermelho), porém o R^2 encontrado foi de 0,66971, mostrando que a regressão descreveu apenas 67,0% dos casos, aproximadamente. Possivelmente, erros da equação semiempírica (Equação 5) e experimentais tiveram contribuição nesse valor.

$$y = 0,117733 + 0,002632.t + 0,008244.T - 0,000801.t^2 - 0,001133.T^2 - 0,002067.t.T \quad (8)$$

São mostrados, na Figura 24, a superfície de resposta e o gráfico de contorno para a concentração de carotenoides. Para esse pigmento, não foi percebido abaulamento na superfície, diferentemente dos resultados encontrados para clorofilas *a* e *b*, uma vez que não houve nenhum efeito quadrático significativo.

Portanto, observa-se, na Figura 24, ao tomar um tempo definido, o aumento linear da extração de carotenoides com o aumento da temperatura do banho-maria, fator que apresentou significância estatística pela análise de variância (ANOVA). Assim, de acordo com os gráficos da Figura 24, as maiores concentrações de carotenoides são obtidas acima de 95°C em toda a faixa de tempo estudada.

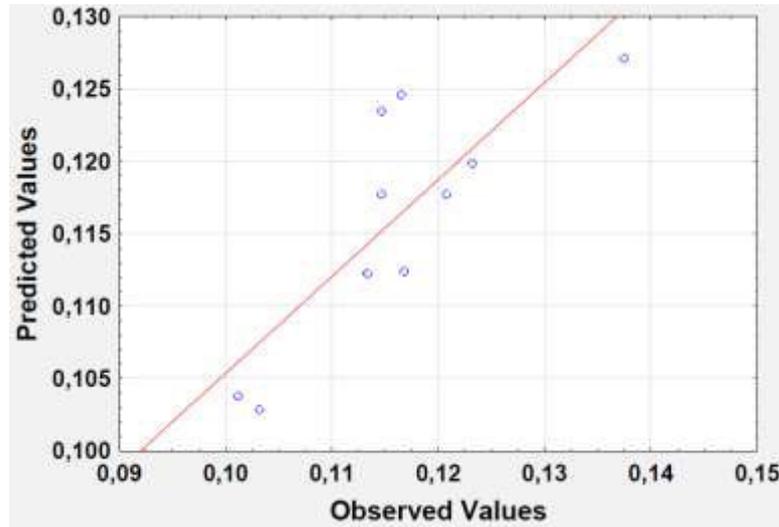
Figura 24 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de carotenoides extraída



Fonte: Próprio autor (2019).

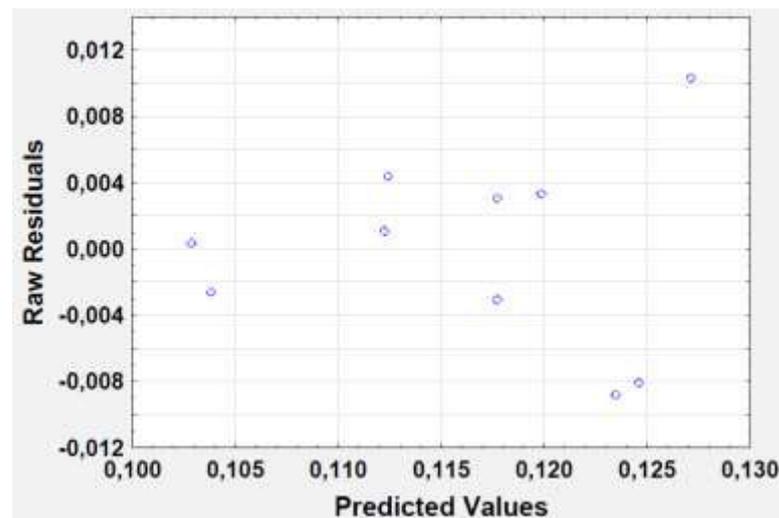
Para as concentrações de carotenoides, também foram construídos os gráficos dos valores preditos vs. observados e dos valores residuais vs. preditos, conforme mostram as Figuras 25 e 26, respectivamente.

Figura 25 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para carotenoides



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 26 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para carotenoides



Fonte: Próprio autor (2019).

Através da análise do gráfico da Figura 25, percebe-se que nem todos os pontos seguiram o comportamento da reta, mostrando uma possível diferença entre os valores observados e ajustados pelo modelo. Entretanto, a Figura 26 apresenta os pontos, em sua maioria, próximos ao zero e bem distribuídos, indicando provavelmente variância constante.

6 CONCLUSÃO

A partir do experimento realizado, foi possível cultivar a microalga *Chlorella vulgaris* em regime fotoautotrófico, de forma que seu crescimento descreveu uma curva próxima à sigmoideal. Inicialmente, o microrganismo passou por uma fase de latência, entrando, logo depois, na fase exponencial de crescimento, em que a densidade celular cresceu consideravelmente com o tempo. Após isso, o microrganismo começou a apresentar uma desaceleração na taxa de crescimento, sendo o cultivo então encerrado.

Utilizando os dados experimentais obtidos, também se encontraram os parâmetros cinéticos do cultivo, de forma a obter velocidade máxima específica de crescimento de $0,0085 \pm 0,0005 \text{ h}^{-1}$, tempo de geração de $82,06 \pm 4,94 \text{ h}$, produtividade máxima com valor de $0,0021 \pm 0,0004 \text{ g/L.h}$ e $0,758 \pm 0,137 \text{ g/L}$ de densidade celular máxima.

A partir da biomassa microalgal obtida do cultivo, foi possível extrair clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides das células de *Chlorella vulgaris*. Comparando as concentrações obtidas, a maior extração, em todas condições, foi de clorofila *a*, seguida de carotenoides e clorofila *b*, respectivamente.

Ao avaliar os efeitos do binômio tempo x temperatura, concluiu-se que, para clorofila *a*, a nível de confiança de 95%, temperatura quadrática e tempo linear foram significativos na extração, resultado confirmado pelos p-valores encontrados.

A superfície de resposta referente à clorofila *a* apresentou um abaulamento, de forma que o aumento da temperatura promoveu maiores extrações até que a quantidade extraída começou a reduzir com a temperatura. Já para o tempo, percebeu-se que quanto maior o período de exposição ao banho, mais clorofila *a* foi extraída. Além disso, em virtude de seu maior efeito, a temperatura teve mais influência na extração que o tempo.

O comportamento estatístico para a clorofila *b* foi similar ao tipo *a* desse pigmento, uma vez que temperatura quadrática e tempo linear foram significativos, sendo a primeira mais influente na extração que o segundo, ao se adotar 95% de confiança. Entretanto, também se obteve significância da temperatura linear. Em virtude disso, o comportamento convexo para a clorofila *b* foi mais suave que o da clorofila *a*.

Já para a extração de carotenoides da microalga, foi necessário reduzir a confiança para 90%, a fim de encontrar um efeito significativo, o qual foi a temperatura linear. Dessa maneira, o comportamento da superfície de resposta apresentou-se de forma a mostrar que o aumento de temperatura provoca melhoria na extração desse pigmento.

Os modelos aplicados mostraram que as maiores concentrações foram obtidas entre 50°C e 80°C e acima de 48 minutos para clorofila *a*; entre 55°C e 75°C e acima de 50 minutos para clorofila *b* e acima de 95°C em toda a faixa de tempo estudada para carotenoides.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se, para trabalhos futuros, a decodificação dos modelos encontrados, a fim de determinar, de forma precisa, a temperatura e o tempo de banho-maria que promovam as maiores extrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides. Além disso, também se recomenda a realização posterior de experimentos utilizando as condições encontradas, de forma a validar os resultados. Em relação ao cultivo, propõe-se o estudo de novos sistemas de aeração mais eficientes que o utilizado.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, G. S. **Utilização de microalgas na biotecnologia, com ênfase para biodiesel e análise de imunoparâmetros em camarões marinhos**. 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BENAVENTE-VALDÉS, J. R.; AGUILAR, C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MONTAÑEZ, J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. Review. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 117-125, June, 2016.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 54-58, Jan-fev, 2008.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica**, v. 2, 1. ed. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda., 2001.

BRONZATO, G. R. F. **Seleção de linhagens de microalgas para a produção de biodiesel**. 2012. 57 f. Monografia (Engenharia Bioquímica) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

CERÓN-GARCÍA, M. C.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; CAMACHO-RODRÍGUEZ, J.; LÓPEZ-ROSALES, L.; GARCÍA-CAMACHO, F.; MOLINA-GRIMA, E. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). **Food Chemistry**, v. 257, p. 316-324, 2018.

CHEN J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R. Y. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 336–346, 2018.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 17, n. 4. p. 429-236, 2006.

D'ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832-841, 2016.

DAMERGI, E.; SCHWITZGUÉBEL, J. P.; REFARDT, D.; SHARMA, S.; HOLLIGER, C. LUDWIG, C. Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass. **Algal Research**, v. 25, p. 488–495, 2017.

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

DE MELO, R. G.; ANDRADE, A. F.; BEZERRA, R. P.; CORREIA, D. S.; SOUZA, V. C.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; MARQUES, D. A. V.; PORTO, A. L. F. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. **Chemosphere**. v. 204, p. 344-350, 2018.

DERNER, R. B. **Sistemas de cultivo de microalgas – Parte I**. 2017. Disponível em: <<http://www.aquaculturebrasil.com/2017/12/06/sistemas-de-cultivo-de-microalgas-parte-i/>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

FREITAS, B. C. B. **Cultivo de microalgas utilizando pentoses como fonte de carbono**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M. H. M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R. H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 243–260, 2015.

GORGÔNIO, C. M. S. **Aplicação de tecnologia enzimática para a obtenção de hidrolisados proteicos de microalgas**. 2013. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

HU, J.; NAGARAJAN, D.; ZHANG, Q.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 54–67, 2018.

KCSMAR. **Phytoplankton pigments**. 2004. Disponível em: <<http://water.iopan.gda.pl/~kaczmar/bdo/pigments.htm>>. Acesso em: 19 de set. de 2019.

KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. K. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 110, p. 60-84, 2018.

KONG, W.; LIU, N.A.; 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 Technology**, 2012.

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

LAM M. K.; YUSOFF, M. I.; UEMURA, Y.; LIM, J. W.; KHOO, C. G.; LEE, K. T.; ONG, H. C. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. **Renewable Energy**, v. 103, p. 197-207, 2017.

LIRA, R. A. **Estudo do rendimento de biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp. visando a obtenção de biocombustíveis**. 2011. 133 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

LOPES, T. S. A. **Estudo da potencialidade de biorremediação e produção de biocombustíveis a partir das microalgas**. 2017. 34 f. Artigo para trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

LOURES, C. C. A. **Otimização do processo de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2016. 154 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

MENDONÇA, T. A. **Carotenoides da microalga *Spirulina platensis*: obtenção e avaliação da atividade antioxidante**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

MIYAWAKI, B. **Purificação de biogás através de cultivo de microalgas em resíduos agroindustriais**. 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

OCTAVE, S.; THOMAS, B. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 659-664, 2009.

PESQUISA da Embrapa identifica microalgas que geram biocombustíveis. **Portal R9**, 05 de mar. de 2017. Disponível em: < <https://r9n.com.br/pesquisa-da-embrapa-identifica-microalgas-que-geram-biocombustiveis>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

PHONG, W. N.; SHOW, P. L.; LE, C. F.; TAO, Y.; CHANG, J. S.; LING, T. C. Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. **Biochemical Engineering Journal**, 2018.

PRASANNA, R.; JAISWAL, P.; KAUSHIK, B. D. Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability – promises and challenges. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 89-94, 2008.

PROCÓPIO, Z. S. S. **Avaliação da produção de biodiesel de microalga *Isochrysis galbana* via transesterificação *in situ***. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

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

RODRIGUES, D. B. **Biorrefinaria de microalgas: produção de químicos de alto valor a partir de efluentes agroindustriais**. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

RODRIGUES, T. T. **Estudo da pirólise da microalga *Chlorella vulgaris*: determinação das classes de produtos e dos parâmetros cinéticos**. 2017. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SAFI, C.; ZEBIB, FRANCES, C; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; POUZET, C.; VACA-GARCIA, C.; PONTALIER, P.Y. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. **Algal Research**, v. 8, p. 61–68, 2015.

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

SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e Recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SILVEIRA, C. A. **Modelagem e simulação de reatores de cultivo de microalgas tipo “open pond”**. 2015. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SOARES, E. J. S.; SILVA, N. F.; COSTA, A. M. M.; RAMOS, A. N. S.; FERREIRA, W. B. Biotecnologia na produção de combustíveis: influência da luminosidade para o desenvolvimento e produção lipídica da microalga *Chlorella vulgaris*. In: IV CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO EM CIÊNCIAS, 2010, Campina Grande. **Anais...**, 2010.

SOUSA, L. F. **Otimização do meio de cultivo para microalgas: variando nitrogênio**. 2019. 23 f. Relatório (Iniciação Científica) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

SPIDEN, E.; M.SCALES, P. J.; YAP, B. H. J.; KENTISH, S. E.; HILL, D. R.A.; MARTIN, G. J.O. The effects of acidic and thermal pretreatment on the mechanical rupture of two industrially relevant microalgae: *Chlorella* sp. and *Navicula* sp. **Algal Research**, v. 7, p. 5-10, 2015.

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

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H.; As clorófitas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, 2005.

SUGAI, M. H. **Modelagem matemática de coluna de gaseificação de Fotobiorreatores tubulares para cultivo de microalgas**. 2008. 223 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

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

TREVISAN, E.; NETO, M. L.; MORO, P.; HOSHINO, S. O.; ARROYO, P. A. Avaliação do pH em cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 8, 2013 Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá: Editora CESUMAR, 2013.

VENTURA, S.P.M.; NOBRE, B. P.; ERTEKIN, F.; HAYES, M.; GARCÍA –VAQUERO, M.; VIEIRA F. KOC. M.; GOUVEIA, L.; AIRES-BARROS, M. R.; PALAVRA, A. M. F. Extraction of value-added compounds from microalgae. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**, p. 461-483, 2017.

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

VIDOTTI, A. D. S. **Cultivo heterotrófico axênico de *Chlorella vulgaris*: inibição por substrato.** 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

WEBER, D. P.; CAETANO, P.; FERNANDES, A. S.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Perfil de carotenoides da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo fototrófico. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, São Carlos. **Anais....**, 2017.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, n. 6, p. 487-502, 1996.

ZHAO, W.; DUAN, M.; ZHANG, X.; TAN, T. A mild extraction and separation procedure of polysaccharide, lipid, chlorophyll and protein from *Chlorella spp.* **Renawable Energy**, v. 118, p. 701-708, 2018.

ZHENG, H.; YIN, J.; GAO, Z.; HUANG, H.; JI, X.; DOU, C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Appl Biochem Biotechnol** v. 164, p. 1215–1224, 2011.