

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

Laís Ferreira de Souza¹, Antonio Carlos Daltro de Freitas¹, Annamaria Dória Souza Vidotti¹

¹Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil (ads.vidotti@ufma.br)

Resumo: Este estudo avaliou as melhores condições de tempo e temperatura para extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris* usando etanol 95% e DCCR. As concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenoides foram medidas por espectrofotometria. A temperatura influenciou significativamente todos os pigmentos; o tempo foi relevante para clorofilas. As maiores extrações ocorreram entre 50–95 °C e tempos acima de 48 minutos.

Palavras-chave: Microalgas; extração de pigmentos; *Chlorella vulgaris*; clorofila.

INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes que vêm ganhando crescente destaque na biotecnologia devido à sua elevada capacidade de conversão de energia solar e dióxido de carbono (CO₂) em biomassa rica em compostos de alto valor agregado (Barka et al., 2022). Podem ser encontradas em diversos ambientes, como águas salgadas, doces e até mesmo em solos úmidos, demonstrando ampla adaptabilidade ecológica (Chew et al., 2017). Dentre as espécies mais estudadas e cultivadas, destaca-se a *Chlorella vulgaris*, que possui alta eficiência fotossintética e composição bioquímica favorável, contendo lipídios, proteínas, carboidratos e pigmentos, como clorofilas e carotenoides (Mata et al., 2010).

O cultivo de microalgas apresenta vantagens significativas em relação a outras fontes de biomassa, como o uso de nutrientes simples, rápido crescimento celular e possibilidade de controle das condições ambientais para intensificar a produção de metabólitos específicos (Chew et al., 2017). Essas características tornam o processo biotecnológico mais eficiente e atraente do ponto de vista econômico e ambiental. Os pigmentos extraídos de microalgas apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais, sendo utilizados em diversos setores, como o alimentício, farmacêutico e cosmético (Del Río-Pérez et al., 2021).

Além disso, o interesse crescente por pigmentos naturais decorre da necessidade de substituir corantes sintéticos potencialmente tóxicos, promovendo soluções mais seguras e sustentáveis. A produção contínua e a possibilidade de manipular

geneticamente e ambientalmente as microalgas para aumentar a biossíntese de compostos desejados são fatores que aumentam ainda mais seu potencial industrial (Günerken et al., 2015).

Contudo, a extração dos compostos intracelulares de microalgas representa um desafio técnico. As células microalgais possuem parede celular espessa e estruturas que dificultam o acesso aos metabólitos de interesse, exigindo a aplicação de técnicas eficientes de ruptura celular e extração (Günerken et al., 2015). Dentre os métodos disponíveis, a extração com solventes se destaca pela viabilidade operacional, especialmente quando combinada com o uso de temperaturas controladas. Temperaturas mais elevadas podem aumentar a eficiência da extração, mas também elevam o risco de degradação térmica dos pigmentos, o que exige estudos cuidadosos para definição das condições ideais (Mendonça, 2014).

Nesse contexto, este trabalho investigou os efeitos de variáveis como tempo e temperatura no processo de extração dos pigmentos da *Chlorella vulgaris*, em cultivo fotoautotrófico, aplicando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), visando maximizar o rendimento e a estabilidade dos compostos. Esse conhecimento contribui diretamente para a otimização de processos industriais, tornando o uso de microalgas mais competitivo e sustentável em aplicações como produção de cosméticos, alimentos funcionais e biofármacos (Del Río-Pérez et al., 2021).

MATERIAL E MÉTODOS

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. 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. O meio foi submetido à esterilização em autoclave à temperatura de 121 °C por 15 minutos. 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.

Fotobiorreatores

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, $\frac{1}{2}$ 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. A Figura 1, apresenta uma foto geral do aparato experimental.



Figura 1: Aparato experimental geral com destaque para os fotobiorreatores.

Curva de crescimento

Para determinação da concentração celular do inóculo, utilizou-se a técnica de peso seco. Foi retirada uma alíquota de 40 mL do cultivo, centrifugando-a a 2500 rpm por quatro minutos (Macro Centrífuga da marca Benfer, modelo BMC). O sobrenadante foi descartado e o pellet 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. Esse fato foi verificado por pesagens diárias do conjunto amostra e tubo, através de balança eletrônica (marca Tecnal, modelo Mark 2200, classe II). Esse procedimento foi realizado em triplicata. Logo em seguida, tomando-se outra amostra do cultivo, fez-se uma série de diluições, a fim de medir a absorbância em espectrofotômetro digital (modelo UV-M51), no comprimento de onda de 680 nm e a curva padrão foi construída. Essa foi usada para, posteriormente, converter os valores de absorbância em concentração e construir a curva de crescimento correspondente ao experimento.

O ensaio teve duração de 15 dias, com dez medidas de absorbância realizadas. Também foram realizadas medidas de pH em pHmetro digital (marca Hanna), a fim de acompanhar esse parâmetro durante o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*. A partir dos dados experimentais, calcularam-se os seguintes parâmetros cinéticos para o cultivo: densidade celular máxima ($X_{\text{máx}}$), velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (t_g) e máxima produtividade celular ($P_{X_{\text{máx}}}$).

Extração de pigmentos

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. 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 e descongelamento, a biomassa foi levada a banho

maria ultratermostalizada (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 1). 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.

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 1, 2 e 3 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).

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

$$\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g/mL}) = (20,97 A_{645} - 3,94 A_{663} - 3,66 A_{630}) \cdot v / (l \cdot V) \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/mL}) = 4,0 A_{480} \cdot v / (l \cdot V) \quad (3)$$

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.

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 1, 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 1 – Matriz do DCCR para as condições de tempo e temperatura do banho maria

Exp	Tempo (min)	T (°C)	Tempo (valores codificados)	T (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

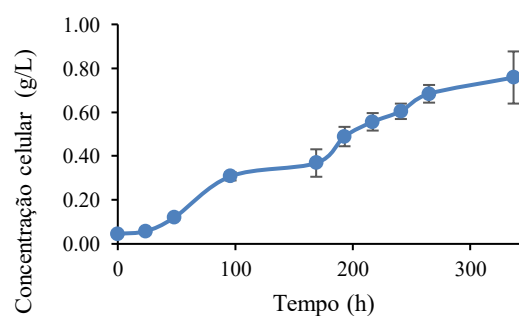
Sendo: (Exp) – experimento; (PC) – ponto central; (T) – Temperatura;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curva de crescimento

As medidas de absorbância realizadas durante o cultivo para a triplicata biológica foram convertidas em concentração celular. A partir dos valores médios de concentração, construiu-se o perfil de crescimento microalgal apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Perfil de crescimento celular da microalga *Chlorella vulgaris*



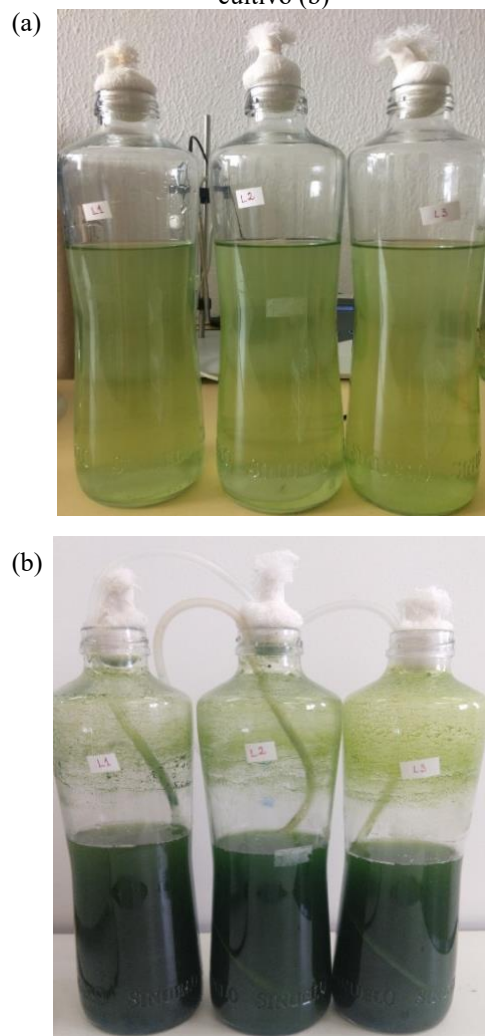
A curva de crescimento da Figura 2 apresentou um comportamento próximo ao sigmoidal. A análise do perfil de crescimento mostra que, no início do cultivo, a microalga passou por uma fase de latência (fase lag), na qual o aumento da concentração celular foi mínimo. Essa fase durou, aproximadamente, 24 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.

A Figura 3 apresenta os cultivos da triplicata biológica no tempo t_0 de início do experimento (Figura 3a) e no tempo 337 horas, ao final do cultivo (Figura 3b). Pode-se perceber a mudança de coloração, que indica o aumento da concentração de células.

Figura 3 – Fotobiorreatores no início (a) e ao final do cultivo (b)



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 2.

Tabela 2 – 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)
$0,0085 \pm 0,0005$	$82,06 \pm 4,94$	$0,0021 \pm 0,0004$	$0,758 \pm 0,137$

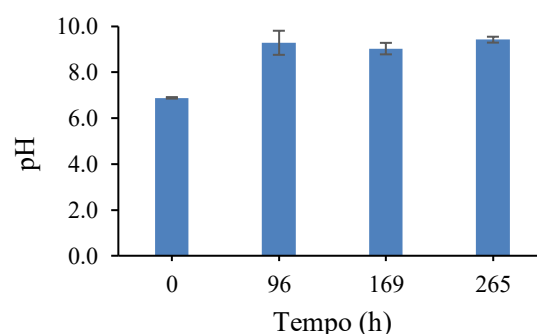
Em que: $\mu_{\text{máx}}$ - velocidade máxima específica de crescimento; t_g - tempo de geração; $P_{X_{\text{máx}}}$ - produtividade celular máxima; $X_{\text{máx}}$ - densidade celular máxima.

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.

pH do cultivo

A Figura 4 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 4 – pH do cultivo ao longo do experimento



Os dados apresentados na Figura 4 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. 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 4), que coincide com a redução na velocidade de crescimento ocorrida entre 96 e 169 horas (Figura 2).

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 1, mantendo a concentração de etanol fixa em 95%.

As absorvâncias 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 1, 2 e 3, como é mostrado nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 – Concentrações de clorofila *a* para diferentes condições de tempo e temperatura do banho

Experimento	Tempo (min)	T (°C)	Concentração clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	40	$0,2707 \pm 0,0000$
2	10	90	$0,3117 \pm 0,0001$
3	50	40	$0,3133 \pm 0,0000$
4	50	90	$0,3277 \pm 0,0000$
5	1,7	65	$0,3138 \pm 0,0000$
6	58,3	65	$0,3538 \pm 0,0000$
7	30	29,6	$0,2488 \pm 0,0001$
8	30	100,4	$0,2645 \pm 0,0004$
9 (PC)	30	65	$0,3385 \pm 0,0005$
10 (PC)	30	65	$0,3074 \pm 0,0001$

(PC) – ponto central; (T) – Temperatura.

Comparando-se as concentrações obtidas para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides presentes nas Tabelas 3, 4 e 5, 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.

Tabela 4 – Concentrações de clorofila *b* para diferentes condições de tempo e temperatura do banho

Experimento	Tempo (min)	T (°C)	Concentração clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	40	$0,0962 \pm 0,0000$
2	10	90	$0,1074 \pm 0,0010$
3	50	40	$0,1068 \pm 0,0002$
4	50	90	$0,1116 \pm 0,0000$
5	1,7	65	$0,1089 \pm 0,0000$
6	58,3	65	$0,1164 \pm 0,0002$
7	30	29,6	$0,0973 \pm 0,0010$
8	30	100,4	$0,1011 \pm 0,0006$
9 (PC)	30	65	$0,1105 \pm 0,0002$
10 (PC)	30	65	$0,1125 \pm 0,0012$

(PC) – ponto central; (T) – Temperatura.

Tabela 5 – Concentrações de carotenoides para diferentes condições de tempo e temperatura do banho

Experimento	Tempo (min)	T (°C)	Concentração carotenoides ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	40	$0,1032 \pm 0,0000$
2	10	90	$0,1147 \pm 0,0000$
3	50	40	$0,1133 \pm 0,0000$
4	50	90	$0,1165 \pm 0,0000$
5	1,7	65	$0,1168 \pm 0,0000$
6	58,3	65	$0,1232 \pm 0,0000$
7	30	29,6	$0,1012 \pm 0,0002$
8	30	100,4	$0,1375 \pm 0,0002$
9 (PC)	30	65	$0,1208 \pm 0,0000$
10 (PC)	30	65	$0,1147 \pm 0,0000$

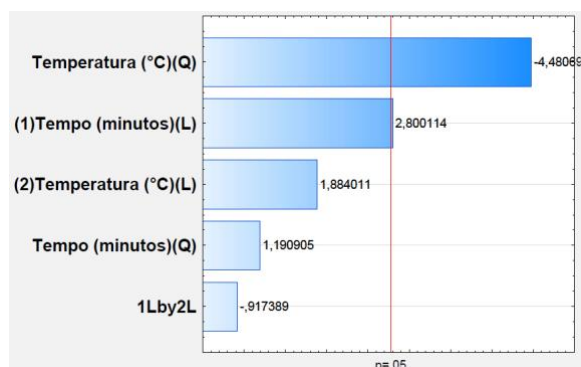
(PC) – ponto central; (T) – Temperatura.

Clorofila *a* extraída

A fim de analisar os dados experimentais encontrados para concentração de clorofila *a* extraída, foi construído o Diagrama de Pareto (Figura 5) 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 6, 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 6.

Figura 5 – Diagrama de Pareto para clorofila *a*



Em que: (L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos.

Tabela 6 – 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.

O diagrama de Pareto da Figura 5 e a Tabela 6 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.

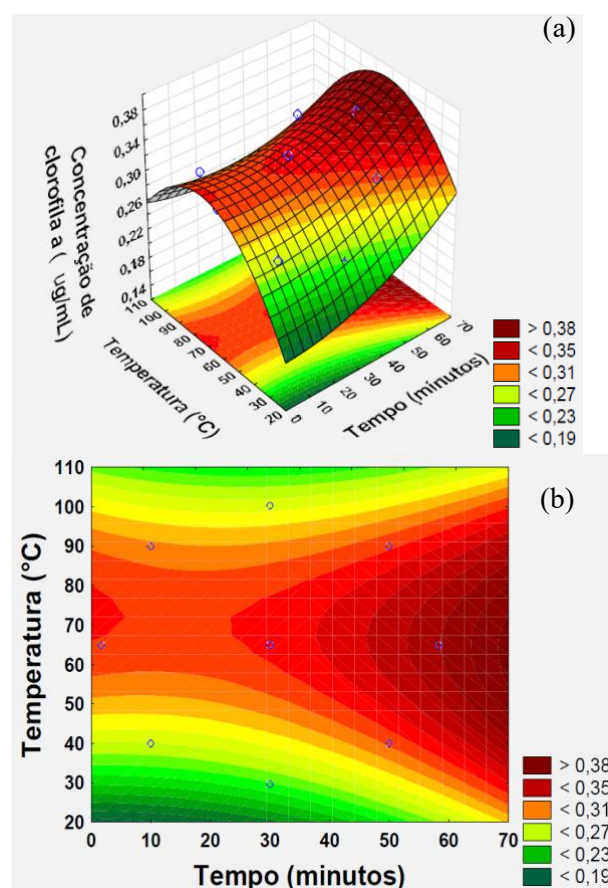
Ademais, a Figura 5 e a Tabela 6 mostraram que não

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 1) e a erros experimentais.

Na Figura 6 são mostrados os gráficos de superfície de resposta (Figura 6a) e de contorno (Figura 6b) para as concentrações de clorofila *a* extraídas.

Figura 6 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de clorofila *a* extraída



Ao analisar a Figura 6, 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 6). 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 6) 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 6 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 6, foi encontrado o modelo de regressão múltipla ajustado expresso na Equação 4, 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.

$$y = 0,322913 + 0,014403.t + 0,009689.T + 0,008105.t^2 - 0,030479.T^2 - 0,006673.t.T \quad (4)$$

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 7 e 8, respectivamente. Resíduos são a diferença entre as variáveis resposta preditas e as variáveis resposta observadas.

Figura 7 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para clorofila *a*

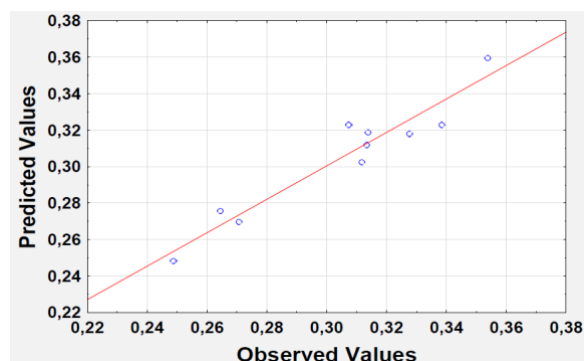
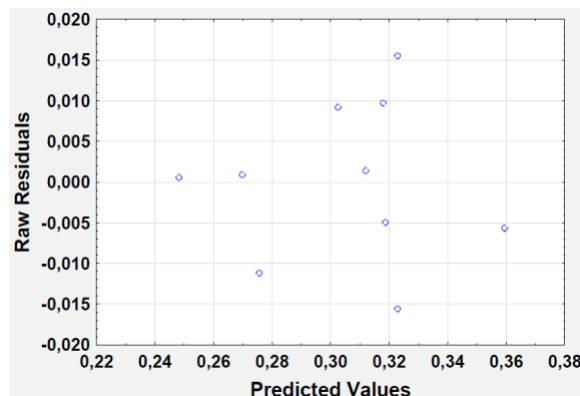


Figura 8 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para clorofila *a*



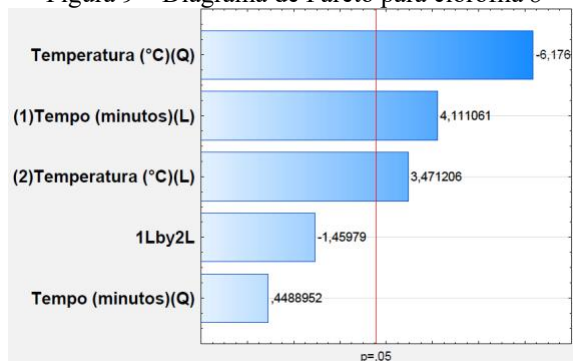
A análise da Figura 7 mostra que os pontos seguiram o comportamento da reta, não se distanciando consideravelmente dela. Isso é um indicio de bom ajuste do modelo, ao mostrar que os valores preditos foram bastante próximos dos observados.

A Figura 8, 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.

Clorofila *b* extraída

Utilizando os dados obtidos para clorofila *b* (Tabela 4), também foi construído o Diagrama de Pareto (Figura 9) 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 9 e da Tabela 7 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 2) e aqueles associados ao experimento.

Figura 9 – Diagrama de Pareto para clorofila *b*



Em que: (L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos.

Tabela 7 – 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

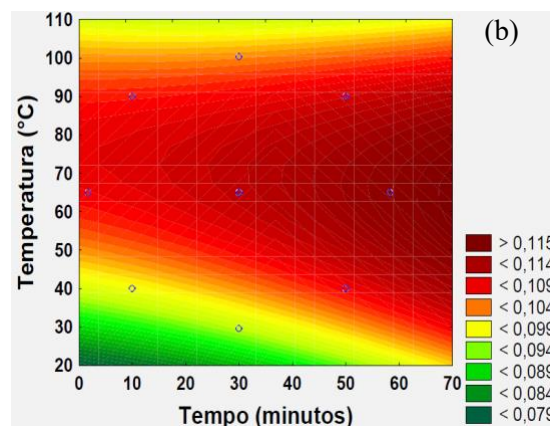
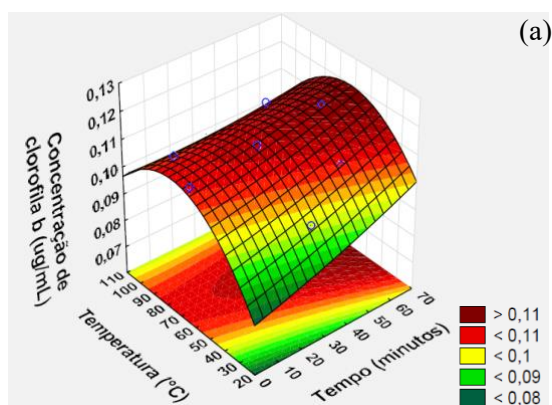
(L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos.

A Equação 5 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.

$$y = 0,111523 + 0,003161.t + 0,002668.T + 0,000457.t^2 - 0,006280.T^2 + 0,001587.t.T \quad (5)$$

Apresenta-se, então, na Figura 10, a superfície de resposta e o gráfico de contorno construído a partir do modelo.

Figura 10 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de clorofila *b* extraída



Analisando a Figura 10a, 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 9). 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 10, 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 10b).

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 são menores.

As Figuras 11 e 12, 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 11), demonstrando bom ajuste do modelo. Já a Figura 12 apresenta os pontos com tendência de deslocamento para a direita, mostrando crescimento na variância residual.

Figura 11 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para clorofila *b*

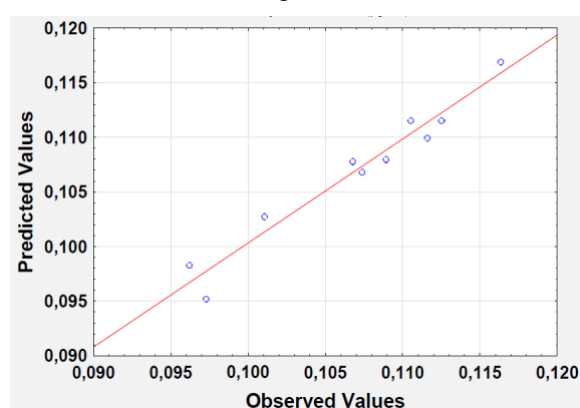
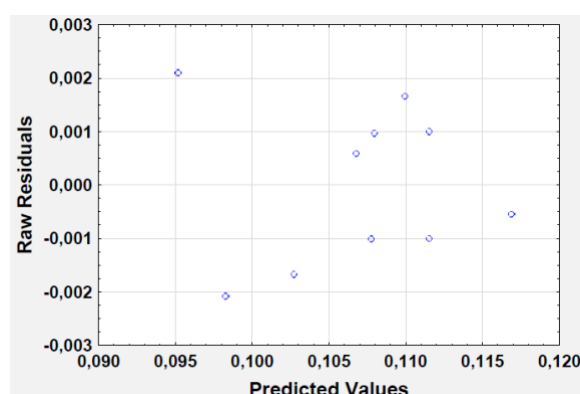


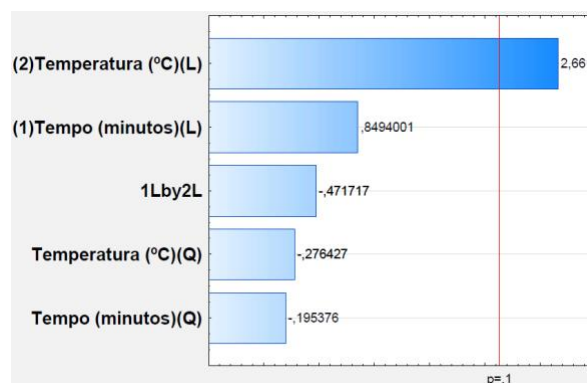
Figura 12 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para clorofila *b*



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 13 e na Tabela 8.

Figura 13 – Diagrama de Pareto para carotenoides



Em que: (L) – termos lineares; (Q) – termos quadráticos.

Tabela 8 – 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.

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 6 (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 3) e experimentais tiveram contribuição nesse valor.

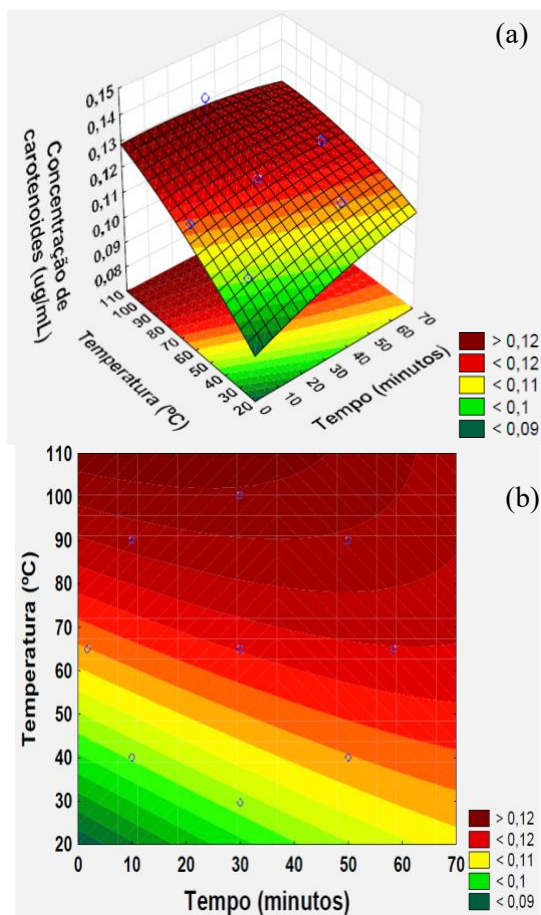
$$y = 0,117733 + 0,002632.t + 0,008244.T - 0,000801.t^2 - 0,001133.T^2 - 0,002067.t.T \quad (6)$$

São mostrados, na Figura 14, 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 14, 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 14 – Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para concentração de carotenoides extraída



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 15 e 16, respectivamente.

Figura 15 – Gráfico dos valores preditos vs. observados para carotenoides

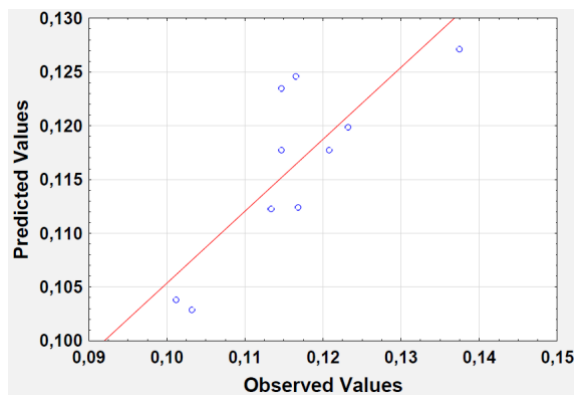
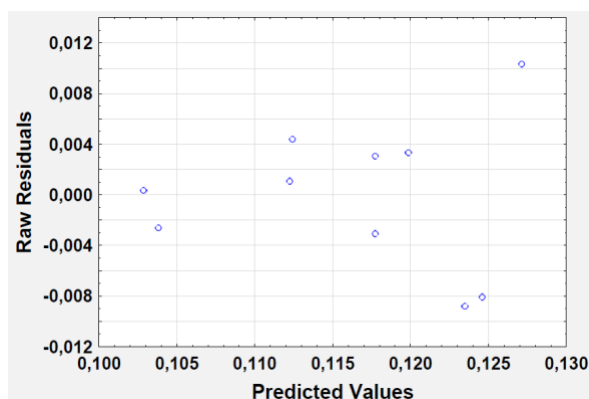


Figura 16 – Gráfico dos valores residuais vs. preditos para carotenoides



Através da análise do gráfico da Figura 15, 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 16 apresenta os pontos, em sua maioria, próximos ao zero e bem distribuídos, indicando provavelmente variância constante.

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.

REFERÊNCIAS

Barka, L. S.; van der Meer, J. R.; Kessler, R. W. Advances in microalgal biotechnology: from

cultivation to biorefinery. *Biotechnology Advances*, v. 59, p. 107963, 2022.

Chew, K. W.; Yap, J. Y.; Show, P. L.; Suan, N. H.; Juan, J. C.; Ling, T. C.; Chang, J. S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, v. 229, p. 53–62, 2017.

Del Río-Pérez, E.; Alonso-Riaño, P.; Trigueros, E.; Díaz-Santos, E. Microalgae-based pigments: a review of extraction methods and industrial applications. *Algal Research*, v. 56, p. 102288, 2021.

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, n. 2, p. 243–260, 2015.

KCSMAR. Phytoplankton pigments. (In: Kaczmar, B. [org.]). Disponível em: <http://water.iopan.gda.pl/~kaczmar/bdo/pigments.htm>

Kong, W.; Liu, Na.; 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.

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.

Mata, T. M.; Martins, A. A.; Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

Mendonça, M. C. Otimização da extração de pigmentos naturais de microalgas. (Orientador: Universidade de Aveiro). Universidade de Aveiro, Aveiro, 2014.

Safi, C.; Zebib, F.; 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.

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



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... (Editora CESUMAR). CESUMAR, Maringá, 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. (In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Edited by R. B. Gupta). Elsevier, London, 2017, pp. 461–483.

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

Zhao, W.; Duan, M.; Zhang, X.; Tan, T. A mild extraction and separation procedure of polysaccharide, lipid, chlorophyll and protein from *Chlorella spp.* *Renewable Energy*, v. 118, p. 701–708, 2018.