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

Gabriel Costa Lima[1], José Henrique Soares Lima[1], Antonio Carlos Daltro de Freitas[1], Annamaria Dória Souza Vidotti[1]

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

O cultivo de microalgas possui destaque devido à aplicabilidade dos seus componentes de biomassa, como os pigmentos. Este trabalho avaliou a influência da concentração de etanol e temperatura na extração de pigmentos da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As faixas encontradas demonstraram que altas temperaturas, para o caso de clorofila *a*, e altas quantidades de etanol são capazes de aumentar o rendimento das clorofilas *a* e *b* e carotenoides.

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

INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos microscópicos presentes não somente no ambiente aquático, como também na superfície de determinados tipos de solo, representando uma grande diversidade de espécies. Elas obtêm nutrientes dos habitats aquáticos, absorvem luz solar e capturam CO_2 do ar, gerando uma complexa biomassa celular que abrange vários compostos bioquímicos importantes usados como matéria-prima para produtos de alto valor agregado (Barroca, 2023).

Microalgas contêm alta quantidade de proteínas, lipídios e carboidratos em sua biomassa. Elas são cultivadas em lagoas abertas ou em sistemas fechados (Colarte et al., 2025). Além de toda aplicabilidade em produtos industriais de grande atrativo, a captura biológica de dióxido de carbono usando microalgas mostrou-se promissora, pois elas fixam CO_2 durante seu crescimento. A captura de CO_2 dos fluxos de gás de combustão é uma tecnologia importante para a mitigação de gases de efeito estufa (Brown et al., 2024).

Por serem microrganismos fotossintéticos, as microalgas são ricas fontes de pigmentos, como clorofilas e carotenoides. Numerosos estudos foram conduzidos com foco no aumento do crescimento de biomassa e otimização de processos para obter produtos de microalgas como os pigmentos (Chettri et al., 2026). Os pigmentos microalgais possuem uma ampla gama de aplicações em diversos setores, incluindo alimentos, nutracêuticos, farmacêutico, aquicultura e cosméticos. (Chettri et al., 2026).

Existem muitas metodologias relatadas na literatura sobre a extração de pigmentos. Normalmente, utilizam-se solventes como meio extrativo, que geralmente são colocados em contato direto com a biomassa. Essa metodologia pode utilizar solventes orgânicos como o metanol, etanol, acetona, acetato de etila, n-hexano e suas misturas (Chettri et al., 2026).

Com base no controle dos parâmetros de crescimento (pH, luz, temperatura), nos níveis de rendimento celular e valor de mercado atual, os pigmentos de microalgas constituem-se em grandes candidatos a co-produtos, especialmente se eles são extraídos de forma seletiva e barata. Dessa forma, um dos obstáculos a ser superado é identificar a concentração de solvente e a temperatura ideal na extração de pigmentos de microalgas, que são os objetivos do presente trabalho, visando otimizar o processo extrativo, que pode maximizar o valor da matéria-prima de microalgas.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e Meio de cultivo

A microalga utilizada neste trabalho foi a *Chlorella vulgaris*. O microrganismo foi mantido na presença de luz artificial em temperatura ambiente.

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

Preparo do ensaio e condições de cultivo

Foram utilizados três fotobiorreatores idênticos de vidro transparente com as seguintes dimensões: diâmetro igual a 7 cm e altura igual a 24 cm. Cada fotobiorreator foi submetido a um sistema de aeração composto por um compressor (marca Vigor Ar

Panther) com capacidade de até 40L, conectado a uma mangueira de silicone contendo uma pedra porosa na extremidade.

Os três fotobiorreatores receberam a mesma concentração de inóculo. Em cada fotobiorreator, o volume total de trabalho foi de 700 ml, sendo 660 ml de meio e 40 ml de inóculo. Todos eles foram submetidos à mesma intensidade luminosa proveniente de duas lâmpadas (11 W D.L) fluorescentes durante todo o cultivo. Os fotobiorreatores foram fechados com tampão de algodão. Realizou-se o experimento em sala mantida à temperatura de, aproximadamente, 24°C.

Métodos analíticos

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

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

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

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) dos cultivos foi realizada através de leitura direta na amostra em phmetro digital (marca Hanna).

Foram realizados três cultivos, sob as mesmas condições experimentais, a fim de se obter a triplicata biológica. As análises das absorbâncias foram realizadas em triplicata técnica, para o cálculo de desvio padrão. À medida que eram coletadas as absorbâncias, os dados eram plotados na curva padrão. 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 ($P_{X_máx}$).

Extração de pigmentos

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

Após as centrifugações e descarte do sobrenadante as células foram misturadas a 2 mL de etanol 95% (v/v) (95 ° GL) P.A, com diferentes concentrações, conforme a matriz determinada através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) realizado. Em seguida, a suspensão biomassa/etanol foi agitada em vórtex por 30 segundos (VIDOTTI, 2015).

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

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 Kaczmar (2004).

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

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

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

Nas Equações 1, 2 e 3, v é o volume de solvente utilizado (2 mL), l é o comprimento da célula espectrofotomérica (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

Realizou-se um planejamento experimental através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com o objetivo de se determinar a melhor

condição de temperatura e a concentração ideal de etanol, otimizando a extração dos pigmentos microalgais. Esse planejamento estatístico foi implementado com o auxílio da ferramenta computacional *Statistica*.

Dentro da implementação, foram avaliadas a concentração de etanol e a temperatura do banho com duas repetições no ponto central. A análise permitiu a realização de 10 experimentos (10 combinações experimentais entre concentração e temperatura), tendo como variáveis de resposta as concentrações em µg/mL de pigmento (clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides) extraído. A Tabela 1 representa a matriz de planejamento com as devidas condições estudadas.

Tabela 1 – Matriz do DCCR para as condições de concentração de etanol e temperatura com seus respectivos valores codificados.

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

Sendo: (Exp) – experimento; (PC) – ponto central; (T) – Temperatura; (Conc) – Concentração de etanol.

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 1.

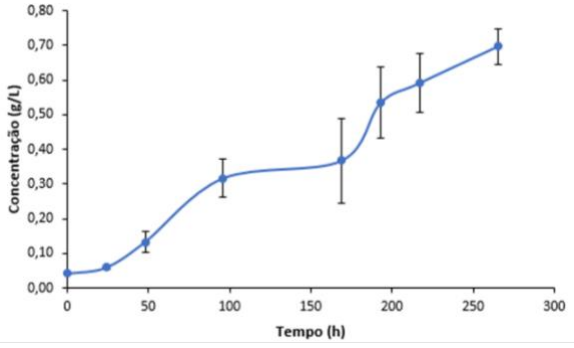


Figura 1 – Perfil de crescimento celular da microalga *Chlorella vulgaris*

A análise do gráfico da Figura 1 permite considerar que houve fase de latência (lag) entre os dois primeiros pontos, com um aumento pouco significativo da concentração de biomassa. O período de adaptação das células ao novo meio de cultivo teve duração pouco pronunciada, com intervalo de tempo de 24 h, isso pode ser atribuído à inoculação com as microalgas na fase exponencial de crescimento.

A partir de 24 h, ainda de acordo com o gráfico (Figura 1), iniciou-se a fase exponencial (log) de crescimento, em que as células microalgais estão adaptadas às novas condições ambientais e apresentam uma alta taxa de crescimento. O cultivo foi interrompido, aproximadamente, com 265 h, a fim de se obter a maior quantidade de biomassa possível para ser utilizada no processo de extração. A Figura 2 ilustra os ensaios ao final do tempo de cultivo.



Figura 2 – Fotobiorreatores ao final do cultivo.

Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados baseando-se nos dados da curva de crescimento, e estão apresentados na Tabela 2. Para a obtenção da velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{máx}$), foi necessário a construção de uma reta que representa a relação semilogarítmica da concentração de biomassa média da fase exponencial da curva de crescimento com o respectivo tempo de cultivo.

Em trabalhos como o de Blair et al. (2013), uma produtividade de 0,002 g/L.h foi alcançada sob condições experimentais próximas, com $\mu_{máx}$ = 0,016 h^{-1} e tg = 43,32 h, mostrando melhor desempenho cinético. Uma melhor atividade cinética também foi obtida no estudo feito por Soares et al. (2019): $P_{xmáx}$= 0,002 g/L.h, $\mu_{máx}$= 0,0480 h^{-1} e t_g = 14,44 h. Os resultados cinéticos (Tabela 2) inferiores aos dos outros trabalhos podem refletir a influência dos problemas causados ao sistema de aeração, gerando baixas ao cultivo.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos do cultivo da microalga

$\mu_{máx}$ (h^{-1})	t_g (h)	$P_{X_máx}$ (g/L.h)
0,010 ± 0,003	74,37 ± 19,86	0,003 ± 0,000

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

pH

Os valores médios de pH encontrados foram utilizados na construção do gráfico ilustrado na Figura 3. Foram realizadas quatro medidas de pH durante o ensaio para cada cultivo e calculadas as suas médias. O monitoramento do pH identifica o crescimento, já que interfere diretamente no metabolismo microalgal e na disponibilidade de nutrientes.

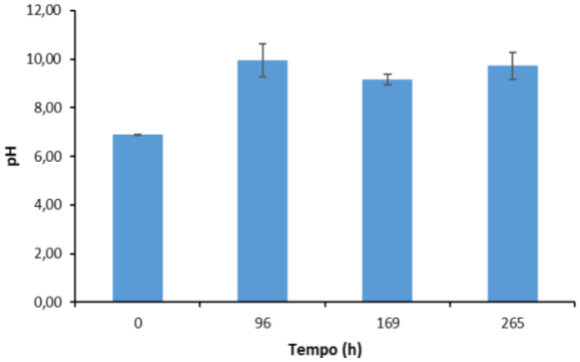


Figura 3 – Comportamento do pH ao longo do cultivo

A análise do perfil médio de pH dos cultivos apresentado na Figura 3 mostrou uma alcalinização do meio no tempo de 96 h. Essa alcalinização ocorreu na fase de grande atividade metabólica microalgal, com alto crescimento celular e alta eficiência fotossintética. Segundo Molazadeh et al. (2019), há maior dissociação de bicarbonato e consequente fixação de CO_2 durante a fotossíntese. A dissociação faz com que a acidez seja reduzida, ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (OH-) no meio, resultando em um aumento do pH.

Ao analisar o perfil de pH, notou-se que a microalga *Chlorella vulgaris* cresceu em uma faixa de pH variando de 6 a 10 ao longo do experimento, com maior produtividade de biomassa em meio alcalino. Esses resultados obtidos são próximos de resultados de outro trabalho, como o de Viana et al. (2014), que demonstraram um comportamento ideal da *Chlorella vulgaris* para a absorção do nitrogênio amoniacal necessário para seu crescimento e desenvolvimento sob valores de pH entre 7 e 9.

Análise estatística

Partindo da biomassa obtida nos cultivos, foi realizado o processo de extração de pigmentos de acordo com as condições de temperatura e concentração de etanol determinadas pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os valores das concentrações (g/mL) médias de clorofila a, clorofila b e carotenoides, obtidos segundo as Equações 1, 2 e 3, respectivamente, estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações médias de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides

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

Sendo: (T) – Temperatura; (Conc) – Concentração.

Baseando-se nos resultados obtidos no processo de extração, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), considerando como variáveis independentes a concentração de etanol e a temperatura, e como variável dependente o efeito na concentração de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides). A análise foi efetuada considerando um intervalo de confiança de 95%. Os resultados encontrados para p-valor e os coeficientes de regressão resultantes da ANOVA estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6. Os coeficientes de regressão constituem os modelos matemáticos, que representam os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes.

Tabela 4 - p-valor e coeficientes do modelo para clorofila *a*

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

Sendo: (L) - Efeito linear; (Q) - Efeito quadrático.

A análise de variância representada pelos dados obtidos nas tabelas anteriores e baseada na matriz DCCR, mostrou que houve influência significativa dos fatores concentração de etanol (L) e temperatura (L) na concentração de pigmentos extraída. As variáveis são consideradas significativas quando p <

0,05, e nesse caso, verificou-se que os fatores, independentemente, produziram efeitos na concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides.

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

Tabela 5 - p-valor e coeficientes do modelo para clorofila *b*

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

Sendo: (L) - Efeito linear; (Q) - Efeito quadrático;

Tabela 6 - p-valor e coeficientes do modelo para carotenoides

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

Sendo: (L) - Efeito linear; (Q) - Efeito quadrático

Os gráficos de Pareto foram produzidos para as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, escolhidas como variáveis de resposta, e estão apresentados nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

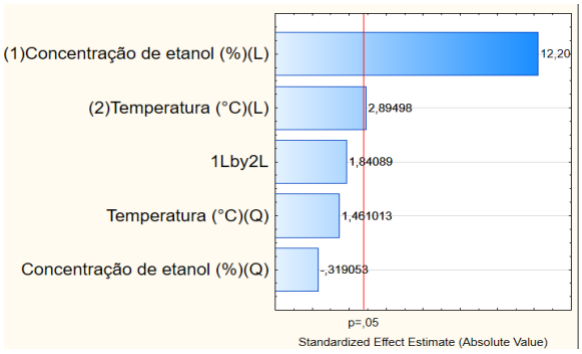


Figura 4 - Gráfico de Pareto para a concentração de clorofila *a*.

A sensibilidade das variáveis (concentração de etanol e temperatura) sobre a concentração de clorofila *a* pode ser visualizada através do diagrama presente na Figura 4. De acordo com diagrama, foi possível observar que o efeito linear (L) da concentração de etanol e temperatura apresentou importância estatística, influenciando significativamente na concentração de clorofila *a*. Os efeitos lineares positivos indicam que o aumento da concentração de etanol ou da temperatura resulta em um aumento linear da quantidade de clorofila *a* extraída.

Ainda de acordo com a Figura 4, verificou-se que não houve efeito significativo da interação linear (1Lby2L) entre concentração de etanol e temperatura, assim como, o efeito quadrático (Q) desses dois fatores.

A Figura 5 apresenta o gráfico de Pareto construído para a clorofila *b*. Observou-se que apenas o efeito linear da concentração de etanol apresentou significância estatística. Seu efeito positivo está associado a um aumento da concentração de clorofila *b*, sem qualquer interação significativa com a temperatura, seja ela linear ou quadrática.

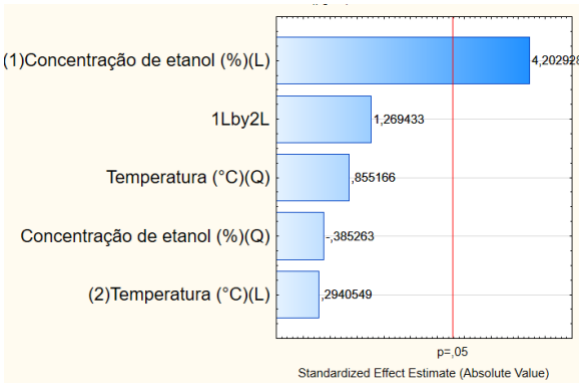


Figura 5 - Gráfico de Pareto para a concentração de clorofila *b*

A influência dos fatores sobre a concentração de carotenoides está apresentada no gráfico da Figura 6. Assim como a clorofila *b*, apenas a concentração de etanol foi capaz de produzir efeito, linearmente, sobre a quantidade de carotenoides extraída.

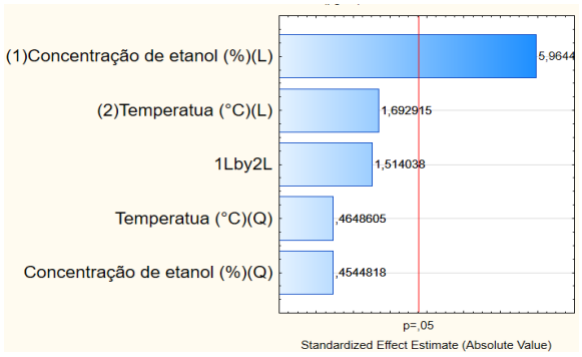


Figura 6 - Gráfico de Pareto para a concentração de carotenoides

A partir dos resultados de concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, foram gerados os modelos que definem os efeitos dos fatores estudados e que

permitem a construção das superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 7, 8 e 9. Os gráficos de superfície de resposta descreveram como as variáveis em teste afetaram as respostas, sendo úteis para determinar as melhores condições de extração.

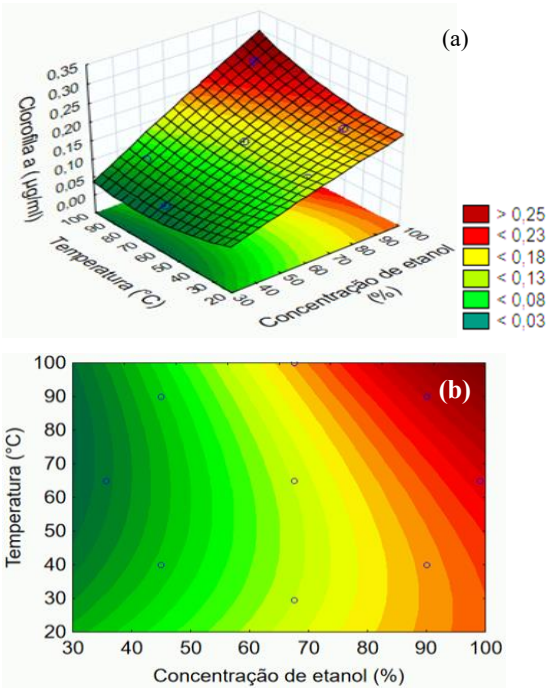


Figura 7 - Superfície de resposta para clorofila *a* - 3D (a); 2D (b).

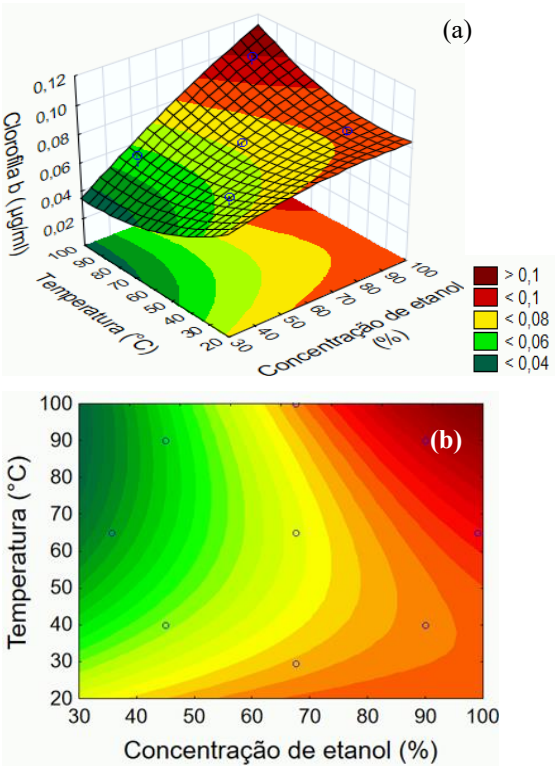


Figura 8 - Superfície de resposta para clorofila *b* - 3D (a); 2D (b).

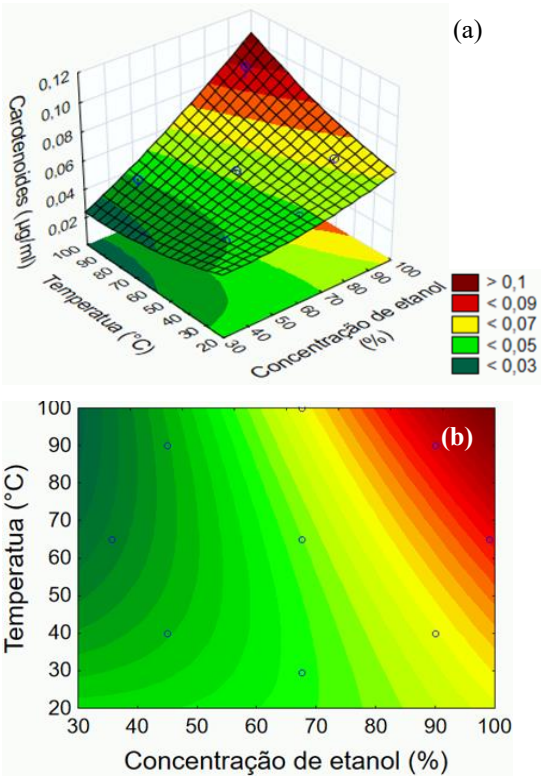


Figura 9 - Superfície de resposta para carotenoides - 3D (a); 2D (b).

A uma concentração de etanol definida, as maiores concentrações de clorofila *a* foram observadas para altas temperaturas. A análise do gráfico (b), na Figura 7, mostrou que a faixa de temperatura encontrou-se, aproximadamente, entre 60 °C e 100 °C. Já a faixa de concentração de etanol, situou-se, aproximadamente, entre 80% e 100%.

Baseando-se nos coeficientes estimados da Tabela 4, foi definido o modelo que representa os efeitos dos parâmetros sobre a clorofila *a*. No modelo codificado, expresso pela Equação 4, Y representa a concentração de clorofila *a*, x representa a concentração de etanol e T, a temperatura do banho.

$$Y = 0{,}140979 + 0{,}063786x - 0{,}002214x^2 + 0{,}015129T + 0{,}010138T^2 + 0{,}013571xT \quad (4)$$

A Figura 8 mostra a superfície de resposta que representa graficamente a influência linear significativa da concentração de etanol na concentração de clorofila *b*. Por meio do gráfico, verificou-se que o aumento da concentração de etanol conduziu a maiores quantidades de clorofila *b*, independente da temperatura. A não significância estatística da temperatura no processo de obtenção de clorofila *b* demonstrou que pode ser possível a utilização do intervalo de temperatura estabelecido na extração. A melhor faixa de concentração de etanol foi encontrada, aproximadamente, entre 80% e 100%.

Através dos coeficientes presentes na Tabela 5, foi expresso o modelo codificado (Equação 5) de regressão múltipla ajustado para os dados de clorofila *b*.

$$Y = 0{,}071343 + 0{,}015478x - 0{,}001884x^2 + 0{,}001083T + 0{,}004181T^2 + 0{,}006594xT \quad (5)$$

A superfície de resposta gerada pelo modelo que representa a influência linear da concentração de etanol sobre a concentração de carotenoides encontra-se ilustrada na Figura 9. O perfil de tal superfície, assim como clorofila *a* e *b*, mostrou que o aumento da porcentagem de etanol afetou de maneira positiva na produção de carotenoides. A faixa com melhores condições de concentração de etanol situou-se entre 90% e 100%.

A partir dos coeficientes estimados da Tabela 6, determinou-se o modelo codificado (Equação 6) que representa numericamente o perfil da superfície de resposta para carotenoides.

$$Y = 0{,}052312 + 0{,}017594x - 0{,}001780x^2 + 0{,}004994T + 0{,}001821T^2 + 0{,}00630xT \quad (6)$$

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

Com base nos dados de concentração obtidos para cada pigmento, sob as condições estudadas, foram construídos os gráficos estatísticos que mostram a relação entre os valores preditos pelos modelos e os valores observados, e ilustram o grau de ajuste do modelo aos dados experimentais. As Figuras 10, 11 e 12 apresentam os gráficos criados para cada variável de resposta.

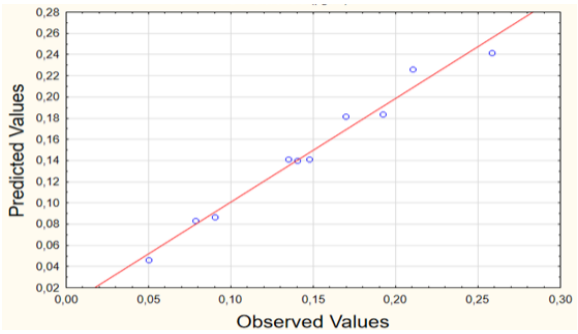


Figura 10 - Valores preditos vs observados para clorofila *a*

A análise da Figura 10 mostrou que os pontos de dados estão próximos da reta de regressão ajustada, revelando um bom ajuste do modelo e uma proximidade entre os valores preditos e observados. Essa proximidade representa graficamente o bom valor de R2=0,976 encontrado para os dados experimentais de clorofila *a*. Observou-se no gráfico que o ajuste satisfatório foi ainda mais evidente no ponto de concentração 0,140 µg/ml, sob parâmetros de 67,5 % e 29,6 °C (Tabela 3), mostrando que essas condições se encontram situados na faixa proposta pelo modelo.

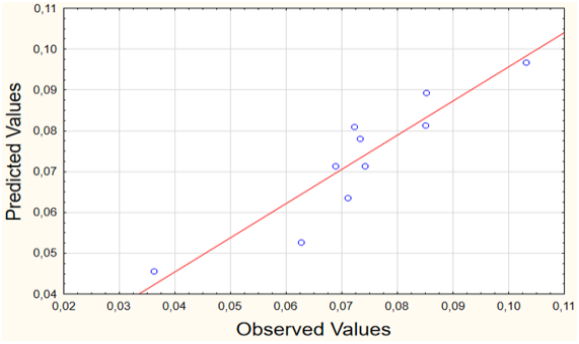


Figura 11 – Valores preditos vs observados para clorofila *b*

A Figura 11 representa a relação entre os valores preditos e observados para clorofila *b*. A análise gráfica dessa relação mostrou um ajuste razoável do modelo, em que alguns pontos apresentaram o mesmo comportamento da reta. O valor de R2=0,839 mostra que, aproximadamente, 84% dos dados foram ajustados.

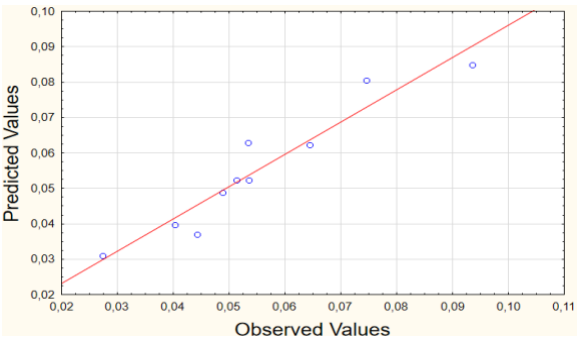


Figura 12 - Valores preditos vs observados para carotenoides

O gráfico da Figura 12 apresenta o grau de ajuste do modelo para os dados experimentais de carotenoides. Observou-se que o modelo prediz alguns valores próximos aos observados, evidenciando graficamente o bom valor de R2= 0,911.

A porcentagem de dados experimentais não ajustada está associada a erros experimentais e dos modelos empíricos (Equações 1, 2 e 3) utilizados na

determinação da concentração de pigmentos e carotenoides.

Para avaliar a qualidade de ajuste dos modelos, foram construídos os gráficos (Figuras 13, 14 e 15) que mostram a relação entre os valores preditos e residuais, verificando se a hipótese de variância constante dos resíduos é satisfeita. Os valores residuais representam a diferença entre valores preditos e observados.

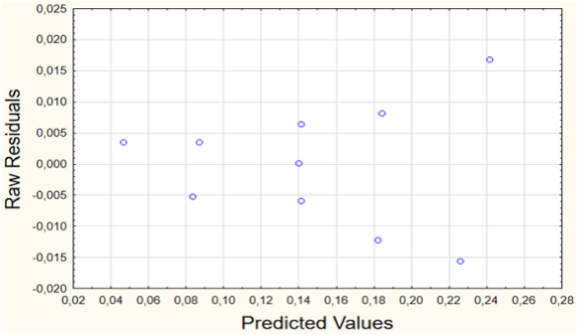


Figura 13 - Valores preditos vs residuais para clorofila *a*

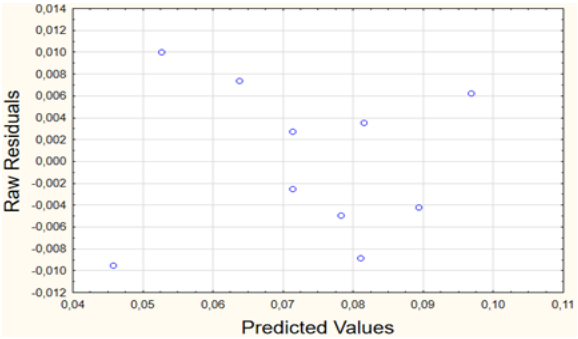


Figura 14 - Valores preditos vs residuais para clorofila *b*

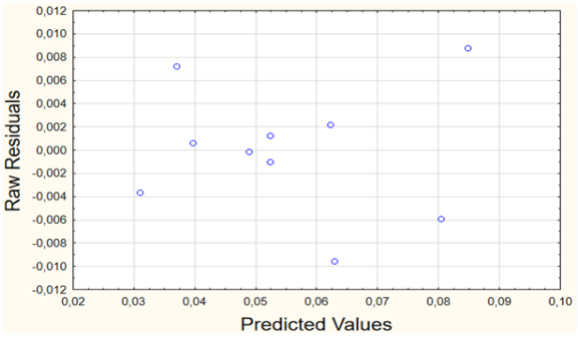


Figura 15 - Valores preditos vs residuais para carotenoides

A análise das Figuras 13, 14 e 15 mostra que os resíduos, em algumas regiões, não apresentam uma variância constante em torno de 0, indicando uma configuração de heterocedasticidade. Na Figura 13, os pontos se concentram em torno de 0, mas, aparentemente, a variabilidade aumenta no lado direito do gráfico. Essa descontinuidade indica a porcentagem de dados que não é explicada pelo modelo. Já nas Figuras 14 e 15, a descontinuidade foi observada no lado direito e esquerdo do gráfico.

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

CONCLUSÃO

O estudo do crescimento da *Chlorella vulgaris* em um fotobiorreator do tipo coluna de bolhas foi feito através da construção da curva de crescimento e análise dos parâmetros cinéticos ($P_{Xmáx}$= 0,003 ± 0,000 g/L.h, $\mu_{máx}$= 0,010 h^{-1} ± 0,003 e tg = 74,37 ± 19,86h).

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

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

REFERÊNCIAS

BARROCA, Maria João; FLORENÇA, Sofia G.; MARTINS, Clara B.; GUINÉ, Raquel P. F. *Handbook of Food and Feed from Microalgae: Production, Application, Regulation, and Sustainability. Chapter 48 - Strategy and design of innovation policy road mapping for microalgae-based foods*. Academic Press, 2023.

BLAIR, M. F.; KOKABIAN, B.; GUDE, V. G. *Light and growth medium effect on Chlorella vulgaris biomass production*. (Journal of Environmental Chemical Engineering). Elsevier, Mississippi, 2013.

BROWN, Lindsay; MELINI, Francesca; MELINI, Valentina; LUZIATELLI, Francesca. *Biological and Nutritional Applications of Microalgae*. Nutrients, 2024.

CHETTRI, Sajesh; ALTEMIMI, Ammar B.; SINGH, Puja; DAS, Rattan; SAID, Prashant Pandharinath; NATH, Pinku Chandra; PANDEY, Vinay Kumar; RUSTAGI, Sarvesh. *Recent advances in microalgal pigments as a source of natural colors and their application in next-generation functional foods*. Sustainable Food Technology, 2026.

COLARTE, Carla Arenas; BALIC, Iván; DÍAZ, Óscar; MORENO, Adrián A.; AMENABAR, Maximiliano J.; LARENAS, Tamara Bruna; FUENTES, Nelson Caro. *High-Value Bioactive Molecules Extracted from Microalgae*. Microorganisms, 2025.

KACZMAR. *Phytoplankton pigments*. Editora não identificada, Lugar de publicação não identificado, 2004.

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

MOLAZADEH, M.; AHMADZADEH, H.; POURIANFAR, H. R.; LYON, S.; RAMPELOTTO, P. H. *The use of microalgae for coupling wastewater treatment with CO2 biofixation*. (Frontiers in Bioengineering and Biotechnology). Frontiers Media, Lugar de publicação não identificado, 2019.

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

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

VIANA, C. R. *Avaliação do cultivo de microalga Chlorella vulgaris em efluente doméstico*. (II Simpósio de Bioenergia e Biocombustíveis do Mercosul). Editora não identificada, Foz do Iguaçu, 2014.

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

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