

JOSÉ ROBERTO MIRANDA JÚNIOR

**ROMPIMENTO CELULAR DA MICROALGA *Tetradismus obliquus* E EXTRAÇÃO
LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PIGMENTOS E LIPÍDIOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra

Coorientadores: Márcio Arêdes Martins
César A. Sodré da Silva

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Miranda Júnior, José Roberto, 1986-
M672r Rompimento celular da microalga *Tetrademus obliquus* e
2022 extração líquido-líquido de pigmentos e lipídios / José Roberto
Miranda Júnior. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (87 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.082>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Microalgas. 2. Extração líquido-líquido. 3. Biomassa.
4. Metabólitos. I. Coimbra, Jane Sélia dos Reis, 1962-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 664.022

JOSÉ ROBERTO MIRANDA JÚNIOR

**ROMPIMENTO CELULAR DA MICROALGA *Tetrademus obliquus* E EXTRAÇÃO
LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PIGMENTOS E LIPÍDIOS**

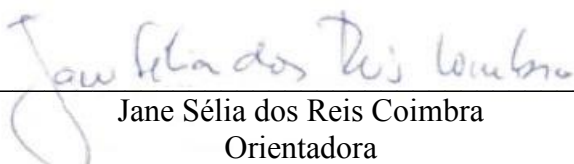
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2022.

Assentimento:



José Roberto Miranda Júnior
Autor



Jane Sélia dos Reis Coimbra
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar força, saúde e determinação para concluir este projeto.

À minha família e amigos pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem no meu trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) e ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro prestado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – pela concessão de bolsa de estudo.

À Professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, ao Professor César A. Sodré Silva e ao Professor Márcio Arêdes Martins pela orientação, confiança, paciência e ensinamentos.

Aos técnicos do laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola Dílson Novais Rocha e Maurício de Oliveira Leite pelas contribuições, orientações e disponibilidade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA-UFV) pelas contribuições e ensinamentos.

Ao Professor Luciano G. Moura do Departamento de Física (UFV) pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pela convivência, respeito, companheirismo e paciência ao longo dessa caminhada.

A todos que de um modo geral, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, Muito Obrigado.

RESUMO

MIRANDA JÚNIOR, José Roberto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Rompimento celular da microalga *Tetrademus obliquus* e extração líquido-líquido de pigmentos e lipídios.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Coorientadores: César Augusto Sodré da Silva e Márcio Arêdes Martins.

As microalgas são microrganismos unicelulares capazes de armazenar e sintetizar grande quantidade de biomoléculas, tais como, proteínas, lipídios, ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos e vitaminas, podem ser usadas nas indústrias de alimentos, rações, cosméticos, farmacêuticas e de biocombustíveis. Para a extração de biocompostos de microalgas é necessário a utilização adequada de técnicas de rompimento celular. A eficiência dos métodos de ruptura celular implica a liberação seletiva e eficiente dos compostos, atingindo uma alta recuperação do conteúdo intracelular de interesse. Visando a extração de biocompostos de *Tetrademus obliquus*, esse trabalho apresenta um estudo sobre aplicação de técnicas de rompimento celular por meio de moagem, ultrasonicação e homogeneização de alta pressão. Para ruptura celular por moagem, foi proposto a otimização do processo por meio do controle das condições operacionais do moinho de bolas através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Foi estudado o efeito do tempo de moagem (T_m) e a massa (M_b) utilizada no volume útil do cilindro do equipamento. Para ultrasonicação, os parâmetros avaliados nos rompimentos foram a potência ultrassônica (P_u), o tempo de sonicação (T_u) e a concentração das biomassas (C_s) através de um delineamento fatorial de superfície de resposta pelo planejamento de Box e Behnken (DBB). Na homogeneização de alta pressão, os parâmetros de processo avaliados foram a pressão de trabalho (P), o número de passagens das suspensões pelo equipamento (N_p) e as concentrações das suspensões (C_s). A otimização foi avaliada através de um delineamento fatorial de superfície de resposta pelo planejamento de Box e Behnken (DBB). As biomassas rompidas nas três condições foram utilizadas para a extração líquido-líquido de pigmentos e lipídios com os solventes etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona. Para a moagem, extrato de pigmentos em acetona apresentou maior teor de clorofila-a (1.72g/100g) para ($T_m= 46$ min e $M_b= 9.25$ g) do que ultrasonicação e homogeneização. No processo de homogeneização, o maior conteúdo de clorofila-a (0.8g/100g) foi observado para extrato de pigmentos em acetona para ($P=312$ bar, $C_s=1.5$ e $N_p= 22$). Ultrasonicação obteve maior conteúdo de clorofila-b (1.00g/100g) para ($P_u=475$ W e $T_u=13$ min) para extrato de pigmentos em etanol e carotenoides totais (0.51g/100g) para ($P_u=475$ W e $T_u=13$ min) para extrato de pigmentos em acetona. Na quantificação lipídica os maiores teores quantificados

foram (5.18g/100g) para o processo de moagem, (4.04g/100g) para o processo de homogeneização e (3.56g/100g) para o processo de ultrasonicação. Em todas as técnicas de rompimento observou-se que o teor de pigmentos e lipídios aumentaram com o aumento dos parâmetros de processo para os ensaios realizados. Portanto, pode-se inferir que a quantificação desses biocompostos podem ser utilizadas como indicadores de rompimentos celular para microalgas.

Palavras-chave: Microalgas. Ruptura. Otimização. Quantificação. Metabólitos.

ABSTRACT

MIRANDA JÚNIOR, José Roberto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Cell disruption of the microalgae *Tetrademus obliquus* and liquid-liquid extraction of pigments and lipids.** Advisor: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisors: César Augusto Sodré da Silva and Márcio Arêdes Martins.

Microalgae are unicellular microorganisms capable of storing and synthesizing large amounts of biomolecules, such as proteins, lipids, polyunsaturated fatty acids, pigments and vitamins, and can be used in the food, feed, cosmetics, pharmaceutical and biofuel industries. For the extraction of biocompounds from microalgae, the proper use of cell disruption techniques is necessary. The efficiency of cell disruption methods implies the selective and efficient release of compounds, reaching a high recovery of the intracellular content of interest. Aiming at the extraction of *Tetrademus obliquus* biocompounds, this work presents a study on the application of cell disruption techniques through milling, ultrasonication and high-pressure homogenization. For cell disruption by milling, it was proposed to optimize the process by controlling the operating conditions of the ball mill through a central composite rotational design (CCRD). The effect of milling time (T_m) and mass (M_b) used on the useful volume of the equipment cylinder was studied. For ultrasonication, the parameters evaluated in the disruption were ultrasonic power (P_u), sonication time (T_u) and biomass concentration (C_s) through a factorial design of response surface by Box and Behnken planning (DBB). In high-pressure homogenization, the process parameters evaluated were the working pressure (P), the number of passages of the suspensions through the equipment (N_p) and the concentrations of the suspensions (C_s). Optimization was evaluated using a response surface factorial design by Box and Behnken (DBB) planning. The biomass broken in the three conditions were used for the liquid-liquid extraction of pigments and lipids with the solvents ethanol, dimethyl sulfoxide (DMSO) and acetone. For milling, pigment extract in acetone showed higher chlorophyll-a content (1.72g/100g) for ($T_m=46\text{min}$ and $M_b=9.25\text{g}$) than ultrasonication and homogenization. In the homogenization process, the highest content of chlorophyll-a (0.8g/100g) was observed for pigment extract in acetone for ($P=312\text{ bar}$, $C_s=1.5$ and $N_p= 22$). Ultrasonication obtained higher chlorophyll-b content (1.00g/100g) for ($P_u=475\text{W}$ and $T_u=13\text{min}$) for pigment extract in ethanol and total carotenoids (0.51g/100g) for ($P_u=475\text{ W}$ and $T_u=13\text{ min}$) for pigment extract in acetone. In the lipid quantification the highest quantified contents were (5.18g/100g) for the milling process, (4.04g/100g) for the homogenization process and (3.56g/100g) for the ultrasonication process. In all disruption techniques, it was observed that the pigment and lipid

content increased with the increase in process parameters for the tests carried out. Therefore, it can be inferred that the quantification of these biocompounds can be used as indicators of cell disruption for microalgae.

Keywords: Microalgae. Disruption. Optimization. Quantification. Metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1.** Sistema de resfriamento do homogeneizador de alta pressão.....33
- Figura 2.2.** (A) Extrato seco de carotenoides e (B) Extrato seco de carotenoides diluído em óleo mineral.....35
- Figura 2.3.** Comportamento linear da temperatura de processo em função do número de passes.....38
- Figura 2.4.** Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da extração de clorofila-a: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....44
- Figura 2.5.** Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da extração de clorofila-b: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....45
- Figura 2.6.** Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da extração de carotenoides totais: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....45
- Figura 2.7.** Curva analítica para determinação de betacaroteno em biomassa homogeneizada de *Tetrademus obliquus*. (A) Intensidades normalizadas de sinais Raman e (B) Intensidade normalizada *versus* concentração de betacaroteno.....47
- Figura 2.8.** (A) Espectros Raman dos ensaios realizados e (B) Imagem expandida dos Espectros Raman na região de interesse em 1155 cm^{-1}48
- Figura 2.9.** Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da extração de betacaroteno: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....49
- Figura 2.10.** Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da determinação do teor de lipídios: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....52

CAPÍTULO 3

- Figura 3.1.** Extrato de carotenoides em acetona para quantificação de betacaroteno. (A) Extrato seco de carotenoides e (B) Extrato de carotenoides diluídos em óleo mineral.....66

Figura 3.2. Otimização da moagem a partir da determinação do teor de clorofila-a extraída com acetona: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....	72
Figura 3.3. Otimização da ultrasonicação a partir da determinação do teor de clorofila-a extraída com acetona: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....	73
Figura 3.4. Otimização da ultrasonicação a partir da determinação do teor de clorofila-b extraída com acetona: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....	73
Figura 3.5. Otimização da ultrasonicação a partir da determinação do teor de carotenoides totais extraídos com acetona: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.....	74
Figura 3.6. Compactação de biomassa durante a moagem analisada em microscópio óptico em objetiva (100X). (A) Biomassa padrão sem ruptura celular, (B) Biomassa rompida e corada com <i>coomassie brilliant blue</i> e (C) Biomassa rompida corada com eritrosina B.....	75
Figura 3.7. Construção da curva de calibração para o cálculo da concentração de betacaroteno em amostras de betacaroteno industrial diluídos em óleo mineral.....	76
Figura 3.8. Espectros Raman plotados para os ensaios oriundos de rompimento em ultrassom (Fig. A e B) e oriundas de rompimento em moinho de bolas (Fig. C e D).....	77
Figura 3.9. Conteúdo de betacaroteno em extrato de pigmentos. (A) Biomassa de ultrassom e (B) biomassa de moinho de bolas.....	78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Equações para determinação das concentrações de clorofila-a (Ca), clorofila-b (Cb) e carotenoides totais (Cc) em µg/mL em diferentes solventes.....	30
Tabela 2.2. Matriz experimental para os níveis das variáveis para o modelo de Box e Behnken.....	32
Tabela 2.3. Composição centesimal da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	37
Tabela 2.4. Consumo específico de energia nos ensaios realizados na homogeneização de alta pressão.....	39
Tabela 2.5. Diferenças de cor entre amostras após a aplicação de homogeneização de alta pressão e amostras padrão.....	40
Tabela 2.6. Resultados encontrados para teores de pigmentos através de extração com acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol.....	43
Tabela 2.7. Conteúdo de betacaroteno em extrato de pigmentos de <i>Tetradismus obliquus</i> diluídos em óleo mineral de alta pureza.....	49
Tabela 2.8. Conteúdo de lipídios em biomassa homogeneizada de <i>Tetradismus obliquus</i>	50

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1. Modelo experimental dos níveis das variáveis do modelo de Box e Behnken.....	63
Tabela 3.2. Modelo experimental dos níveis das variáveis selecionadas do DCCR.....	64
Tabela 3.3. Equações para determinação das concentrações de clorofila-a (Ca), clorofila-b (Cb) e carotenoides totais (Cc) em µg/mL em função do solvente de extração.....	65
Tabela 3.4. Composição centesimal da microalga <i>Tetradismus obliquus</i> BR003.....	68
Tabela 3.5. Resultados encontrados para teores de pigmentos através de extração com acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol para biomassa oriunda de moagem.....	70

Tabela 3.6. Resultados encontrados para teores de pigmentos através de extração com acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol para biomassa oriunda de ultrasonicação.....	71
Tabela 3.7. Teores de lipídios quantificados a partir de biomassa rompida pelo processo de moagem.....	79
Tabela 3.8. Teores de lipídios quantificados a partir de biomassa rompida pelo processo de ultrasonicação.....	80

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1. MICROALGAS E SUAS APLICAÇÕES.....	16
1.2. CULTIVO DE MICROALGAS	16
1.3. MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR DE MICROALGAS.....	17
1.3.1. HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO PARA ROMPIMENTO CELULAR DE MICROALGAS.....	17
1.3.2. ULTRASONICAÇÃO PARA ROMPIMENTO CELULAR DE MICROALGAS.....	18
1.3.3. MOAGEM EM MOINHO DE BOLAS PARA ROMPIMENTO CELULAR DE MICROALGAS	19
1.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DE MICROALGAS	20
2. REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2 - HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO: INFLUÊNCIA DO ROMPIMENTO CELULAR NA RECUPERAÇÃO DE PIGMENTOS E LIPÍDIOS DE MICROALGAS <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i> POR EXTRAÇÃO COM SOLVENTES	26
1. INTRODUÇÃO	28
2. METODOLOGIA	29
2.1 MATERIAIS	29
2.2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MICROALGA <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i> BR003.....	30
2.3. DESIGN EXPERIMENTAL PARA RUPTURA CELULAR POR HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO	31
2.4. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DURANTE A HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO.....	32
2.5. CONSUMO ESPECÍFICO DE ENERGIA NO PROCESSO DE HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO.....	33
2.6. ESTUDO COLORIMÉTRICO DA BIOMASSA LIOFILIZADA APÓS RUPTURA CELULAR	34
2.7. EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS COMO INDICADORES DE RUPTURA CELULAR.....	34
2.7.1. EXTRAÇÃO DE CLOROFILA-A, CLOROFILA-B E CAROTENOIDES TOTAIS.....	34
2.7.2. EXTRAÇÃO DE BETACAROTENO.....	35
2.7.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS DA BIOMASSA ROMPIDA	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i>	36
3.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DA HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO	37
3.3. CONSUMO ESPECÍFICO DE ENERGIA NA HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO.....	39
3.4. ESTUDO COLORIMÉTRICO.....	40
3.5. INDICADORES DE ROMPIMENTO CELULAR	41
3.5.1. CONTEÚDO DE CLOROFILA-A, CLOROFILA-B E CAROTENOIDES TOTAIS	41
3.5.2. CONTEÚDO DE BETACAROTENO	46
3.5.3 CONTEÚDO DE LIPÍDIOS.....	50
4. CONCLUSÃO	52

5. REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 3 – ROMPIMENTO CELULAR DE <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i> POR ULTRASONICAÇÃO E MOAGEM PARA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PIGMENTOS E LIPÍDIOS	58
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.1. MATÉRIA-PRIMA	61
2.2. REAGENTES	62
2.3. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MICROALGA <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i> BR003	62
2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	62
2.4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ULTRASONICAÇÃO (USN)	63
2.4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA MOAGEM (MB)	63
2.5. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BIOCÓMPÓSTOS COMO INDICADORES DE ROMPIMENTO CELULAR	64
2.5.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILA-A, CLOROFILA-B E CAROTENOIDES TOTAIS	64
2.5.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BETACAROTENO	65
2.5.2.1. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE BETACAROTENO	66
2.5.2.2. CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO A PARTIR DE BETACAROTENO COMERCIAL	66
2.5.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS EM BIOMASSA ROMPIDA	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i> BR003	68
3.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS E LIPÍDIOS	69
3.2.1. TEORES DE CLOROFILA-A, CLOROFILA-B E CAROTENOIDES TOTAIS	69
3.2.2. QUANTIFICAÇÃO DE BETACAROTENO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	75
3.2.3. QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS	78
4. CONCLUSÃO	81
5. REFERÊNCIAS	81
5. CONCLUSÃO GERAL	86
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87

INTRODUÇÃO GERAL

Microalgas são microrganismos aquáticos unicelulares que podem ser encontrados tanto em sistemas de água doce quanto marinhos, são capazes de transformar a luz solar em energia química por meio da fotossíntese (DANESHVAR et al., 2018; SHUBA; KIFLE, 2018) e são encontrados em muitas formas e tamanhos, variando de três a dez micrômetros (VU; CHANG; OH, 2018).

Com a previsão do aumento acentuado da população mundial nas próximas décadas, existe uma preocupação global crescente com a demanda nutricional, o que coloca o cultivo de microalgas como fonte alternativa de alimentos para humanos e animais (SUN et al., 2019). A capacidade das microalgas de crescerem rapidamente e produzir mais biomassa por hectare do que as plantas vasculares podem atender de maneira econômica a necessidade de produtos de alto valor nutricional em grande escala. Além disso, um cultivo extensivo em escala não prejudicaria a disponibilidade de terras, uma vez que se pode utilizar a terra e as fontes de água inadequadas para a agricultura (DE CARVALHO et al., 2019).

O cultivo de microalgas pode fornecer um grande número de nutrientes essenciais e são capazes de acumular lipídios, proteínas e polissacarídeos (DAO ET AL., 2018). O teor de cada um destes metabólitos varia de acordo com a espécie da microalga (SHUBA; KIFLE, 2018). No contexto de biorrefinaria, os lipídios acumulados como reserva de energia podem ser extraídos, refinados e convertidos a biodiesel (FARIED et al., 2017); os carboidratos podem ser fermentados e convertidos a álcoois (SANCHEZ RIZZA et al., 2017); e as proteínas e os pigmentos podem ser utilizados como alimento na dieta humana (SMETANA et al., 2017).

Um dos primeiros processos na etapa *downstream* utilizados nas plataformas biotecnológicas de microalgas a partir da biomassa microalgal, é o rompimento celular, uma operação unitária essencial para disponibilizar os produtos intracelulares desses microrganismos. A ruptura celular é um passo muito importante na biorrefinaria de biomoléculas que estão presentes dentro das células e visa permeabilizar ou quebrar completamente a parede celular e a membrana da microalga para permitir o acesso direto de água e/ou solvente às biomoléculas intracelulares, realizando assim uma simples extração ou liberação de biomoléculas intracelulares (POSTMA et al., 2016).

Dependendo da estrutura da parede celular e da morfologia das microalgas, a ruptura celular pode ser um desafio. Considerando que as etapas de *downstream* são responsáveis por grande parte dos custos operacionais em toda cadeia produtiva, as tecnologias de lise celular devem ser de baixo custo e com eficiência energética, aprimorando a qualidade do produto e

seu rendimento (RICHMOND; HU, 2013; D'HONDT et al., 2017). Os métodos mais utilizados para a ruptura celular são microondas, ultrasonicação, homogeneização de alta pressão, campo elétrico pulsado, moagem em moinho de bolas, tratamentos químicos (solventes e ácidos), autoclavagem em alta temperatura e ciclos de congelamento-descongelamento (LEE et al., 2017).

Dentro deste contexto, o rompimento celular é considerado um ponto crítico para posterior separação de compostos intracelulares de microalgas e o uso de técnicas de rompimento adequadas pode ser um diferencial para a viabilização da exploração de compostos microalgais de grande interesse industrial. Assim, no presente trabalho foram avaliadas técnicas de rompimento celular por homogeneização de alta pressão, ultrasonicação e moagem, visando o aumento do rendimento da extração líquido-líquido e a recuperação de biocompostos da microalga *Tetrademus obliquus* BR003.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Aplicar técnicas de rompimento celular na microalga *Tetrademus obliquus* visando a extração líquido-líquido de biocompostos.

Objetivos específicos

1. Caracterizar a biomassa de *Tetrademus obliquus*
2. Otimizar o rompimento celular de *Tetrademus obliquus* em homogeneizador de alta pressão.
3. Otimizar o rompimento celular de *Tetrademus obliquus* em ultrassom.
4. Otimizar o rompimento celular de *Tetrademus obliquus* em moinho de bolas
5. Avaliar a variação de cor da biomassa de *Tetrademus obliquus* após o rompimento celular por homogeneização de alta pressão
6. Avaliar o consumo específico de energia no processo de homogeneização de alta pressão
7. Extrair e quantificar pigmentos e lipídios de biomassa rompida de *Tetrademus obliquus*

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Microalgas e suas aplicações

Microalgas são definidas como microrganismos eucarióticos e representam um dos mais diversos grupos de microrganismos em sistemas de água doce e marinhas (HU et al., 2008). As microalgas verdes pertencentes ao filo *Chlorophyta* incluem os gêneros mais comuns como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Scenedesmus* (METTING, 1996). Microalgas possuem potencial para diversas aplicações biotecnológicas e comerciais em várias áreas, como por exemplo, no tratamento de águas residuais, produção de biocombustíveis, na nutrição humana e animal, bem como, na obtenção de valiosos compostos para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e químicas, dentre outras. Estima-se que possa existir desde centenas de milhares até alguns milhões de representantes deste grupo, o que reflete em diferentes composições bioquímicas, caracterizando as microalgas como fontes de uma quantidade muito elevada de produtos (DERNER et al., 2006).

As microalgas possuem desde alguns nutrientes básicos como carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e alguns minerais, até importantes compostos que também agregam valor comercial ao produto, como antioxidantes, enzimas, fármacos, biopigmentos, marcadores fluorescentes e exopolissacarídeos, utilizados como gelificantes, emulsificantes, floculantes e hidratantes (ANDRISANI et al., 2015; LI et al., 2015).

1.2. Cultivo de microalgas

No cultivo autotrófico, as microalgas geram compostos orgânicos usando a luz solar para processar uma fonte de carbono inorgânico, principalmente CO₂ (UGGETTI et al., 2018). As microalgas são organismos que podem ser cultivados em diversos sistemas de produção, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. Os sistemas comumente empregados desde o final da década de 1950 devido à sua simplicidade, é o sistema de lagoas e/ou tanque aberto (ZHAN; RONG; WANG, 2017). Devido ao baixo controle ambiental, sua suscetibilidade à contaminação por outras microalgas e microrganismos (DERUYCK et al., 2019), e variações de temperatura ao longo dos períodos de dia/luz (KANNAN; VENKAT, 2018) tornam o sistema de Tanque aberto problemático para cultivo em larga escala (ZHAN; RONG; WANG, 2017).

No sentido de superar as deficiências para cultivo em sistema aberto, tem sido proposto o uso de fotobiorreatores, resultando em uma série de projetos de reatores que aumentaram a relação superfície-volume e a confiabilidade do sistema (ZITTELLI et al., 2012). Operando em um sistema fechado, painéis de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato, os fotobiorreatores foram desenvolvidos para um processo asséptico e independente do clima. Nesse sistema é possível controlar as condições de cultivo, tais como, quantidade de nutrientes, temperatura, iluminação, pH e aeração. No entanto, ainda é um desafio, uma vez que os custos dos sistemas fechados são substancialmente mais altos do que os sistemas de lagoas abertas e, portanto, inviável dependendo do produto alvo (COSTA et al., 2019).

1.3. Métodos de rompimento celular de microalgas

A ruptura celular de microalgas é um passo muito importante na biorrefinaria de biomoléculas, que estão presentes dentro das células. A ruptura celular visa permeabilizar ou quebrar completamente a parede celular e a membrana da microalga para permitir o acesso direto de solvente às biomoléculas intracelulares, realizando assim, simples extrações ou liberação de biomoléculas intracelulares (GOH et al., 2019; POSTMA et al., 2016). A ruptura celular é um parâmetro crítico na determinação do rendimento e qualidade do produto, seus métodos dependem da parede celular das microalgas e da natureza do produto a ser obtido (RICHMOND; HU, 2013). No entanto, a obtenção dessas biomoléculas não é uma tarefa fácil e requer a aplicação de técnicas especiais para ruptura celular. Segundo Mata, Martins e Caetano (2010), a ruptura e extração podem ocorrer de duas maneiras: pela ação mecânica - por meio de homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, ultrassom, campo elétrico pulsado ou microondas e pela ação não mecânica - através de ciclos de congelamento-descongelamento, utilização de solventes orgânicos, choque osmótico, reações de ácidos ou bases ou por enzimas.

1.3.1. Homogeneização de alta pressão para rompimento celular de microalgas

A homogeneização de alta pressão é uma das técnicas de ruptura celular mais promissoras, principalmente devido à sua escalabilidade, sua aplicabilidade em lamas algais altamente concentradas e sua eficácia na desagregação de espécies de microalgas de parede celular rígida (LEE et al., 2017). Porém, a homogeneização de alta pressão causa liberação não seletiva dos produtos com alta concentração de resíduos celulares, o que pode dificultar os

processos de separação a jusante (BALASUNDARAM et al., 2009); é acompanhada por um aumento indesejável de temperatura para extratos sensíveis ao calor (por exemplo, enzimas, lipídios, pigmentos e proteínas) e causa alto consumo de energia (LEE et al., 2013).

Portanto, a otimização do processo de rompimento celular por homogeneização de alta pressão é um diferencial para o melhoramento das condições operacionais e maior recuperação de biocompostos. A maioria dos estudos sobre homogeneização de alta pressão para ruptura de células microalgais foram realizados com pressões de homogeneização de até no máximo 1500 bar, exigindo vários passes de homogeneização para microalgas de parede celular mais rígidas (GÜNERKEN et al., 2015). Segundo Bernaerts et al., (2019) podem ser aplicadas pressões de homogeneização mais elevadas (até 3000 bar), designadas como homogeneização de ultra alta pressão, o que resultaria em um processo de ruptura mais eficiente ao reduzir o número de passagens de homogeneização. A capacidade de avaliar e quantificar com precisão o grau de ruptura é essencial para compreender o processo de ruptura por homogeneização por alta pressão. Portanto, tem sido sugerido combinar diferentes métodos de quantificação de biocompostos para uma caracterização abrangente do processo de ruptura celular (EKPENI et al., 2015).

A ruptura celular por homogeneização de alta pressão ocorre devido a combinação da cavitação hidrodinâmica gerada pela agitação em altas rotações e força mecânica, principalmente, cisalhamento. Também conhecida como prensa francesa, a HAP é uma das primeiras técnicas testadas para o rompimento de células microalgais. Nesse processo, as suspensões são bombeadas a partir de um orifício estreito (80-200 μm) em uma válvula sob alta pressão (1380-4000 bar), e a suspensão é então liberada em uma câmara de baixa pressão. O impacto de alta pressão e velocidade gerados pelo jato celular na superfície da válvula é devido a tensão de cisalhamento induzida pela queda de pressão quando a célula passa da válvula para a câmara. As várias configurações de sede de válvula projetadas permitem maximizar a eficiência de ruptura da célula e minimizar os danos da sede da válvula devido à cavitação (D'HONDT et al., 2017).

1.3.2. Ultrasonicação para rompimento celular de microalgas

As ondas de ultrassom são ondas sonoras de alta frequência (20 kHz a 1 MHz) além do nosso limite de audição humana (ZHANG et al., 2019). O sonicador utiliza um transdutor que gera essas ondas com frequências acima de 20 kHz através da conversão de energia elétrica em energia mecânica. Através de um fenômeno denominado cavitação, os efeitos causados

pelas ondas ultrassônicas criam um ciclo de bolhas de gás e cavidades no solvente líquido (SANTOS; VARDANEGA; DE ALMEIDA, 2014). Quando ocorre o colapso das bolhas, são geradas ondas de energia muito elevadas na zona de cavitação. O impacto gerado pela energia desse processo sobre a superfície sólida, quando este ocorre nas proximidades da parede celular da matriz vegetal ou microalgal, aumenta a permeabilidade da parede celular, favorecendo a entrada do solvente. O resultado desse processo implica no aumento do processo de difusão e da transferência de massa, respectivamente (PATIST; BATES, 2008).

Segundo Gerde et al. (2012) a cavitação aliada ao calor liberado no colapso das bolhas aumenta a solubilidade dos analitos e, portanto, a eficiência da extração. A sonicação pode ser realizada em diversos equipamentos, no entanto, os mais utilizados são o banho e a sonda ultrassônica. O banho ultrassônico é um método indireto, onde as ondas são propagadas através do recipiente contendo a amostra e em contato com o fluido de imersão, enquanto que a sonda (ou ponteira) ultrassônica age diretamente na matriz e no solvente (CHEMAT et al., 2011).

1.3.3. Moagem em moinho de bolas para rompimento celular de microalgas

A moagem é um método simples e efetivo para o rompimento da parede celular de diferentes tipos de microrganismos e pode ser uma opção de pré-tratamento para espécies de microalgas que apresentam paredes celulares mais rígidas (D'HONDT et al., 2017). Utilizando o moinho de bolas, as células de microalgas em suspensão ou biomassa seca dentro de uma câmara cilíndrica fechada na presença de pequenas esferas (vidro, cerâmica, plástico ou aço) são submetidas a forte agitação, utilizando a energia cinética para que as mesmas possam se colidirem com as células microalgais, com o intuito de romper as células devido à força cisalhante (ANDRADE, 2014).

A moagem é uma operação unitária considerada de alta eficiência de rompimento, capaz de processar grande volume de biomassa por batelada e facilidade na separação da biomassa rompida por gravidade. Melhorias recentes de *design* e a possibilidade de controlar a temperatura da suspensão de algas, fazem do moinho de bolas uma promissora técnica de ruptura celular (POSTMA et al., 2016).

Doucha e Lívansky' (2008) mostraram que moinhos de bolas podem ser usados para a desintegração de células de microalgas. Richmond (2013) utilizou essa técnica para desintegrar a microalga *Scenedesmus obliquus* e a cianobactéria *Spirulina platensis*. Schwenzfeier, Wierenga e Gruppen (2011) usaram um moinho de bolas para desintegração de microalgas que eram mantidas congeladas antes do uso, para a liberação de proteínas. A

concentração de biomassa e velocidade do agitador são apontados como os parâmetros mais influentes no tempo de processo, eficiência de desintegração e no consumo de energia. A escolha do diâmetro das esferas e da carga de partículas é de grande importância para uma maior eficiência no processo de ruptura celular. Uma carga geralmente de 80-90% do volume livre do compartimento de abrasão é considerada ótima (MIDDELBERG, 1995; RICHMOND, 2013). Este método de rompimento celular pode ser usado em larga escala, sendo um dos mais indicado devido ao seu baixo custo operacional (CHISTI; MOO-YONG, 1986).

1.4. Métodos de extração de biocompostos de microalgas

A extração é uma operação unitária que envolve transferência de massa e objetiva basicamente a separação de compostos de interesse de uma matriz, seja ela sólida ou líquida através de processos químicos, físicos ou mecânicos. Os processos podem ser realizados em meio sólido-líquido, líquido-líquido ou gás-líquido (VIEIRA et al., 2013). Os processos de extração de lipídios e pigmentos aplicados a microalgas são derivados principalmente de técnicas fotoquímicas desenvolvidas em plantas e macroalgas superiores. A tecnologia a ser utilizada na extração vai depender das características bioquímicas das moléculas extraídas, rapidez, limitação do uso de solvente, reprodutibilidade (padronização), rendimento de extração, seletividade, proteção das moléculas extraídas contra transformação química, dimensão, custo e facilidade da extração (WANG; WELLER, 2006).

As técnicas de extração convencionais utilizam solventes orgânicos incluindo maceração (imersão), percolação, extração em fluxo contracorrente, extração com líquido pressurizado e *Soxhlet* e são tecnologias amplamente descritas para extrair lipídios e pigmentos (WANG; WELLER, 2006). Os métodos ditos não convencionais são processos que envolvem maior tecnologia, como fluido pressurizado (extração com fluido supercrítico), extração assistida por ultrassom, enzimas, microondas, campo elétrico pulsado e, mais recentemente, a extração com surfactantes, solventes comutáveis e líquidos iônicos (WIJESINGHE; JEON, 2012).

2. REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgae inland waters: Production of biomass and co-products. v. 2, Londrina: **Eduel**, 2014.

ANDRISANI, A.; DONÀ, G.; TIBALDI, E.; BRUNATI, A.; SABBADIN, C.; ARMANINI, D.; BORDIN, L. Astaxanthin Improves Human Sperm Capacitation by Inducing Lyn Displacement and Activation. **Marine Drugs**, v. 13, n. 9, p. 5533–5551, 2015. doi:10.3390/md13095533

BALASUNDARAM, B.; SKILL, S. C.; LLEWELLYN, C. A. A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 48–56, 2012. doi:10.1016/j.bej.2012.08.010

BERNAERTS, T. M. M.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. M. Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization. **Algal Research**, v. 42, 101616, 2019 doi:10.1016/j.algal.2019.101616

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.02

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 4, p. 194–204, 1986. doi:10.1016/0141-0229(86)90087-6

DANESHVAR, E.; ZARRINMEHR, M. J.; HASHTJIN, A. M.; FARHADIAN, O.; BHATNAGAR, A. Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 523–530, 2018. doi:10.1016/j.biortech.2018.08.03

DE CARVALHO, J. C.; SYDNEY, E. B.; ASSÚ TESSARI, L. F.; SOCCOL, C. R. Culture media for mass production of microalgae. **Biofuels from Algae**, p. 33–50, 2019. doi:10.1016/b978-0-444-64192-2.00002-0

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. DE; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Rural Science**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967. doi:10.1590/s0103-84782006000600050

DERUYCK, B.; THI NGUYEN, KH; DECAESTECKER, E.; MUYLAERT, K. Modeling the impact of rotifer contamination on microalgal production in open pond, photobioreactor and thin layer cultivation systems. **Alga Research**, v. 38, 101398, 2019. doi:10.1016/j.algal.2018.101398

D'HONDT, E.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; BOLADO, S.; KASPEROVICIENE, J.; KOREIVIENE, J.; SULCIUS, S.; BASTIAENS, L. Cell disruption technologies. **Microalgae-based biofuels and bioproducts**, p. 133–154, 2017. doi:10.1016/b978-0-08-101023-5.00006-6

DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 431–440, 2008. doi:10.1007/s00253-008-1660-6

EKPENI, L. E. N.; BENYOUNIS, K. Y.; NKEM-EKPENI; FEHINTOLA F.; STOKES, J., OLABI, A.G. Underlying factors to consider in improving energy yield from biomass source through yeast use on high-pressure homogenizer (HPH), **Energy**, v. 81, p. 74-83, 2015. DOI:10.1016/j.energy.2014.11.038

FARIED, M.; SAMER, M.; ABDELSALAM, E.; YOUSEF, R. S.; ATTIA, Y. A.; ALI, A. S. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 893–913, 2017. doi:10.1016/j.rser.2017.05.199

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175–181, 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.11

GOH, B. H. H.; ONG, H. C.; CHEAH, M. Y.; CHEN, W.-H.; YU, K. L.; MAHLIA, T. M. I. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 59–74, 2019. doi:10.1016/j.rser.2019.02.012

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. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.008

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives

and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008. doi:10.1111/j.1365-313x.2008.03492.x

KANNAN, D. C.; VENKAT, D. An open outdoor algal growth system of improved productivity for biofuel production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2018. doi:10.1002/jctb.5768

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Force and energy requirement for microalgal cell disruption: An atomic force microscope evaluation. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 199–206, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.03

LEE, S. Y.; CHO, J. M.; CHANG, Y. K.; OH, Y.-K. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1317–1328, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.03

LI, R.; WU, H.; ZHUO, W.; MAO, Q.; LAN, H.; ZHANG, Y.; HUA, S. Astaxanthin Normalizes Epigenetic Modifications of Bovine Somatic Cell Cloned Embryos and Decreases the Generation of Lipid Peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 793–799, 2015. doi:10.1111/rda.12589

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. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020

METTING, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 5-6, p. 477-489, 1996. doi:10.1007/bf01574779

MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 491–551, 1995. doi:10.1016/0734-9750(95)02007-p

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 147–154, 2008. doi:10.1016/j.ifset.2007.07.004

PILÁT, Z.; BERNATOVÁ, S.; JEŽEK, J.; ŠERÝ, M.; SAMEK, O.; ZEMÁNEK, P.; TRTÍLEK, M. Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: β -carotene quantification. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 541–546, 2011. doi:10.1007/s10811-011-9754-

POSTMA, P. R.; 'T LAM, G. P.; BARBOSA, M. J.; WIJFFELS, R. H.; EPPINK, M. H. M.; OLIVIERI, G. Microalgal biorefinery for bulk and high-value products: product extraction within cell disintegration. **handbook of electroporation**, p. 2205–2224, 2017. doi:10.1007/978-3-319-32886-7_38

RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, second ed., John Wiley & Sons, Ltd, **Chichester**, 2013. 719 p.

ROCHA, D. N.; MARTINS, M. A.; SOARES, J.; VAZ, M. G. M. V.; DE OLIVEIRA LEITE, M.; COVELL, L.; MENDES, L. B. B. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus spp.* **Bioresource Technology**, v. 289, 121644, 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.121644

SANCHEZ RIZZA, L.; SANZ SMACHETTI, M. E.; DO NASCIMENTO, M.; SALERNO, G. L.; CURATTI, L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140–147, 2017. doi:10.1016/j.algal.2016.12.021

SANTOS, D.; VARDANEGA, R.; DE ALMEIDA, M. A. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8, n. 16, p. 88, 2014. doi:10.4103/0973-7847.134231

SCHWENZFEIER, A.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis sp.* **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9121–9127, 2011. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.04

SHUBA, E. S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: “Promising” alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 743–755, 2018. doi:10.1016/j.rser.2017.08.042

SMETANA, S.; SANDMANN, M.; ROHN, S.; PLEISSNER, D.; HEINZ, V. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 162–170, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.11

SUN, J.; XIONG, X.; WANG, M.; DU, H.; LI, J.; ZHOU, D.; ZUO, J. Microalgae biodiesel production in China: A preliminary economic analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 104, p. 296–306, 2019. doi:10.1016/j.rser.2019.01.021

UGGETTI, E.; SIALVE, B.; HAMELIN, J.; BONNAFOUS, A.; STEYER, J.-P. CO₂ addition to increase biomass production and control microalgae species in high rate algal ponds treating wastewater. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 28, p. 292–298, 2018. doi:10.1016/j.jcou.2018.10.009

VIEIRA, G. S.; CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A.; HUBINGER, M. D. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 2, p. 196–204, 2013. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.05.03

VU, C. H. T.; LEE, H.-G.; CHANG, Y. K.; OH, H.-M. Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 380–396, 2018. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.018

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006. doi:10.1016/j.tifs.2005.12.004

WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y.-J. Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. **Phytotherapy**, v. 83, n. 1, p. 6–12, 2012. doi:10.1016/j.fitote.2011.10.016

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8505–8517, 2017. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.12.02

ZHANG, R.; GRIMI, N.; MARCHAL, L.; LEOVKA, N.; VOROBIEV, E. Effect of ultrasonication, high pressure homogenization and their combination on efficiency of extraction of bio-molecules from microalgae *Parachlorella kessleri*. **Algal Research**, v. 40, 101524, 2019. doi:10.1016/j.algal.2019.101524

CAPÍTULO 2 - HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO: INFLUÊNCIA DO ROMPIMENTO CELULAR NA RECUPERAÇÃO DE PIGMENTOS E LIPÍDIOS DE MICROALGAS *Tetrademus obliquus* POR EXTRAÇÃO COM SOLVENTES

José Roberto Miranda Júnior ^a, Jane Sélia dos Reis Coimbra ^a, César A. Sodré da Silva ^a, Márcio Arêdes Martins ^b

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos, ^b Departamento de Engenharia Agrícola

^{a, b} Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 36570-900

RESUMO

As condições operacionais para o uso de homogeneização de alta pressão (HAP) para romper as células de *Tetrademus obliquus* foram avaliadas no presente trabalho. A influência de cada parâmetro do processo, como pressão (P), concentração de suspensões (C_s) e número de passes (N_p) da biomassa microalgal dentro do homogeneizador foi analisada com um experimento fatorial de acordo com a metodologia de superfície de resposta de Box-Behnken. O conteúdo de clorofila-a, clorofila-b, betacaroteno, carotenoides totais e lipídios foram avaliados como indicadores de ruptura celular. Esses metabólitos foram extraídos da biomassa rompida por extração líquido-líquido com os solventes acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol. O consumo específico de energia na homogeneização foi estimado para diferentes condições de operação, bem como, a mudança de cor da biomassa após a homogeneização. A preservação da degradação térmica dos biocompostos foi limitada por temperaturas de até 40 °C. Os fatores avaliados na HAP foram pressão de (250, 300 e 350) bar, concentração das suspensões de (1.0, 1.5 e 2.0) % e número de passes de (5, 15 e 25) passes. No presente estudo, maior teor de clorofila-a com um menor consumo específico de energia foi encontrado a partir do extrato de pigmentos em acetona em que foi possível quantificar na condição de processo otimizada ($P=312$ bar, $C_s=1.5\%$ e $N_p=22$) cerca de (0.80g de clorofila-a / 100g de biomassa rompida). Nessas condições, o consumo específico de energia foi de cerca de (47.50kJ / g de matéria seca). Para a clorofila-b, os maiores teores foram observados para o extrato de pigmentos em acetona. Na condição otimizada de homogeneização ($P=345$ bar, $C_s=1.5\%$ e $N_p=24$) foi possível obter cerca de (0.60g de clorofila-b / 100g de biomassa homogeneizada). O consumo específico de energia nessas condições de processo foi de cerca de (57.30kJ / g matéria seca). De acordo com a otimização realizada, a partir de extrato de pigmentos em acetona com aplicação de ($P=340$ bar, $C_s=1.5\%$ e $N_p=23$) foi possível quantificar cerca de (0.50g carotenoides totais /

100g de biomassa homogeneizada). Nessas condições a energia específica consumida foi de (54.12kJ / g massa seca). No processo de homogeneização otimizado com (P= 330bar, Cs=1.5% e Np=25) foram obtidos teores de betacaroteno de cerca de (1.00µg/g). A condição ótima de homogeneização para recuperação de lipídios foi observada para (P ≥ 350bar e Np ≥ 23). Nesta condição, o teor lipídico foi de cerca de (4.0g/100g). A biomassa rompida apresentou variação na diferença de cor em relação à biomassa padrão. Essa descoloração celular pode estar associada com a liberação de biocompostos e desgaste e/ou ruptura das camadas da parede celular, expondo novos componentes no meio. A análise de variância pelo teste de Tukey a 5% indicou diferença significativa (p<0.05) entre os tratamentos para teores de pigmento e lipídios, evidenciando que esses metabólitos podem ser utilizados como potenciais indicadores de ruptura celular para homogeneização em alta pressão para a microalga *Tetradismus obliquus*.

Palavras-chave: *Tetradismus obliquus*. Ruptura. Quantificação. Otimização. Biocompostos.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos aquáticos unicelulares encontrados em sistemas de água doce e marinhos que podem transformar a radiação solar em energia química através da fotossíntese. Esses microrganismos possuem morfologia e tamanho variados (de três a dez micrômetros). As microalgas podem sintetizar e acumular vários compostos intracelulares como lipídios, proteínas, polissacarídeos e pigmentos. O conteúdo de cada metabólito varia de acordo com as espécies de microalgas, tipo de meio de cultivo e condições de estresse (DANESHVAR, 2018; VU et al., 2018). Em aplicações biotecnológicas, os lipídios acumulados como reservas de energia podem ser extraídos, refinados e convertidos em biodiesel, os carboidratos podem ser fermentados e convertidos em álcoois e as proteínas e pigmentos podem ser utilizados como alimento na dieta humana (AMORIM et al., 2020).

A ruptura celular é uma operação unitária essencial para recuperar compostos intracelulares de microalgas e é um dos primeiros processos a jusante usados em plataformas biotecnológicas de microalgas a partir de biomassa. A lise celular visa permeabilizar ou quebrar completamente a parede celular e a membrana das microalgas para permitir o acesso direto de água e/ou solvente às biomoléculas intracelulares, realizando assim uma simples extração ou liberação de biomoléculas intracelulares (POSTMA et al., 2016).

Células de microalgas tem sido rompidas usando diferentes técnicas, como homogeneização de alta pressão (HALIM et al., 2012; SAMARASINGHE et al., 2012), ultrassom (HALIM et al., 2012; KERIS-SEN et al., 2014; LEE et al., 2010), microondas (BALASUBRAMANIAN et al., 2011; LEE et al., 2010), moinho de bolas (BALASUNDARAM et al., 2012), choque osmótico (LEE et al., 2010) e campos elétricos pulsados (ZHANG et al., 2022).

A homogeneização de alta pressão é uma das técnicas de ruptura celular mais promissoras, principalmente devido à possibilidade de produção em larga escala, sua aplicabilidade no tratamento de lodo de microalgas altamente concentrado e sua eficácia na quebra de células de espécies de microalgas com paredes celulares rígidas (LEE et al., 2017). A homogeneização de suspensões contendo microalgas de paredes celulares rígidas requer várias passagens pelo equipamento e pressões de até 1500 bar (ultra alta pressão) para promover a ruptura celular (GÜNERKEN et al., 2015). Segundo Bernaerts et al. (2019), podem ser aplicadas altas pressões de homogeneização (acima de 300 bar), denominadas homogeneização de ultra alta pressão, aumentando à eficiência de ruptura pela redução do número de passes de homogeneização. No entanto, esse processo exotérmico é acompanhado por um aquecimento

indesejável da suspensão que podem degradar biocompostos sensíveis ao calor (por exemplo, enzimas, pigmentos, proteínas e lipídios) e requer alto consumo de energia para a ruptura celular (LEE et al., 2013).

A rigidez estrutural e a morfologia das células das microalgas influenciam as condições do processo de ruptura e aumentam a demanda energética. Como as etapas a jusante são responsáveis por grande parte dos custos operacionais em toda a cadeia de produção de metabólitos de microalgas, as tecnologias de lise celular devem ser de baixo custo e eficiência energética, melhorando a qualidade e o rendimento do produto (D'HONDT et al., 2017; RICHMOND, 2013). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos (1) modelar e otimizar a ruptura celular para suspensões de microalgas *Tetradismus obliquus* por homogeneização de alta pressão, (2) avaliar a extração líquido-líquido de biocompostos da biomassa microalgal e (3) estudar o consumo específico de energia sob diferentes condições operacionais de homogeneização de alta pressão.

Deve-se ressaltar que a microalga *Tetradismus obliquus* possui três camadas em sua estrutura celular: uma camada interna de celulose que delimita a célula, uma fina camada intermediária baseada na estrutura das algas e uma camada externa de pectina unindo as células em um cenóbio. Essa complexidade da parede celular microalgal requer, portanto, estudo e otimização de técnicas de ruptura celular (BISALPUTRA; WEIER, 1963).

2. METODOLOGIA

2.1 Materiais

A biomassa da microalga *Tetradismus obliquus* BR003 com cerca de (6% de sólidos) foi adquirida em parceria com o Laboratório de Biocombustíveis da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. A biomassa foi armazenada em bandejas de alumínio de 300 mL, congelada a -80°C e liofilizada por 48 h, atingindo um teor de umidade final de cerca de 8 % (base úmida). A biomassa liofilizada foi macerada e padronizada quanto a granulometria em peneira de aço inoxidável (Granutest, Brasil) com abertura de 30 mesh (0,59 mm). A biomassa foi então armazenada em frascos âmbar à temperatura ambiente para posterior análises.

Os principais reagentes utilizados neste estudo foram: Acetona (99.8% de pureza) e DMSO (99.7% de pureza) fornecidos pela Sigma-Aldrich (Alemanha). O álcool etílico anidro ($\geq 98.0\%$ de pureza) foi adquirido da Fisher Scientific (Bélgica). Óleo mineral de alta pureza adquirido junto à (Farmacêutica Nativita, Brasil). O betacaroteno comercial (99.9% de pureza)

foi fornecido pela Sigma-Aldrich (EUA). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico e foram usados sem purificação adicional.

2.2. Composição centesimal da microalga *Tetrademus obliquus* BR003

A biomassa liofilizada foi caracterizada quanto ao teor de umidade (AOAC, 2005; método 925.09), cinzas (AOAC, 2005; método 923.03), proteínas (AOAC, 2005; método 920.87) com fator de conversão de 4.5 (SILVA et al., 2020), fibras alimentares solúveis e insolúveis (método enzimático-gravimétrico) (AOAC, 2005; método 985.29), carboidratos (DUBOIS et al., 1951) e lipídios (método Schmid-Bondzynski-Ratzlaff) (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Clorofila-a (Ca), clorofila-b (Cb) e carotenoides totais (Cc) foram quantificados por espectrofotometria (Shimadzu, UV-1800, Japão) e usando equações empíricas conforme Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Equações para determinação das concentrações de clorofila-a (Ca), clorofila-b (Cb) e carotenoides totais (Cc) em µg/mL em diferentes solventes.

Solventes	Equações empíricas	Referências
Acetona (80%)	$Ca [\mu\text{g/ml}] = 12.25_{A\ 663.2} - 2.79_{A\ 646.8}$	(LICHTENTHALER, 1987; WELLBURN, 1994)
	$Cb [\mu\text{g/ml}] = 21.50_{A\ 646.8} - 5.10_{A\ 663.2}$	
	$Cc [\mu\text{g/ml}] = 1000_{A\ 470} - 1.82Ca - 85.02Cb/198$	
Etanol (95%)	$Ca [\mu\text{g/ml}] = 13.36_{A\ 664.2} - 5.19_{A\ 648.6}$	(LICHTENTHALER, 1987)
	$Cb [\mu\text{g/ml}] = 27.43_{A\ 648.6} - 8.12_{A\ 664.2}$	
	$Cc [\mu\text{g/ml}] = (1000_{A\ 470} - 2.13Ca - 97.64Cb)/209$	
DMSO	$Ca [\mu\text{g/ml}] = 12.19_{A\ 665} - 3.45_{A\ 649}$	(WELLBURN,1994)
	$Cb [\mu\text{g/ml}] = 21.99_{A\ 649} - 5.32_{A\ 665}$	
	$Cc [\mu\text{g/ml}] = (1000_{A\ 480} - 2.14Ca - 70.16Cb)/220$	

*A – Absorbância das amostras em seus respectivos comprimentos de onda

A conversão dos teores de pigmentos quantificados com concentrações em $\mu\text{g/mL}$ para (mg de pigmento /100 mg de microalgas) foi efetuada usando-se o volume total do extrato e a massa de biomassa inicial, Equação (1)

$$\text{Pigmentos (mg/100 mg)} = 100 \frac{C.V.10^{-3}}{m} \quad (1)$$

Em que C é a concentração de clorofila-a, clorofila-b ou carotenoides totais ($\mu\text{g/mL}$), V é o volume total do extrato (mL) e m é a massa de microalgas (mg).

O teor de betacaroteno foi determinado de acordo com a metodologia modificada de Pilát et al., (2012). Em que uma solução estoque de betacaroteno puro (1 g/L) em óleo mineral de alta pureza foi usada para definir a região espectral dos sinais Raman dos carotenoides. Leituras de espectroscopia Raman foram realizadas na região percorrida entre (800 e 3050 cm^{-1}) para verificar picos gerados por sinais Raman, características do betacaroteno. As condições operacionais das análises Raman (espectrômetro MicroRaman, Renishaw InVia, Reino Unido) foram laser de 514 nm, objetiva de 20x e tempo de exposição da amostra de 5s. Os dados do sinal Raman de cada execução experimental foram gerados a partir da média de 10 acumulações. Aliquotas da solução estoque foram diluídas para construção da curva analítica em função dos sinais Raman, resultando em 10 soluções com concentrações (0.00000; 0.00005; 0.0001; 0.0003; 0.0005; 0.0007; 0.001; 0.003; 0.005; 0.007 g de betacaroteno / L de óleo mineral). A equação da curva analítica é uma função linear (Equação 2) com um coeficiente de correlação (R^2) e foi utilizada para o cálculo da concentração de betacaroteno nas amostras.

$$y = a \cdot x \pm b \quad (2)$$

Em que y é a intensidade do sinal Raman (A.U) e x é a concentração de betacaroteno (%).

2.3. Design experimental para ruptura celular por homogeneização de alta pressão

A otimização do processo de homogeneização das suspensões de *Tetradismus obliquus* foi realizada de acordo com o delineamento de superfície de resposta desenvolvido por Box e Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960). As variáveis pressão (P), concentração da suspensão (Cs) e número de passes (Np) foram avaliadas no experimento fatorial em três níveis codificados, -1 (baixo), 0 (ponto central) e +1 (alto), como mostra a Tabela 2.2. Quinze ensaios experimentais

foram gerados para as três variáveis estudadas em três níveis e com dois pontos axiais cada, incluindo três repetições no ponto central. Os teores de pigmentos (clorofila-a, clorofila-b, carotenoides totais e betacaroteno) e lipídios foram quantificados como variáveis resposta. Além disso, foram realizados dois estudos paralelos para avaliar o processo de homogeneização de alta pressão. Um estudo colorimétrico foi realizado para avaliar o efeito da homogeneização na mudança de cor da biomassa após a ruptura celular e outro para estudar a energia consumida durante a homogeneização. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 2.2. Matriz experimental para os níveis das variáveis para o modelo de Box e Behnken.

Variáveis	Fator	Níveis		
		baixo (-1)	Central (0)	alto (+1)
Concentração (% m/v)	C _s	1.0	1.5	2.0
Pressão (bar)	P	250	300	350
Número de passes (passes)	N _p	5.0	15	25

2.4. Avaliação da temperatura durante a homogeneização de alta pressão

Utilizou-se um banho termostático (TECNAL, TE -184, Brasil) com funções de resfriamento e recirculação de água foi utilizado para reduzir a temperatura das suspensões de biomassa durante a homogeneização (ALITEC, A100, Brasil). A água resfriada circulava através de um sistema fechado desde o banho até o homogeneizador dentro de um tubo flexível de silicone. Este tubo foi conectado a uma serpentina de cobre em formato espiral acoplada ao funil de alimentação e em contato com as suspensões que circulavam no equipamento (Figura 2.1)



Figura 2.1. Sistema de resfriamento do homogeneizador de alta pressão.

Testes preliminares de rompimento celular foram conduzidos para definir os limites máximos de pressão e temperatura de trabalho. A pressão máxima de 350 bar foi utilizada nos ensaios com 5, 15 e 25 passes. A temperatura final máxima permitida foi de 40.00 °C. Assim, a temperatura inicial média foi fixada em 31.50 °C para atingir 40.00 °C ao final do experimento com 5 passes. As temperaturas da suspensão foram registradas a cada 1 passe. A temperatura média inicial foi fixada em 20.51 °C para atingir 40.00 °C ao final do experimento com 15 passes. As temperaturas da suspensão foram medidas a cada 3 passes. A temperatura média inicial foi fixada em 15.00 °C para atingir 40.00 °C ao final do experimento com 25 passes. As temperaturas da suspensão foram aferidas a cada 2 passes.

2.5. Consumo específico de energia no processo de homogeneização de alta pressão

Para o processamento das suspensões microalgais utilizou-se um volume de 3 litros de suspensão de biomassa pré-homogeneizada ($P= 100$ bar e $N_p= 5$) e a suspensão foi diluída nas concentrações de 1.0, 1.5 e 2.0 % de sólidos totais e homogeneizada nas pressões de 150, 250 e 350 bar, e números de passes de 5, 15 e 25 passes foram usados, de acordo com o delineamento experimental proposto.

O consumo específico de energia (E) foi estimado através da Equação (3) (ANAND et al., 2007; ZHANG et al., 2019).

$$E(\text{kJ/g de biomassa}) = \frac{P \cdot N_p}{C_s \cdot \rho} \quad (3)$$

Em que P é a pressão (bar), C_s é a concentração da suspensão de biomassa (% m/v), N_p é o número de passes e ρ é a densidade das suspensões (kg/m^3).

2.6. Estudo colorimétrico da biomassa liofilizada após ruptura celular

A mudança de cor da biomassa após a ruptura celular foi avaliada em um colorímetro (Konica Minolta Optics, CR-10-BASIC, Japão) usando o iluminante padrão da Comissão Internacional de Iluminação (CIE) D65 (luz do dia 6.500K), um ângulo de 10° para o observador e à escala do sistema de cores "Cielab" para o cálculo dos parâmetros de cor. Amostras liofilizadas de biomassa rompida foram comparadas quanto à diferença de cor com biomassa liofilizada sem ruptura celular (biomassa padrão). As amostras foram colocadas em uma cubeta de vidro, e as leituras foram feitas em triplicata. A equação (4), descrita por Langdon (1987) e Ozoglu e Bayindirh (2002), foi adotada para avaliar a diferença de cor (ΔE).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (4)$$

Em que ΔL^* é a mudança de claridade ou brilho (claro/escuro), Δa^* é a mudança de cromaticidade no eixo de cor verde (-) para vermelho (+) e Δb^* é a mudança de cromaticidade no azul (-) para eixo de cor amarelo (+).

2.7. Extração de biocompostos como indicadores de ruptura celular

2.7.1. Extração de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais

As extrações de pigmentos foram realizadas após o rompimento das células das microalgas de acordo com os ensaios gerados pelo delineamento experimental proposto. A metodologia utilizada foi adaptada de (Wellburn, 1994) para extrato de carotenoides em acetona, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO). As extrações ocorreram com a adição de cerca de 33.33 mg de microalga em 10 mL de solvente (acetona, etanol e DMSO) durante 12 horas no escuro e em temperatura ambiente. O material foi filtrado (Papel filtro qualitativo Whatman n°1) e esse procedimento foi denominado de (EXT-PIG).

2.7.2. Extração de betacaroteno

O betacaroteno foi extraído a partir da mistura EXT-PIG com acetona. Após a filtração, o extrato foi transferido para um béquer de 50 mL e o solvente foi totalmente evaporado em banho-maria (Solab, SL-153, Brasil) por 6 h no escuro a 30 °C. O óleo mineral comercial de alta pureza (4 mL) foi adicionado ao extrato seco sob agitação (10 rpm) em banho Dubnofft (Tecnal, TE-053, Brasil) por 12 h no escuro a 25 °C. O extrato seco contendo carotenoides foi totalmente diluído no óleo, conforme Figuras (2A e 2B). Devido à utilização de temperaturas acima de 40°C para evaporação, DMSO e etanol não foram utilizados para quantificação de betacaroteno devido à ocorrência de deterioração térmica do biocomposto no processo. Os espectros Raman dos sinais das amostras foram medidos nas mesmas condições usadas para construir a curva de calibração.

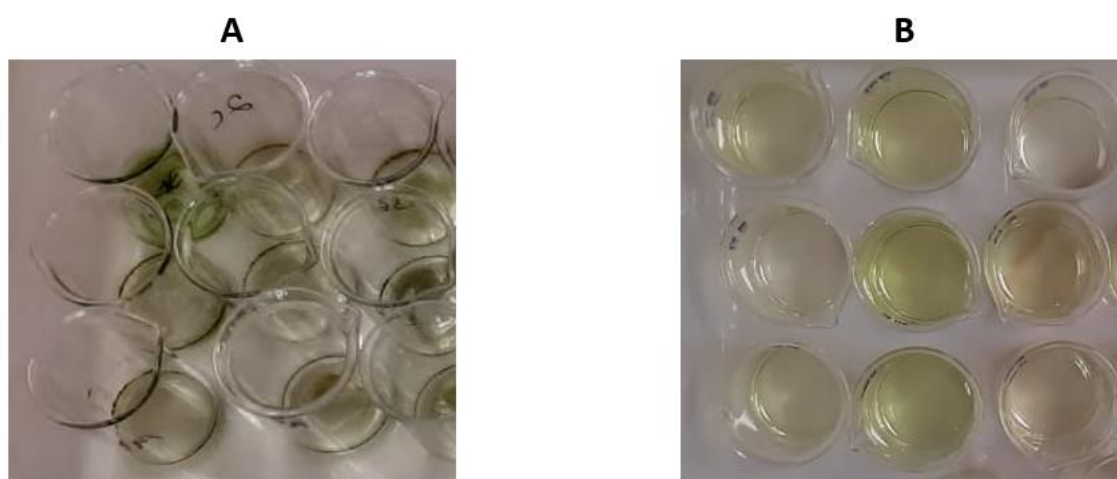


Figura 2.2. (A) extrato seco de carotenoides e (B) extrato seco de carotenoides diluído em óleo mineral.

2.7.3 Extração de lipídios totais da biomassa rompida

A extração lipídica foi efetuada de acordo com a metodologia proposta por Hara e Radin (1978). A partir de uma mistura ternária de hexano-álcool-água foi possível extrair lipídios de biomassa rompida de *T. obliquus*. Para o procedimento pesou-se cerca de 0.5 g de amostra liofilizada efetuando hidratação em 10 mL de água destilada em tubo *Falcon* de 50 mL por 3 horas. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de etanol e 20 mL de hexano sob agitação em vortex (AP56, Phoenix Lufenco, USA) por 5 minutos. Após centrifugação (Centrífuga 5418,

Eppendorf, USA) a 5000 g por 5 minutos, o sobrenadante com hexano contendo a fração lipídica foi retirado e transferido para um béquer de 50 mL. Ao fim de cada processo, um novo volume de 20 mL de hexano foi adicionado aos tubos e repetiu-se os procedimentos de agitação e centrifugação, totalizando 4 repetições. O hexano foi evaporado a 70°C em chapa aquecedora (Marconi 085 - CT) em capela com sistema de exaustão. A quantificação do teor de lipídios se deu através da equação (5).

$$\text{Lipídios totais (g/100g)} = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Em que P_i é a massa inicial da biomassa (g) e P_f é a massa final do extrato lipídico seco (g).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da biomassa de *Tetrademus obliquus*

A composição físico-química da microalga está apresentada na Tabela 2.3. O biocomposto mais abundante observado foi proteínas (37.02%) usando o fator de conversão de 4.5, fibras insolúveis (15.28%), fibras solúveis (3.48%) e lipídios (14.10%). Silva et al. (2020) encontraram valores superiores de proteínas (40.42%) usando o fator 4.5, teores de fibras na faixa de (16.23%) para fibras insolúveis e (3.14%) para fibras solúveis) e teor de lipídios de cerca de (5.57%) que é de aproximadamente (39.00%) abaixo do teor encontrado no presente estudo (14.10%). Em relação ao teor de carboidratos, Visca et al. (2017) encontraram aproximadamente (30.50%) em *Scenedesmus sp* (atual *Tetrademus sp*), e o presente trabalho relatou (27.76%). Ambos os estudos utilizaram a metodologia de Dubois (DUBOIS et al., 1951) para quantificar os carboidratos da biomassa. Os principais fatores que estão associados a diferenças na composição da microalga *Tetrademus obliquus* estão associados a condições de cultivo, tais como, meio de cultura utilizado, condições climáticas do período do cultivo, condições de estresse e tempo de produção.

Tabela 2.3. Composição centesimal da microalga *Tetrademus obliquus*.

Componentes	Conteúdo (g/100g)
Umidade	7.9270 ± 0.6657
Proteína (fator de 4.5)	37.0159 ± 3.7381
Lipídios totais	14.1047 ± 0.4721
Cinzas	16.4696 ± 2.1612
Carboidratos	29.7648 ± 3.0583
Fibras totais	18.7639 ± 2.9914
Fibras solúveis	3.4826 ± 0.9602
Fibras Insolúveis	15.2813 ± 2.0312
Pigmentos Totais	1.9645 ± 0.6086
Clorofila a	0.8000 ± 0.2132
Clorofila b	0.6312 ± 0.2240
Betacaroteno (µg/g)	1.0035 ± 0.2560
Carotenoides totais	0.5333 ± 0.1714

Amaro et al. (2018) extraíram carotenoides da biomassa de *Scenedesmus obliquus* (cepa M2-1) com acetona na proporção de 1:60 (m/v), encontrando valores de cerca de (0.100 ± 0.004 µg de betacaroteno / g de massa seca) e (2.970 ± 0.068 µg de carotenoides totais / g de massa seca) por cromatografia líquida de alta eficiência. Os teores de carotenoides totais e betacaroteno encontrados no estudo de Amaro et al. (2018) foram inferiores ao encontrado no presente trabalho. A discrepância observada pode estar associada à ausência de um método de ruptura celular eficiente e/ou à diferença nos métodos de quantificação utilizados. O alto teor de cinzas (16.45%) encontrado no presente estudo pode estar associado ao teor do meio de cultura utilizado (L4-m), que é composto por alta concentração de fertilizantes inorgânicos, como cloreto de potássio, sulfato de magnésio hepta-hidratado, ferro monohidratado e ureia, como fonte primária de nitrogênio (ROCHA et al., 2019).

3.2. Influência da temperatura da homogeneização de alta pressão

O equilíbrio térmico entre as suspensões e a água de resfriamento para reduzir a temperatura da biomassa foi observado em uma diferença de 6 °C entre a temperatura do termostato e a temperatura da suspensão, medido com um termômetro digital do tipo ponto (Kasvy, K29-5030, Brasil) no funil de alimentação do homogeneizador. Durante o processo, observou-se uma variação de temperatura de aproximadamente 5 °C para a homogeneização em 5 passes, uma variação de 15 °C para os ensaios de 15 passagens e uma variação de 25 °C

para os ensaios de 25 passes. O aumento médio de temperatura para cada passe das suspensões pelo homogeneizador foi de aproximadamente 1.03 ± 0.01 °C.

Yap et al. (2015) usaram homogeneização de alta pressão para ruptura celular de *Nannochloropsis sp.* biomassa com uma concentração de até 25 % de sólidos. Os autores relataram um aumento de temperatura da suspensão de 1.5 °C para cada 69 bar de aumento de pressão. Bernaerts et al. (2019) atingiram uma temperatura de processo de aproximadamente 70 °C na homogeneização de ultra alta pressão de *Nannochloropsis sp.* suspensões a 2500 bar de pressão de trabalho, concentração de 0.1 % (m/v) e 4 passes, mesmo com uma unidade externa de resfriamento a (4 °C) conectada ao homogeneizador para minimizar o aumento de temperatura.

A Figura 2.3 apresenta o comportamento linear da temperatura em função do número de passes com ajuste dos dados a um modelo de primeira ordem e com coeficiente de correlação ($R^2 > 99\%$). Assim, o comportamento das temperaturas de processo para o homogeneizador (Alitec, A100, Brasil) podem ser estimadas em função do tempo de processo usando as equações de regressão como mostradas na imagem.

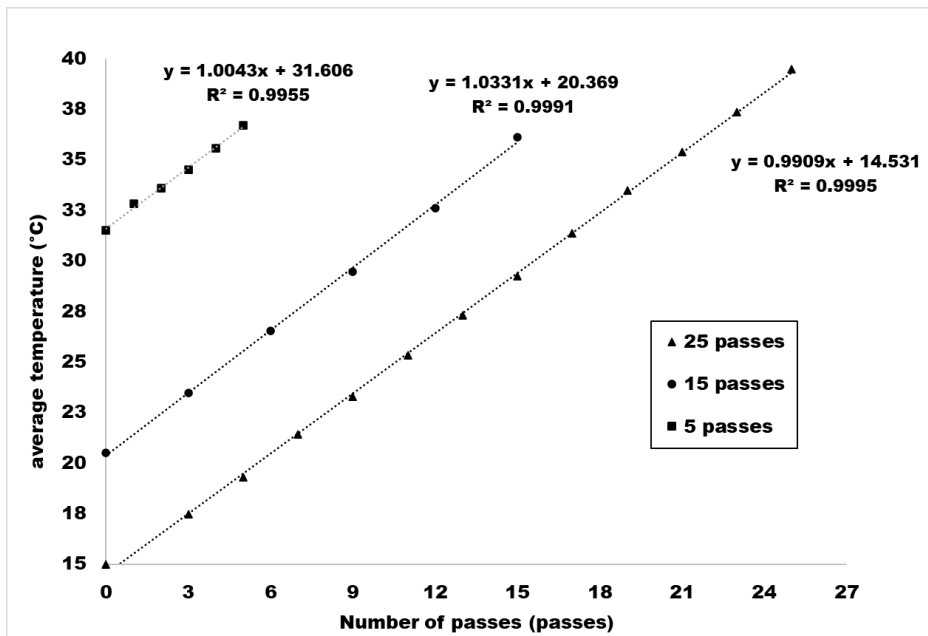


Figura 2.3. Comportamento linear da temperatura de processo em função do número de passes.

3.3. Consumo específico de energia na homogeneização de alta pressão

As densidades médias das suspensões de biomassa foram necessárias para calcular o consumo específico de energia e foram medidas em um picnômetro de 10 mL a 25 °C. As densidades das suspensões de (1.0, 1.5 e 2.0) % foram (962.3, 963.3 e 964.5) kg/m³, respectivamente. O maior consumo de energia foi observado para os tratamentos de maior pressão aplicada e maior número de passes, conforme Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Consumo específico de energia nos tratamentos realizados na homogeneização de alta pressão.

Tratamentos	Pressão (bar)	Concentração (% m/v)	Número de passes	Energia (kJ/g massa seca)
T12	300	1.0	25	77.94
T3	350	1.5	25	60.56
T11	350	1.0	15	54.56
T2	250	1.5	25	43.25
T10	250	1.0	15	38.97
T8	300	2.0	25	38.88
T1	300	1.5	15	31.14
T6	300	1.5	15	31.14
T15	300	1.5	15	31.14
T5	350	2.0	15	27.22
T9	250	2.0	15	19.44
T7	300	1.0	5	15.59
T4	350	1.5	5	12.11
T14	250	1.5	5	8.65
T13	300	2.0	5	7.78

Os tratamentos mais severos apresentaram alto consumo de energia. O ensaio 12 (P = 300 bar, Cs = 1.0 % e Np = 25) demandou aproximadamente 77.94 kJ de energia/g de massa seca. O ensaio 3 (P = 350 bar, Cs = 1.5% e Np = 25) consumiu aproximadamente 60.56 kJ de energia/g de massa seca. Os ensaios nos pontos centrais do delineamento experimental (P = 300

bar, $C_s = 1.5\%$ e $N_p = 15$) consumiram em média 29.83 kJ de energia/g de massa seca. Yap et al. (2015) estudaram o consumo específico de energia de *Nannochloropsis sp.* por homogeneização de alta pressão e descobriram que a eficiência energética depende da relação entre as condições operacionais, como pressão e concentrações das suspensões. A homogeneização de alta pressão pode ser ampliada e otimizada para aplicações industriais para processamento de microalgas para obter melhores rendimentos e menores custos de energia.

Grimi et al. (2014) usaram homogeneização de alta pressão para quebrar células de suspensão de *Nannochloropsis sp.* 1.0 % (m/v) a 1500 bar com circulação de 1 a 10 passagens. Os autores relataram que o consumo específico de energia variou de 15 a 150 kJ/g de massa seca. Zhang et al. (2019) relataram um consumo de energia de aproximadamente 48 kJ/g de massa seca para homogeneização de suspensões de *Parachlorella kessleri* com ($C_s = 1.0\%$, $P = 1200$ bar e 4 passes das suspensões pelo equipamento). De acordo com D'Hondt et al. (2018), as técnicas de rompimento celular costumam demandar alto gasto energético. Assim, o custo-benefício desse processo está associado à otimização do consumo de energia por quilograma de massa seca, da concentração das suspensões de células tratadas e do número de passagens pelo homogeneizador para obter rendimentos de ruptura mais eficientes.

3.4. Estudo colorimétrico

O estudo colorimétrico baseou-se na análise da diferença de cor (ΔE^*) da suspensão de biomassa de microalgas antes e depois da quebra celular porque a cor da amostra é modificada durante o processamento. A magnitude da mudança de cor foi maior para os tratamentos com maior pressão e maior número de passes (tratamentos 3, 8 e 5), conforme mostrado na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Diferenças de cor entre amostras após a aplicação de homogeneização de alta pressão e amostras padrão.

Tratamentos	Pressão (bar)	Concentração (%)	Número de passes	ΔE^*
T3	350	1.5	25	4.74 ± 0.02^a
T8	300	2.0	25	4.66 ± 0.06^b
T5	350	2,0	15	4.50 ± 0.14^c
T12	300	1.0	25	4.39 ± 0.07^d

Tratamentos	Pressão (bar)	Concentração (%)	Número de passes	ΔE^*
T11	350	1.0	15	4.14 ± 0.02^e
T6	300	1.5	15	3.30 ± 0.02^f
T1	300	1.5	15	3.11 ± 0.01^g
T15	300	1.5	15	3.10 ± 0.03^g
T2	250	1.5	25	2.67 ± 0.04^h
T4	350	1.5	5	2.05 ± 0.05^i
T9	250	2.0	15	2.03 ± 0.02^i
T10	250	1.0	15	2.02 ± 0.03^i
T13	300	2.0	5	1.51 ± 0.01^j
T7	300	1.0	5	1.40 ± 0.04^l
T14	250	1.5	5	1.07 ± 0.01^m

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$)

A análise de variância foi verificada estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância, observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. A mudança de cor da biomassa no processo de homogeneização de alta pressão está associada a danos na estrutura da parede celular e à liberação de biocompostos, como pigmentos, lipídios, proteínas e, outros. Assim, o estudo colorimétrico por meio da avaliação da cor comprovou-se que pode ser utilizado como um indicador de ruptura ou dano celular para microalga *Tetrademus obliquus*.

3.5. Indicadores de rompimento celular

3.5.1. Conteúdo de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais

Os resultados encontrados para os teores de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais com os solventes acetona, DMSO e etanol estão apresentados na Tabela 2.6. Como esperado, houve aumento no teor de pigmentos com o aumento da pressão de trabalho e com o número de passagens das suspensões pelo homogeneizador, evidenciando que esses compostos intracelulares ficaram mais biodisponíveis no meio à medida que o rompimento celular foi-se

intensificando. Portanto, pode-se inferir que a extração de pigmentos pode ser utilizada como um indicativo de rompimento celular da microalga *Tetradismus obliquus*.

Tabela 2.6. Resultados encontrados para teores de pigmentos através de extração com acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol.

Ensaio	Pressão (bar)	Concentração % (m/v)	Passes (passes)	Acetona			DMSO			Etanol		
				Ca	Cb	Cc	Ca	Cb	Cc	Ca	Cb	Cc
				(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)
1	300	1.5	15	0.7162	0.3842	0.3268	0.3857	0.2565	0.3633	0.2740	0.1184	0.0654
2	250	1.5	25	0.5246	0.4241	0.2800	0.3617	0.3574	0.3631	0.2154	0.1297	0.0968
3	350	1.5	25	0.7760	0.6312	0.5333	0.4778	0.5046	0.5307	0.3312	0.2122	0.1767
4	350	1.5	5	0.4261	0.2565	0.2424	0.3587	0.2125	0.3045	0.1462	0.0620	0.0860
5	350	2.0	15	0.5598	0.4175	0.4244	0.4447	0.3802	0.5179	0.2804	0.1665	0.1332
6	300	1.5	15	0.7847	0.3744	0.2827	0.3913	0.2522	0.3814	0.2698	0.1211	0.0615
7	300	1.0	5	0.3800	0.1963	0.1843	0.3276	0.2019	0.3157	0.1177	0.0755	0.0609
8	300	2.0	25	0.7075	0.5703	0.4901	0.4479	0.4614	0.5255	0.2897	0.2106	0.1313
9	250	2.0	15	0.5012	0.3062	0.2697	0.3455	0.2557	0.3554	0.1497	0.0927	0.0873
10	250	1.0	15	0.4185	0.2726	0.2018	0.3547	0.2404	0.3566	0.1407	0.0824	0.0766
11	350	1.0	15	0.5386	0.3726	0.4202	0.4410	0.3902	0.5118	0.2665	0.1457	0.1266
12	300	1.0	25	0.6835	0.5633	0.4515	0.4597	0.4409	0.4865	0.2759	0.2007	0.1090
13	300	2.0	5	0.3752	0.1608	0.1877	0.3024	0.1939	0.2968	0.1050	0.0717	0.0486
14	250	1.5	5	0.3465	0.1194	0.1712	0.2416	0.1577	0.2162	0.0532	0.0242	0.0099
15	300	1.5	15	0.7745	0.4000	0.3625	0.3945	0.2368	0.3711	0.2668	0.1259	0.0520

*Ca – clorofila-a, Cb – clorofila-b e Cc – carotenoides totais

O maior teor de clorofila-a com um menor consumo específico de energia foi encontrado neste estudo foi a partir do extrato de pigmentos em acetona em que foi possível quantificar na condição de processo otimizado ($P= 312$ bar, $C_s= 1.5\%$ e $N_p= 22$) cerca de (0.80 g de clorofila-a / 100 g de biomassa rompida) (Figura 2.4). Nessas condições, o consumo específico de energia foi de cerca de (47.50 kJ/g de matéria seca). Cerca de (0.50g de clorofila-a /100g de biomassa rompida) foi quantificado a partir de extrato de pigmentos em DMSO na condição de processo otimizado ($P= 350$ bar, $C_s = 1.5\%$ e $N_p= 22$) e o consumo específico de energia foi de cerca de (53.29 kJ / g de matéria seca). Em extrato de carotenoides em etanol na condição de processo otimizado ($P= 341$ bar, $C_s= 1.5$ e $N_p= 24$) foi possível quantificar cerca de (0.31g de clorofila-a / 100g de biomassa rompida) com um consumo específico de energia de cerca de (56.64 kJ / g de matéria seca).

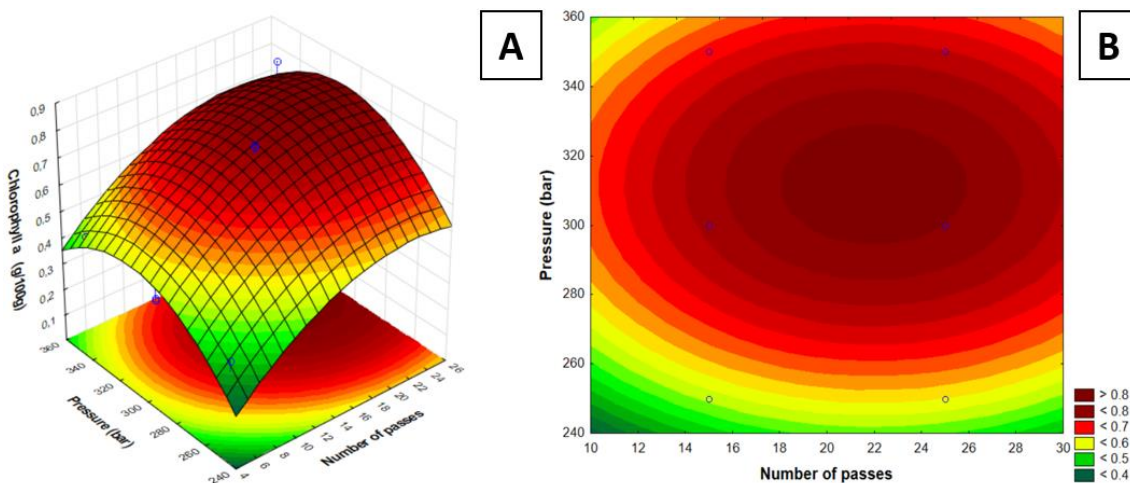


Figura 2.4. Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da extração de clorofila-a: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

Para a clorofila-b, os maiores teores foram observados para o extrato de pigmentos em acetona. Na condição otimizada de homogeneização ($P= 345$ bar, $C_s = 1.5\%$ e $N_p= 24$) foi possível obter cerca de (0.60g de clorofila-b / 100g de biomassa homogeneizada) (Figura 2.5). O consumo específico de energia nessas condições de processo foi de cerca de (57.30 kJ/g matéria seca). Cerca de (0.50g de clorofila-b / 100g de biomassa homogeneizada) foi quantificada a partir de extratos de pigmentos em DMSO na condição de processo otimizada ($P= 350$ bar, $C_s = 1.5\%$ e $N_p= 25$) com cerca de (60.56 kJ/g matéria seca) de consumo específico de energia.

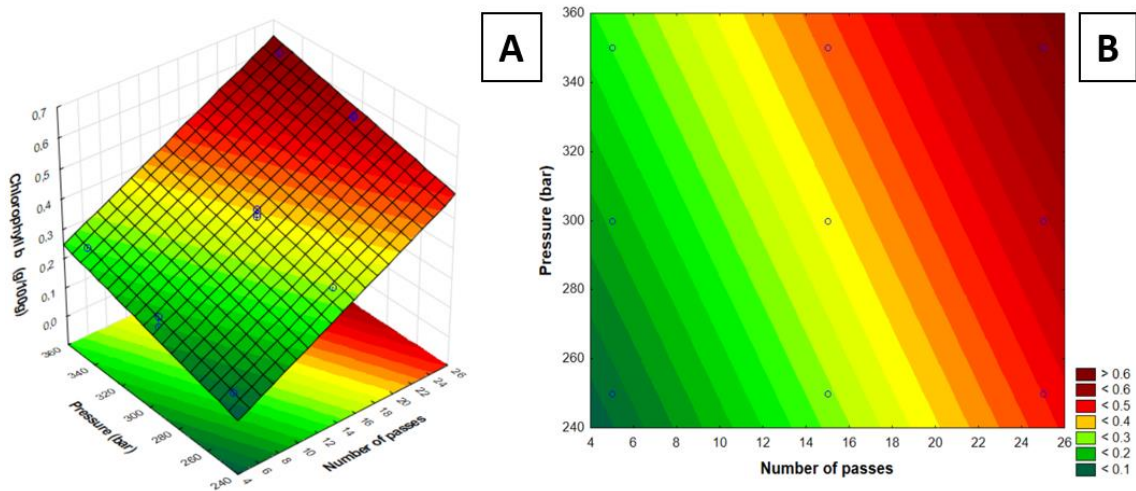


Figura 2.5. Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da extração de clorofila-b: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

De acordo com a otimização realizada, a partir de extrato de pigmentos em acetona com aplicação de ($P= 340$ bar, $C_s= 1.5\%$ e $N_p= 23$) foi possível quantificar cerca de (0,50 g carotenoides totais /100 g de biomassa homogeneizada). Nessas condições a energia específica consumida foi de (54.12 kJ/g massa seca).

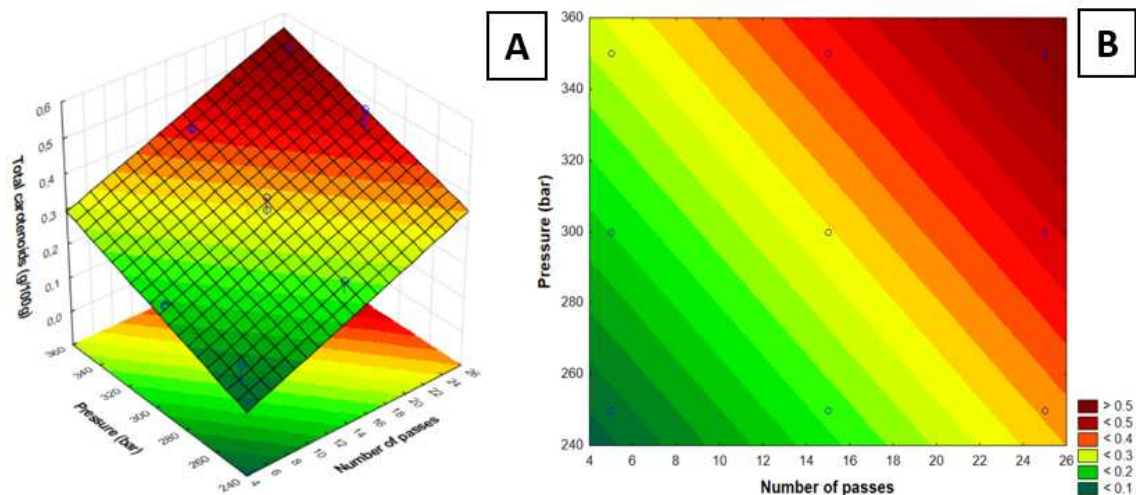


Figura 2.6. Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da extração de carotenoides totais: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

Zhang et al. (2019) relataram cerca de (240kJ/g de massa seca) de energia consumida para ruptura celular de *P. kessleri* usando homogeneização de alta pressão com ($P=1200$ bar, $C_s=0.5\%$ e $N_p=10$), quantificando nessas condições, (0.90g de pigmentos totais / 100g de biomassa homogeneizada) utilizando a acetona como solvente de extração. Esses valores estão

abaixo do encontrado no presente trabalho (1.95 g de pigmentos totais/100g de biomassa homogeneizada). A complexidade da parede celular de cada espécie de microalga e o pré-tratamento da amostra antes da homogeneização, pode afetar o rendimento da ruptura celular e, conseqüentemente, a recuperação de biocompostos.

3.5.2. Conteúdo de betacaroteno

A região espectral em 1155 cm^{-1} foi utilizada para quantificar o betacaroteno. Essa região é caracterizada pela torção da ligação da molécula do pigmento (C-C) (PILÁT et al., 2022). Nessa região, não se observou sinal Raman derivado do óleo mineral e, portanto, não existe contribuição do óleo mineral para a intensificação dos sinais relacionados ao betacaroteno. Depois de plotar os dados gerados pela medição dos espectros Raman, a linha de base dos gráficos foi removida. Os espectros Raman foram então normalizados usando um valor definido em relação ao pico do sinal Raman na região de (1300 cm^{-1}). Nessa região, todas as intensidades geradas são exclusivas da contribuição do óleo mineral e, portanto, permanecem praticamente constantes em todos os ensaios devido às baixas concentrações de betacaroteno nas soluções diluídas.

A Figura 2.7A mostra as intensidades normalizadas e as respectivas concentrações de suas soluções diluídas utilizadas para construir a curva analítica. Os picos gerados na região em 1155 cm^{-1} foram utilizados para a regressão linear da curva de intensidade normalizada em função da concentração de betacaroteno (Figura 2.7B). Através do modelo de primeira ordem, descrito pela Equação 6, gerou-se uma curva analítica. A aceitabilidade do ajuste do modelo aos dados experimentais foi através do coeficiente de correlação ($R^2= 0.99$). Para a calibração da curva analítica foi utilizada uma solução com concentração de betacaroteno conhecida de 0.0009% e o erro relativo calculado foi de 1.67%.

$$y = 7632 \cdot x + 0.2981 \quad (6)$$

Em que y é a intensidade normalizada (A.U) e x é a concentração de betacaroteno ($\mu\text{g/g}$).

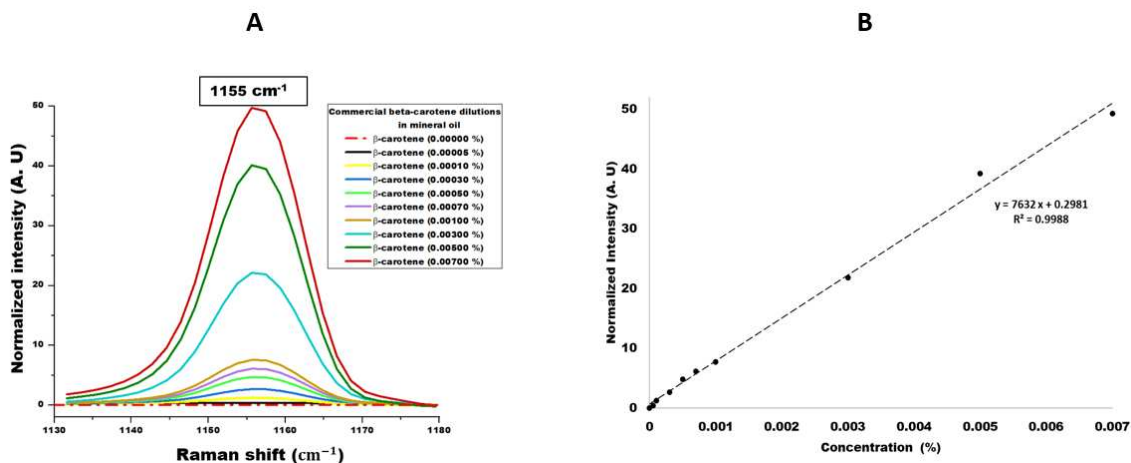


Figura 2.7. Curva analítica para determinação de betacaroteno em biomassa homogeneizada de *Tetrademus obliquus*. (A) Intensidades normalizadas de sinais Raman e (B) Intensidade normalizada *versus* concentração de betacaroteno.

A Figura 2.8A mostra os espectros Raman para todos os ensaios experimentais realizados, e a Figura 2.8B mostra uma imagem expandida da região de interesse em 1155 cm⁻¹. Os espectros Raman das amostras foram gerados e normalizados após a remoção da linha de base dos gráficos plotados para a quantificação do conteúdo de betacaroteno da biomassa rompida. O betacaroteno foi determinado em extratos de carotenoides em óleo mineral. A maior intensidade de detecção de sinais Raman fora para os ensaios E3 (P= 350 bar, Cs= 1.5% e Np= 25), E8 (P= 300, Cs= 2% e Np= 25) e E12 (P= 300, Cs= 1.0% e Np= 25), respectivamente. Esses tratamentos foram submetidos a maiores pressões e maiores números de passes. Os valores de intensidade dos sinais Raman medidos nos picos para cada ensaio foram usados para calcular a concentração de betacaroteno (µg/g) através da Equação 6, apresentada anteriormente.

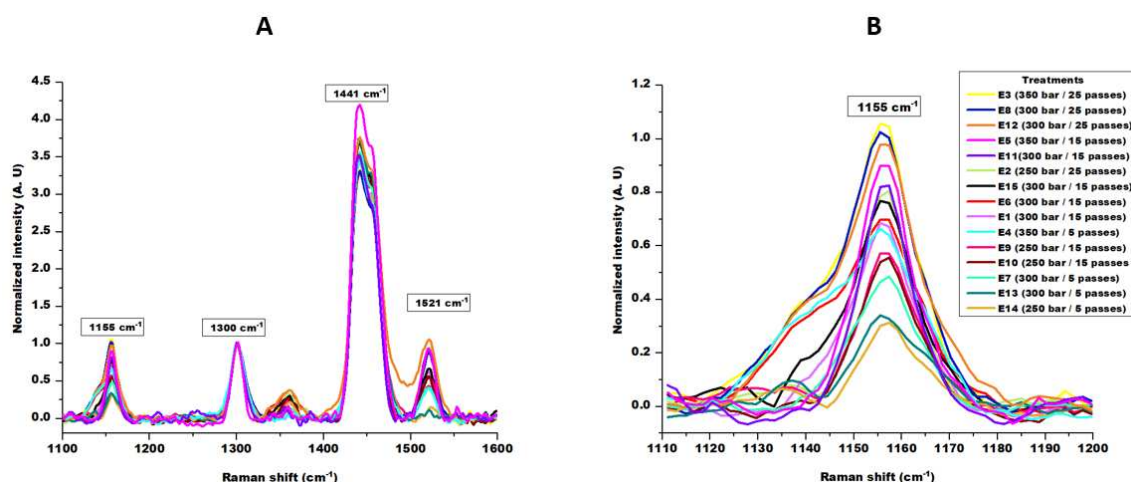


Figura 2.8. (A) Espectros Raman dos ensaios realizados e (B) Imagem expandida dos Espectros Raman na região de interesse em 1155 cm^{-1} .

A tabela 2.7 apresenta o conteúdo de betacaroteno provenientes das biomassas rompidas dos 15 ensaios experimentais realizados. Percebe-se o aumento no teor do carotenoide nos tratamentos que envolvem maiores pressões e maiores e número de passes. No presente estudo, o ensaio 3 ($P = 350\text{ bar}$, $C_s = 1.5\%$ e $N_p = 25$) foi o que obteve maior teor de betacaroteno, cerca de $1.0\ (\mu\text{g/g})$. Por outro lado, ensaios com menores pressões e menores tempo de processo, ensaio 9 ($P = 250\text{ bar}$, $C_s = 2.0\%$ e $N_p = 15$) e o ensaio 10 ($P = 250\text{ bar}$, $C_s = 1.0\%$ e $N_p = 15$) obtiveram cerca de 0.3655 e $0.3408\ (\mu\text{g de betacaroteno/g de biomassa})$, respectivamente. Nota-se que houve um aumento significativo no teor de betacaroteno pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0.05$) entre a maioria dos ensaios realizados. O aumento nos valores dos parâmetros de processo indicam que a eficiência do rompimento celular também aumenta, permitindo assim, a maior recuperação de betacaroteno.

Tabela 2.7. Conteúdo de betacaroteno em extrato de pigmentos de *Tetrademus obliquus* diluídos em óleo mineral de alta pureza.

Ensaio	Pressão (bar)	Concentração % (m/v)	Número de passes	Betacaroteno ($\mu\text{g/g}$)
3	350	1.5	25	1.0035 ± 0.0055^a
8	300	2.0	25	0.9252 ± 0.0023^b
12	300	1.0	25	0.8829 ± 0.0101^c
5	350	2.0	15	0.7819 ± 0.0011^d
11	350	1.0	15	0.6965 ± 0.0121^e
2	250	1.5	25	0.6923 ± 0.0056^e
15	300	1.5	15	0.6042 ± 0.0024^f
6	300	1.5	15	0.5000 ± 0.0009^g
1	300	1.5	15	0.4925 ± 0.0111^g
4	350	1.5	5	0.4786 ± 0.0098^h
9	250	2.0	15	0.3655 ± 0.0022^i
10	250	1.0	15	0.3408 ± 0.0031^j
7	300	1.0	5	0.2461 ± 0.0020^k
13	300	2.0	5	0.0681 ± 0.0018^l
14	250	1.5	5	0.0609 ± 0.0027^l

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0.05$)

No processo de homogeneização otimizado com ($P= 330$ bar, $C_s= 1.5\%$ e $N_p= 25$) foram obtidos teores de betacaroteno de cerca de ($1.00 \mu\text{g/g}$) (Figura 2.9). A Equação 7 descreve o modelo gerado através da otimização com um coeficiente de correlação ($R^2= 0.95$).

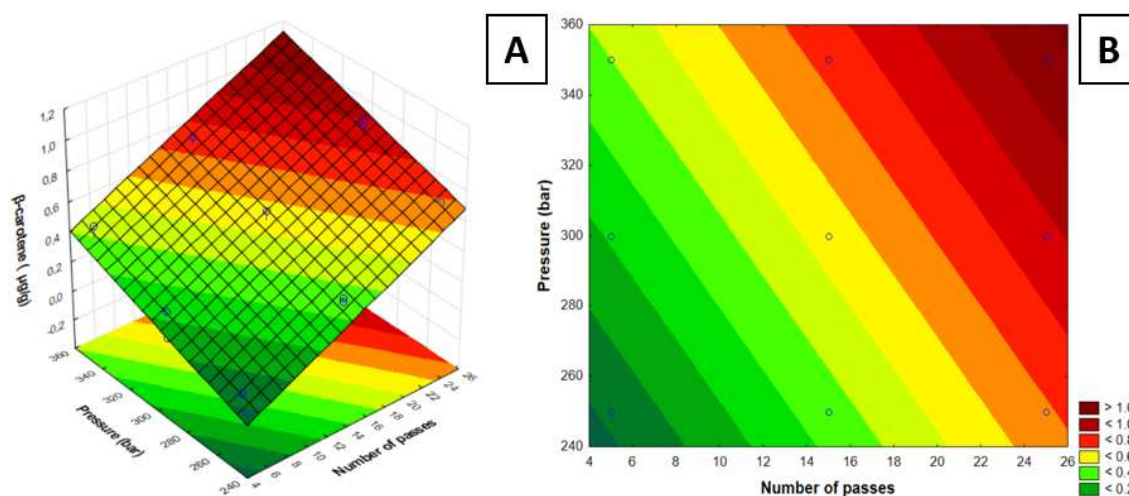


Figura 2.9. Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da extração de betacaroteno: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

$$\text{Betacaroteno } (\mu\text{g/g}) = -1.0800 + 0.0038P + 0.0331NP \quad (7)$$

Em que P é a pressão de trabalho aplicada na homogeneização e Np é o número de passes da suspensão no homogeneizador.

3.5.3 Conteúdo de lipídios

A extração lipídica foi realizada usando o método de Hara e Radin (1978) para avaliar a eficiência da ruptura celular através do conteúdo deste biocomposto. Essa metodologia não utiliza nenhuma etapa de hidrólise (ácida ou básica) ou altas temperaturas que poderiam influenciar na ruptura ou dano celular das microalgas. Logo, extração e quantificação de lipídios foram associadas principalmente com a contribuição da ruptura celular por homogeneização de alta pressão, à afinidade do hexano com o conteúdo lipídico e a confiabilidade do método de quantificação.

A tabela 2.8 apresenta os tratamentos realizados na homogeneização e os teores de lipídios encontrados a partir dessa biomassa processada. Pelo teste de Tukey a 5% de significância, os tratamentos utilizados apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$), com exceções observadas para os tratamentos nos pontos centrais, como esperado. É possível inferir de acordo com os resultados, que o conteúdo de lipídios aumenta com o aumento da pressão e tempo de processo. Portanto, a extração desse biocomposto pode ser utilizada como indicador de ruptura e dano celular no processo de homogeneização de alta de alta pressão, visto que, os métodos de extração e quantificação foram rigorosamente idênticos em todos os tratamentos.

Tabela 2.8. Conteúdo de lipídios em biomassa homogeneizada de *Tetrademus obliquus*.

Ensaio	Pressão (bar)	Concentração (% m/v)	Número de Passes (passes)	Teor de lipídios (g/100g)
3	350	1.5	25	4.070 ± 0.012 ^a
8	300	2.0	25	3.900 ± 0.023 ^b
12	300	1.0	25	3.870 ± 0.014 ^c
5	350	2.0	15	3.840 ± 0.015 ^d
11	350	1.0	15	3.830 ± 0.069 ^d
6	300	1.5	15	3.820 ± 0.046 ^d
1	300	1.5	15	3.789 ± 0.033 ^e
15	300	1.5	15	3.769 ± 0.036 ^e
2	250	1.5	25	3.440 ± 0.051 ^f
9	250	2.0	15	3.430 ± 0.054 ^f

Ensaio	Pressão (bar)	Concentração (% m/v)	Número de Passes (passes)	Teor de lipídios (g/100g)
10	250	1.0	15	3.340 ± 0.029 ^g
4	350	1.5	5	3.200 ± 0.057 ^h
7	300	1.0	5	3.130 ± 0.036 ⁱ
14	250	1.5	5	2.890 ± 0.055 ^j
13	300	2.0	5	2.880 ± 0.048 ^j

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0.05$).

A eficiência máxima de ruptura celular por homogeneização para extração de lipídios baseou-se na quantificação do teor de lipídios totais (14.11%) na biomassa sem ruptura determinada pelo método de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Assim, quanto mais próximo o conteúdo lipídico dos ensaios da homogeneização estiver de 14.11 % mais eficiente será a ruptura celular. A condição de homogeneização ($P= 350$ bar, $C_s= 1.5\%$ e $N_p= 25$) recuperou o maior teor de lipídios totais (4.04 g de lipídios/100g de biomassa) e representou uma eficiência de ruptura de 28.63%. As condições de homogeneização ($P= 250$ bar, $C_s= 1.5\%$ e $N_p= 5$) recuperou o menor conteúdo de lipídios totais (2.88 g de lipídios/100g de biomassa), com eficiência de 20.41%. Nos tratamentos nos pontos centrais do delineamento ($P= 300$ bar, $C_s= 1.5\%$ e $N_p= 15$) obteve-se cerca de (3.79 g de lipídios/100g de biomassa) e uma eficiência média associada de 26.88%. Observou-se um aumento no teor de lipídios à medida que as condições operacionais de homogeneização foram aumentadas, evidenciando que a extração de lipídios pode ser utilizada como um indicador de ruptura celular de *Tetrademus obliquus* para homogeneização de alta pressão.

A condição ótima de homogeneização para recuperação de lipídios foi observada para ($P \geq 350$ bar e $N_p \geq 23$) (Figura 2.10). Nesta condição, o teor lipídico é (≥ 4.0 g/100g). A concentração das suspensões (1.0, 1.5 e 2.0 %) não teve efeito significativo na otimização da homogeneização. No entanto, a concentração de processo de 2.0% pode ser utilizada, pois houve um menor consumo de energia neste valor em comparação com outras concentrações testadas para homogeneização sob pressão e número de passes semelhantes.

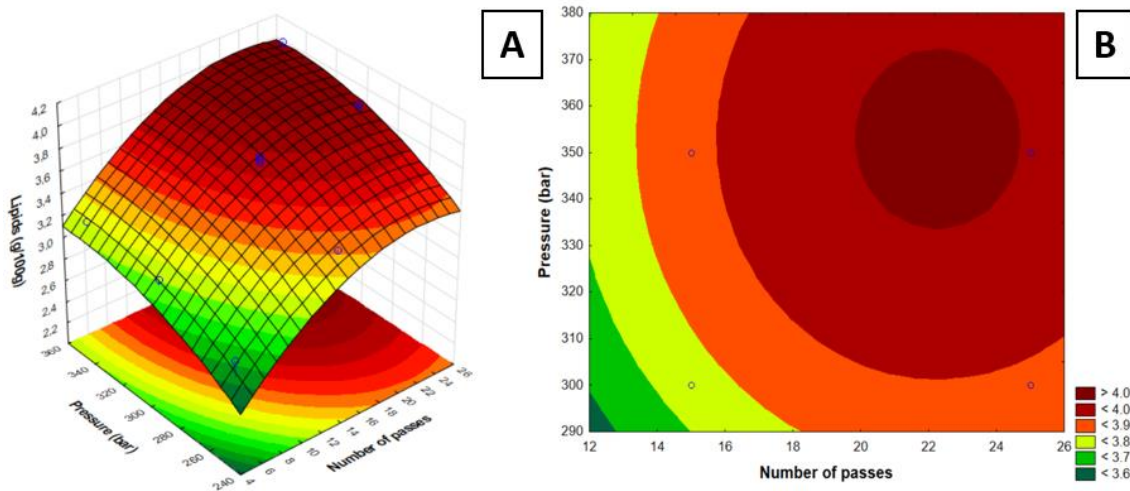


Figura 2.10. Otimização da homogeneização de alta pressão a partir da determinação do teor de lipídios: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

4. CONCLUSÃO

Este estudo otimizou o processo de homogeneização de alta pressão para ruptura celular da microalga *Tetrademus obliquus* através de um planejamento experimental de acordo com a metodologia de Box e Behnken. Verificou-se que a aplicação de pressão mais elevada combinado com um maior tempo de processo promoveram melhores condições para extração de pigmentos e lipídios, no entanto, aumentar esses parâmetros exigiu maior consumo específico de energia. O solvente acetona promoveu os maiores rendimentos de extração de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais, seguido do DMSO. O etanol não foi eficiente para extração de pigmentos, apresentando baixa recuperação desses biocompostos. O método hexano/etanol para extração de lipídios permitiu avaliar a eficiência de ruptura celular de acordo com o rendimento lipídico. O teste de Tukey ao nível de significância de 5% apontou diferença significativa ($p < 0.05$) nas extrações de pigmentos e lipídios entre os tratamentos, demonstrando que esses biocompostos podem ser utilizados como indicadores de ruptura celular por homogeneização de alta pressão.

5. REFERÊNCIAS

- AMARO, H.; GUEDES, A.; PRETO, M.; SOUSA-PINTO, I.; MALCATA, F. *Gloeothece sp.* as a nutraceutical source—An improved method of extraction of carotenoids and fatty acids. **Marine Drugs**, v. 16, n. 9, p. 327-344, 2018. doi:10.3390/md16090327
- AMORIM, M. L.; SOARES, J.; COIMBRA, J. S. DOS R.; LEITE, M. DE O.; ALBINO, L. F. T.; MARTINS, M. A. (2020). Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–27, 2020. doi:10.1080/10408398.2020.1768046
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington, 1995.
- ANAND, H.; BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A. B.; HARRISON, S. T. L. The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 166–173, 2007. doi:10.1016/j.bej.2007.01.011
- BALASUBRAMANIAN, S.; ALLEN, J. D.; KANITKAR, A.; BOLDOR, D. (2011). Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3396–3403, 2011. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.11
- BALASUNDARAM, B.; SKILL, S. C.; LLEWELLYN, C. A. A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 48–56, 2012. doi:10.1016/j.bej.2012.08.010
- BERNAERTS, T. M. M.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. M. Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization. **Algal Research**, v. 42, 101616, 2019. doi:10.1016/j.algal.2019.101616
- BLSALPUTRA, T.; WEIER, W. E. The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 10, p. 1011–1019, 1963. doi:10.1002/j.1537-2197.1963.tb06584.x
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p.455–475, 1960. doi:10.1080/00401706.1960.10489912

DAO, G.-H.; WU, G.-X.; WANG, X.-X.; ZHUANG, L.-L.; ZHANG, T.-Y.; HU, H.-Y. Enhanced growth and fatty acid accumulation of microalgae *Scenedesmus sp.* LX1 by two types of auxin. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 561–567, 2018. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.079

D'HONDT, E.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; BOLADO, S.; KASPEROVICIENE, J.; KOREIVIENE, J.; SULCIUS, S.; BASTIAENS, L. Cell disruption technologies. **Microalgae-based biofuels and bioproducts**, p. 133–154. 2017. doi:10.1016/b978-0-08-101023-5.00006-6

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956. doi:10.1021/ac60111a017

FARIED, M.; SAMER, M.; ABDELSALAM, E.; YOUSEF, R. S.; ATTIA, Y. A.; ALI, A. S. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 893–913, 2017. doi:10.1016/j.rser.2017.05.199

GRIMI, N.; DUBOIS, A.; MARCHAL, L.; JUBEAU, S.; LEBOVKA, N. I.; VOROBIEV, E. Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis sp.* using different methods of cell disruption. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 254–259, 2014. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.011

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. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.008

HALIM, R.; HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Microalgal cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**, v. 91, n. 1, p. 116–121, 2012. doi:10.1016/j.apenergy.2011.08.048

HARA, A. C.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420-426, 1978.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION., (1986). Cheese and processed cheese products: determination of fat content - gravimetric method - reference method (No. 5B). Brussels.

KERIS-SEN, U. D.; SEN, U.; SOYDEMIR, G.; GUROL, M. D. An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 407–413, 2014 doi:10.1016/j.biortech.2013.11.01

LANGDON, T.T. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. **Food Technol.**, v. 41, n. 5, p. 64-67, 1987.

LEE, J.-Y.; YOO, C.; JUN, S.-Y.; AHN, C.-Y.; OH, H.-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 75-77, 2010. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.05

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Force and energy requirement for microalgal cell disruption: An atomic force microscope evaluation. **Bioresource Technology**, n. 128, p. 199–206, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.03

LEE, S. Y.; CHO, J. M.; CHANG, Y. K.; OH, Y.-K. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1317–1328, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.03

LICHTENTHALER, H. K. [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Plant Cell Membranes**, p. 350–382, 1987. doi:10.1016/0076-6879(87)48036-1

ÖZOĞLU, H.; BAYINDIRLI, A. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. **Food Control**, v. 13, n. 4-5, p. 213–221, 2002. doi:10.1016/s0956-7135(02)00011-7

PILÁT, Z.; BERNATOVÁ, S.; JEŽEK, J.; ŠERÝ, M.; SAMEK, O.; ZEMÁNEK, P.; TRTÍLEK, M. Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: β -carotene quantification. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 541–546, 2011. doi:10.1007/s10811-011-9754-4

POSTMA, P. R.; 'T LAM, G. P.; BARBOSA, M. J.; WIJFFELS, R. H.; EPPINK, M. H. M.; OLIVIERI, G. Microalgal biorefinery for bulk and high-value products: product extraction within cell disintegration. **handbook of electroporation**, p. 2205–2224, 2017. doi:10.1007/978-3-319-32886-7_38

RADIN, N. S. Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. In: Lowenstein, J. M. (Ed.). *Methods in enzymology*, New York: **Academic Press**, v. 72, n. 5-7, 1981

RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, second ed., John Wiley & Sons, Ltd, **Chichester**, 2013. 719 p.

ROCHA, D. N.; MARTINS, M. A.; SOARES, J.; VAZ, M. G. M. V.; DE OLIVEIRA LEITE, M.; COVELL, L.; MENDES, L. B. B. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus spp.* **Bioresource Technology**, v. 289, 121644, 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.121644

SAMARASINGHE, N.; FERNANDO, S.; LACEY, R.; FAULKNER, W. B. Algal cell rupture using high pressure homogenization as a prelude to oil extraction. **Renewable Energy**, v. 48, p. 300–308, 2012. doi:10.1016/j.renene.2012.04.039

SANCHEZ RIZZA, L.; SANZ SMACHETTI, M. E.; DO NASCIMENTO, M.; SALERNO, G. L.; CURATTI, L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140–147, 2017. doi:10.1016/j.algal.2016.12.021

SILVA, M. E. T. DA; CORREA, K. DE P.; MARTINS, M. A.; DA MATTA, S. L. P.; MARTINO, H. S. D.; COIMBRA, J. S. DOS R. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 65, 103711, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103711>

SMETANA, S.; SANDMANN, M.; ROHN, S.; PLEISSNER, D.; HEINZ, V. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 162–170. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.11

Vu, C. H. T., Lee, H.-G., Chang, Y. K., & Oh, H.-M. (2018). Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. *Biotechnology Advances*, 36(2), 380–396. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.018

VU, C. H. T.; LEE, H.-G.; CHANG, Y. K.; OH, H.-M. Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 380–396, 2018. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.018

Wellburn, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994. doi:10.1016/s0176-1617(11)81192-2

YAP, B. H. J.; DUMSDAY, G. J.; SCALES, P. J.; MARTIN, G. J. O. (2015). Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 280–285, 2015. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.049

ZHANG, R.; GRIMI, N.; MARCHAL, L.; LEBOVKA, N.; VOROBIEV, E. Effect of ultrasonication, high pressure homogenization and their combination on efficiency of extraction of bio-molecules from microalgae *Parachlorella kessleri*. **Algal Research**, v. 40, 101524, 2019. doi:10.1016/j.algal.2019.101524

ZHANG, R.; LEBOVKA, N.; MARCHAL, L.; VOROBIEV, E.; GRIMI, N. Pulsed electric energy and ultrasonication assisted green solvent extraction of bio-molecules from different microalgal species. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 102358, 2020. doi:10.1016/j.ifset.2020.10

CAPÍTULO 3 – ROMPIMENTO CELULAR DE *Tetrademus obliquus* POR ULTRASONICAÇÃO E MOAGEM PARA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PIGMENTOS E LIPÍDIOS

José Roberto Miranda Júnior ^a, Jane Sélia dos Reis Coimbra ^a, César A. Sodré da Silva ^a Marcio Arêdes Martins ^b

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos, ^b Departamento de Engenharia Agrícola

^{a,b} Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 36570-900

RESUMO

O presente estudo avaliou o rompimento celular pelo processo de ultrasonica o em ultrassom de ponteira e moagem em moinho de bolas. A ultrasonica o das suspensões foi otimizada de acordo com os parâmetros de processo: potência (Pu), concentra o das suspensões (Cs) e tempo de ultrasonica o (tu) através de um experimento fatorial segundo o planejamento de superfície de resposta descrito por Box e Behnken. A moagem foi otimizada através de um delineamento composto central rotacional para os parâmetros operacionais de tempo de moagem (tm) e massa de biomassa seca no cilindro do moinho (M_b). Os teores de pigmentos (clorofila-a, clorofila-b, betacaroteno e carotenoides totais) e lipídios foram avaliados como possíveis indicadores de rompimento celular nos dois processos de rompimento. Os pigmentos foram obtidos por meio de extra o líquido-líquido em acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol. Clorofilas e carotenoides foram quantificados por espectrofotometria. Extrato de carotenoides em acetona foi evaporado e o teor de betacaroteno foi quantificado por espectroscopia Raman. O maior teor de clorofila-a obtido nesse estudo foi de cerca (1.72g/100g) em extrato de pigmentos em acetona, em condi es ideais de processamento de moagem com tempo ótimo de processo de 46 min e a massa de biomassa utilizada foi de cerca de 9.25 g, correspondente a 30.24 % do volume útil do cilindro do moinho. Através de biomassa oriunda de ultrasonica o em condi es ótimas de opera o com cerca de (Pu= 475 w e tu= 13 min) obteve-se cerca de (1.0g/100g) de clorofila-b em extrato de pigmentos em etanol. Carotenoides totais com teor de (0.51g/100g) foi quantificado em extrato de pigmentos em acetona em condi es ótimas de moagem de cerca de 46 min de processo e 13 g de biomassa. Foi possível extrair de extrato de carotenoides oriundos de biomassa ultrasonicada, cerca de (1.55 g/g) de betacaroteno em condi o otimizada, com potência de 475 W e tempo de processo de 13 minutos, apresentando R²= 0.96. Para moagem, foi possível extrair cerca de

(1.50 µg/g) com tempo de moagem de cerca de 46 min e cerca de 13 g de biomassa (43.33%) do volume útil do cilindro do moinho). Para moagem, foi quantificado o maior teor de lipídios do presente estudo, cerca de (4.65 g/100g) nas condições operacionais de tempo de 46 minutos e 9g de biomassa no cilindro do moinho. Esse valor corresponde a uma eficiência de rompimento estimada de cerca de 32.96%. Pelos resultados observados estatisticamente pela análise de variância pelo teste de Tukey, observou-se diferença significativa ($p < 0.05$) ao nível de 5% de significância entre os tratamentos para teores de pigmentos e lipídios, tanto para o processo de moagem quanto para o processo de ultrasonicação. Portanto, podemos inferir que esses biocompostos podem ser utilizados como indicadores de rompimento celular, evidenciando que a taxa de rompimento celular é dependente dos parâmetros operacionais escolhidos.

Palavras-chave: Microalgas. Ruptura. Otimização. Separação. Metabólitos.

1. INTRODUÇÃO

Microalgas são definidas como microrganismos unicelulares aquáticos que podem ser encontrados em sistemas de água doce e marinhos e são capazes de realizar fotossíntese (DANESHVAR et al., 2018). Microalgas apresentam uma diversidade morfológica bastante variada, podendo ser encontradas em muitas formas e tamanhos, variando de três a dez micrômetros (VU et al., 2018). As microalgas apresentam taxas de crescimento elevadas e eficiência fotossintética. Elas também se apresentam como substrato rico em componentes bioativos, tais como proteínas, lipídios, ácidos graxos poliinsaturados, carboidratos, pigmentos e polifenóis (MAKRI et al., 2011; KHANRA et al., 2018), que podem ser usados em alimentos para consumo humano, rações, cosméticos, indústrias farmacêuticas e de biocombustíveis (ARIEDE et al., 2017).

Atualmente, o interesse crescente em microalgas tem sido focado no desenvolvimento de tecnologias emergentes para a recuperação total de biomoléculas (KHANRA et al., 2018; RAHEEM et al., 2018). No entanto, esses compostos são envoltos em vacúolos intracelulares e cloroplastos, protegidos pelas paredes e membranas celulares rígidas das microalgas (PARNIAKOV et al., 2015), limitando muito sua recuperação durante o processo de extração. Microalgas do gênero *Tetradismus obliquus* possui em sua constituição uma estrutura celular complexa de três camadas, uma camada interna de celulose que delimita a célula, uma fina camada média à base de algaenan e uma camada externa de pectina unindo as células em cenóbio (BISALPUTRA; WEIER, 1963).

Métodos eficazes de recuperação de conteúdo intracelular de microalgas têm sido relatados em estudos recentes. Esses métodos podem ser químicos, enzimáticos ou diferentes tratamentos físicos, como ultrassom (US), microondas, campos elétricos pulsados e tensões mecânicas (homogeneização de alta pressão (HAP), moagem por esferas (MB) e outros) (LUENGO et al., 2015; PARNIAKOV et al., 2015). A eficiência de aplicação de HAP e MB podem ser explicados por cisalhamento de alta pressão, alongamentos, turbulências e cavitações (ZHANG et al., 2019). Samarasinghe et al. (2012) utilizaram homogeneização de alta pressão para quantificar o grau de quebra de células de algas e como um pré-tratamento para a extração lipídica com solvente. Montalescot et al. (2015) estudaram a ruptura celular por moagem de esferas para duas microalgas, *Nannochloropsis oculata* e *Porphyridium cruentum*. Postma et al. (2015) estudaram desintegração da microalga *Chlorella vulgaris* para a liberação de biocompostos por meio da moagem de esferas, as suspensões de microalgas foram desintegradas em diferentes concentrações de biomassa (25-145 g de biomassa seca/kg) em

uma faixa de velocidades do agitador (6-12 m/s). Em todos os casos, mais de 97% da desintegração celular foi alcançada, resultando em uma liberação de água e proteínas solúveis.

O ultrassom utiliza um transdutor que gera ondas com frequências acima de 20 kHz através da conversão de energia elétrica em energia mecânica. Através de um fenômeno denominado cavitação, os efeitos causados pelas ondas ultrassônicas criam um ciclo de bolhas de gás e cavidades no solvente líquido (VARDANEGA et al., 2014). Quando ocorre o colapso das bolhas, são geradas ondas de energia muito elevadas na zona de cavitação. O impacto gerado pela energia desse processo sobre a superfície sólida, quando este ocorre nas proximidades da parede celular da matriz vegetal ou microalgal, aumenta a permeabilidade da parede celular, favorecendo a entrada do solvente. O resultado desse processo implica no aumento do processo de difusão e da transferência de massa, respectivamente (PATIST; BATES, 2008). Gerde et al. (2012) avaliaram condições de sonicação para quebrar células de (*Schizochytrium limacinum*) e células de microalgas autotróficas (*Chlamydomonas reinhardtii*).

No processo de obtenção de metabólitos intracelulares, tem-se usado desde técnicas mais antigas (por exemplo, maceração) até técnicas de extração convencionais (por exemplo, *Soxhlet*) no caso de extração lipídica, em que são utilizados grandes volumes de solventes aquosos ou orgânicos, dependendo da polaridade dos compostos alvo (LUENGO et al., 2015). Esses métodos apresentam algumas desvantagens, como sua pequena escala, longo tempo de extração e baixa eficiência de processo, a coextração de componentes indesejáveis e requerem etapas de separação a jusante mais complexas (POOJARY et al., 2016).

Visando aumentar a extração de pigmentos e lipídios, foi proposto nesse estudo o uso de ultrassom e moinho de bolas como técnicas para rompimento celular de *Tetrademus obliquus* e a otimização dos parâmetros de processo de moagem e ultrasonicação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Matéria-prima

A microalga *Tetrademus obliquus* BR003 utilizada nesse estudo foi cedida pelo Laboratório de Biocombustíveis (LBC) do Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Estado de Minas Gerais, com um teor de cerca de 6 % em massa de sólidos.

O material foi congelado a -80° C e liofilizado por 48 horas, atingindo umidade final de cerca de 8.0 % (m/m). A biomassa seca material foi macerada e peneirada em peneira analítica

(Granutest) com abertura de 30 mesh (0.59 mm). Durante o estudo a biomassa foi acondicionada em frascos âmbar a temperatura ambiente.

2.2. Reagentes

Os principais reagentes utilizados neste estudo foram: Acetona (99.8% de pureza) e DMSO (99.7% de pureza) fornecidos pela Sigma–Aldrich (Alemanha). O álcool etílico anidro ($\geq 98.0\%$ de pureza) foi adquirido da Fisher Scientific (Bélgica). Óleo mineral de alta pureza adquirido junto à (Farmacêutica Nativita, Brasil). O betacaroteno comercial (99.9% de pureza) foi fornecido pela Sigma–Aldrich (EUA). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico e foram usados sem purificação adicional.

2.3. Composição centesimal da microalga *Tetrademus obliquus* BR003

A biomassa liofilizada foi caracterizada quanto à sua composição química (AOAC, 2005), pela quantificação de umidade (925,09), cinzas (923,03), proteínas (920,87) com fator de conversão de (4,5) (SOUZA et al., 2020). A fibra alimentar solúvel e a fibra alimentar insolúvel foram quantificadas de acordo com o método enzimático-gravimétrico (985,29) (AOAC, 2005). O teor de carboidratos foi obtido pelo método de Dubois (DUBOIS et al. 1951). O teor de lipídios totais foi quantificado de acordo com a metodologia proposta por J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Os teores de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais foram quantificados de acordo com a metodologia adaptada descrita por Wellburn (1994). O teor de betacaroteno foi quantificado de acordo com metodologias adaptadas descritas em estudos realizados por Pilát (2012). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4. Delineamento experimental

Para a modelagem e otimização da ultrasonicação e moagem, utilizou-se um modelo quadrático. Os modelos empíricos são polinômios de segunda ordem, em que a resposta \hat{y} é relacionada às variáveis x_i através da equação 1.

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

Em que k o número de variáveis, β_0 o termo constante, β_i , β_{ij} e β_{ii} são os parâmetros de regressão para os efeitos dos coeficientes linear, de interação e quadrático, respectivamente e ε refere-se ao resíduo, isto é, a diferença entre a resposta obtida experimentalmente e a resposta prevista pelo modelo (DAS; GOUD, 2017; DING et al., 2016; HE et al., 2016). Interações não significativas foram removidas da equação.

2.4.1. Delineamento experimental para ultrasonicação (USN)

Para otimização do processo de ultrasonicação da biomassa microalgal, realizou-se um experimento fatorial segundo o planejamento de superfície de resposta desenvolvido por *Box e Behnken*, onde os fatores tempo (t_u), potência ultrassônica (P_u) e concentração das suspensões (C_s) foram avaliados em três níveis codificados como baixo (-1), médio (0) e alto (+1) (Tabela 3.1). Foram gerados 15 ensaios para três variáveis em três níveis, com dois pontos axiais cada, incluindo três repetições do ponto central. Como variáveis resposta, foi quantificado o teor de pigmentos (clorofila-a, clorofila-b, carotenoides totais e betacaroteno) e lipídios. As análises foram efetuadas em triplicata.

Tabela 3.1. Modelo experimental dos níveis das variáveis do modelo de Box e Behnken.

Variável, unidade	Fatores		Níveis	
	X	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
Tempo, min	t_u	5	9	13
Potência, W	P_u	375	425	475
Concentração, %	C_s	5	7	9

*Variável independente fixa, frequência - 20 kHz.

2.4.2. Delineamento experimental para moagem (MB)

Para a otimização da moagem utilizou-se a técnica de superfície de resposta com delineamento composto central rotacional (DCCR) com fatorial $2k + (2k+1)$ e com 2 fatores

independentes, biomassa (C_b) e tempo de moagem (t_m), com quatro níveis cada um, dois pontos axiais adicionados em cada fator, totalizando 13 tratamentos com 5 repetições do ponto central (Tabela 3.2). As análises foram efetuadas em triplicata.

Tabela 3.2. Modelo experimental dos níveis das variáveis selecionadas do DCCR.

Variável, unidade	Fatores		Níveis			
	X	-1.41	-1	0	1	1.41
Biomassa, g	M_b	4.76	6.0	9.0	12.0	13.24
Tempo de moagem, min	t_m	3.8	10.0	25.0	40.0	46.2

*Variáveis independentes fixas- velocidade do agitador e a potência do moinho. Volume útil do moinho – 100 mL

2.5. Extração e quantificação de biocompostos como indicadores de rompimento celular

Visando estudar o efeito do rompimento celular, a quantificação do teor de biocompostos foi determinada para avaliar o comportamento dos tratamentos. Foi observada a variação do conteúdo dos metabólitos em função das interações dos parâmetros de processo com a finalidade de observar possíveis indicadores de lise celular.

2.5.1. Extração e quantificação de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais

As extrações de pigmentos foram realizadas após o rompimento das células das microalgas de acordo com os ensaios gerados pelo delineamento experimental proposto. A metodologia utilizada foi adaptada de Wellburn, 1994 para extrato de carotenoides em acetona, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO). As extrações ocorreram com a adição de cerca de 33.33 mg de microalga em 10 mL de solvente (acetona, etanol e DMSO) durante 12 horas no escuro e em temperatura ambiente. O material foi filtrado (Papel filtro qualitativo Whatman n°1) e esse procedimento foi denominado de (EXT-PIG 1).

A quantificação foi realizada por espectrofotometria (Shimadzu, Modelo 1800, Japão) através de equações empíricas descritas para clorofila-a (C_a) e clorofila-b (C_b) e carotenoides totais (C_c) de acordo com a Tabela (3.3).

Tabela 3.3. Equações para determinação das concentrações de clorofila-a (Ca), clorofila-b (Cb) e carotenoides totais (Cc) em µg/mL em função do solvente de extração.

Solventes	Equações empíricas	Referências
Acetona (80%)	Ca [µg/ml] = $12.25_{A\ 663.2} - 2.79_{A\ 646.8}$	(LICHTENTHALER, 1987; WELLBURN, 1994)
	Cb [µg/ml] = $21.50_{A\ 646.8} - 5.10_{A\ 663.2}$	
	Cc [µg/ml] = $1000_{A\ 470} - 1.82Ca - 85.02Cb/198$	
Etanol (95%)	Ca [µg/ml] = $13.36_{A\ 664.2} - 5.19_{A\ 648.6}$	(LICHTENTHALER, 1987)
	Cb [µg/ml] = $27.43_{A\ 648.6} - 8.12_{A\ 664.2}$	
	Cc [µg/ml] = $(1000_{A\ 470} - 2.13Ca - 97.64Cb)/209$	
DMSO	Ca [µg/ml] = $12.19_{A\ 665} - 3.45_{A\ 649}$	(WELLBURN,1994)
	Cb [µg/ml] = $21.99_{A\ 649} - 5.32_{A\ 665}$	
	Cc [µg/ml] = $(1000_{A\ 480} - 2.14Ca - 70.16Cb)/220$	

*A – Absorbância das amostras em seus respectivos comprimentos de onda

A conversão dos teores de pigmentos quantificados com concentrações em µg/mL para (mg de pigmento /100 mg de microalgas) foi efetuada usando-se o volume total do extrato e a massa de biomassa inicial, Equação (2).

$$\% (mg/100mg) = 100 \frac{C.V.10^{-3}}{m} \quad (2)$$

Em que C é a concentração de clorofila-a, clorofila-b ou carotenoides totais (µg/mL), V é o volume total do extrato (mL) e m é a massa de microalgas (mg).

2.5.2. Extração e quantificação de betacaroteno

A quantificação do conteúdo de betacaroteno foi efetuada indiretamente através de uma curva de calibração de betacaroteno comercial em óleo mineral de alta pureza e as amostras foram preparadas a partir de extrato de pigmentos em acetona.

2.5.2.1. Preparo das amostras para quantificação de betacaroteno

O EXT-PIG 1 em acetona foi transferido para béquer de 50 ml e a acetona foi totalmente evaporada em banho Maria (Solab, SL-153) durante 6 h no escuro a uma temperatura de 30°C. Posteriormente adicionou-se 4 ml de óleo mineral comercial de alta pureza ao extrato seco sob agitação (4 rpm) em banho Dubnofft (Tecnal, TE-053) durante 12 horas no escuro a temperatura de 25 °C. O extrato seco contendo carotenoides foi totalmente diluído no óleo (Figura 3.1).

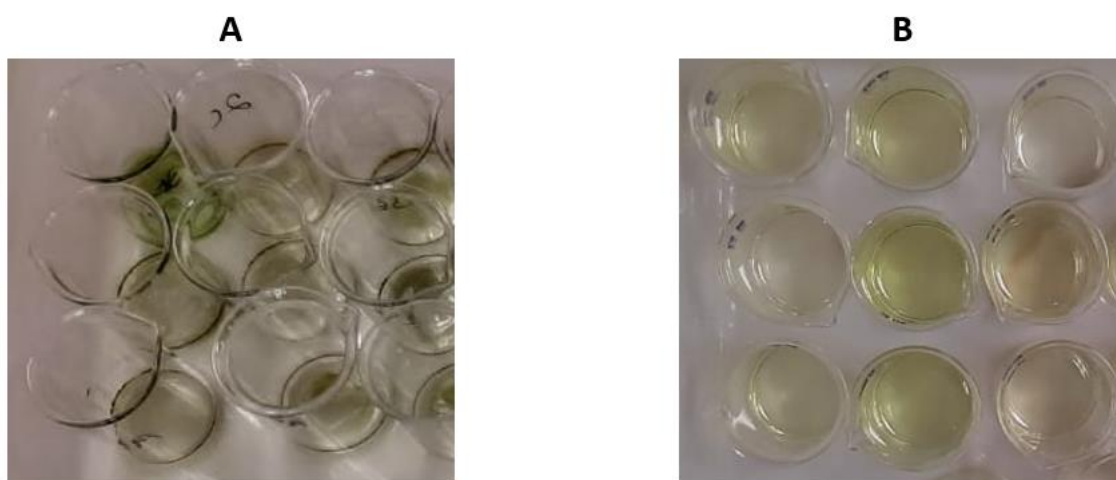


Figura 3.1. Extrato de carotenoides em acetona para quantificação de betacaroteno. (A) Extrato seco de carotenoides e (B) Extrato de carotenoides diluídos em óleo mineral.

2.5.2.2. Construção da curva de calibração a partir de betacaroteno comercial

Para caracterização dos espectros característicos do betacaroteno, utilizou-se uma solução estoque de betacaroteno comercial (Sigma-Aldrich Corp., USA) em óleo mineral de alta pureza a 1 g/L e realizou-se uma varredura na região espectral de distância Raman compreendida entre (800 a 3050 cm^{-1}) relatada nos estudos de (Pilát et al., 2012) como prováveis regiões para detecção de sinais Raman, característicos de betacaroteno. Para análise por espectroscopia Raman utilizou-se um espectrômetro Raman (Microraman - Invia Renishaw) com laser de 514 nm, objetiva de 20x e tempo de exposição da amostra ao laser de 5 segundos. Os dados dos sinais Raman de cada ensaio experimental foram gerados a partir da média de 10 acumulações. Para construção da curva de calibração tomou-se alíquotas da solução estoque para preparo de diluições, resultando-se em soluções padrões com concentrações de betacaroteno de (0.000 a 0.007) g/L. A equação da curva de calibração gerada

através das concentrações de betacaroteno em função dos sinais Raman é uma função linear com coeficiente de correlação (R^2) (Equação 3).

$$y = ax \pm b \quad (3)$$

Em que y é a intensidade do sinal Raman (A.U.) e x é concentração de betacaroteno ($\mu\text{g/g}$).

2.5.3. Extração e quantificação de lipídios totais em biomassa rompida

A extração lipídica foi efetuada de acordo com a metodologia proposta por Hara e Radin (1978). A partir de uma mistura ternária de hexano-álcool-água foi possível extrair lipídios de biomassa rompida de *T. obliquus*. Para o procedimento pesou-se cerca de 0.5 g de amostra liofilizada efetuando hidratação em 10 mL de água destilada em tubo *Falcon* de 50 mL por 3 horas. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de etanol e 20 mL de hexano sob agitação em vortex (AP56, Phoenix Lufenco, USA) por 5 minutos. Após centrifugação (Centrífuga 5418, Eppendorf, USA) a 5000g por 5 minutos, o sobrenadante com hexano contendo a fração lipídica foi retirado e transferido para um béquer de 50 mL. Ao fim de cada processo, um novo volume de 20 mL de hexano foi adicionado aos tubos e repetiu-se os procedimentos de agitação e centrifugação, totalizando 4 repetições. O hexano foi evaporado a 70°C em chapa aquecedora (Marconi 085 - CT) em capela com sistema de exaustão. A quantificação do teor de lipídios se deu através da equação (4).

$$\text{Lipídios totais (g/100g)} = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

Em que P_i é a massa inicial da biomassa (g) e P_f é a massa final do extrato lipídico seco (g).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Caracterização da biomassa de *Tetrademus obliquus* BR003

A tabela 3.4 apresenta os resultados para caracterização físico-química de biomassa seca de *Tetrademus obliquus*. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 3.4. Composição centesimal da microalga *Tetrademus obliquus* BR00.

Componentes	g/100g
Umidade	7.9270 ±0.6657
Proteínas (fator de 4.5)	37.0159 ±3.7381
Lipídios totais	14.1047 ±0.4721
Cinzas	16.4696 ±2.1612
Carboidratos totais	29.7648 ±3.0583
Fibras totais	18.7639 ±2.9914
Fibras solúveis	3.4826 ±0.9602
Fibras insolúveis	15.2813 ±2.0312
*Pigmentos	
Clorofila a	1.7264 ±0.1520
Clorofila b	1.0000 ±0.3213
Betacaroteno (µg/g)	1.5500 ±0.0125
Carotenoides totais	0.5333 ±0.2147

*Maiores resultados observados para diferentes solventes

O maior teor de metabólito foi observado para proteínas totais, cerca de (37.02 %). Esse valor foi próximo ao encontrado por (Silva et al., 2020), cerca de (40.42 %) de proteína, utilizando o mesmo fator de conversão (4.5). Afify et al. (2018) encontraram cerca de (40.69 %) de proteína em biomassa de *Scenedesmus obliquus* (atual *Tetrademus obliquus*). Superestimação na quantificação do conteúdo proteico de microalgas podem estar associados a quantificação de nitrogênio não proteico derivado de várias fontes, principalmente da ureia presente no meio de cultura (L4-m) como principal fonte de nitrogênio durante o cultivo da microalga. Alto teor de cinzas (cerca de 16.50 %) encontrado nesse estudo, também podem estar associados ao meio de cultura que além da ureia é composto por elevada concentração de outros fertilizantes inorgânicos, tais como, cloreto de potássio, sulfato de magnésio heptaidratado, sulfato de ferro monoidratado (ROCHA, 2019).

No presente estudo foi possível quantificar cerca de (14.11 %) de lipídios totais pela metodologia de J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION,

1986). Vieira (2020) quantificou cerca de (15.00 %) de lipídios em biomassa seca de *Scenedesmus obliquus*, valor similar ao encontrado no presente trabalho. Shin et al. (2014) encontraram cerca de (14.50 %) de lipídios em biomassa de *S. obliquus*, no entanto, utilizando o método de Bligh e Dyer (1959). Para fibras foi quantificado cerca de 3.48 % de fibras solúveis e 15.28 % de fibras insolúveis. Silva et al. 2020 relataram teores de cerca de 3.14 e 16.23 % para fibras solúveis e insolúveis, respectivamente.

3.2. Extração e quantificação de pigmentos e lipídios

3.2.1. Teores de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais

As tabelas (3.5 e 3.6) apresentam os resultados para teores de pigmentos extraídos com acetona, etanol e DMSO e seus respectivos ensaios experimentais realizados para moagem e ultrasonicação, respectivamente. É perceptível que os teores de pigmentos quantificados aumentam à medida que os valores dos parâmetros de processo aumentam, tanto para ultrassom quanto para moinho de bolas. Justifica-se inferir que o rompimento celular se acentua à medida que condições mais severas de potência e tempo de processo são aplicadas na ultrasonicação e tempo de moagem para ruptura em moinho de bolas. Dentro dessa perspectiva, quantificação de pigmentos podem ser utilizadas como um indicativo de rompimento celular de *Tetradasmus obliquus*.

Tabela 3.5. Resultados encontrados para teores de pigmentos através de extração com acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol para biomassa oriunda de moagem.

Ensaio	Parâmetros		Acetona			DMSO			Álcool		
	Tempo	Biomassa	Ca	Cb	Cc	Ca	Cb	Cc	Ca	Cb	Cc
	(min)	(g)	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
1	10.00	6.00	1.3120	0.5077	0.1724	1.1815	0.5691	0.1498	0.6989	0.3191	0.1179
2	10.00	12.00	1.2121	0.4934	0.1579	1.1796	0.6524	0.1413	0.5640	0.2616	0.1172
3	40.00	6.00	1.7088	0.8430	0.2960	1.1965	0.6387	0.1840	0.7273	0.3283	0.1241
4	40.00	12.00	1.6907	0.6564	0.2876	1.2242	0.7241	0.1766	0.8256	0.3692	0.1391
5	3.79	9.00	1.1649	0.4925	0.1092	1.0822	0.5468	0.1233	0.8857	0.6451	0.1497
6	46.21	9.00	1.7203	0.9138	0.3270	1.2450	0.6372	0.2151	0.8277	0.3709	0.1419
7	25.00	4.76	1.5886	0.5490	0.2582	1.2023	0.5866	0.1796	0.8635	0.3946	0.1421
8	25.00	13.24	1.5276	0.5374	0.2327	1.3789	0.6194	0.1582	0.8177	0.3689	0.1388
9	25.00	9.00	1.5869	0.6282	0.2465	1.5025	0.6846	0.1670	0.8073	0.3641	0.1382
10	25.00	9.00	1.5838	0.5920	0.2467	1.5236	0.6757	0.1662	0.7963	0.3623	0.1375
11	25.00	9.00	1.5828	0.5833	0.2599	1.5631	0.7000	0.1709	0.7331	0.3314	0.1315
12	25.00	9.00	1.5819	0.5686	0.2539	1.4784	0.6624	0.1786	0.7658	0.3471	0.1326
13	25.00	9.00	1.5801	0.6006	0.2506	1.5076	0.6508	0.1644	0.4163	0.2019	0.0973

*Ca – clorofila-a, Cb - clorofila-b e Cc - carotenoides totais.

Tabela 3.6. Resultados encontrados para teores de pigmentos através de extração com acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol para biomassa oriunda de ultrasonicação.

Ensaio	Parâmetros			Acetona			Álcool			DMSO		
	Tempo (min)	Potência (w)	Concentração (% m/v)	Ca g/100g	Cb g/100g	Cc g/100g	Ca g/100g	Cb g/100g	Cc g/100g	Ca g/100g	Cb g/100g	Cc g/100g
1	5	375	7	1.1823	0.4716	0.4326	0.9281	0.7173	0.0357	0.5082	0.2958	0.0347
2	13	375	7	1.3919	0.5554	0.4656	1.0522	0.8350	0.0783	0.7852	0.3432	0.2055
3	5	475	7	1.4815	0.5495	0.4747	1.0437	0.8087	0.0654	0.7685	0.3195	0.2191
4	13	475	7	1.6544	0.7104	0.5378	1.1737	0.9573	0.1570	1.0628	0.5587	0.4354
5	5	425	5	1.3285	0.5247	0.4370	1.0091	0.7719	0.0720	0.6850	0.3147	0.1111
6	13	425	5	1.4924	0.6089	0.4788	1.1410	0.9338	0.1150	0.9460	0.4434	0.2682
7	5	425	9	1.3441	0.5235	0.4437	1.0181	0.7952	0.0644	0.6716	0.3111	0.0936
8	13	425	9	1.4366	0.5932	0.4707	1.1375	0.8725	0.1137	0.8744	0.4066	0.2572
9	9	375	5	1.3052	0.4797	0.4361	0.9651	0.7667	0.0601	0.6714	0.2956	0.0933
10	9	475	5	1.5944	0.6780	0.5204	1.1666	0.9572	0.1520	0.9719	0.4884	0.3034
11	9	375	9	1.2418	0.5193	0.4339	0.9521	0.7572	0.0526	0.6503	0.2760	0.0925
12	9	475	9	1.5578	0.6326	0.5145	1.1601	0.9481	0.1303	0.9298	0.4868	0.3020
13	9	425	7	1.4061	0.5763	0.4672	1.1275	0.8500	0.1101	0.8669	0.3702	0.2299
14	9	425	7	1.4136	0.5885	0.4593	1.1127	0.8369	0.1109	0.8775	0.3690	0.2314
15	9	425	7	1.4349	0.5923	0.4611	1.1379	0.8688	0.1110	0.8861	0.3944	0.2246

*Ca - clorofila -a, Cb - clorofila-b e Cc - carotenoides totais

Na quantificação dos teores de clorofila-a de extrato de pigmentos em acetona, foi obtido cerca de (1.72g/100g) do pigmento, em condições otimizadas do processamento da moagem o tempo ótimo de processo foi de cerca de 46 minutos e a massa de biomassa utilizada foi de cerca de 9.25 g, correspondente a 30.24 % do volume útil do cilindro do moinho (Figura 3.2). Teores de clorofila-a de extrato de pigmentos em DMSO de cerca de (1.52g/100g) foram obtidos em condições de processo de ($t_m = 26.48$ min e $M_b = 9.43$ g), correspondente a cerca de 31.43 % do volume útil ocupado no cilindro do moinho. O ajuste do modelo dado pelo coeficiente de correlação foi de ($R^2 = 0.95$).

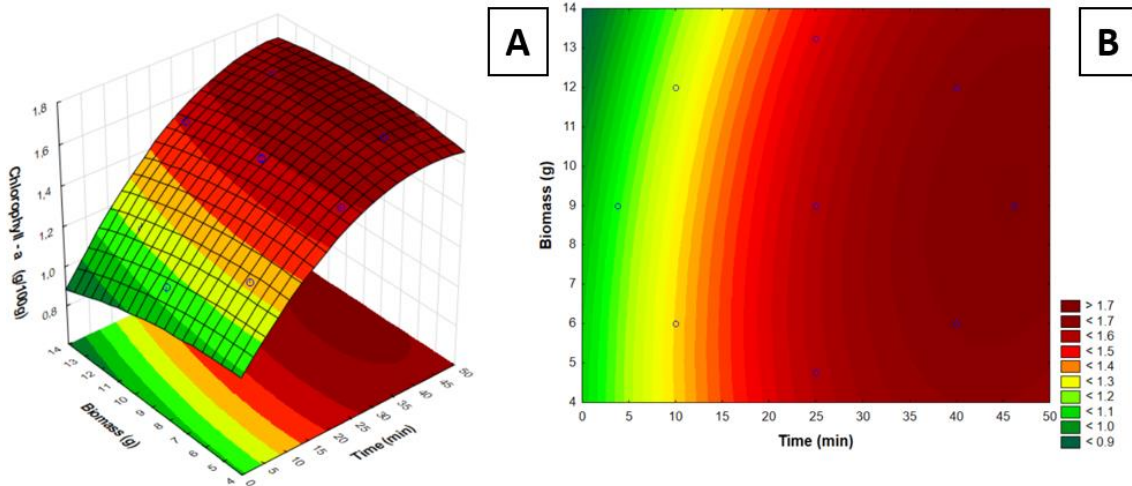


Figura 3.2. Otimização da moagem a partir da determinação do teor de clorofila-a extraída com acetona: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

Para ultrasonicação obteve-se cerca de (1.60g/100g) de clorofila-a para ($T_u = 13$ min e $P_u = 470$ W) no processo otimizado em extrato de pigmentos em acetona. O ajuste do modelo otimizado nessas condições operacionais apresentou coeficiente de correlação de ($R^2 = 0.96$).

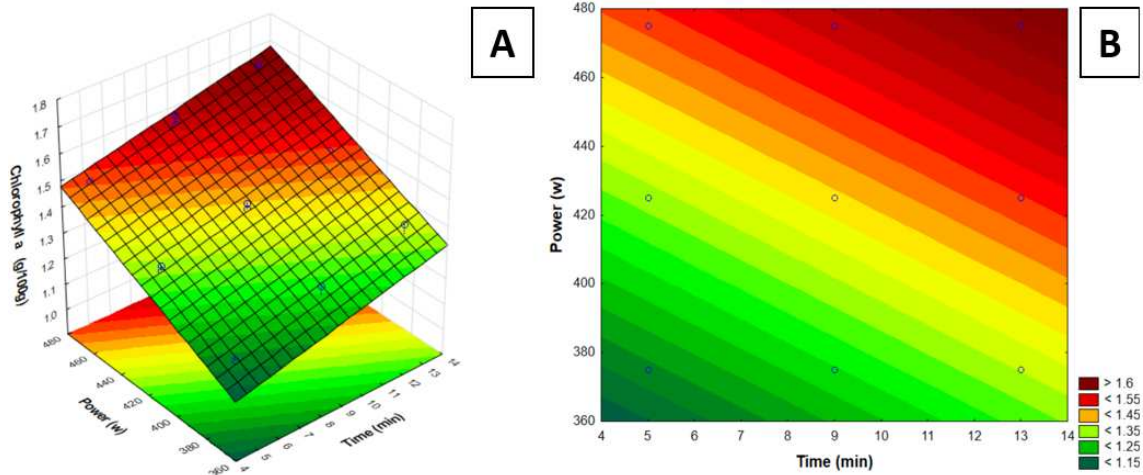


Figura 3.3. Otimização da ultrasonicação a partir da determinação do teor de clorofila-a extraída com acetona: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

Teor de clorofila-b de cerca de (1.0g/100g) foi quantificado em extrato de pigmentos em etanol de biomassa ultrasonicada em condições ótimas de operação com cerca de ($P_u=475W$ e $t_u=13$ min) (Figura 3.4). O ajuste do modelo foi avaliado através do coeficiente de correlação ($R^2=0.90$), como aceitável. Para extrato de pigmentos em DMSO oriundos de ultrasonicação, cerca de (1.0g/100g) de clorofila-b foi quantificada em condições de processo de ($P_u=475W$ e $t_u >13$ min) com ($R^2=0.85$).

Para moagem, em condições ótimas de processo foi possível extrair e quantificar cerca de (1.0g/100g) de clorofila-b em extrato de pigmentos em acetona, no entanto, apesar de um coeficiente de correlação ($R^2=0.96$), esse teor de clorofila-b só é possível quando as condições ótimas de operação superam os limites dos valores máximos observados para o delineamento.

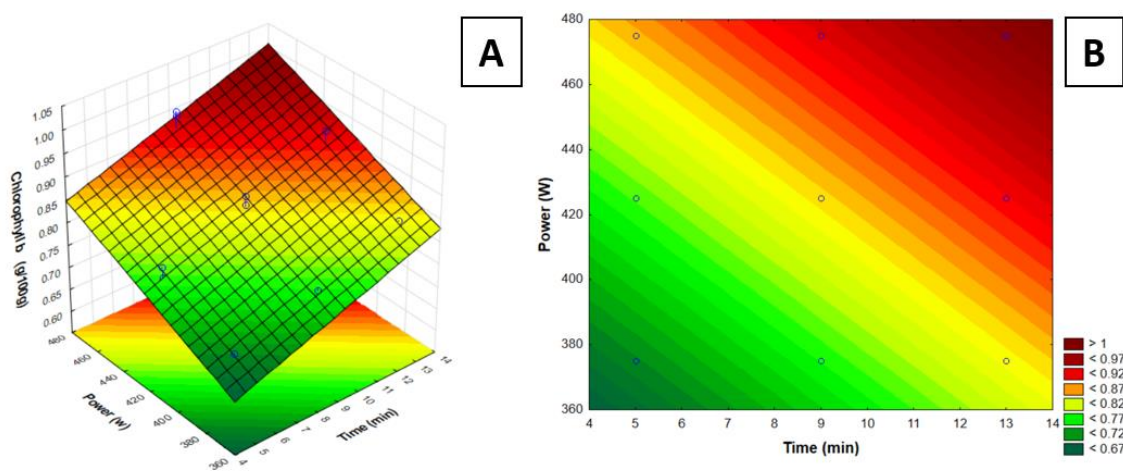


Figura 3.4. Otimização da ultrasonicação a partir da determinação do teor de clorofila-b extraída com acetona: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

Teor de carotenoides totais de cerca de (0.51g/100g) foram quantificados em extrato de pigmentos em acetona em condições ótimas de processo de ultrasonicação de cerca de ($P_u=460\text{W}$ e $t_u=11.6\text{ min}$) com ($R^2=0.98$) (Figura 3.5). Teor de carotenoides totais de cerca de (0.32g/100g) foi quantificado para extrato de pigmentos em acetona com condições ótimas de moagem de cerca de 46 min de processo e 13 g de biomassa, ocupando cerca de 43.40 % do volume útil do cilindro do moinho. O ajuste do modelo aos dados experimentais apresentou um ($R^2=0.98$).

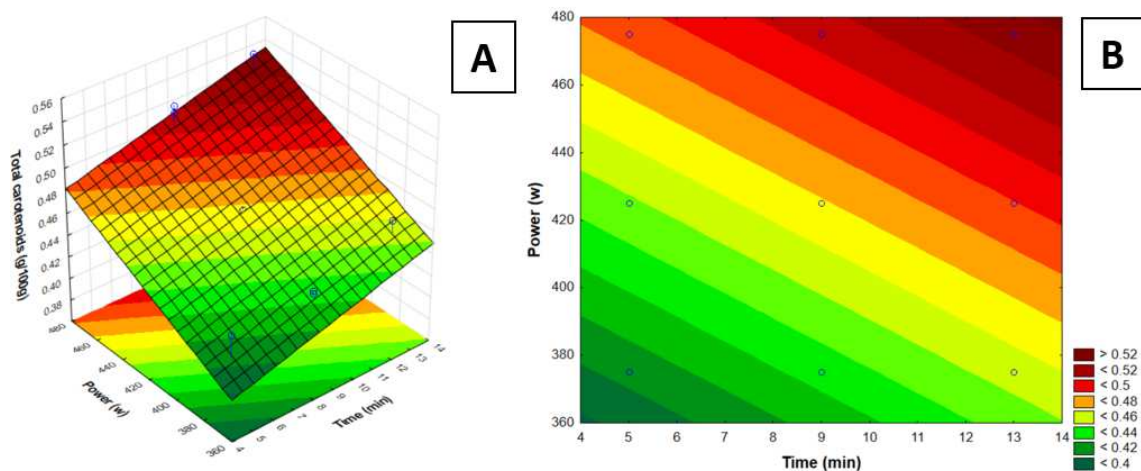


Figura 3.5. Otimização da ultrasonicação a partir da determinação do teor de carotenoides totais extraídos com acetona: (A) Superfície de resposta e (B) Curva de contorno.

O solvente que apresentou melhor rendimento de extração para pigmentos foi a acetona, com exceção para clorofila-b oriunda de biomassa ultrasonificada, no qual, o solvente de extração foi o etanol.

Em moinho de bolas a carga de biomassa utilizada no processo deve ser considerada para melhor rendimento de moagem. Richmond (2013) considerou que uma carga geralmente entre 80-90% do volume livre do compartimento de abrasão é considerada ótima. Segundo Wills et al. (2006) moinhos de bolas devem operar com uma porcentagem de sólidos, em peso, em torno de 65 a 80% do volume útil da câmara do moinho, dependendo do tipo de biomassa. Moinhos com mais de duas esferas, geralmente requer maior volume ocupado, devido ao atrito entre as esferas, que provoca aquecimento excessivo e podem degradar biocompostos (D'HONDT et al., 2017). No presente estudo foi observado compactação indesejada na biomassa com uso de volume acima de 50% do volume útil do moinho (Figura 3.6). A compactação de biomassa rompida afetou no tempo de extração de pigmentos devido à barreira

formada entre o solvente e o biocomposto de interesse. Logo, foi necessário a redução de volume útil ocupado para valores abaixo de 50%, o que foi possível por se tratar de um moinho de uma esfera.

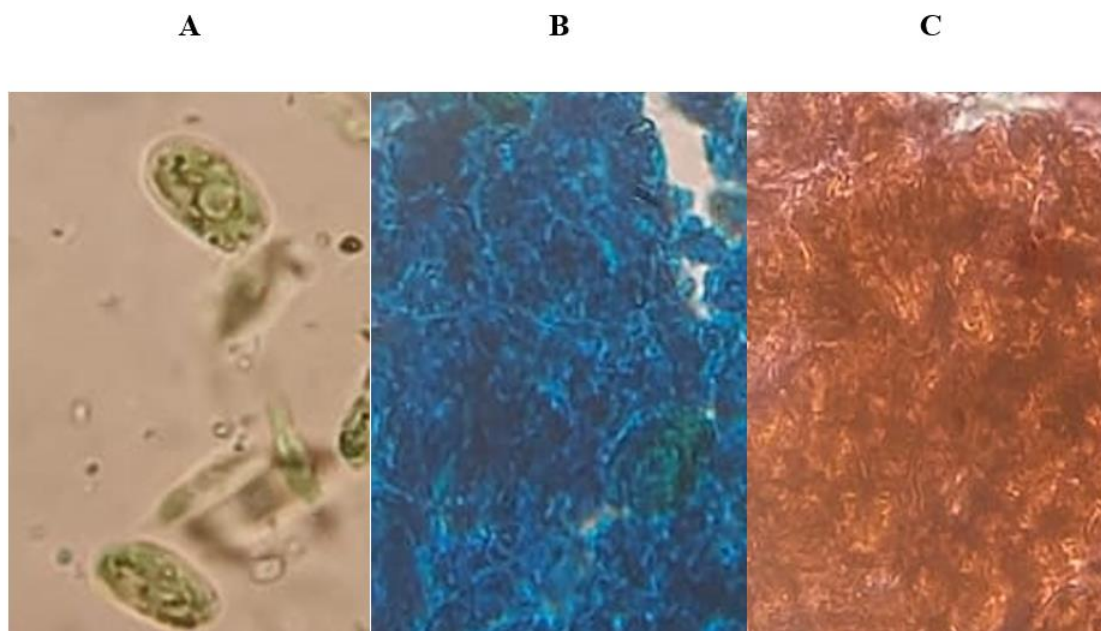


Figura 3.6. Compactação de biomassa durante a moagem analisada em microscópio óptico em objetiva (100X). (A) Biomassa padrão sem ruptura celular, (B) Biomassa rompida e corada com *coomassie brilliant blue* e (C) Biomassa rompida corada com eritrosina B.

Foi observado estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância, que existe diferença significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos mais severos (nível alto do delineamento) e os tratamentos mais brandos (nível baixo do delineamento) para moagem e ultrasonicação. Portanto, pode-se afirmar que os tratamentos influenciaram no teor de biocompostos extraídos, podendo, portanto, ser utilizados como possíveis indicadores de rompimento celular de *Tetrademus obliquus*.

3.2.2. Quantificação de betacaroteno por espectroscopia Raman

Betacaroteno foi quantificado na região Raman de 1155 cm^{-1} caracterizada pela torção da ligação (C-C) da molécula do pigmento (PILÁT et al., 2022). Nessa região não foi verificado nenhum sinal Raman derivado do óleo mineral e, portanto, não houve contribuição do óleo para intensificação dos sinais relativos ao betacaroteno.

Após a plotagem dos dados gerados pela medição dos espectros Raman, efetuou-se a retirada da linha de base dos gráficos gerados. Os espectros Raman foram então normalizados, utilizando um valor definido relativo ao pico do sinal Raman na região de (1300 cm^{-1}). Nessa região todas as intensidades geradas (picos Raman) são exclusivas da contribuição do óleo mineral e, portanto, se mantém praticamente constante em todos os ensaios.

A figura 3.7A mostra as intensidades normalizadas e as suas respectivas diluições na construção da curva de calibração. Os picos gerados na região de 1155 cm^{-1} foram utilizados para regressão linear da curva de intensidade normalizada em função da concentração de betacaroteno (Figura 3.7B). A curva de calibração apresentou um bom ajuste dos dados ao modelo de primeira ordem com coeficiente de correlação $R^2 = 0.9988$ e está descrita pela (Equação 8). Para calibração da curva foi utilizada uma solução de concentração conhecida a 0.0009% e o erro relativo calculado foi de 1.67% .

$$y = 7632 \cdot x + 0.2981 \quad (5)$$

Em que y é a intensidade normalizada (A. U) e x é a concentração de betacaroteno ($\mu\text{g/g}$).

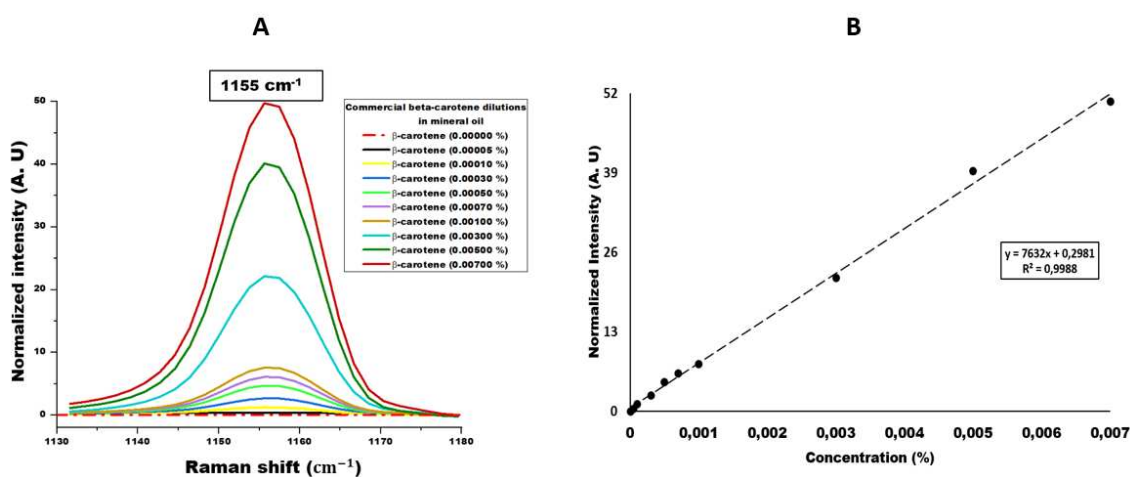


Figura 3.7. Construção da curva de calibração para o cálculo da concentração de betacaroteno em amostras de betacaroteno industrial diluídos em óleo mineral.

Para quantificação do teor de betacaroteno nos extratos de carotenoides em óleo mineral após o rompimento celular, os espectros Raman foram gerados e os mesmos foram normalizados após a retirada da linha de base no *Software* (ORIGIN, 2018).

Os espectros Raman gerados para os ensaios experimentais do processo de moagem e do processo de ultrasonicação e suas respectivas imagens expandidas no comprimento Raman de interesse em 1155 cm^{-1} , estão apresentados na (Figura 3.8). Verifica-se que os tratamentos mais ‘severos’ em ambos os equipamentos repercutiram em maior detecção de intensidade dos sinais Raman e, conseqüentemente, maiores teores de betacaroteno ($\mu\text{g/g}$) foram registrados. Foi possível extrair de extrato de carotenoides oriundos de biomassa ultrasonificada, cerca de ($1.55\text{ }\mu\text{g/g}$) de betacaroteno em condição otimizada, com potência de 475 W e tempo de processo de 13 min , apresentando $R^2 = 0.96$. Para moagem, foi possível extrair cerca de ($1.50\text{ }\mu\text{g/g}$) com tempo de moagem de cerca de 46 min e cerca de 13 g de biomassa (43.33%) do volume útil do cilindro do moinho).

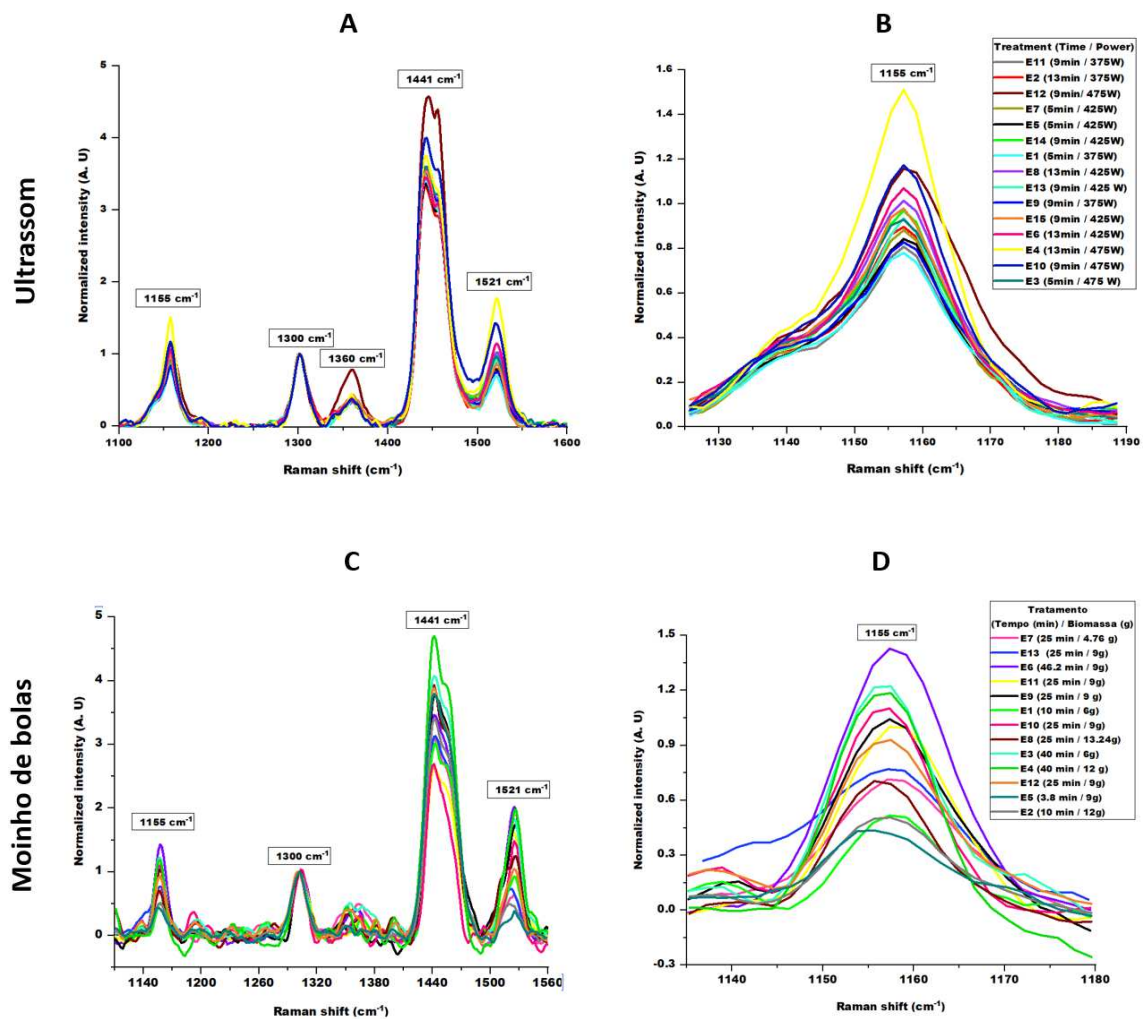


Figura 3.8. Espectros Raman plotados para os ensaios oriundos de rompimento em ultrassom (Fig. A e B) e oriundas de rompimento em moinho de bolas (Fig. C e D).

A Figura 3.9 apresenta o conteúdo de betacaroteno em extrato de pigmentos de *Tetrademus obliquus* diluídos em óleo mineral de alta pureza em biomassa oriunda de ultrassom e moinho de bolas. Percebe-se que o teor de betacaroteno varia de acordo com as condições de processo aplicada. Na ultrasonicação, ensaios com maiores potências e maior tempo de sonicação apresentação maiores teores do biocomposto. Analogamente, para moagem foi verificado que o teor de betacaroteno aumenta proporcionalmente com o aumento do tempo de processo. Logo, podemos inferir que a extração e quantificação pode ser utilizado como um indicado de lise celular para microalga *Tetrademus obliquus*.

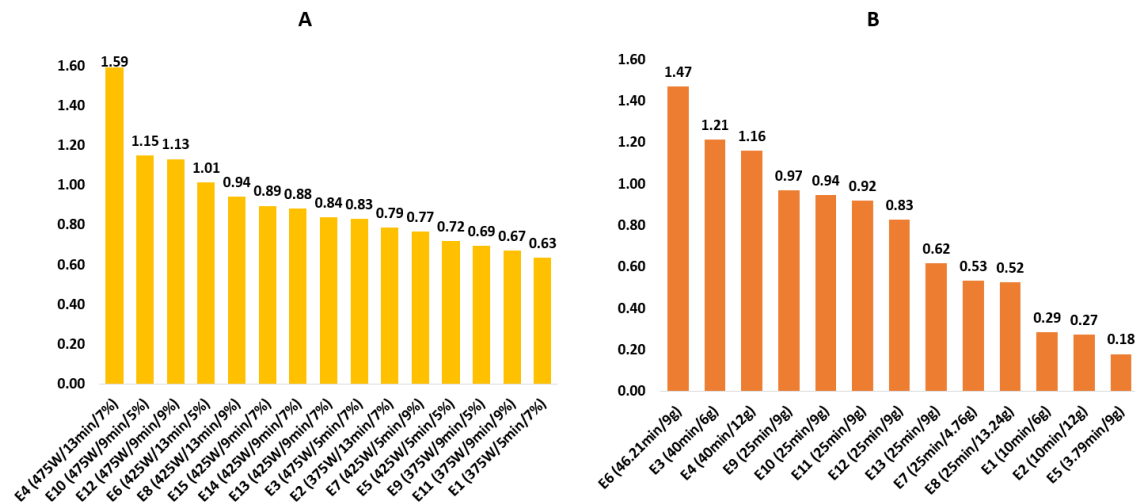


Figura 3.9. Conteúdo de betacaroteno em extrato de pigmentos. (A) Biomassa de ultrassom e (B) biomassa de moinho de bolas.

3.2.3 Quantificação de lipídios totais

A quantificação lipídica foi efetuada pela metodologia descrita por Hara e Radin (1978), também conhecida como método hexano/etanol. Esse método se caracteriza por não utilizar nenhum tipo de hidrólise ácida seguida de tratamento térmico, tais como, extração por *soxhlet* e método de Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Logo, não existe a possibilidade de o método de extração influenciar no rompimento celular durante o processo. Wang et al. (2016) estudaram extração lipídica por hidrólise ácida com ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido fórmico e concluíram que somente o ácido fórmico não é capaz de romper células microalgais.

Para fins de avaliação de comparação de eficiência de rompimento celular entre as técnicas de moagem e ultrasonicação foi considerado o teor 14.11 % para a quantificação de lipídios totais como 100% de eficiência de rompimento, efetuada neste estudo pelo método de J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986).

Para moagem, foi possível obter-se cerca de (5.18g/100g) de lipídios nas condições operacionais de 46 minutos de moagem e 9 g de biomassa no cilindro do moinho. Esse valor corresponde a uma eficiência de moagem de cerca de 36.71 %. Na pior condição avaliada para moagem ($T_m = 3.79$ min e $M_b = 9$ g) foi possível obter-se, cerca de (3.75g/100g) com eficiência calculada de (26.58%) de rompimento celular por moagem (Tabela 3.7). Foi observado que houve diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste de tukey a 5%, entre os tratamentos realizados na moagem, o que permite inferir que o teor de lipídios aumenta com o aumento do rompimento celular.

Tabela 3.7. Teores de lipídios quantificados a partir de biomassa rompida pelo processo de moagem.

Ensaio	Parâmetros		Teor de Lipídios (g/100g)
	Tempo (min)	Biomassa (g)	
6	46.21	9.00	5.18 ± 0.78 ^a
3	40.00	6.00	4.93 ± 0.39 ^b
4	40.00	12.00	4.89 ± 0.27 ^c
7	25.00	4.76	4.82 ± 0.13 ^d
8	25.00	13.24	4.79 ± 0.21 ^e
10	25.00	9.00	4.71 ± 0.42 ^f
11	25.00	9.00	4.70 ± 0.12 ^f
12	25.00	9.00	4.66 ± 0.31 ^g
13	25.00	9.00	4.63 ± 0.25 ^h
9	25.00	9.00	4.57 ± 0.32 ⁱ
1	10.00	6.00	4.24 ± 0.24 ^j
2	10.00	12.00	4.22 ± 0.41 ^j
5	3.79	9.00	3.75 ± 0.12 ^l

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0.05$).

Para ultrasonicação, o teor de (3.56g/100g) foi obtido como maior eficiência (25.26%) utilizando-se uma potência de 475W, tempo de processo de 13min e concentração das suspensões de 7 % (m/v). Para a menor eficiência, teor de (1.61g/100g) com 11.41% de eficiência, foi registrado para ($P_u= 375$ W, $t_u= 5$ min e $C_s= 7$ % (m/v) (Tabela 3.8). Nos tratamentos realizados para ultrasonicação foi observado que houve diferença significativa ($p<0.05$) pelo teste de tukey a 5%, o que permite inferir que o teor de lipídios aumenta com o aumento do rompimento celular e a extração e quantificação desse biocomposto, pode ser utilizada como um indicativo de ruptura celular.

Tabela 3.8. Teores de lipídios quantificados a partir de biomassa rompida pelo processo de ultrasonicação.

Ensaio	Tempo (min)	Potência (W)	Concentração (% m/v)	Teor de Lipídios (g/100g)
4	13	475	7	3.56 ± 0.92 ^a
10	9	475	5	3.44 ± 0.32 ^b
12	9	475	9	3.35 ± 0.27 ^c
6	13	425	5	3.29 ± 0.63 ^d
8	13	425	9	3.20 ± 0.12 ^e
15	9	425	7	2.94 ± 0.23 ^f
14	9	425	7	2.90 ± 0.32 ^g
13	9	425	7	2.88 ± 0.10 ^g
3	5	475	7	2.82 ± 0.08 ^h
2	13	375	7	2.77 ± 0.06 ⁱ
7	5	425	9	2.64 ± 0.10 ^j
5	5	425	5	2.12 ± 0.07 ^k
9	9	375	5	2.00 ± 0.03 ^l
11	9	375	9	1.83 ± 0.08 ^m
1	5	375	7	1.61 ± 0.03 ⁿ

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0.05$).

O processo de moagem se mostrou mais eficiente do que o processo de ultrasonicação nas condições de processo utilizadas para quantificação lipídica de *T. obliquus*. No entanto,

alguns fatores que afetam o custo-benefício dos processos devem ser considerados para correta escolha do método a ser utilizado. A moagem, geralmente utiliza biomassa seca, o que requer a utilização de um processo de secagem que requer gasto de energia. Por outro lado, a ultrasonicação é realizada em biomassa úmida, geralmente com concentrações de (50-200 kg de matéria seca/m³) e dispensa métodos preliminares de secagem (ZHANG et al., 2019). Segundo Halim et al. (2013), geralmente moagem de esferas, homogeneização de alta pressão e tratamento de microondas são técnicas entre as mais caras energeticamente, enquanto o ultrassom e a campo elétrico pulsado são os mais baratos (em investimentos e custos operacionais). Parâmetros de processos (tempo, potência, pressão, temperatura, concentração de suspensões e, outros) que possam degradar metabólitos de interesse, também devem ser considerados. O processo de moagem apresenta maior potencial de expansão de escala, portanto, mais interessante do ponto de vista da aplicação industrial.

4. CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível extrair e quantificar pigmentos e lipídios da microalga *Tetrademus obliquus* através de biomassa oriunda de rompimento celular por ultrasonicação e moagem. Tratamentos mais severos apresentaram melhores resultados de extração. Extrato de acetona oriundas de biomassa rompida por moagem geraram maiores teores de Clorofila-a e carotenoides. Já para clorofila-b, extrato de pigmentos em DMSO de biomassa rompida por ultrassom obtiveram maiores teores. Lipídios totais tiveram maiores teores extraídos de biomassa processada em moinho de bolas. Foi observado diferença significativa ($p < 0.05$) entre tratamentos de um mesmo delineamento para teores de pigmentos e lipídios pelo teste de tukey a 5%, o que implica que o conteúdo desses biocompostos variam de acordo com as condições de processo aplicadas, evidenciando que pigmentos e lipídios podem ser usados como indicadores de rompimento celular de *Tetrademus obliquus*.

5. REFERÊNCIAS

AFIFY, A. E.-M. M. R.; EL BAROTY, G. S.; EL BAZ, F. K.; ABD EL BAKY, H. H.; MURAD, S. A. Scenedesmus obliquus: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 399-408, 2018. doi:10.1016/j.jgeb.2018.01.002

AMARO, H.; GUEDES, A.; PRETO, M.; SOUSA-PINTO, I.; MALCATA, F. *Gloeothece sp.* as a nutraceutical source—An improved method of extraction of carotenoids and fatty acids. **Marine Drugs**, v. 16, n. 9, p. 327, 2018. doi:10.3390/md16090327

AMORIM, M. L.; SOARES, J.; COIMBRA, J. S. DOS R.; LEITE, M. DE O.; ALBINO, L. F. T.; MARTINS, M. A. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 1, n. 27, p. 1976-2002, 2020. doi:10.1080/10408398.2020.1768046

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington, 1995.

ANAND, H.; BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A. B.; HARRISON, S. T. L. The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 166–173, 2007. doi:10.1016/j.bej.2007.01.011

BALASUBRAMANIAN, S.; ALLEN, J. D.; KANITKAR, A.; BOLDOR, D. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3396–3403, 2011. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.11

BALASUNDARAM, B.; SKILL, S. C.; LLEWELLYN, C. A. A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 48–56, 2012. doi:10.1016/j.bej.2012.08.010

BERNAERTS, T. M. M.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. M. Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization. **Algal Research**, v. 42, 101616, 2019 doi:10.1016/j.algal.2019.101616

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959. doi:10.1139/o59-099

BLSALPUTRA, T.; WEIER, W. E. The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 10, p. 1011–1019, 1963. doi:10.1002/j.1537-2197.1963.tb06584.x

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960. doi:10.1080/00401706.1960.10489912

DAO, G.-H.; WU, G.-X.; WANG, X.-X.; ZHUANG, L.-L.; ZHANG, T.-Y.; HU, H.-Y. Enhanced growth and fatty acid accumulation of microalgae *Scenedesmus sp.* LX1 by two types of auxin. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 561–567, 2018. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.079

DAS, A. B.; GOUD, V. V.; DAS, C. Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (*Oryza sativa* L.) using ultrasound: A comparative analysis and phytochemical profiling. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 332–341, 2017. doi:10.1016/j.indcrop.2016.10.041

D'HONDT, E.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; BOLADO, S.; KASPEROVICIENE, J.; KOREIVIENE, J.; SULCIUS, S.; BASTIAENS, L. Cell disruption technologies. **Microalgae-based biofuels and bioproducts**, p. 133–154, 2017. doi:10.1016/b978-0-08-101023-5.00006-6

DING, Y.; ZHENG, J.; XIA, X.; REN, T.; KAN, J. Box–Behnken design for the optimization of nanoscale retrograded starch formation by high-power ultrasonication. **LWT - Food Science and Technology**, v. 67, p. 206–213, 2016. doi:10.1016/j.lwt.2015.11.022

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956. doi:10.1021/ac60111a017

FARIED, M.; SAMER, M.; ABDELSALAM, E.; YOUSEF, R. S.; ATTIA, Y. A.; ALI, A. S. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 893–913, 2017. doi:10.1016/j.rser.2017.05.199

GRIMI, N.; DUBOIS, A.; MARCHAL, L.; JUBEAU, S.; LEBOVKA, N. I.; VOROBIEV, E. Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis sp.* using different methods of cell disruption. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 254–259, 2014. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.011

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. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.008

HALIM, R.; HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Microalgal cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**, v. 91, n. 1, p. 116–121, 2012. doi:10.1016/j.apenergy.2011.08.048

HARA, A. C.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420-426, 1978.

HE, B.; ZHANG, L.-L.; YUE, X.-Y.; LIANG, J.; JIANG, J.; GAO, X.-L.; YUE, P.-X. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**, v. 204, p. 70–76, 2016. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.09

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. (1986). Cheese and processed cheese products: determination of fat content - gravimetric method - reference method (No. 5B). Brussels.

KERIS-SEN, U. D.; SEN, U.; SOYDEMIR, G.; GUROL, M. D. An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 407–413, 2014. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.01

LANGDON, T.T. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. **Food Technol.**, v. 41, n. 5, p. 64-67, 1987.

LEE, J.-Y.; YOO, C.; JUN, S.-Y.; AHN, C.-Y.; OH, H.-M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 75–77, 2010. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.05

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Force and energy requirement for microalgal cell disruption: An atomic force microscope evaluation. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 199–206, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.03

LEE, S. Y.; CHO, J. M.; CHANG, Y. K.; OH, Y.-K. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1317–1328, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.03

LICHTENTHALER, H. K. [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Plant Cell Membranes**, p. 350–382, 1987. doi:10.1016/0076-6879(87)48036-

ÖZOĞLU, H.; BAYINDIRLI, A. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. **Food Control**, v. 13, n. 4-5, p. 213–221, 2002. doi:10.1016/s0956-7135(02)00011-7

PILÁT, Z.; BERNATOVÁ, S.; JEŽEK, J.; ŠERÝ, M.; SAMEK, O.; ZEMÁNEK, P.; TRTÍLEK, M. Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: β -carotene quantification. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 541–546, 2011. doi:10.1007/s10811-011-9754-4

POSTMA, P. R.; 'T LAM, G. P.; BARBOSA, M. J.; WIJFFELS, R. H.; EPPINK, M. H. M.; OLIVIERI, G. Microalgal biorefinery for bulk and high-value products: product extraction within cell disintegration. **handbook of electroporation**, p. 2205–2224, 2017. doi:10.1007/978-3-319-32886-7_38

RADIN, N. S. Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. In: Lowenstein, J. M. (Ed.). *Methods in enzymology*, New York: **Academic Press**, v. 72, n. 5-7, 1981.

RICHMOND, A.; HU, Q. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, second ed., John Wiley & Sons, Ltd, **Chichester**, 2013. 719 p.

ROCHA, D. N.; MARTINS, M. A.; SOARES, J.; VAZ, M. G. M. V.; DE OLIVEIRA LEITE, M.; COVELL, L.; MENDES, L. B. B. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus spp.* **Bioresource Technology**, v. 289, 121644, 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.121644

SAMARASINGHE, N.; FERNANDO, S.; LACEY, R.; FAULKNER, W. B. Algal cell rupture using high pressure homogenization as a prelude to oil extraction. **Renewable Energy**, v. 48, p. 300–308, 2012. doi:10.1016/j.renene.2012.04.039

SANCHEZ RIZZA, L.; SANZ SMACHETTI, M. E.; DO NASCIMENTO, M.; SALERNO, G. L.; CURATTI, L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140–147, 2017. doi:10.1016/j.algal.2016.12.021

SHIN, H.-Y.; RYU, J.-H.; BAE, S.-Y.; CROFCHECK, C.; CROCKER, M. Lipid extraction from *Scenedesmus sp.* microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. **Fuel**, v. 130, p. 66–69, 2014. doi:10.1016/j.fuel.2014.04.023

SILVA, M. E. T. DA; CORREA, K. DE P.; MARTINS, M. A.; DA MATTA, S. L. P.; MARTINO, H. S. D.; COIMBRA, J. S. DOS R. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 65, 103711, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103711>

SMETANA, S.; SANDMANN, M.; ROHN, S.; PLEISSNER, D.; HEINZ, V. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 162–170, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.11

VU, C. H. T.; LEE, H.-G.; CHANG, Y. K.; OH, H.-M. Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 380–396, 2018. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.018

Wellburn, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994. doi:10.1016/s0176-1617(11)81192-2

YAP, B. H. J.; DUMSDAY, G. J.; SCALES, P. J.; MARTIN, G. J. O. (2015). Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 280–285, 2015. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.049

ZHANG, R.; GRIMI, N.; MARCHAL, L.; LEOVKA, N.; VOROBIEV, E. Effect of ultrasonication, high pressure homogenization and their combination on efficiency of extraction of bio-molecules from microalgae *Parachlorella kessleri*. **Algal Research**, v. 40, 101524, 2019. doi:10.1016/j.algal.2019.101524

ZHANG, R.; LEOVKA, N.; MARCHAL, L.; VOROBIEV, E.; GRIMI, N. Pulsed electric energy and ultrasonication assisted green solvent extraction of bio-molecules from different microalgal species. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 102358, 2020. doi:10.1016/j.ifset.2020.10

5. CONCLUSÃO GERAL

O processo de rompimento celular para *Tetrademus obliquus* mostrou-se bastante complexo. Vários fatores devem ser considerados para avaliação da viabilidade do processo, a relação custo-benefício da ruptura vai depender do tipo de microalga, tamanho, força da parede

celular, condições e tempo de cultivo, estágio, métodos de ruptura utilizados, parâmetros do processo e a escala. No presente estudo, melhores resultados para recuperação de pigmentos e lipídios foram em biomassa processada em moinho de bolas, ultrassom e homogeneizador, respectivamente. No entanto, a definição da técnica de rompimento celular a ser utilizada deve levar em consideração, principalmente, o gasto energético e o potencial de aumento de escala do processo. A metodologia utilizada na quantificação de betacaroteno se mostrou eficiente e pode ser utilizada para quantificação de outros carotenoides presentes na microalga em estudo. Pigmentos e lipídios podem ser utilizados como possíveis indicadores de rompimento celular para microalgas, uma vez que os métodos de extração e quantificação não contribuíram para superestimar a avaliação da ruptura celular.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1) Para aumentar o rompimento celular de *Tetradismus obliquus* e aumentar o rendimento de recuperação de biocompostos, sugere-se:

i) No processo de homogeneização de alta pressão: utilizar pressão de trabalho acima de 800 bar e números de passes abaixo de 10, mantendo a suspensão em temperaturas inferiores à 40°C para evitar a degradação de biocompostos.

ii) No processo de moagem: utilizar moinho com no mínimo duas esferas e otimizar o tempo de processo e a quantidade de biomassa utilizada no volume útil do cilindro.

iii) No processo de ultrasonicação: aumentar a potência e o tempo de processo e manter as suspensões em temperaturas abaixo de 40°C para evitar a degradação de metabólitos de interesse.

2) Avaliar novos indicadores de rompimento celular.

3) Utilizar a metodologia apresentada no presente trabalho de extração e quantificação de betacaroteno para extração e quantificação de luteína, carotenoide de maior conteúdo em *Tetradismus obliquus*.

4) Aplicar técnicas combinadas visando maior rompimento celular.