

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Estudo da utilização de campo elétrico moderado na extração de lipídeos e carotenoides a partir da microalga *Chlorella* sp.**

- Dissertação de Mestrado -

Débora Pez Jaeschke

Porto Alegre

2015



---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Estudo da utilização de campo elétrico moderado na extração de lipídeos e carotenoides a partir da microalga *Chlorella* sp.**

Débora Pez Jaeschke

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ligia Damasceno Ferreira Marczak**

**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giovana Domeneghini Mercali**

**Colaboração: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Rech**

Porto Alegre

2015



---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Estudo da utilização de campo elétrico moderado na extração de lipídeos e carotenoides a partir da microalga Chlorella sp.*, elaborada por Débora Pez Jaeschke, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana de Cassia de Souza Schneider

---

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

---

Dr.<sup>a</sup> Júlia Ribeiro Sarkis



---

## **Agradecimentos**

Às minhas orientadoras Ligia Damasceno Ferreira Marczak e Giovana Domeneghini Mercali pela ajuda e ensinamentos ao longo da elaboração deste trabalho e por todo o incentivo e paciência, especialmente na etapa de finalização do trabalho.

À professora colaboradora Rosane Rech por toda a ajuda, ensinamentos e pela confiança e liberdade para utilização da estrutura do Laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos pela amizade e ajuda.

Aos colegas do Laboratório 117, especialmente à Tânia, pela amizade, paciência e grande ajuda durante todo o trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, especialmente à todos os professores que de uma forma ou de outra me incentivaram na realização desta dissertação.

À bolsista de iniciação científica Angélica Alves, pela ajuda na elaboração dos experimentos.

À minha família pelo apoio incondicional e especialmente ao meu irmão Guilherme, pela paciência.

Ao meu namorado Eduardo Corrêa Silveira pelo apoio, companheirismo e compreensão em todos os momentos de ausência.





---

## Resumo

Microalgas são conhecidas como excelentes fontes de lipídeos, vitaminas e carotenoides. Contudo, os métodos de extração de compostos intracelulares tradicionais são dispendiosos e não têm se mostrado eficientes. Assim, o desenvolvimento de métodos de extração com maior rendimento e com a substituição de solventes tóxicos por solventes ambientalmente amigáveis se torna essencial para viabilizar a produção em grande escala de produtos derivados das microalgas. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a utilização de campo elétrico moderado (MEF) na extração de carotenoides e lipídeos a partir da microalga *Chlorella sp.*. Para tanto, foram estudadas diferentes tensões (0-180 V) numa etapa de pré-tratamento de extração. Além disso, o presente trabalho também avaliou a utilização de etanol como solvente de extração; foi avaliada uma concentração fixa de 25 % (v/v) durante a etapa de pré-tratamento em presença de campo elétrico moderado e diferentes concentrações de etanol numa etapa difusiva (25-75 %, v/v). Ainda, este trabalho avaliou a utilização do método sulfo-phospho-vanilina (SPV) como método de quantificação de lipídeos totais em microalgas. Os resultados mostraram que a extração de carotenoides teve influência significativa ( $p < 0,05$ ) da aplicação de MEF e da concentração de etanol (%), sendo observado um efeito positivo e combinado de ambas as variáveis avaliadas. Esse resultado se deve, possivelmente, ao efeito que o MEF exerceu sobre os cloroplastos; acredita-se que a aplicação de campo elétrico promoveu a eletroporação reversível das membranas dos cloroplastos, favorecendo a extração de carotenoides. Em contrapartida, somente a concentração de etanol apresentou efeito significativo positivo na extração de lipídeos. Dessa forma, a permeabilização reversível da membrana celular não contribuiu para um aumento da extração de lipídeos. Vale enfatizar que, utilizando a tecnologia de MEF, um processo de baixa demanda energética, e etanol, um solvente ambientalmente amigável obteve-se uma extração de até 73 e 83 % de carotenoides e lipídeos, respectivamente. Ainda, o método SPV utilizado para quantificação de lipídeos totais em microalgas, se mostrou uma metodologia simples, rápida e adequada para quantificação de lipídeos em microalgas.

**Palavras-chave:** MEF, etanol, método SPV.

---

## Abstract

Microalgae are known as good sources of lipids, vitamins and carotenoids. The intracellular compounds extraction methods are time consuming and, in some cases, inefficient. Therefore, the development of new extraction methodologies is important to enable large scale extraction of compounds of interest derived from microalgae. The aim of the present work was to evaluate moderate electric field (MEF) application on lipid and carotenoid extraction from the microalgae *Chlorella sp.*. For this purpose, voltage was evaluated on a pre-treatment, varying from 0 to 180 V. Also, ethanol was evaluated as extraction solvent during the pre-treatment in the presence of MEF (25%, v/v) and during the diffusive step, at concentrations varying from 25 to 75 %, (v/v). Moreover, this work evaluated sulfo-phosphovanillin method (SPV) as a total lipid quantification method in microalgae. The results showed that MEF and ethanol concentration significantly influenced ( $p < 0.05$ ) carotenoid extraction, and a positive combined effect of both variables was observed. It is believed that, MEF promoted reversible electroporation of the cellular and chloroplast membranes. MEF possibly promoted an elongation on chloroplasts structure, which contributed to the increase on carotenoid extraction. On the other hand, only the ethanol concentration showed a positive effect on lipid extraction. In this case, the reversible electroporation on cellular membrane was not sufficient to increase lipid extraction. It is important to point out that the application of MEF and ethanol, an environmentally friendly solvent, promoted an extraction yield of up to 73 and 80 % of carotenoid and lipids, respectively. Also, SPV method showed to be an attractive fast lipid quantification method.

**Keywords:** MEF, ethanol, SPV.

---

## Lista de Figuras

Figura 3.1. Micrografia eletrônica de uma célula de <i>Chlorella vulgaris</i> . .....	24
Figura 3.2. Desenho esquemático mostrando diferentes fases de formação de células filhas de <i>Chlorella vulgaris</i> . .....	25
Figura 3.3. Estrutura molecular da luteína. ....	28
Figura 3.4. Estutura da molécula de zeaxantina .....	28
Figura 3.5. Esquema apresentando os principais compostos produzidos pelas microalgas bem como suas principais aplicações. ....	34
Figura 3.6. Esquema representativo dos fenômenos de eletroporação reversível e irreversível. ....	43
Figura 4.1. Fotobiorreatores utilizados no cultivo de microalgas. ....	52
Figura 4.2. Biomassa liofilizada e homogeneizada para realização dos experimentos de extração. ....	53
Figura 4.3. Célula de referência utilizada para determinar os valores de condutividade elétrica de diferentes soluções salinas. ....	54
Figura 4.4. Sistema de campo elétrico moderado utilizado na realização dos experimentos; (a) célula de extração utilizada na etapa difusiva, (b) banho de aquecimento, (c) banho de resfriamento, (d) variador de tensão, e) estabilizador e f) painel de aquisição de dados. ....	55
Figura 4.5. Célula de extração EC1 utilizada durante o pré-tratamento. ....	55
Figura 4.6. Curva de calibração realizada para quantificação de lipídeos em amostras de microalgas utilizando o método sulfo-fosfo-vanilina (SPV). ....	60
Figura 5.1. Concentração de biomassa em função do tempo de cultivo para o Cultivo 1. ....	96
Figura 5.2. Concentração de biomassa em função do tempo de cultivo para o cultivo semi-contínuo 1. ....	96
Figura 5.3. Concentração de biomassa em função do tempo de cultivo para o cultivo semi-contínuo 2. ....	97
Figura 5.4. Variação da condutividade elétrica com a frequência em amostras de microalgas submetidas a diferentes tratamentos. ....	98

---

Figura 5.5. Comportamento típico da variação da condutividade elétrica com variações de frequência (kHz a MHz) de tecidos biológicos com (a) células intactas; (b) células intactas e rompidas e (c) células totalmente rompidas..... 99

---

## Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Grupos de algas e número aproximado de espécies, material de reserva e habitats de cada grupo.....	24
Tabela 3.2. Microalgas e teor de lipídeos (% , base seca).....	32
Tabela 3.3. Composição de células de <i>Chlorella protothecoides</i> em cultivo autotrófico e heterotrófico.....	36
Tabela 4.1. Temperatura do banho de resfriamento para as diferentes tensões aplicadas no pré-tratamento de extração.....	57
Tabela 4.2. Planejamentos experimentais e condições de tensão e concentração de etanol avaliadas. ....	65

---

## Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

b.s.	base seca
d	diâmetro (cm)
h	altura (cm)
m	massa (g)
MEF	<i>Moderate Electric Field</i> (Campo Elétrico Moderado)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
$R^2$	coeficiente de determinação
T	temperatura (°C)
V	volume (mL)
v/v	volume/volume

---

## Sumário

<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	<b>17</b>
<b>Capítulo 2 - Objetivos</b> .....	<b>21</b>
2.1. <i>Objetivo geral</i> .....	21
2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	21
<b>Capítulo 3 - Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>21</b>
3.1. <i>Microalgas</i> .....	23
3.1.1. Principais características, classificação e reprodução .....	23
3.1.2. Nutrição .....	25
3.1.3. Composição .....	26
Carotenoides .....	26
Lipídeos .....	29
3.1.4. Aplicações comerciais .....	33
3.2. <i>Cultivos de microalgas</i> .....	35
3.2.1. Cultivo autotrófico.....	35
3.2.2. Cultivo heterotrófico .....	35
3.2.3. Cultivo mixotrófico .....	36
3.2.4. Sistemas de cultivo abertos .....	36
3.2.5. Sistemas de cultivo fechados.....	37
3.2.6. Cultivos em batelada .....	37
Fase lag.....	37
Fase exponencial.....	37
Fase linear.....	37
3.2.7. Cultivos contínuos .....	38
3.3. <i>Pré-tratamentos de extração</i> .....	38
3.4. <i>Campo elétrico moderado</i> .....	41
3.5. <i>Efeitos do etanol na membrana celular</i> .....	44
3.6. <i>Métodos de extração e quantificação</i> .....	45
3.6.1. Lipídeos .....	46
3.6.2. Carotenoides .....	48
<b>Capítulo 4 - Materiais e Métodos</b> .....	<b>51</b>

---

<b>4.1.</b>	<b><i>Cultivo de microalgas</i></b> .....	<b>51</b>
<b>4.2.</b>	<b><i>Calibração da célula ôhmica</i></b> .....	<b>53</b>
<b>4.3.</b>	<b><i>Extração via campo elétrico moderado (MEF)</i></b> .....	<b>55</b>
4.3.1.	Análises de lipídeos .....	58
	Bligh & Dyer.....	58
	SPV .....	59
	Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos .....	60
4.3.2.	Análises de carotenoides .....	61
<b>4.4.</b>	<b><i>Avaliação da Permeabilização das células de microalgas</i></b> .....	<b>63</b>
4.4.1.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	64
<b>4.5.</b>	<b><i>Planejamento experimental</i></b> .....	<b>64</b>
<b>Capítulo 5 - Resultados e Discussão</b> .....		<b>67</b>
<b>5.1.</b>	<b><i>Artigo 1 – Extração de carotenoides</i></b> .....	<b>67</b>
<b>5.2.</b>	<b><i>Artigo 2 – Extração de lipídeos</i></b> .....	<b>81</b>
<b>5.3.</b>	<b><i>Resultados complementares</i></b> .....	<b>96</b>
5.3.1.	Calibração da célula ôhmica .....	96
5.3.2.	Cultivos de microalgas.....	96
5.3.3.	Permeabilização das células de microalgas .....	97
<b>Capítulo 6 - Considerações Finais</b> .....		<b>100</b>
<b>Sugestões para Trabalhos Futuros</b> .....		<b>101</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....		<b>103</b>



## Capítulo 1 - Introdução

Microalgas são microrganismos, em sua maioria, unicelulares que são capazes de sobreviver em diferentes habitats (águas doces, águas salobras e águas marinhas) e em diferentes condições de pH e temperaturas. As microalgas possuem boa habilidade de transformar energia solar em energia química, através da fotossíntese. Por esse motivo, esses microrganismos são considerados importantes sequestrantes de gases presentes na atmosfera, como o gás carbônico, além de gases industriais de exaustão e carbonatos. Além disso, as microalgas também podem ser utilizadas no tratamento biológico de efluentes, absorvendo gás carbônico, nitrogênio e fosfato.

Microalgas do gênero *Chlorella* são conhecidas pela elevada taxa de produção de biomassa, bem como pela alta taxa de acumulação de lipídeos, utilizando somente nitrogênio, fósforo e outros micronutrientes na presença de luz e gás carbônico. Portanto, *Chlorellas*, são consideradas ótimas opções para produção de proteínas, lipídeos, carboidratos, pigmentos (carotenoides e clorofilas), minerais e vitaminas. Esses compostos, normalmente extraídos e consumidos a partir de frutas, sementes, carnes e outros são sintetizados pelas microalgas. Desta forma, é importante ressaltar que o cultivo de microalgas se apresenta como uma alternativa para produção desses compostos de interesse, com a vantagem de não utilizar terras aráveis, não competindo, portanto, com a agricultura.

Carotenoides são pigmentos lipossolúveis encontrados normalmente em vegetais, folhas e frutas de coloração verde, amarela, laranja e vermelha. Recentemente, o consumo de carotenoides tem sido associado a benefícios para a saúde humana, como prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas e degenerativas, como cataratas e Alzheimer. Estudos mostram que esses benefícios estão relacionados, principalmente, às propriedades antioxidantes desses compostos.

Lipídeos são compostos que se dissolvem bem em solventes orgânicos, como clorofórmio. Os componentes principais das moléculas de lipídeos são os ácidos graxos, que podem apresentar estrutura saturada ou insaturada. Os ácidos graxos insaturados do tipo  $\omega$ -3 e

$\omega$ -6 são ácidos graxos essenciais e atuam em diversos processos metabólitos importantes. Ácidos graxos do tipo  $\omega$ -3 são encontrados, principalmente, em peixes e alguns óleos vegetais, como canola e soja, e os ácidos graxos do tipo  $\omega$ -6 são normalmente encontrados nos óleos de milho e girassol, carnes e ovos. Estudos demonstram que a substituição de gorduras saturadas por insaturadas pode reduzir os níveis de deposição de gorduras nas artérias, diminuindo o nível de colesterol LDL.

Contudo, esses compostos de interesse presentes nas microalgas, estão confinados no interior das células, que são envoltas por uma parede celular e uma membrana plasmática, o que dificulta a sua extração. Portanto, a busca por um método eficiente de extração dos componentes intracelulares é crucial para aumentar a competitividade e viabilizar a extração dos compostos produzidos por esses microrganismos. Recentemente, a aplicação de tecnologias elétricas tem se mostrado uma alternativa atraente para a extração seletiva de compostos intracelulares. A exposição de células vegetais a um campo elétrico promove o rearranjo das moléculas de fosfolipídeos, o que pode induzir a formação de poros em membranas celulares, com aumento da transferência de massa desses componentes para o meio externo.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um processo alternativo para extração de lipídeos e carotenoides, utilizando a tecnologia de campo elétrico moderado e etanol como solvente. No Capítulo 2 são apresentados em mais detalhes os objetivos deste trabalho.

O Capítulo 3 apresenta uma revisão sobre os principais aspectos relacionados às microalgas, como nutrição, condições de cultivo e composição, com ênfase nos carotenoides e lipídeos. Além disso, neste capítulo é apresentada uma revisão a respeito dos métodos utilizados para o rompimento celular e da utilização de campo elétrico em processos de extração. Também é apresentada uma revisão sobre os principais métodos de quantificação de lipídeos e carotenoides.

O Capítulo 4 apresenta os materiais e métodos utilizados, abordando as metodologias de extração, quantificação e identificação dos compostos avaliados neste trabalho.

O Capítulo 5 apresenta os resultados obtidos no presente trabalho na forma de dois artigos científicos, o primeiro relativo a extração de carotenoides e o segundo, a extração de

lipídeos. Além disso, neste capítulo são apresentados alguns resultados complementares que não foram apresentados nos artigos.

No Capítulo 6 são apresentadas as principais conclusões, as considerações finais e as sugestões para continuidade deste trabalho.



## Capítulo 2 - Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a utilização de campo elétrico moderado como tecnologia alternativa na extração de carotenoides e lipídeos a partir da microalga *Chlorella sp.* Além disso, este trabalho também visou avaliar a utilização de etanol como solvente para extração desses compostos.

### 2.2. Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- realizar o pré-tratamento utilizando campo elétrico moderado (MEF), identificando as melhores condições de processamento (tensão) para extração dos compostos;
- avaliar a utilização de etanol como solvente para extração dos compostos de interesse, identificando a concentração ideal do solvente para realizar a extração;
- comparar métodos de extração e quantificação de lipídeos com o objetivo de validar o método sulfo-fosfo-vanilina (SPV) para aplicação em microalgas;
- propor um processo alternativo que possa ser empregado industrialmente para extração de compostos intracelulares presentes em microalgas.



---

## Capítulo 3 - Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Este capítulo apresenta, inicialmente, uma revisão sobre as principais características da microalga, abordando aspectos relativos à nutrição, composição, cultivo e aplicações comerciais. Na sequência, é apresentada uma revisão sobre os métodos de extração aplicados em microalgas. Por fim, é realizada uma descrição sobre a tecnologia de campo elétrico moderado e o uso de etanol como solvente em processos de extração.

### 3.1. Microalgas

#### 3.1.1. Principais características, classificação e reprodução

Microalgas são microrganismos fotossintetizantes e, em sua maioria, unicelulares. Acredita-se que esses microrganismos foram uma das primeiras formas de vida terrestre. As microalgas são capazes de sobreviver em diferentes habitats (águas doces, águas salobras e águas marinhas) e em diferentes condições de pH e temperaturas. Além disso, os cultivos de microalgas não competem com a agricultura, pois não utilizam terras aráveis (Richmond, 2004; John *et al.*, 2011; Leu e Boussiba, 2014).

As células de microalgas eucariontes possuem núcleo envolto por membrana, que contém as informações genéticas de cada célula. O citoplasma é composto por diversos compartimentos e organelas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolos e centríolos. Na Figura 3. 1 é apresentada uma micrografia eletrônica de uma célula da microalga *Chlorella vulgaris*. Através da observação da micrografia é possível identificar: a parede celular (**pc**), cloroplastos (**cl**), tilacóides (**tl**), grânulos de amido (**ga**), núcleo (**nu**), nucléolo (**nc**) e mitocôndrias (**mi**).

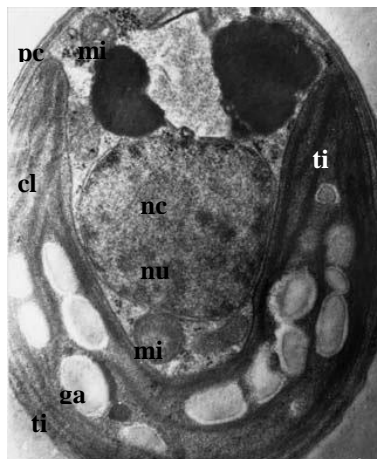


Figura 3. 1. Micrografia eletrônica de uma célula de *Chlorella vulgaris*.

Fonte: Adaptado de Richmond (2004).

As microalgas são classificadas quanto ao tipo de pigmento, à natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Na classificação, também são considerados processos fisiológicos, como a existência ou não de flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, presença e caracterização de envoltório dos cloroplastos, entre outros (Derner *et al.*, 2006). Os quatro grupos mais importantes de algas bem como o habitat de cada grupo, material de reserva e número aproximado de espécies conhecidas são encontrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Grupos de algas e número aproximado de espécies, material de reserva e habitats de cada grupo.

Alga	Número de espécies conhecidas (aproximado)	Material de reserva	Habitat
Diatomáceas (Bacillariophyta)	100.000	Crisolaminarina e triacilglicerol	Oceanos, água doce e água salobra
Algas verdes (Chlorophyta)	8.000	Amido e triacilglicerol	Oceanos, água doce e água salobra
Algas azuis (Cyanophyta)	2.000	Amido e triacilglicerol	Diferentes habitats (ambientes aquáticos, congelados, solos úmidos)
Algas douradas (Chrysophyta)	1.000	Triacilglicerol e carboidratos	Água doce

Fonte: Adaptado de Khan *et al.* (2009).



O grupo das algas verdes compreende um grande número de microrganismos, tanto microscópicos quanto macroscópicos. Estas algas contêm clorofila a e b e carotenoides, que são sintetizados e acumulados nos cloroplastos em condições de deficiência de nitrogênio e/ou estresse. O composto de reserva, formado no interior do cloroplasto, é o amido, composto de amilose e amilopectina.

As *Chlorellas* pertencem ao grupo das algas verdes, são unicelulares, não possuem flagelos e possuem estrutura celular ovalada; podem crescer em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas; se reproduzem através da formação de células filhas ou autoesporos com a mesma forma da célula mãe; em 24h uma célula de *Chlorella* dá origem a quatro células filhas, que possuem sua própria parede celular. Após a maturação dessas novas células, a parede celular da célula mãe é rompida, dando origem às células filhas. Na Figura 3. 2 é apresentada uma ilustração esquemática com os diferentes estágios de formação de novas células de *Chlorella vulgaris* (Richmond, 2004; Safi *et al.*, 2014).

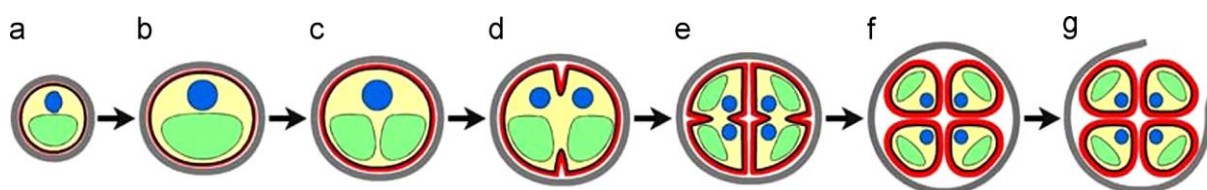


Figura 3. 2. Desenho esquemático com diferentes fases de formação de células filhas de *Chlorella vulgaris*.

As microalgas possuem boa habilidade de transformar energia solar em energia química, através da fotossíntese. Esse mecanismo é muito similar ao de outras plantas de grande porte. Para realizar a fotossíntese, as microalgas podem fixar gás carbônico presente na atmosfera, além de gases industriais de exaustão e carbonatos, como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$ , que podem ser utilizados para o crescimento de biomassa (Kiran, Kumar e Deshmukh, 2014).

### 3.1.2. Nutrição

Carbono, fósforo e nitrogênio são nutrientes essenciais para as microalgas, sendo que o carbono corresponde a 45% da composição desses microrganismos. Para atingir condições ótimas de cultivo, é necessário conhecer as concentrações ideais de carbono, nitrogênio e fósforo. A fonte e a concentração de carbono afetam diretamente a produção de biomassa e de lipídeos. Alta concentração de lipídeos e biomassa pode ser atingida com fontes de carbono orgânico, como metanol, glicose e hidrólise enzimática (Li *et al.*, 2011).

O nitrogênio corresponde de 7 a 10% da célula, em base seca, sendo constituinte da síntese de proteínas, essencial para divisão e crescimento celular. Numa condição ideal de nitrogênio, existe um balanço metabólico entre a taxa de fixação de carbono e a taxa de assimilação de nitrogênio, necessárias para o metabolismo celular. A deficiência de nitrogênio no meio de cultivo afeta a síntese de proteínas e reduz a taxa de fotossíntese, favorecendo o acúmulo de lipídeos. Muitos estudos relatam que a produção de lipídeos neutros e/ou amido em microalgas é aumentada em situação de falta de nitrogênio. Além disso, níveis baixos de nitrogênio no meio de cultivo, para algumas espécies de algas, pode favorecer a produção de carotenoides secundários (Richmond, 2004; Li *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015).

Fósforo também é considerado um nutriente essencial para o crescimento de microalgas e desempenha um papel importante no metabolismo celular nos processos relacionados ao transporte de energia, transdução de sinal, fotossíntese e respiração. Acredita-se que a falta de fósforo no meio de cultivo favorece a síntese de lipídeos (Xin *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2013).

O crescimento não depende apenas dos nutrientes essenciais, mas também de micronutrientes: manganês, zinco, cobalto, cobre, ferro e molibdênio (Kiran, Kumar e Deshmukh, 2014). O ferro é o metal traço mais importante e desempenha papel nas reações enzimáticas que ocorrem durante a fotossíntese. Estudos mostram que aumento na concentração de ferro no meio de cultivo resulta em um aumento da biomassa e da produção de lipídeos (Singh *et al.*, 2015).

### **3.1.3. Composição**

Os principais componentes sintetizados pelas microalgas são proteínas, lipídeos, carboidratos, pigmentos (carotenoides e clorofilas), minerais e vitaminas. A seguir são apresentados mais detalhes a respeito dos carotenoides e lipídeos, que são objeto de estudo deste trabalho.

#### Carotenoides

Carotenoides são pigmentos lipossolúveis encontrados em vegetais, em folhas verdes, e em frutas de coloração amarela, laranja e vermelha. Os carotenoides podem ser divididos em dois grupos, carotenos e xantofilas. Os carotenos são constituídos por cadeias carbônicas compostas somente por carbono e hidrogênio, enquanto que as xantofilas possuem grupos

oxigenados (hidroxila, epóxi, aldeído e ceto), o que faz com que as moléculas pertencentes a esse grupo tenham características mais polares do que os carotenos. Portanto, carotenos são solúveis em éter de petróleo, hexano e tolueno, enquanto que as xantofilas se dissolvem bem em metanol e etanol, com algumas exceções.

Os carotenoides têm sido utilizados como alimento na aquicultura e como corante de alimentos por muitas décadas. Alguns carotenoides são precursores da vitamina A, que é conhecida por atuar na prevenção de doenças relacionadas à visão. Acredita-se que existem cerca de 700 carotenoides na natureza, porém, apenas cerca de 50 possuem atividade provitamina A. Os três carotenoides precursores de vitamina A mais importantes são o  $\alpha$ -caroteno, o  $\beta$ -criptoxantina e o  $\beta$ -caroteno.

Recentemente, o consumo de carotenoides tem sido associado a benefícios para a saúde humana, como prevenção ao câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas (cataratas e degeneração macular) e degenerativas (Alzheimer) devido, principalmente, às propriedades antioxidantes desses compostos. A habilidade que as moléculas de carotenoides possuem desativar oxigênio singlete está relacionada ao sistema de ligações duplas conjugadas; quanto maior o número de ligações duplas conjugadas, mais facilmente as moléculas irão desativar o oxigênio singlete. Esta capacidade antioxidante dos carotenoides tem sido investigada e estudos sugerem que esse seria o principal mecanismo de ação destas moléculas (Rodriguez-Amaya, 2001; Amorim-Carrilho *et al.*, 2014).

Nas plantas, os carotenoides desempenham papel de proteção do sistema fotossintetizante, atuando na dissipação do excesso de energia; reagem preferencialmente com o oxigênio singlete, prevenindo a oxidação de clorofilas, lipídeos, proteínas e DNA. Além disso, os carotenoides são pigmentos auxiliares na fotossíntese e podem atuar na absorção da luz e na estabilização do enovelamento das proteínas (Fennema, 2007).

As ligações duplas conjugadas constituem os cromóforos de absorção de luz que promovem a coloração característica de cada molécula de carotenoide. A coloração característica dessas moléculas permite a identificação e quantificação das moléculas, além de identificação visual e monitoramento das várias etapas das análises para identificação e quantificação de carotenoides. Como a coloração varia de amarelo a vermelho, os picos de absorbância variam aproximadamente de 430 a 480 nm; os maiores comprimentos de onda são

geralmente utilizados para quantificação de xantofilas, para evitar interferências de clorofilas (Fennema, 1996).

Do grupo das xantofilas, a luteína é o carotenoide majoritário em folhas, vegetais verdes e flores amarelas; é conhecida por prevenir alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e doenças relacionadas à visão. O consumo diário de luteína, estimado em 1,5 mg, através da ingestão de vegetais e frutas, não é suficiente para atingir a dose recomendada de 6 mg dia<sup>-1</sup>. Consequentemente, recomenda-se ingerir luteína como suplemento alimentar, podendo ser obtida de fontes animais, como gema de ovo, e outras fontes vegetais, como calêndula e couve (Rodríguez-Amaya, 2001; Goto *et al.*, 2015; Limón *et al.*, 2015). Na Figura 3.3 é apresentada a estrutura da molécula de luteína.

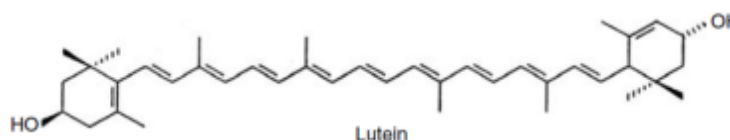


Figura 3.3. Estrutura molecular da luteína.

Fonte: Adaptado de Fennema (2007).

A zeaxantina, também encontrada nas *Chlorellas*, juntamente com a luteína encontra-se acumulada em diferentes partes do olho humano, especialmente no centro da retina. Esses dois pigmentos são normalmente referenciados com pigmentos maculares (MP, *macular pigments*, do inglês) (Bendich e Olson, 1989; Granado-Lorencio *et al.*, 2009). Na Figura 3. 4 é apresentada a estrutura molecular da zeaxantina.

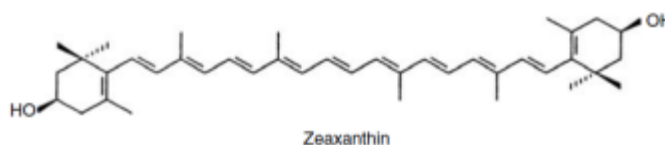


Figura 3. 4. Estutura da molécula de zeaxantina

Fonte: Adaptado de Fennema (2007).

Nas algas verdes, como é o caso das *Chlorellas*, também pode-se encontrar outras xantofilas como a violaxantina e a neoxantina, além dos carotenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno. Inbaraj, Chien e Chen (2006) realizaram a qualificação e quantificação de carotenoides na microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Esses autores constataram que a luteína foi o carotenoide majoritário, sendo sua concentração correspondente a 93% do teor de carotenoides, seguido do  $\beta$ -caroteno

(2,6%),  $\alpha$ -caroteno (2,6%), zeaxantina (1,3%), xantofilas com grupo epóxi (0,2%) e  $\beta$ -criptoxantinas (0,2%). Tibbetts *et al.* (*In Press*) caracterizaram a biomassa de várias espécies de microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Nannochloris bacillaris*, *Tetracystis* sp. e *Micractinium reisseri*. Os autores constataram que o teor de carotenoides na microalga *Chlorella vulgaris* foi de  $176,7 \pm 12,6$  mg 100g de biomassa seca<sup>-1</sup>. A luteína foi considerada o carotenoide majoritário ( $132 \pm 8,7$ ), seguida pela zeaxantina ( $20,8 \pm 2,0$ ) e fucoxantina ( $6,2 \pm 0,6$ ). Os autores não identificaram os carotenoides  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno. Para fins de comparação com vegetais normalmente consumidos pelo homem, a couve é considerada um dos vegetais mais ricos em luteína. Dos Reis *et al.* (2015) avaliaram o teor de carotenoides, flavonoides, clorofila, compostos fenólicos e atividade antioxidante na couve e no brócolis frescos e cozidos. O teor de luteína e zeaxantina encontrado pelos autores na couve fresca foi de  $731 \pm 19$   $\mu$ g 100 g de amostra seca<sup>-1</sup>; e  $70,5 \pm 1,6$   $\mu$ g 100g de amostra seca<sup>-1</sup>, respectivamente. O espinafre também é considerado um vegetal rico em luteína. Bunea *et al.* (2008) avaliaram o teor de carotenoides e ácidos fenólicos em espinafre fresco, refrigerado e processado. O teor de luteína encontrado pelos autores nas amostras analisadas variou de 33,5 a 53 mg kg de massa úmida<sup>-1</sup>. De Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2005) avaliaram a influência do amadurecimento, de estações e de processamento no teor de carotenoides em espinafre e endívia. O teor de luteína encontrado pelos autores nas diferentes amostras de espinafre variou de 37,9 a 50,5  $\mu$ g g<sup>-1</sup> e nas amostras de endívia variou de 20,6 a 61,5  $\mu$ g g<sup>-1</sup>.

### Lipídeos

As definições de lipídeos apresentadas na literatura são bem variadas. Alguns autores definem lipídeos como uma variedade de produtos naturais incluindo ácidos graxos e seus derivados, esteroides, terpenos, carotenoides; esses compostos têm em comum a solubilidade em solventes orgânicos, como éter dietílico, hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol. Outros autores definem lipídeos como moléculas que são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio, éter e benzeno; contém longas cadeias de hidrocarboneto e estão presentes ou são derivados de organismos vivos (Casimir C. Akoh, 2008).

A classificação das moléculas de lipídeos é baseada em propriedades físicas a temperatura ambiente (óleos são líquidos e gorduras são sólidas), na polaridade (lipídeos polares ou neutros), na essencialidade (ácidos graxos essenciais e não essenciais) e na estrutura (lipídeos de estrutura simples ou complexos) (Casimir C. Akoh, 2008).

Os ácidos graxos são os componentes principais das moléculas de lipídeo e são compostos por uma cadeia alifática ligada a um ácido carboxílico. A maioria dos ácidos graxos encontrados na natureza possui cadeia carbônica com 14 a 24 carbonos. Os ácidos graxos insaturados mais comuns possuem apenas uma dupla ligação e a posição mais comum é no carbono 9, contado a partir ácido carboxílico; esse é o caso do ácido oleico (18:1 $\omega$ 9), comumente encontrado em alimentos. A localização estereoespecífica das duplas ligações é importante na determinação do impacto de cada ácido graxo em relação aos aspectos nutricionais. Estudos demonstram que a substituição de gorduras saturadas por insaturadas pode reduzir os níveis de deposição de gorduras nas artérias, diminuindo o nível de colesterol LDL (Seo *et al.*, 2005; Sudheendran, Chang e Deckelbaum, 2010). Dentre os ácidos graxos insaturados, alguns são considerados essenciais, ou seja, não são sintetizados pelo organismo humano. Os ácidos graxos do tipo  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 são ácidos graxos essenciais e atuam em diversos processos metabólicos importantes. Ácidos graxos do tipo  $\omega$ -3 atuam na membrana celular, no DNA e no metabolismo eicosanoide, e são encontrados, principalmente, em peixes e alguns óleos vegetais, como canola e soja. Ácidos graxos do tipo  $\omega$ -6 são mais comumente encontrados, se comparado aos  $\omega$ -3, sendo normalmente encontrados nos óleos de milho e girassol, carnes e ovos (Fennema, 2007).

Os fosfolipídeos são lipídeos polares que, junto com as proteínas, são os componentes majoritários da membrana celular. A habilidade dos lipídeos de promover uma barreira de permeabilidade em dupla camada entre os ambientes interno e externo das células constitui uma das mais importantes funções da membrana celular. Dois tipos de mecanismos são frequentemente utilizados para descrever a permeação de íons através da membrana celular. No primeiro, os íons se deslocam através da membrana e se difundem através da fase hidrofóbica. No segundo, conhecido como mecanismo de formação de poro, os íons passam através da membrana por defeitos físicos existentes na mesma.

Lipídeos produzidos por microalgas normalmente incluem lipídeos neutros, lipídeos polares, ceras, esteróis e hidrocarbonetos (tocoferóis, carotenoides e terpenos). Esses lipídeos podem ser agrupados em dois grupos: lipídeos de reserva (apolares) e lipídeos estruturais (polares). Os lipídeos de reserva normalmente possuem forma de triglicerídeos, constituídos predominantemente de ácidos graxos saturados e alguns ácidos graxos insaturados, que podem ser transesterificados para a produção de biodiesel. Os lipídeos estruturais normalmente são constituídos por ácidos graxos poli-insaturados (Sharma, Schuhmann e Schenk, 2012).

O teor de lipídeos pode variar, dependendo da espécie de microalga, de 1 a 70%, podendo atingir até 90%, em base seca, dependendo das condições de cultivo (Spolaore *et al.*, 2006). O acúmulo de lipídeos nas microalgas é normalmente estimulado durante períodos de estresse. Esse acúmulo pode ser controlado pela enzima acetil-coa-carboxilase, que catalisa uma etapa inicial na biossíntese de ácidos graxos (Kiran, Kumar e Deshmukh, 2014). Na Tabela 3.2 é apresentado o teor de lipídeos de acordo com a espécie de microalga.

Krzemińska *et al.* (2015) avaliaram a influência da luminosidade no teor de lipídeos totais e o perfil de ácidos graxos na microalga *Chlorella protothecoides*. Os autores variaram a luminosidade de 35 a 420  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O perfil de ácidos graxos obtido utilizando condições mais elevadas de luminosidade foi: C18:2 (ácido linoleico), com concentração de  $31,51 \pm 3,29$  e C(18:1) ácido oleico, com concentração de  $32,19 \pm 4,01$ , seguidos do C16:0 (ácido palmítico), com concentração de  $12,69 \pm 1,09$  e do C18:3 (ácido linolênico), com concentração de  $7,44 \pm 3,65$ .

Praveenkumar *et al.* (2014) estudaram a produtividade da microalga *Chlorella sp.* em diferentes condições de cultivo. Para tanto, os autores identificaram a concentração de lipídeos nas células de microalgas, bem como o perfil de ácidos graxos. Em todas as condições de cultivo avaliadas, o ácido palmítico (C16:0), o ácido linoleico (C18:2n6c), o ácido esteárico (C18:0) e o ácido oleico (C18:1n9c) corresponderam a mais de 50 % do teor total de ácidos graxos nas amostras. As concentrações dos ácido linoleico e palmítico variaram de  $21,92 \pm 0,84$  a  $25,96 \pm 0,8$  e de  $20,85 \pm 0,25$  a  $24,68 \pm 0,82$ , respectivamente. Ohse *et al.* (2015) avaliaram o teor de lipídeos e o perfil de ácidos graxos de dez espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* e *Isochrysis sp.*). Os autores constataram que o teor de lipídeos totais encontrado na microalga *Chlorella vulgaris* foi de 16,1 % e os ácidos graxos majoritários foram o ácido palmítico e o ácido linolênico, correspondendo a 21,17 e 22,71 % do teor total de ácidos graxos, respectivamente. Os ácidos esteárico, oleico e linoleico também foram identificados e corresponderam a 15,47, 13,46 e 7,44 %, respectivamente.

O desenvolvimento de um processo sustentável e efetivo para a extração de lipídeos a partir das células de microalgas é fundamental para viabilizar a produção em larga escala de biodiesel, além da extração de ácidos graxos com potencial de utilização na indústria de

alimentos. Esse assunto será abordado com mais detalhes nos subcapítulos de pré-tratamento e extração.

Tabela 3.2. Microalgas e teor de lipídeos (% , base seca).

<b>Microalga</b>	<b>Teor de lipídeos (%, base seca)</b>
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23
<i>B. braunii</i>	25-75

Fonte: Adaptado de Khan *et al.* (2009)



### 3.1.4. Aplicações comerciais

Um grande número de aplicações comerciais para as microalgas tem sido sugerido e investigado. A crescente demanda por produtos de origem natural faz com que os produtos sintetizados pelas microalgas sejam de interesse das indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêutica (Luengo *et al.*, 2014).

As microalgas podem ser utilizadas como suplemento alimentar tanto na alimentação humana como animal, devido, principalmente, ao seu alto valor proteico. Ainda, o padrão de aminoácidos da maioria das espécies de microalgas é comparável a outros alimentos ricos em proteínas. Além de proteínas, as células de microalgas contêm carboidratos na forma de amido, glicose, outros açúcares e polissacarídeos (Spolaore *et al.*, 2006).

Para o consumo humano, as microalgas são comercializadas em forma de cápsulas, comprimidos ou líquidos. Além disso, podem ser incorporadas em massas, salgadinhos, balas e bebidas. As principais cepas utilizadas para essas aplicações comerciais são *Arthrospira*, *Chlorella*, *D. salina* e *Aphanizomenon flos-aquae* (Spolaore *et al.*, 2006).

Além de proteínas e carboidratos, as microalgas também são consideradas fontes promissoras de vários produtos de alto valor agregado, como carotenoides, clorofilas, ficobilinas, vitaminas, esteróis e ácidos graxos poli-insaturados dos tipos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6. Porém, atualmente, apenas se realiza a comercialização em grande escala de cultivos autotróficos de  $\beta$ -caroteno, sintetizado a partir de *Dunaliella salina*, e astaxantina, sintetizada a partir de *Haematococcus pluvialis*. Outras cepas de microalgas e processos de produção necessitam melhorias para competir com os produtos tradicionalmente utilizados em alimentos, cosméticos e na agricultura (Leu e Boussiba, 2014).

O grande acúmulo de triglicerídeos por algumas espécies de microalgas tem despertado o interesse do cultivo desses microrganismos para a produção de biocombustíveis. Contudo, ainda são necessárias melhorias nas etapas de cultivo para viabilizar a produção de biocombustíveis a partir de biomassa algal. Os maiores desafios encontrados hoje são o tamanho das células (da ordem de micrometros), a massa específica (similar a da água) e a baixa concentração de biomassa no meio de cultura. Portanto, a energia necessária para realização de cultivo e colheita ainda é considerada alta. A maioria das plantas em larga escala utiliza centrífugas para a colheita, o que se justifica economicamente devido ao alto valor agregado dos produtos a serem obtidos a partir da biomassa (Bilad, Arafat e Vankelecom,

2014; Leu e Boussiba, 2014).

Na Figura 3.5 é apresentado um esquema incluindo os diferentes compostos produzidos pelas microalgas bem como suas aplicações.

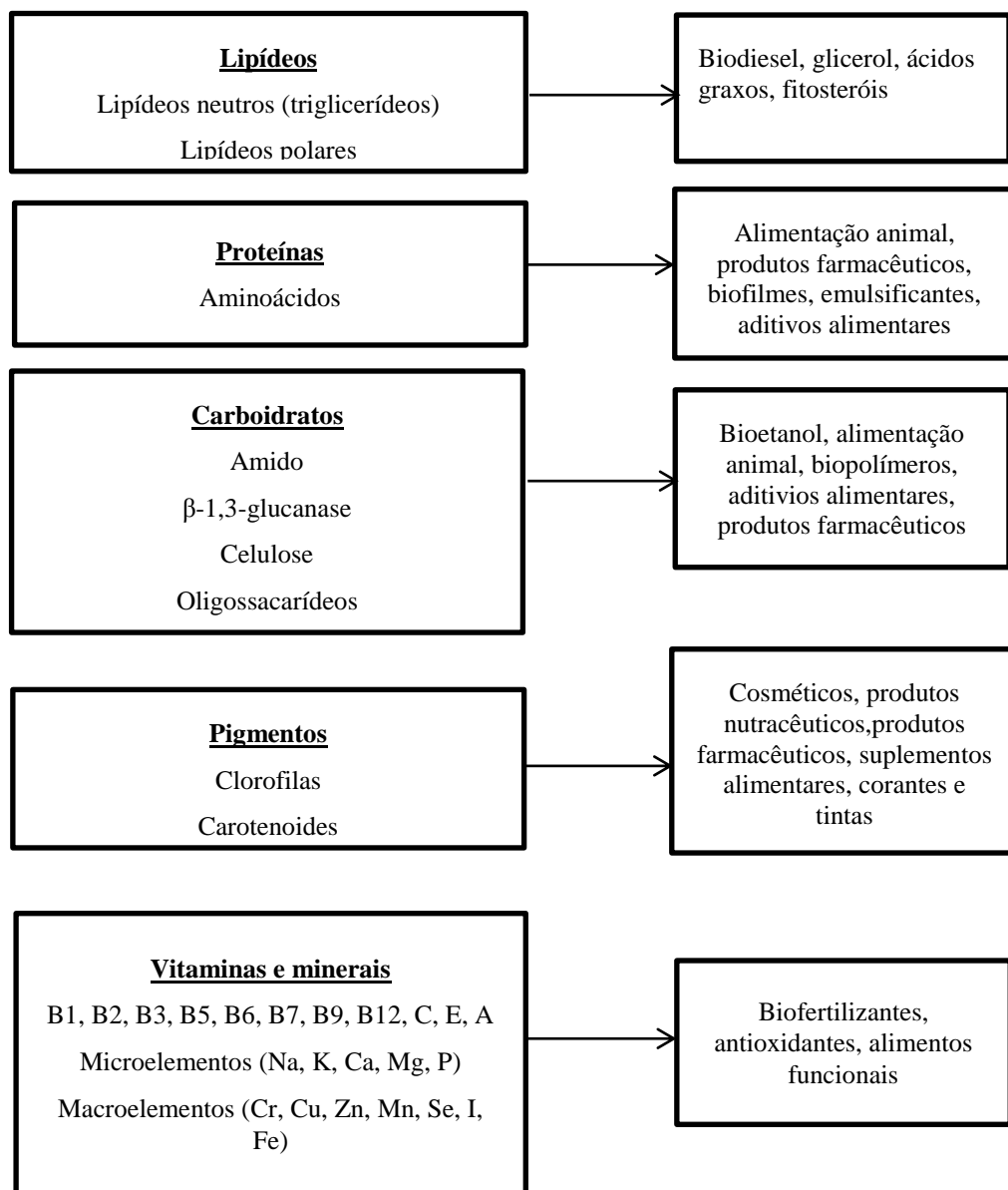


Figura 3.5. Esquema apresentando os principais compostos produzidos pelas microalgas, bem como suas principais aplicações.

Fonte: Adaptado de Safi *et al.* (2014) e Luengo *et al.* (2014).

As *Chlorellas* são produzidas por mais de 70 companhias, sendo a Taiwan Chlorella Manufacturing and Co. (Taipei, Taiwan) o maior produtor, atingindo 400 toneladas por ano de

biomassa seca (Spolaore *et al.*, 2006).

### **3.2. Cultivos de microalgas**

Nessa seção é apresentada a classificação dos cultivos de microalgas. Os cultivos podem ser classificados quanto à presença de nutrientes (autotrófico, heterotrófico e mixotrófico), quanto à operação do processo (batelada, contínuo e semicontínuo) e quanto ao sistema de cultivo (aberto ou fechado).

#### **3.2.1. Cultivo autotrófico**

O cultivo autotrófico é o mais comum entre os métodos de cultivo. Organismos autotróficos possuem a capacidade de converter energia solar, gás carbônico e água em energia (carboidratos, lipídeos e proteínas). Esse tipo de cultivo utiliza gás carbônico; portanto, pode ser utilizado para capturar CO<sub>2</sub> da atmosfera ou de algum processo com saída de gases (Prathima Devi, Swamy e Venkata Mohan, 2013). Se comparada com outras plantas, as microalgas possuem alta capacidade da conversão de gás carbônico em energia através da fotossíntese (Zeng *et al.*, 2011). Além disso, nesse tipo de cultivo, a contaminação, por outros tipos de microorganismos, é considerada menos provável de ocorrer. A principal desvantagem desse método de cultivo é o baixo rendimento de biomassa, se comparada a cultivos que utilizam fonte de carbono orgânico. Ainda, em cultivos autotróficos existe a limitação da luminosidade; quando atinge-se uma alta densidade ótica no meio de cultivo, algumas células não são mais expostas a luz, o que prejudica o crescimento (Chen *et al.*, 2011).

#### **3.2.2. Cultivo heterotrófico**

No método de cultivo heterotrófico, a biomassa é alimentada com alguma fonte de carbono orgânica e, por esse motivo, esse tipo de cultivo não necessita luz. Assim, as microalgas podem ser cultivadas em biorreator de tanque agitado ou em fermentadores. Através da utilização de cultivo heterotrófico, normalmente, atinge-se elevado grau de crescimento e custos de colheita mais baixos devido à alta produtividade e grande acúmulo de compostos que dependem diretamente da concentração de carbono no meio de cultivo, como lipídeos. As fontes de carbono normalmente utilizadas são glicose, acetato, glicerol e glutamato (Safi *et al.*, 2014).

Na Tabela 3.3 é apresentada uma comparação do acúmulo de compostos em células de *Chlorella Protothecoides* em cultivo autotrófico e heterotrófico.

Tabela 3.3. Composição de células de *Chlorella protothecoides* em cultivo autotrófico e heterotrófico.

Componente (%)	Cultivo autotrófico	Cultivo heterotrófico
Proteína	52,64 ± 0,26	10,28 ± 0,10
Lipídeo	14,57 ± 0,16	55,20 ± 0,28
Carboidrato	10,62 ± 0,14	15,43 ± 0,17
Cinzas	6,36 ± 0,05	5,93 ± 0,04
Umidade	5,39 ± 0,04	1,96 ± 0,02
Outros	10,42 ± 0,65	11,20 ± 0,61

Fonte: Apadtado de Xu, Miao e Wu (2006).

### 3.2.3. Cultivo mixotrófico

Esse tipo de cultivo pode ser realizado para crescimento de algumas espécies de microalgas que possuem a capacidade de crescer tanto em condições autotróficas como heterotróficas; nesse tipo de cultivo as microalgas podem crescer em presença de luz e utilizar fonte de carbono orgânico para o crescimento. Isso acontece porque muitas espécies não são necessariamente dependentes da luz ou de fontes orgânicas de carbono. Cultivos mixotróficos, normalmente, atingem alta produtividade de biomassa e lipídeos. As principais vantagens são a redução de substratos orgânicos utilizados para o crescimento e a minimização da perda de biomassa na etapa de respiração no escuro. Esse tipo de cultivo é o menos utilizado atualmente (Mata, Martins e Caetano, 2010; Safi *et al.*, 2014; Skorupskaite, Makareviciene e Levisauskas, 2015).

### 3.2.4. Sistemas de cultivo abertos

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos ou fechados. Sistemas abertos são os mais comumente utilizados para produção de biomassa em larga escala. Esses sistemas consistem no crescimento de microalgas em águas residuais, sistemas artificiais, como lagoas e containers, e sistemas naturais, como lagos e lagoas. Os sistemas abertos normalmente são construídos nas proximidades de indústrias com grande descarga de gases, como dióxido de carbono. Esses sistemas são considerados mais baratos do que os sistemas fechados, porém, possuem algumas limitações. Para realização de cultivos em sistemas abertos é necessário um

rigoroso controle do ambiente para evitar a contaminação por bactérias e outros contaminantes e a excessiva evaporação da água. Além disso, normalmente se utiliza sistemas abertos com agitação porque ocorre a flotação de muitas células, o que prejudica a absorção da luz pelas células que se encontram mais abaixo (Safi *et al.*, 2014).

### **3.2.5. Sistemas de cultivo fechados**

Sistemas fechados vêm sendo utilizados para superar muitas das dificuldades encontradas nos sistemas abertos. Através da utilização desse tipo de sistema é possível atingir níveis maiores de produção de biomassa devido à possibilidade de controlar o pH, a luminosidade, a temperatura e a concentração de dióxido de carbono no meio de cultivo. Vários modelos de fotobiorreatores em sistemas fechados têm sido utilizados e estudados: placa plana, tubular e em forma de coluna. A principal desvantagem desses sistemas é o custo de construção e esterilização do sistema e a baixa área de iluminação (Richmond, 2004; Safi *et al.*, 2014).

### **3.2.6. Cultivos em batelada**

O cultivo em batelada é a maneira mais comum de realizar cultivo de microalgas. É necessária a utilização de inóculo, uma quantidade limitada de meio de cultivo e alguma forma de agitação. As diferentes fases que ocorrem durante um cultivo fechado em batelada são relacionadas a seguir (Richmond, 2004).

#### Fase lag

Fase inicial de ajuste fisiológico devido a mudanças nas condições de cultura. Essa fase inicial pode ocorrer também devido à presença de células inviáveis ou a presença de esporos no meio de cultura. Pode ser evitada quando células em fase exponencial de crescimento são utilizadas como inóculo.

#### Fase exponencial

Na fase lag as células se adaptam às condições de cultivo e iniciam o crescimento e multiplicação e, então, tem início a fase de crescimento exponencial. Ao final da fase exponencial, as células crescem e se dividem como função exponencial ao longo do tempo.

#### Fase linear

A quantidade de luz absorvida pelas células, em meio de cultura autotrófico, normalmente

é determinada pela concentração de células e não pela iluminação. Assim, a concentração de células vai continuar crescendo exponencialmente até que todos os fótons de luz que atravessam a superfície do reator sejam absorvidos pelas células. Uma vez que essa concentração é atingida, a concentração de biomassa aumenta a taxa constante até que algum substrato ou inibidor atue como fator limitante.

### **3.2.7. Cultivos contínuos**

Em cultivos contínuos, novo meio de cultura é repostado no cultivo, enquanto que uma parte do cultivo é retirada continuamente ou intermitentemente. A retirada de meio de cultivo e a alimentação são realizadas a partir da observação da falta de substrato e acúmulo de produtos durante o crescimento. Para garantir o crescimento, os substratos limitantes do crescimento devem ser repostos e os produtos inibidores do crescimento devem ser removidos ou diluídos através da adição de novo meio de cultura. Cultivos semi-contínuos se caracterizam pela retirada de parte do cultivo em determinado período (horas ou dias, normalmente) e reposição da alimentação para manter o crescimento dos microrganismos.

### **3.3. Pré-tratamentos de extração**

Nesta seção são apresentados alguns processos de extração utilizados concomitantemente ou como alternativas à extração convencional. É importante ressaltar que, neste trabalho, optou-se por apresentar as siglas conforme o nome de cada processo em inglês, já que há poucos estudos abordando essas tecnologias no Brasil.

Os compostos de interesse presentes nas microalgas estão confinados no interior das células envoltas por uma parede celular rígida, o que confere alta resistência a ataques de bactérias e, por sua vez, dificulta o rompimento dessa barreira. Além disso, a presença de uma membrana plasmática intacta também dificulta a extração. Portanto, a busca por um método eficiente de extração dos componentes intracelulares é fundamental para aumentar a competitividade e viabilizar a extração dos compostos produzidos por esses microrganismos (Goettel *et al.*, 2013; Luengo *et al.*, 2014; Mendez *et al.*, 2014).

A extração desses componentes de interesse presentes nas microalgas pode ser realizada tanto a partir de biomassa seca quanto úmida. Contudo, a secagem da biomassa envolve gastos energéticos e tempo de processamentos maiores. Assim, é preferível realizar a extração a partir de biomassa hidratada.

A maior parte das técnicas de extração utilizadas se baseia no uso de solventes orgânicos ou fluidos supercríticos. Contudo, quando a biomassa hidratada entra em contato com solventes orgânicos, os componentes de interesse (apolares) tendem a permanecer na fase aquosa devido às cargas superficiais das moléculas. Assim, para a utilização de biomassa hidratada se torna necessária a utilização de um método de pré-tratamento. Com o rompimento celular, os compostos confinados no interior da célula conseguem migrar com maior facilidade para a fase orgânica, o que facilita a extração (Concas, Pisu e Cao, 2015).

Com o objetivo de acelerar a extração desses compostos, vários métodos de rompimento celular têm sido estudados. Dentre eles, tratamentos físicos ou mecânicos (*high pressure homogenization*, moinho de bolas, micro-ondas, ultrassom, eletrocoagulação, decomposição térmica, choque osmótico, eletroporação e tratamento com laser), tratamentos químicos (hidrólise enzimática, hidrólise básica e hidrólise ácida), e extração utilizando fluidos supercríticos. Na maioria dos casos, a combinação da utilização de solvente com métodos de pré-tratamento mecânicos tem se mostrado mais eficiente para o rompimento da parede celular. Contudo, mesmo com o uso dos pré-tratamentos citados, a baixa concentração de biomassa proveniente do cultivo (0,1-1%, base seca), torna o processo de extração difícil e caro. Aliado a esse fator, vários dos métodos citados não atuam de forma seletiva, o que também reduz a eficiência da extração; esse é o caso dos métodos mecânicos que normalmente possuem boa eficiência, mas não possuem boa seletividade (Grimi *et al.*, 2014).

Grimi *et al.* (2014) estudaram diferentes métodos de rompimento celular: PEF (*pulsed electric field*) (20 kV/cm, 1–4 ms, 13,3–53,1 kJ/kg), *high voltage electrical discharge* (HVED) (40 kV/cm, 1–4 ms, 13,3–53,1 kJ/kg), ultrassom (USN) (200 W, 1–8 min, 12–96 kJ/kg), e *high pressure homogenization* (HPH) (150 MPa, 1–10 passes, 150–1500 kJ/kg). Esses autores constataram que as tecnologias elétricas (PEF e HVED) permitem a extração seletiva de componentes iônicos e orgânicos de baixa massa molar, solúveis em água; contudo, não se observou extração de pigmentos (clorofilas e carotenoides). A técnica de HPH foi a tecnologia mais eficiente para extração desses componentes.

Recentemente, a aplicação de tecnologias elétricas têm se mostrado uma alternativa atraente para a extração seletiva de compostos intracelulares. Estudos mostram que a aplicação de campo elétrico pulsado (PEF) pode ser usada para formação de poros em tecidos vegetais, para intensificar a extração de compostos intracelulares de interesse. O processo de PEF

utilizada corrente elétrica na forma de pulsos, com duração de microsegundos e intensidade de campo elétrico elevada (da ordem de kV) (Vorobiev e Lebovka, 2006).

Goettel *et al.* (2013) estudaram a influência de PEF na extração de lipídeos a partir de biomassa seca e hidratada de *Auxenochlorella protothecoides*; esses autores constataram que o tratamento com PEF aumentou a extração dos compostos intracelulares em até 4 vezes, se comparado às amostras não tratadas. Esses autores realizaram o tratamento com PEF em presença de etanol, em concentrações de 50, 70 e 100%, e constataram que o teor de lipídeos após a extração foi maior quando foi utilizado 70% de etanol.

Parniakov *et al.* (2015b) estudaram a extração de compostos intracelulares (pigmentos, compostos fenólicos e proteínas) da microalga *Nannochloropsis* sp. utilizando a extração convencional (apenas com os solventes orgânicos, dimetilsulfóxido e etanol) e compararam com a extração com PEF em presença de água como um pré-tratamento. Os autores constataram que o uso apenas de PEF, em presença de água, ocorre extração seletiva das proteínas nesta primeira etapa e posterior extração dos pigmentos e fenólicos na extração convencional; quando se realiza apenas a extração convencional ocorre degradação de proteínas.

Zbinden *et al.* (2013) avaliaram a utilização de PEF em presença de acetato de etila como pré-tratamento na extração de lipídeos a partir da microalga *Ankistrodesmus falcatus*. Os autores avaliaram também a extração tradicional (descrito por Bligh & Dyer), utilizando como solventes acetato de etila, metanol e água em proporção de 10:5:4, respectivamente; o teor de lipídeos com acetato de etila foi de 83 a 88% superior ao teor de lipídeos obtido com clorofórmio. A utilização de PEF em presença de acetato de etila resultou em um incremento no teor de lipídeos extraídos de 50% se comparado a extração convencional na mesma temperatura.

Luengo *et al.* (2014) avaliaram a permeabilização e a extração de pigmentos de células de *Chlorella vulgaris*. A intensidade do campo elétrico variou de 10 a 25 kV cm<sup>-1</sup> e a frequência de cada pulso foi 0,5 Hz. Os autores avaliaram a extração de pigmentos logo após a aplicação do tratamento com PEF e uma hora após o tratamento e esses resultados foram comparados com experimentos controle, nos quais não foi utilizado o tratamento com PEF. Os pesquisadores constataram que 1 h após a aplicação de PEF, a concentração de pigmentos (carotenoides e clorofila *a* e *b*) foi até 2,1 vezes maior do que a encontrada nas amostras analisadas imediatamente após a aplicação do tratamento.



Dos Santos *et al.* (2015) avaliaram diferentes métodos de ruptura celular na extração de lipídeos a partir de microalgas. Os autores avaliaram a extração assistida por ultrassom e microondas e avaliaram as técnicas de *electroflotation by alternating current* (EFAC) e autoclave, realizando um pré-tratamento das amostras utilizando ambos os métodos. A eficiência de cada metodologia foi avaliada através da comparação com o controle, que consistiu na extração lipídica pelo método de Bligh & Dyer, sem nenhum pré-tratamento. Os pesquisadores constataram que as metodologias que resultaram no maior rendimento de extração foram as de microondas ( $33,7 \pm 5,3$  %) e EFAC ( $24,8 \pm 7,1$  %). As metodologias de autoclave, ultrassom e controle resultaram na extração de  $15,4 \pm 2,3$  %,  $13,3 \pm 3,0$  % e 4,8 %, respectivamente.

A aplicação de campo elétrico tem se mostrado uma alternativa atraente para a extração seletiva de compostos intracelulares. Contudo, até onde se sabe, não há estudos que avaliaram a utilização de campo elétrico moderado (MEF) para extração de compostos a partir de microalgas. No subcapítulo seguinte, a tecnologia de MEF é abordada em detalhes.

### 3.4. Campo elétrico moderado

O campo elétrico moderado é um processo caracterizado pela utilização de campo elétrico de intensidade variando de 1 a  $1000 \text{ V cm}^{-1}$  com forma de onda arbitrável, com ou sem os efeitos de aquecimento ôhmico (Sensoy e Sastry, 2004). Normalmente a aplicação de campo elétrico moderado resulta na geração de calor; esse processo é denominado aquecimento ôhmico. Contudo, existem alguns efeitos associados ao campo elétrico que não estão associados à geração de calor e podem aumentar a transferência de massa de componentes intracelulares. Esses efeitos são chamados de efeitos não-térmicos e estão associados ao fenômeno de permeabilização das células (Eugène Vorobiev, 2008; Somavat, Mohamed e Sastry, 2013).

A exposição de células vegetais a um campo elétrico promove o acúmulo de cargas elétricas na membrana celular, o que induzindo ao aumento da diferença de potencial químico. Quando se atinge uma diferença de potencial suficientemente alta (de 0,5 a 1 V) ocorre um rearranjo das moléculas de fosfolipídeos e se atinge o chamado potencial de colapso. Como resultado, a membrana perde sua seletividade e se torna permeável. Esse fenômeno é conhecido como eletroporação, eletropermeabilização ou eletroplasmólise. Dessa forma, o fenômeno de eletroporação tem sido conhecido por induzir a formação de poros em membranas celulares,

aumentando a transferência de massa desses componentes para o meio externo bem como de componentes presentes no meio externo para o interior da célula (Jemai e Vorobiev, 2002; Kusnadi e Sastry, 2012).

De acordo com a exposição térmica e elétrica de determinado tratamento, é possível obter diferentes efeitos em um tecido vegetal. Segundo (Papchenko *et al.*, 1988), a eletroplasmólise pode ser dividida em dois mecanismos: eletroporação e desnaturação térmica da membrana celular. Em presença de calor a desnaturação térmica é o fenômeno mais importante; se a presença de calor é limitada, ou não existe, a eletroporação é o fenômeno principal da plasmólise.

A eletroporação pode ocorrer de maneira reversível ou irreversível. Para que a eletroporação ocorra de maneira reversível, a diferença de potencial transmembrana deve ser mantida abaixo do potencial de colapso. Neste tipo de eletroporação, os poros são temporariamente formados e são mantidos apenas durante a aplicação de campo elétrico. Pelo contrário, quando o potencial de colapso é atingido, ocorre a formação permanente de poros, resultando na desintegração da membrana e morte celular. Uma representação esquemática de ambos os fenômenos é apresentada na Figura 3.6. O fenômeno de eletroporação é dividido em diferentes fases: a primeira é a formação de poros na membrana celular, em resposta à diferença de potencial induzido, com duração de alguns microsegundos; a segunda fase é a expansão dos poros formados, que pode durar de microsegundos a milisegundos, dependendo da duração dos pulsos aplicados; a última fase é a recuperação da membrana celular e se inicia com o término da aplicação de campo elétrico podendo ter duração de minutos. Os fenômenos de formação de poros e recuperação da membrana celular ocorrem mais rapidamente a temperaturas elevadas. A difusão através dos poros pode levar minutos a 35 °C e até horas se o processo for mantido a 4 °C (Eugène Vorobiev, 2008).

Os parâmetros que influenciam na eficiência da eletroporação são: intensidade do campo elétrico, forma, duração e número de pulsos elétricos aplicados e a energia específica fornecida (Goettel *et al.*, 2013). Esses parâmetros são controlados no processo de PEF, que utiliza pulsos elétricos em curto intervalo de tempo (microsegundos ou milisegundos) com intensidade do campo elétrico acima de 1 kV cm<sup>-1</sup> (Puértolas *et al.*, 2012). No processo de MEF não são utilizados pulsos, e sim corrente elétrica alternada de maneira contínua. A utilização de corrente elétrica alternada é análoga à utilização de pulsos e o número de pulsos por segundo é dado pela frequência utilizada. A eletroporação é favorecida pela aplicação de

baixas frequências, normalmente em torno de 50 Hz (Sensoy e Sastry, 2004; Eugène Vorobiev, 2008).

A aplicação de MEF proporciona eletroporação reversível da camada fosfolipídica. Este tipo de eletroporação tem sido estudado em processos de secagem (Lima e Sastry, 1999; Wang e Sastry, 2000; Salengke e Sastry, 2005), extração (Schreier, Reid e Fryer, 1993; Lima, Heskitt e Sastry, 2001; Kulshrestha e Sastry, 2003; Sensoy e Sastry, 2004; Kulshrestha e Sastry, 2010) e na influência do crescimento de microrganismos (Cho, Yousef e Sastry, 1996; Loghavi, Sastry e Yousef, 2007). Além disso, a eletroporação reversível é considerada uma ferramenta da biologia molecular para introduzir moléculas de interesse em células. Acredita-se ainda que a aplicação de baixas tensões induzem reações de estresse em células de tecidos vegetais, o que resulta em um aprimoramento do mecanismo de defesa das células e, conseqüentemente, no aumento da produção de metabólitos secundários (Sensoy e Sastry, 2004; Eugène Vorobiev, 2008).

A aplicação de tensão elevada, como é o caso do PEF, proporciona eletroporação irreversível. Este tipo de eletroporação causa a morte celular e é aplicável à inativação de microrganismos e pasteurização não térmica de alimentos líquidos (Sensoy e Sastry, 2004; Eugène Vorobiev, 2008; Goettel *et al.*, 2013; Zbinden *et al.*, 2013).

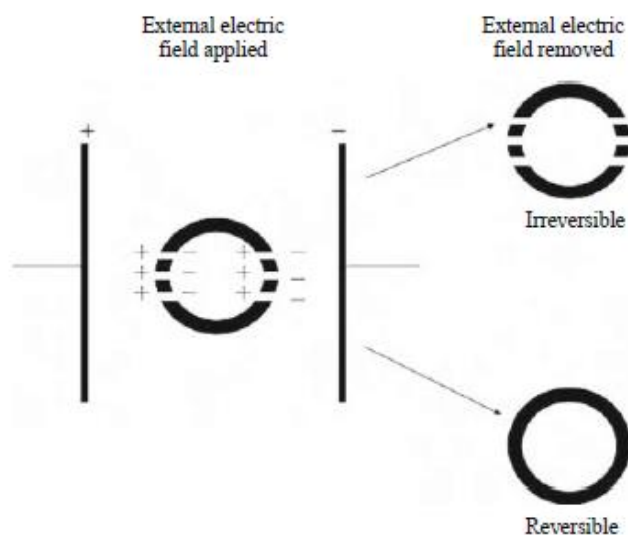


Figura 3.6. Esquema representativo dos fenômenos de eletroporação reversível e irreversível.

Fonte: Adaptado de Eugène Vorobiev (2008)

Conforme já mencionado, estudos apontam resultados positivos na extração de lipídeos e pigmentos a partir de microalgas utilizando PEF (Goettel *et al.*, 2013; Zbinden *et al.*,

2013; Grimi *et al.*, 2014; Luengo *et al.*, 2014; Parniakov *et al.*, 2015a; Parniakov *et al.*, 2015b). Contudo, a eletroporação reversível tem sido pouco investigada apesar de interessantes estudos terem sido relatados com o uso de MEF na extração de compostos de alimentos, conforme já citado anteriormente.

Kulshrestha e Sastry (2003) estudaram a difusão de corante de beterraba com tensão variando de 0 a 23,9 V/cm e frequência de 0 a 5000 Hz. Esses autores concluíram que a difusão aumenta com o aumento da tensão e com a diminuição da frequência; ainda, segundo os autores, a transferência de massa aumentou quando a matéria-prima possuía células intactas. Sensoy e Sastry (2004) estudaram os efeitos do MEF na permeabilidade de células de alimentos. Para tanto, os autores avaliaram os efeitos da tensão e frequência em folhas de chá preto fermentadas, frescas e secas e compararam com aquecimento convencional (controle). Os pesquisadores concluíram que a aplicação de MEF aumentou a transferência de massa de soluto a partir das folhas de chá, se comparado ao controle. Contudo, esse comportamento não foi observado quando se utilizou folhas secas; também foi observado aumento da difusão em baixas frequências.

Tecidos vegetais, quando expostos a baixas frequências, estão sujeitos à dispersão dielétrica devido à relaxação de cargas na membrana celular, fenômeno que não ocorre em altas frequências (Kulshrestha e Sastry, 2010). A aplicação de campo elétrico a baixas frequências proporciona maior tempo para a distribuição de cargas na membrana celular, o que pode vir a facilitar a eletroporação (Kulshrestha e Sastry, 2003).

Kulshrestha e Sastry (2010) estudaram a permeabilização ao longo do tempo de células de beterraba e batata utilizando MEF a baixas frequências. Esses autores concluíram que, mesmo com a aplicação de baixas tensões, ocorreu um aumento na difusão, o que sugere que tratamentos com baixa energia podem ser utilizados para aumentar a difusão de compostos do interior de células.

### **3.5. Efeitos do etanol na membrana celular**

Sabe-se que pequenas mudanças na estrutura da membrana celular alteram a funcionalidade das proteínas, influenciam na passagem de íons e aquaporinas ou canais de água que regulam o balanço físico-químico das células. O etanol pode desordenar a estrutura física da membrana celular através da interação com a camada fosfolipídica da membrana, aumentando sua permeabilidade. Essa desordem provocada pelo etanol pode ser observada em

praticamente todos os tipos de membranas celulares (Goldstein, 1986; Patra *et al.*, 2006). O etanol é capaz de passar através da membrana celular devido à parcela hidrofóbica da molécula que se liga com a parte hidrofóbica da membrana celular; além disso, as moléculas de etanol concentram-se em regiões próximas a interface entre os lipídeos e a água circundante, o que facilita a interação com a camada fosfolipídica (Patra *et al.*, 2006).

O etanol é amplamente utilizado como agente antimicrobiano em sanitização, e estudos demonstram que trata-se de um solvente efetivo para eliminar microrganismos. A eficácia do etanol puro é menor do que a do etanol diluído, sendo comumente utilizadas soluções com concentrações de 70% para assepsia. A concentração ideal da solução etanol/água varia conforme a espécie de microrganismo a ser reduzida. Para eliminar bactérias em biofilmes, por exemplo, a concentração mínima necessária de etanol é de 40% (Park *et al.*, 2015).

Öncü (2014) estudaram a concentração de etanol ideal para sanitização de cateteres contaminados com algumas espécies de *Candida*. Esses autores concluíram que concentrações variando de 30 a 80% por um período de 2 horas efetivamente destrói as células de *Candida*. Gurtovenko e Anwar (2009) realizaram simulações para avaliar os efeitos do etanol com concentrações variando de 2,5 a 30% molar em membranas fosfolipídicas. Esses autores constataram que, em concentrações abaixo de 12% molar (30,5 % v/v), o solvente provoca desordem da membrana bem como diminuição da espessura; essas mudanças se evidenciam com o aumento da concentração de etanol, contudo a estrutura em bicamada da membrana é mantida. Acima dessa concentração (12 %), inicia-se o aparecimento de irregularidades na membrana, afetando a estrutura de bicamada da membrana.

### **3.6. Métodos de extração e quantificação**

A seguir são apresentados os principais métodos descritos na literatura para extração, quantificação e qualificação de lipídeos e carotenoides. É importante salientar que na tecnologia avaliada no presente trabalho estes métodos não substituem a aplicação de MEF e foram utilizados para avaliação dos resultados, como métodos de quantificação e qualificação dos compostos de interesse.

### 3.6.1. Lipídeos

Os métodos mais utilizados na extração de lipídeos são métodos gravimétricos, que utilizam solventes orgânicos, como clorofórmio e hexano. Os métodos devem considerar a possibilidade de as moléculas de lipídeos se ligarem com outras moléculas, como proteínas e carboidratos, e a habilidade que diferentes misturas de solventes possuem de solubilizar as moléculas de interesse. Os lipídeos neutros (triglicerídeos) se dissolvem bem em solventes apolares; contudo, os lipídeos polares, (fosfolipídeos) somente são solúveis em solventes relativamente polares. Portanto, a mistura de solventes utilizada nos métodos deve ser suficientemente polar para remover os lipídeos do interior das células e suficientemente apolar para dissolver os lipídeos neutros.

Folch, Lees e Stanley (1957) desenvolveram um método de extração de lipídeos em tecidos animais pelo uso de uma mistura de clorofórmio e metanol, seguido da purificação do extrato com solução salina de cloreto de potássio. O método de Folch utiliza como solventes de extração clorofórmio e metanol na proporção 2:1 (v/v). O extrato é homogeneizado e misturado com água, sendo a mistura total dos solventes clorofórmio/metanol/água realizada na proporção 8:4:3 (v/v). A adição de água promove a separação das fases; a fase superior (metanólica) contém outros compostos não lipídicos, enquanto que a fase com clorofórmio concentra os lipídeos. Os autores sugerem adicionar, juntamente com a água, os sais Na, K, Ca ou Mg, de acordo com o tipo de amostra; pois a adição de sal purifica o extrato pela remoção de substâncias indesejadas, além de redistribuir para a fase lipídica uma parcela de lipídeos que pode ter permanecido na fase superior, como por exemplo ácidos graxos livres. A eficiência do sal depende da quantidade de sais minerais presentes no extrato; esses sais alteram a distribuição de lipídeos e praticamente eliminam todos os lipídeos da fase superior.

Posteriormente, Bligh e Dyer (1959) modificaram o método descrito por Folch, Lees e Stanley (1957). Os autores avaliaram a extração de lipídeos em amostras de peixe. A mistura de solventes utilizada foi metanol e clorofórmio na proporção 2:1 (v/v). As amostras foram homogeneizadas e o clorofórmio foi adicionado novamente à proporção final 1:1 de metanol/clorofórmio. Após a adição de clorofórmio, água foi adicionada à proporção final metanol/clorofórmio/água 2:2:1 (v/v/v). As amostras foram, então, filtradas e transferidas para pipeta graduada; após a separação das fases, o volume de clorofórmio foi medido e a fase alcoólica retirada por aspiração. Para determinação do teor de lipídeos na amostra, uma quantidade conhecida da fase com os lipídeos foi retirada, o solvente (clorofórmio) foi

evaporado e o teor lipídico determinado por diferença de massa. Os autores sugerem que para uma determinação mais precisa do teor de lipídeos nas amostras, o resíduo de amostra (tecido animal) e o resíduo contido no filtro devem ser postos em contato novamente com clorofórmio e o filtrado acondicionado junto com a fase clorofórmica obtida na primeira extração.

Hara e Radin (1978) posteriormente avaliaram a utilização de hexano e isopropanol na extração de lipídeos a partir de cérebro de rato. Os autores utilizaram a proporção 3:2 de metanol/isopropanol. A amostra foi homogeneizada e filtrada. Foram realizadas mais 3 lavagens do resíduo de amostra e do resíduo do filtro com hexano e isopropanol. Foi adicionada solução salina de sulfato de sódio ( $0,06 \text{ g mL}^{-1}$ ). Após a separação das fases, os lipídeos permaneceram na fase superior, rica em hexano. Esse método se mostrou adequado; contudo, em amostras que continham gangliosídios (lipídeos mais polares), o método não se mostrou adequado.

Chen, Shen e Sheppard (1981), com o objetivo de modificar o método de Folch, substituíram o clorofórmio por outro solvente, já que o clorofórmio é carcinogênico e a exposição ao solvente por períodos longos pode provocar aumento no fígado e danos nos rins. Os autores testaram diclorometano em substituição ao clorofórmio no método de Folch em 10 amostras de alimentos e encontraram o mesmo resultado para todas as amostras com ambos os métodos. Contudo, em relação a análise de lipídeos, principalmente de microalgas, todos esses métodos apresentam a desvantagem da utilização de grandes quantidades de biomassa (cerca de 1 g de biomassa seca) para realização da análise. Além disso, os processos de secagem e extração são dispendiosos (Mishra *et al.*, 2014). Devido a essas desvantagens, outros métodos para a extração de lipídeos passaram a ser estudados.

Métodos utilizando corantes lipofílicos fluorescentes do tipo Nile Red ou do tipo BODIPY foram desenvolvidos (Cooksey *et al.*, 1987). Nile Red e BODIPY têm sido utilizados como marcadores, apresentando fortes propriedades fluorescentes em ambientes apolares. O corante BODIPY tem se mostrado mais eficiente que o Nile Red. Contudo, esses métodos são eficazes somente para qualificação de lipídeos, não sendo adequados para quantificação, visto que a intensidade da fluorescência pode variar dependendo das células presentes na amostra; se algumas células tiverem parede celular muito espessa, o método passa a ser não confiável para quantificação, visto que a intensidade de iluminação pode variar de uma célula para outra (De La Hoz Siegler *et al.*, 2012).

Outro método que vem sendo utilizado recentemente é o método sulfo-fosfo-vanilina (SPV). Esse método é simples, menos dispendioso e necessita de quantidades muito pequenas de amostra, se comparado com os métodos anteriormente citados. O método SPV foi desenvolvido para determinação de lipídeos totais, primeiramente, na área médica e, recentemente, Mishra *et al.* (2014) avaliaram a aplicação do método em microalgas. O método SPV é baseado na reação de íons carbono, resultantes do processo de quebra das moléculas de lipídeo, com o grupo carbonila, presente no reagente fosfo-vanilina adicionado à amostra. A reação necessita de duplas ligações carbono-carbono, que serão quebradas pela adição de ácido sulfúrico, o que forma íons de carbono. Essa reação resulta em um composto de coloração rosada, detectável por medidas em espectrofotômetro (Knight, Anderson e Rawle, 1972). Basicamente, o método consiste em adicionar ácido sulfúrico concentrado à amostra lipídica e submetê-la a aquecimento a 100°C. Em seguida, adiciona-se o reagente fosfo-vanilina que reage com os lipídeos, resultando em coloração rosada. A amostra é, então, analisada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm.

### 3.6.2. Carotenoides

A estrutura química das moléculas de carotenoides, com sistemas de ligações conjugadas, torna a formação de isômeros frequente e fácil de ocorrer. A oxidação das moléculas de carotenoides pode ocorrer via oxidação ou isomeração e é influenciada pela presença de luz, calor, ácidos e oxigênio, principalmente. A grande variabilidade na estrutura química das moléculas e a baixa estabilidade contribuem para grandes dificuldades na realização da análise de carotenoides. Além disso, os padrões comerciais atualmente disponíveis são poucos e de preço elevado, e a baixa concentração desses componentes em amostras naturais (vegetais e animais) dificulta o desenvolvimento de métodos analíticos e a identificação e quantificação dos carotenoides em amostras.

A identificação de carotenoides em determinada amostra pode ser realizada via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada com espectroscopia de massas, pela comparação com dados existentes para cada molécula na espectroscopia de massas. No caso de picos desconhecidos, pode ser realizada uma relação entre os dados encontrados na cromatografia líquida (detectores DAD e UV-Vis) com a espectroscopia de massas. A quantificação pode ser realizada também via CLAE bem como por análises em espectrofotômetro, no UV-Vis. No caso das análises por cromatografia, a quantificação é



baseada em uma relação linear entre a massa de padrão injetada e a área do pico resultante. Normalmente, os cromatogramas de análises de carotenoides são relativamente complexos devido à variedade de compostos em uma única amostra. Não existem padrões para todos os carotenoides disponíveis, e, em muitos casos, apenas uma das formas isoméricas encontra-se disponível comercialmente (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014).

Para realizar a qualificação e quantificação de carotenoides, o método amplamente utilizado consiste na extração exaustiva, que é constituída pelos seguintes passos: contato com solvente orgânico (acetona, acetato de etila); posterior contato com éter de petróleo e éter etílico para separação das fases; saponificação, utilizando solução de KOH e metanol (essa etapa é necessária para remover clorofila e uma parcela de lipídeos que podem interferir na separação cromatográfica); lavagem da amostra com água destilada; segunda separação de fases, novamente com éter de petróleo e éter etílico; secagem em rota-evaporador e análise em cromatógrafo ou espectrofotômetro (Rodriguez-Amaya, 2001). Essa metodologia é bastante trabalhosa, sendo que a etapa de saponificação deve ser feita de um dia para o outro. Outra alternativa para extração de carotenoides, é a utilização da extração com fluidos supercríticos (Macías-Sánchez *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2010; Abrahamsson, Rodriguez-Meizoso e Turner, 2012; Guedes *et al.*, 2013).



## Capítulo 4 - Materiais e Métodos

Este capítulo apresenta a metodologia empregada para o cultivo das microalgas, assim como a metodologia utilizada para realização do processo de extração com a aplicação de MEF como pré-tratamento. Por fim, são apresentados os métodos para quantificação de lipídeos e carotenoides utilizados.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), localizado no Departamento de Engenharia Química da UFRGS, e no Laboratório de Bioengenharia, localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

### 4.1. Cultivo de microalgas

As cepas da microalga *Chlorella sp.* utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Professor Sérgio Lourenço, do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas, do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense. Essas cepas foram mantidas em um banco de algas no Laboratório 117, no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

O meio de cultivo utilizado foi o meio Guillard f1/2 modificado, conforme descrito por (Lourenço, 2006). Água do mar artificial contendo 34 g de sal marinho (Red Sea) por litro foi utilizada. O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave (121 °C por 15 min) e as soluções estoque, a seguir relacionadas, foram adicionadas posteriormente a fim de evitar degradação térmica e/ou precipitação. O meio de cultivo contém por litro as seguintes soluções estoque: 1 mL de solução de nitrato de sódio (300 mg L<sup>-1</sup>), 1 mL de solução de fosfato de sódio (5 g L<sup>-1</sup>), 1 mL de solução de silicato de sódio (30 g L<sup>-1</sup>), 1 mL de solução de metais traço, 1 mL de solução de vitaminas e 1 mL de solução tampão de pH. A solução de metais-traço contém por litro: 9,8 mg de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 22 mg de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 mg de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 180 mg de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 6,3 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4,36 g de Na<sub>2</sub>EDTA e 3,15 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. A solução de vitaminas contém, por litro: 100 mg de tiamina, 0,5 mg de cianocobalamina e 0,5 mg de biotina. A solução tampão utilizada para manter o pH entre 7,5 e 8,5 foi feita com 50 g de TRIS

(tris(hidroximetil)aminometano), aproximadamente 30 mL de ácido clorídrico e água destilada para um volume final de 200 mL.

As condições de cultivo adequadas para uma maior produção de biomassa (composição do meio de cultivo, iluminação, desenvolvimento dos reatores) foram determinadas por estudos realizados anteriormente no Laboratório de Bioengenharia.

Para a realização do cultivo, as microalgas foram pré-inoculadas por 14 dias. No pré-inóculo, foram utilizados 10 mL do banco de algas e 100 mL de meio de cultivo em erlenmeyer. As amostras foram dispostas em mesa agitadora orbital com aquecimento (*Oxylab*, Brasil) a 28 °C e 19 rpm. Após 7 dias foram adicionados 100 mL de meio de cultivo. Durante todo o período de pré-inoculação, a iluminação foi mantida constante em 64 W por lâmpadas eletrônicas. Após esse período, as amostras foram dispostas em 8 fotobiorreatores, conforme descrito posteriormente.

Os cultivos foram realizados nos fotobiorreatores, cuja fotografia está apresentada na Figura 4.1. Os fotobiorreatores são do tipo *air-lift*, feitos de acrílico e possuem uma camisa interna para troca de calor. Os fotobiorreatores utilizados foram desenvolvidos no Laboratório 117 e mais detalhes sobre o projeto e funcionamento dos mesmos podem ser encontrados em (Kochem *et al.*, 2014).

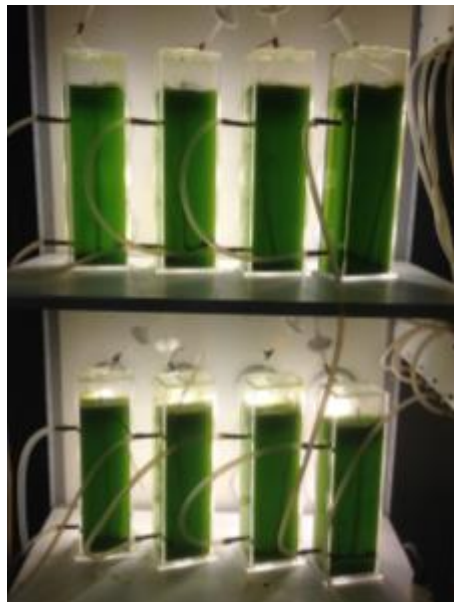


Figura 4.1. Fotobiorreatores utilizados no cultivo de microalgas.

Primeiramente, realizou-se um cultivo (Cultivo 1) com duração de 7 dias para obtenção de biomassa a ser utilizada em testes iniciais. Posteriormente, realizou-se dois cultivos semi-contínuos (Cultivo semi-contínuo 1 e Cultivo semi-contínuo 2) com a finalidade de se obter uma maior quantidade de biomassa em tempo reduzido. Os cultivos semi-contínuos foram realizados da seguinte maneira: no quarto dia a partir do início do cultivo realizou-se a retirada de 1,2 L de cultivo, o que corresponde à metade da capacidade de cada um dos oito reatores, e, a cada 48h prosseguiu-se com a retirada da mesma quantidade de cultivo e posterior reposição do conteúdo dos reatores utilizando meio de cultivo. Após a retirada da biomassa dos reatores, realizou-se a centrifugação das amostras (10 min, 12.200g, *Hitachi*, CR 21GIII, Japão) e posterior congelamento com N<sub>2</sub> líquido e liofilização (*LIOTOP*, Model L101, Brasil). Após a liofilização, as amostras foram homogeneizadas para realização dos experimentos de extração. Na Figura 4.2 é apresentada uma fotografia da biomassa homogeneizada e liofilizada.



Figura 4.2. Biomassa liofilizada e homogeneizada para realização dos experimentos de extração.

## 4.2. Calibração da célula ôhmica

A fim de determinar a condutividade elétrica das amostras durante a realização dos experimentos, realizou-se a calibração da célula ôhmica. Através das medidas dos valores de corrente elétrica e tensão é possível realizar o cálculo da condutividade elétrica, de acordo com a Equação 4.1, onde  $L$  é o espaço entre os eletrodos,  $A$  é a área da seção transversal da amostra (m<sup>2</sup>),  $I$  é a corrente elétrica através da amostra (A) e  $V$  é a tensão (V).

$$\sigma = \frac{L.I}{A.V} \quad (4.21)$$

No sistema de campo elétrico utilizado, os valores de  $I$  e  $V$  são medidos. Contudo, a célula utilizada para realização do processo de extração não possui valores de  $L$  constantes porque os

eletrodos foram confeccionados conformando o diâmetro da célula. Assim, foi necessária a realização de experimentos de calibração para obtenção dos valores de  $L$  e  $A$ . Para tanto, utilizou-se uma segunda célula, especialmente confeccionada para determinação de condutividade elétrica em alimentos, denominada célula de referência (Figura 4.3). A célula de referência utilizada possui geometria cilíndrica e, portanto, valores de  $L$  e  $A$  conhecidos ( $8 \text{ cm}^2$  e  $2 \text{ cm}^2$ , respectivamente). Foram realizados experimentos com soluções de NaCl de concentrações 0,5, 1, 2, 4 e  $6 \text{ g L}^{-1}$ .



Figura 4.3. Célula de referência utilizada para determinar os valores de condutividade elétrica de diferentes soluções salinas.

Esses experimentos foram realizados em um sistema de campo elétrico com variador de frequência. O sistema conta com um data logger (*Agilent*, LXI Data acquisition 34972A, USA ) um gerador de funções (*Tektronix*, AFG 3251, USA ) e um amplificador de potência (*Powertron*, Model 500 A, USA). Durante a realização dos experimentos, os valores de corrente ( $I$ ), tensão ( $V$ ) e frequência foram monitorados. A tensão foi mantida constante a 25 V e a frequência variou de 10 até  $10^5$  Hz. Assim, foi possível determinar a condutividade elétrica para cada solução salina em cada uma das frequências avaliadas. Da mesma maneira, foram realizados os experimentos com o uso de uma célula de extração, EC1, posteriormente utilizada para realização do planejamento experimental. Esses experimentos foram realizados a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e em duplicata.

De posse dos valores de condutividade elétrica para cada solução e frequência, foi possível calcular o valor da constante da célula,  $L/A$  para a célula EC1. Esse valor foi calculado através da média dos valores de  $L/A$  obtidos para cada condutividade e frequência.

### 4.3. Extração via campo elétrico moderado (MEF)

O sistema de campo elétrico moderado utilizado pode ser visualizado na Figura 4.4. O aparato experimental consiste em duas células de extração encamisadas (EC1 e EC2), cujas tampas possuem entrada para medidores de temperatura e eletrodos. Na Figura 4.5 é apresentada uma fotografia da célula de extração utilizada para realização do pré-tratamento (EC1).

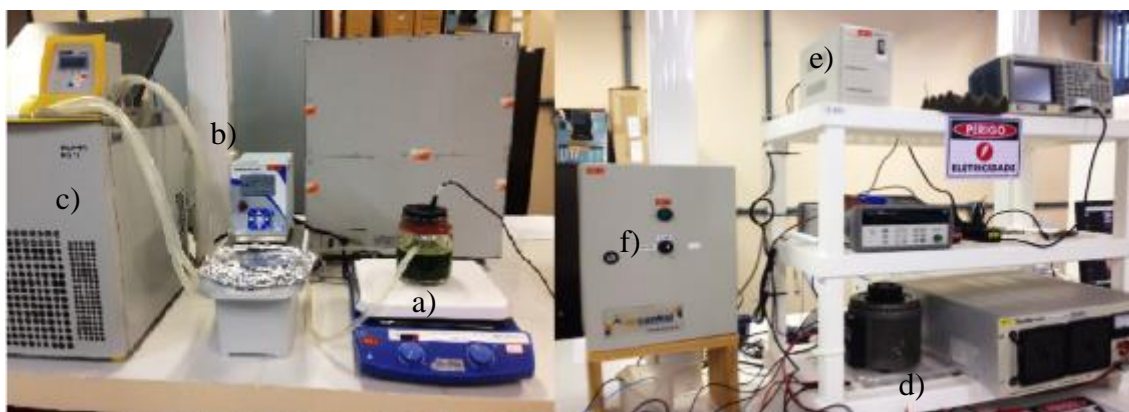


Figura 4.4. Sistema de campo elétrico moderado utilizado na realização dos experimentos; (a) célula de extração utilizada na etapa difusiva, (b) banho de aquecimento, (c) banho de resfriamento, (d) variador de tensão, (e) estabilizador e f) painel de aquisição de dados.

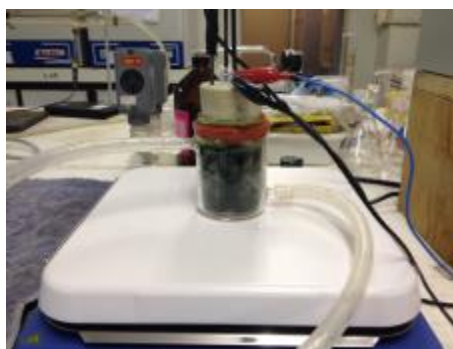


Figura 4.5. Célula de extração EC1 utilizada durante o pré-tratamento.

Além das células de extração, o aparato experimental possui um sistema de fornecimento de energia, um sistema para aquisição de dados, um banho de resfriamento (*LAUDA*, Alpha RA 12, Alemanha), um banho de aquecimento (*Polystat*, Cole-Parmer, USA) e um agitador magnético (*IKA C-MAG*, Model HS 10, Alemanha). O sistema para fornecimento de energia é composto por um regulador de tensão de 0 a 220V (*Sociedade Técnica Paulista LTDA*, modelo Varivolt, Brasil), um estabilizador (*Forceline*, modelo EV 1000T/2-2, Brasil) e um disjuntor (*Siemens*, Brasil). Para o controle e monitoramento da temperatura das amostras, foi utilizado um medidor de temperatura do

tipo Pt-100 (*Novus*, Brasil) de aço inoxidável. A partir do sistema de aquisição de dados, é possível monitorar e registrar os dados de corrente elétrica, tensão e temperatura ao longo do tempo. A interface do software utilizado é apresentada na Figura 6.

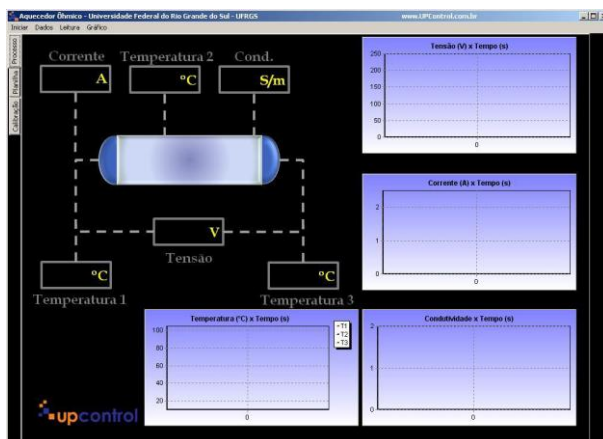


Figura 4.6. Interface do software utilizado para aquisição de dados.

Como o cultivo das microalgas foi realizado em meio de alta concentração salina, após a centrifugação e liofilização da biomassa, a amostra permaneceu com um alto teor de sais e, portanto, com uma alta condutividade elétrica. Contudo, para a aplicação do campo elétrico moderado com manutenção da temperatura abaixo de 35°C, é necessário que a condutividade elétrica seja baixa para evitar taxas elevadas de aquecimento. De acordo com (Goullieux e Pain, 2005), condutividades elétricas a partir de 500  $\mu\text{S cm}^{-1}$  são consideradas adequadas aplicação de campo elétrico moderado e aquecimento ôhmico. Portanto, previamente à realização dos experimentos de extração, a biomassa passou por um processo de lavagem para retirada do sal, para redução da condutividade elétrica para valores próximos a 500  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Esse procedimento permitiu a aplicação do campo elétrico com a manutenção da temperatura até um máximo de 35°C. As amostras foram lavadas com água e centrifugadas, repetidamente (20 min, 6000 rpm, 20°C). Após o processo de lavagem a condutividade elétrica das amostras foi ajustada com solução de NaCl (2 g L<sup>-1</sup>) para 500  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

Em seguida, as amostras foram acondicionadas na célula de extração EC2, juntamente com a solução de etanol correspondente a cada ponto do planejamento experimental (Subcapítulo 4.5). A célula foi conectada ao banho de resfriamento, previamente mantido à temperatura adequada para cada condição experimental, de forma que a temperatura do experimento não ultrapassasse 35°C (Tabela 4.1). Após a amostra atingir a temperatura desejada, iniciou-se a etapa de pré-tratamento



com a passagem de corrente elétrica, utilizando uma tensão especificada para cada ponto do planejamento (0-180V). Após 10 minutos, a passagem de corrente elétrica foi cessada e iniciou-se a etapa difusiva do processo de extração. Para tanto, a amostra foi transferida para a célula de extração EC2, mantida a 30°C, através da conexão com o banho de aquecimento. Em seguida, foi adicionada uma solução de água e etanol, ajustando a concentração de etanol de acordo com cada ponto do planejamento experimental, até um volume final de 300 mL. A etapa difusiva foi mantida por 50 minutos. Durante todo o processo de extração as amostras foram mantidas sob agitação constante.

Tabela 4.1. Temperatura do banho de resfriamento para as diferentes tensões aplicadas no pré-tratamento de extração.

Tensão (V)	Temperatura do banho de resfriamento (°C)
0	30
90	23
135	18
180	3

Após o procedimento de extração, as amostras foram centrifugadas (10 min, 6.000 rpm, *Cientec*, CT-5000R) e o sobrenadante filtrado (*Allcrom*, PTFE, 0,45  $\mu\text{m}$ ).

A partir do sobrenadante prosseguiu-se com as análises de determinação de lipídeos, utilizando o método de Bligh & Dyer (Bligh e Dyer, 1959) e o método sulfo-fosfo-vanilina (SPV) (Mishra *et al.*, 2014). As análises para quantificação de carotenoides foram realizadas de acordo com (Rodriguez-Amaya, 2001) e essas metodologias são descritas a seguir. Na Figura é apresentado um fluxograma resumido do processo de extração.

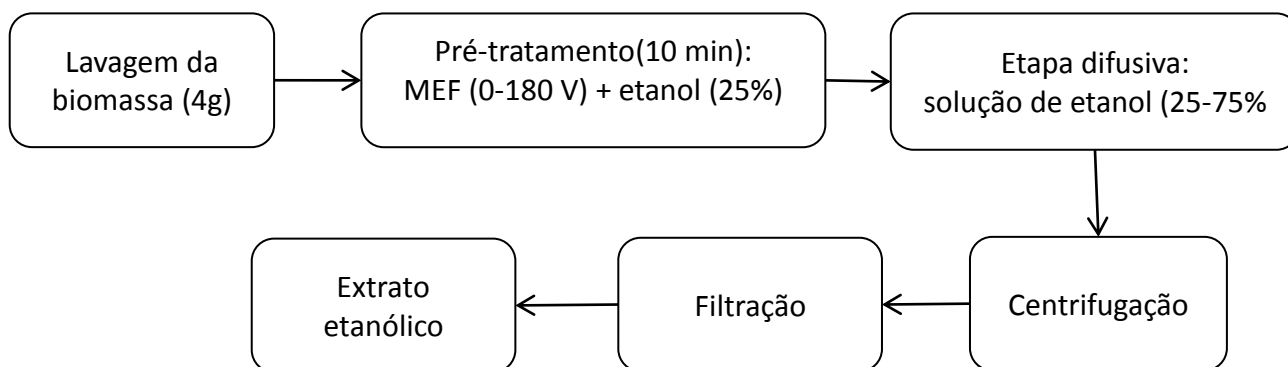


Figura 4.7. Fluxograma do processo de extração.

#### 4.4. Análise dos extratos

A partir dos sobrenadantes centrifugados e filtrados prosseguiu-se com a análise de lipídeos e carotenoides. Conforme mencionado anteriormente, estas análises foram utilizadas para avaliação dos extratos (quantificação e qualificação de lipídeos e carotenoides) e não substituem a metodologia de extração utilizando MEF e etanol, avaliada no presente trabalho. As etapas de extração de todas as análises foram mantidas a fim de eliminar possíveis impurezas e componentes indesejados no extrato etanólico.

##### 4.4.1. Análises de lipídeos

###### Bligh & Dyer

Para quantificação de lipídeos pelo método de Bligh & Dyer, foram pesados, em balança analítica (*Shimadzu*, Modelo AY 220, Japão), 0,05g de biomassa ou 20 g de extrato (sobrenadante filtrado) em um recipiente fechado. Às amostras, foram adicionados 20 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio. Na análise da biomassa, 8 mL de água destilada também foram adicionados às amostras. Após, as amostras permaneceram sob agitação por 30 min em agitador magnético (*IKA C-MAG*, Model HS 10, Alemanha). A seguir, adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (10%). Em seguida, as amostras foram agitadas novamente por 2 min em agitador magnético (*IKA C-MAG*, Model HS 10, Alemanha). As amostras foram, então, vertidas em funil de separação para separação da fase oleosa (clorofórmio) e da fase aquosa (metanol e água). A fase com clorofórmio e lipídeos, que permaneceu na parte inferior do funil de separação, foi coletada em um béquer; ao realizar a coleta, foi efetuada a filtração das amostras utilizando 1 g de sulfato de sódio anidro. Na sequência, 5 mL da fase com clorofórmio foram transferidos para cápsulas de alumínio, previamente secas e taradas. As cápsulas com as amostras foram mantidas em estufa (*DeLeo*, Secador de alimentos, Brasil) por, no mínimo, uma hora, resfriadas em dessecador e pesadas. Por diferença gravimétrica, foi calculado o teor total de lipídeos nas amostras. As Equações 4.2 e 4.3 apresentam os cálculos realizados para verificação do teor de lipídeos na biomassa e no extrato, respectivamente.

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{(M_{ca} - M_c) * 4}{M_o} * 100 \quad (4.2)$$

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{(M_{ca} - M_c) * 4}{M_o} * \frac{V_f}{V} * 100 \quad (4.3)$$

Onde:

$M_{ca}$  – massa da cápsula com amostra (g)

$M_c$  – massa da cápsula (g)

$M_o$  – massa inicial de amostra (g)

$V_f$  – volume final do extrato (mL)

$V$  – volume de extrato utilizado (mL)

### SPV

Para quantificação de lipídeos pelo método SPV, 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foram transferidos para tubos falcon de 15mL. Às amostras, foram adicionados 2mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 10 min em água mantida em ebulição em chapa de aquecimento (*Fisatom*, 752A, Brasil) a 100°C e resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. A seguir, 5 mL de solução fosfato-vanilina foram adicionados e as amostras foram incubadas no escuro por 15 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (*PG Instruments Ltd.*, T80 UV-Vis, United Kingdom) em comprimento de onda de 530 nm e relacionada com a curva de calibração. No preparo da curva de calibração foi utilizada uma solução mãe com uma concentração 2 mg mL<sup>-1</sup> (0,02 g de óleo de oliva em 10 mL de clorofórmio). Dessa solução, 100  $\mu\text{L}$  foram transferidos para tubo falcon de 15 mL e as demais soluções, de concentrações variando de 0,4 a 1,8 mg mL<sup>-1</sup>, foram realizadas adicionando determinada quantidade da solução mãe e completando com clorofórmio para um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Os tubos foram mantidos em estufa a 60°C para remoção do clorofórmio e, quando o clorofórmio foi evaporado, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de água destilada em cada tubo. Em seguida, prosseguiu-se com a metodologia previamente descrita para as amostras. Na Figura 4. é apresentada uma das curvas de calibração realizada. A cada preparo de solução fosfato-vanilina realizou-se uma nova curva de calibração, em triplicata.

Para realização da análise de lipídeos da biomassa, 0,05 g de biomassa foram pesados em balança analítica (*Shimadzu*, Modelo AY 220, Japão) e diluídos utilizando 2 mL de água destilada. Dessa amostra, 100  $\mu\text{L}$  foram utilizados para realização da análise.

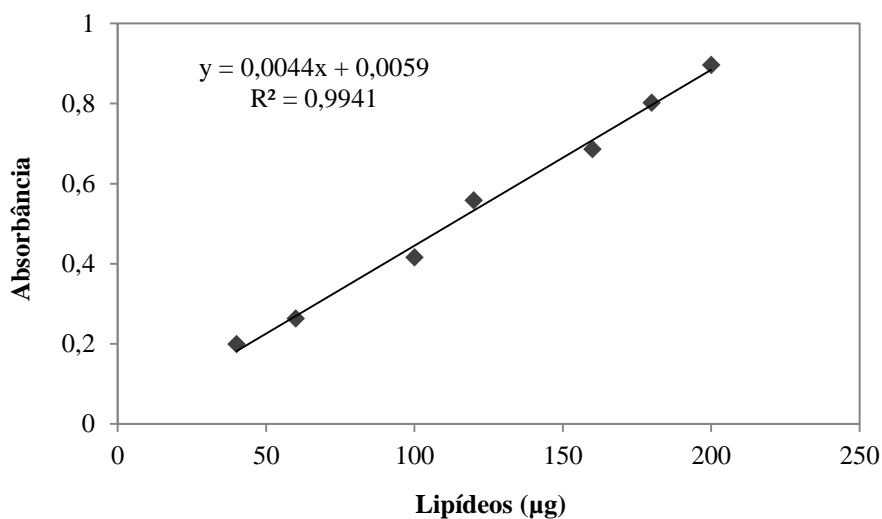


Figura 4.8. Curva de calibração realizada para quantificação de lipídeos em amostras de microalgas utilizando o método sulfo-fosfo-vanilina (SPV).

#### Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos

Com o objetivo de avaliar o perfil de ácidos graxos na biomassa e no extrato com o maior rendimento de extração, realizou-se a análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES, do inglês *fatty acids methyl esters*). A metodologia de transesterificação utilizada é descrita por (Joseph e Ackman, 1992). Para tanto, 1,5 mL de solução de NaOH em metanol (0,5 N) foi adicionada às amostras. Após, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e, subsequentemente, resfriadas a temperatura ambiente. A seguir, 2 mL de BF<sub>3</sub> (trifluoreto de bório) foi adicionado às amostras e, em seguida, as mesmas foram aquecidas, novamente, durante 30 minutos a 100°C. Na sequência, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, e 5 mL de solução saturada de NaCl (36 g 100 mL<sup>-1</sup>) foi adicionada aos tubos. Então, as amostras foram agitadas, e 1 mL de isoctano foi adicionado. Quando ocorreu a separação de fases, a fase superior (com isoctano) foi coletada e transferida para outro tubo. A seguir, as amostras foram secas utilizando nitrogênio gasoso. Previamente a injeção das amostras no cromatógrafo gasoso, foi realizada a diluição das amostras utilizando a solução de BHT/Hexano. Durante todo o procedimento de transesterificação e armazenamento das amostras, os tubos foram mantidos fechados em atmosfera inerte de nitrogênio.

A separação dos ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso (*Shimadzu*, GC – 2010 Plus, Japão) com coluna capilar de sílica fundida (*Shimadzu*, SBL 100, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura). As temperaturas do detector por ionização de chama (FID) e da porta de injeção utilizadas foram 260 e 240 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi mantida a 50 °C por 1

minuto e aumentou a uma taxa de 10 °C por minuto até atingir a temperatura de 250 °C, com um tempo total de 74 minutos. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio com um taxa de injeção constante de 1 mL por minuto. As amostras foram injetadas em triplicata. Para identificação dos ácidos graxos, os tempos de retenção foram comparados com padrões de ésteres metílicos (*Sigma Aldrich*, Supelco 37 component FAME mix) previamente analisados por espectroscopia de massas acoplada a um cromatógrafo gasoso (CG – EM). A metodologia descrita foi desenvolvida no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS.

O cálculo para quantificação de cada ácido graxo foi realizado conforme metodologia descrita pela AOCS (1997), de acordo com a Equação 4.4, onde PI é o padrão interno,  $m_o$  é a massa inicial de amostra, FC é o fator de correção teórico do ácido graxo e FID é o fator de resposta teórico do detector para cada ácido graxo.

$$\frac{mg}{g \text{ de óleo}} = \frac{\text{massa PI (g)} * \text{área} * 4}{\text{área PI} * m_o \text{ (g)} * \text{lipídeos totais (g/100g)}} * FC * FID * 10 \quad (4.4)$$

#### 4.4.2. Análises de carotenoides

A quantificação de carotenoides foi realizada de acordo com metodologia descrita por (Rodriguez-Amaya, 2001), com algumas modificações. Foram pesados, em balança analítica (Shimadzu, Modelo AY 220, Japão), 20 mL de sobrenadante e, às amostras, 20 mL de acetona foram adicionados para passagem dos pigmentos da fase etanólica para a fase com acetona. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e mantidas no escuro por 10 minutos. Após a etapa de extração prosseguiu-se com a etapa de partição. Nessa etapa, foram adicionados a funis de separação aproximadamente 15 ml de água, 10 mL de éter de petróleo e 10 mL de éter etílico; em seguida, o extrato com acetona foi adicionado vagarosamente pelas paredes do funil. Após a mudança de fase dos compostos (em torno de 5 minutos) iniciou-se a lavagem do extrato; essa lavagem foi realizada com água destilada até que toda a acetona fosse removida (pH neutro). A fase aquosa foi retirada e a fase éter coletada em frasco âmbar. Após a etapa de partição foi realizada a saponificação. A saponificação foi realizada com o objetivo de separar os carotenoides de interferentes, como clorofilas e lipídeos, e possibilitar a quantificação adequada desses compostos. Para isso, adicionou-se à fase éter 20 mL de solução KOH-metanol (10%) e mantiveram-se as amostras em repouso longe do abrigo da luz durante a noite (o equivalente a aproximadamente 17h). Após a etapa de saponificação, realizou-se nova lavagem do extrato para purificação da fase éter, conforme descrito anteriormente. Após a lavagem, os solventes éter de petróleo e éter etílico

foram evaporados em rota-evaporador (*Fisatom*, Modelo 450-5, Brasil) a 30°C. Os carotenoides secos foram então dissolvidos em etanol e transferidos para balão volumétrico de 2, 5, 10 ou 25 mL, dependendo da amostra. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (*PG Instruments Ltd.*, T80 UV-Vis, United Kingdom) em comprimento de onda de 450 nm. A resposta foi calculada em mg de luteína equivalente por g de amostra. A quantificação foi realizada com base na Equação 4.5, onde  $V$  é o volume do extrato (ml),  $P$  é o peso da amostra (g),  $Ac$  é o coeficiente de absorção da luteína em etanol.

$$\text{Carotenoides totais} = \frac{\text{Abs} \cdot V \cdot 10000}{Ac \cdot P} \quad (4.5)$$

A quantificação de carotenoides da biomassa foi realizada de maneira similar, com diferenças na etapa de extração. Nesse caso, a biomassa foi previamente hidratada com água destilada (cerca de 200  $\mu\text{L}$ ) e os carotenoides foram extraídos utilizando 20 mL de acetona; contudo, o solvente foi adicionado aos poucos e a biomassa foi macerada com grau e pistilo. Essa etapa foi realizada várias vezes (em torno de 5 vezes) até que o sobrenadante não apresentasse mais cor. Os sobrenadantes foram acondicionados em tubo de centrífuga e as amostras foram centrifugadas (*Cientec*, Modelo CT 5000R, 10 min, 6.000 rpm, 20°C). Após a etapa de extração procedeu-se com as etapas de partição e saponificação e leitura em espectrofotômetro, conforme descrito anteriormente.

Para determinação do perfil de carotenoides na biomassa e no melhor ponto de extração, foi realizada análise das amostras via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O preparo das amostras de extrato se deu de maneira similar ao procedimento já descrito. Contudo, após a secagem das amostras no rota-evaporador, as amostras foram diluídas em éter de petróleo, transferidas para frasco âmbar e o solvente foi evaporado com nitrogênio gasoso. O preparo das amostras de biomassa também foi realizado de maneira similar ao já descrito, mas com diferenças na etapa de extração. Esse procedimento foi realizado conforme descrito por (Mandelli *et al.*, 2012). À biomassa liofilizada (0,02 g), foram adicionados 2mL de acetato de etila, e a amostra foi macerada com auxílio de grau e pistilo. O solvente foi coletado separadamente, e esse procedimento foi realizado até o sobrenadante permanesse sem cor. Após essa etapa, iniciou-se a extração com metanol, repetindo-se o mesmo procedimento realizado com o acetato de etila. Os sobrenadantes foram misturados e centrifugados. Após a etapa de extração dos carotenoides, as amostras foram particionadas, saponificadas, secas em rota-evaporador, diluídas com éter de petróleo, e o solvente

foi evaporado com nitrogênio gasoso. As amostras provenientes da extração e purificação de carotenoides do extrato e da biomassa foram congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a separação por HPLC. Essas análises foram realizadas em triplicata.

Pouco tempo antes da injeção das amostras no cromatógrafo, as amostras foram dissolvidas em 500  $\mu\text{L}$  de MTBE (éter metil-terc-butílico) e 500  $\mu\text{L}$  de metanol, levadas ao banho de ultrassom por 5 minutos, filtradas (PTFE, 0,45  $\mu\text{m}$ ) com auxílio de uma seringa e transferidas para os *vials*. Foi utilizando um cromatógrafo (*Shimadzu*, Tokyo, Japão) equipado com uma bomba quaternária e detector UV-Vis. O espectro de absorção foi obtido entre 250 e 600 nm e analisado em 450 nm. A separação dos carotenoides foi realizado em uma coluna C30 YMC (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, *Waters*, Wilmington – DE, USA). As fases móveis utilizadas foram metanol (A) e MTBE (B) com um gradiente linear de 95:5 a 70:30 nos primeiros 30 minutos e de 70:30 a 50:50 durante os próximos 20 minutos, mantendo essa proporção pelos últimos 15 minutos. A identificação foi realizada através da comparação dos tempos de eluição dos compostos, da observação das características dos picos no espectro UV-Vis e da injeção do padrão all-trans- $\beta$ -carotene (0,125 – 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O desenvolvimento do método descrito acima foi realizado no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **4.5. Avaliação da permeabilização das células de microalgas**

Com o objetivo de avaliar a permeabilização das células de microalgas, determinou-se a condutividade elétrica de diferentes amostras submetidas a diferentes frequências, através de um sistema de campo elétrico já descrito no Subcapítulo 4.3. Esses experimentos tiveram como objetivo principal a avaliação de uma possível alteração da estrutura da membrana celular com o processo de liofilização da biomassa. Essa verificação é importante pois se as células estivessem permeabilizadas previamente à realização dos experimentos de extração, não seria possível detectar os efeitos do campo elétrico moderado.

A presença de células com baixa condutividade elétrica produz, na presença de corrente alternada dependente da frequência, mudanças detectáveis através de medidas de condutividade elétrica. Em sistemas biológicos, essas mudanças são visíveis em frequências variando de 1 kHz a 100 MHz (Angersbach, Heinz e Knorr, 1999). Os experimentos foram realizados com biomassa *in natura*, biomassa liofilizada e com biomassa congelada e danificada com pistilo e grau. Essa última amostra foi preparada congelando-se a amostra *in natura* a  $-5^{\circ}\text{C}$  (congelamento lento) e,

posteriormente, descongelando-a a temperatura ambiente; após esse procedimento a amostra foi macerada com pistilo e grau. Esses procedimentos foram realizados com o objetivo de danificar a estrutura celular e avaliar células permeabilizadas. Previamente à realização dos experimentos a condutividade elétrica de todas as amostras foi corrigida para  $0,01 \text{ S m}^{-1}$  e a concentração das amostras foi fixada em  $0,05 \text{ g de biomassa L}^{-1}$ . Os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 4.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na tentativa de visualizar a permeabilização das células de microalgas, realizou-se análise de MEV. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Design e Seleção de Materiais (LDSM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para realização da técnica, as amostras foram colocadas em *stubs* de 1 cm de diâmetro utilizando uma fita metálica. Posteriormente, as amostras foram examinadas em diferentes magnitudes em microscópio eletrônico de varredura (*Hitachi*, Tabletop Microscope TM3000, Japão).

Foram avaliadas amostras de biomassa liofilizada e amostras resultantes dos experimentos de extração realizados nas condições 0 V, 25 % e 180 V, 75 %. As amostras resultantes dos experimentos de extração foram previamente secas em estufa (*DeLeo*, Secador de alimentos, Brasil) a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

#### 4.6. Planejamento experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com dois planejamentos fatoriais 22 com ponto central para avaliar a influência da tensão (V) e da concentração de etanol na etapa difusiva (%) na extração de lipídeos e carotenoides. Primeiramente foi realizado um dos planejamentos, variando a tensão de 0 a 180 V e a concentração de etanol entre 25 e 75 %. Esse planejamento foi realizado em duplicata. Em função dos resultados obtidos, optou-se pela realização de um segundo planejamento, com o objetivo de avaliar a tensão e a concentração de etanol entre 50 e 180 V e 50 e 75 %, respectivamente. As condições experimentais estudadas em cada um dos planejamentos são mostradas na

Tabela 4.2. Como foram utilizados cultivos diferentes para realização do primeiro e segundo planejamentos, os pontos 90 V, 50 % e 180 V, 75 % foram repetidos, para validação dos experimentos.

Os dados foram analisados utilizando os *softwares* Excel (*MapInfo Corporation*, Troy, NY, USA) e *Statística* (7.0, *Statsoft Inc.*, Tulsa, USA). Foram realizados testes de Tukey e ANOVA com



um nível de significância de 95 % para avaliar diferenças estatísticas. Além disso, os dados experimentais foram ajustados a um modelo de regressão polinomial apresentado na Equação 4.6. Nesse modelo,  $Y$  representa a resposta estimada pelo modelo,  $X_1$  e  $X_2$  representam as variáveis (tensão e concentração de etanol) e  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}$  e  $\beta_{12}$  são os coeficientes da equação.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (4.6)$$

Tabela 4.2. Planejamentos experimentais e condições de tensão e concentração de etanol avaliadas.

Planejamento experimental	Tensão (V)	Concentração de etanol (%)
1	0	25,0
	0	75,0
	90	50,0
	180	75,0
	180	25,0
2	90	50,0
	90	75,0
	135	62,5
	180	50,0
	180	75,0



## Capítulo 5 - Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados na forma de dois artigos científicos (Subcapítulos 5.1 e 5.2) e na forma de resultados complementares (Subcapítulo 5.3). Os resultados foram divididos em dois artigos: o primeiro abordando a extração de carotenoides e o segundo, a extração de lipídeos. Também serão apresentados alguns resultados que não foram considerados relevantes para incluir nos artigos no subcapítulo de Resultados Complementares.

### Artigo 1 – Extração de carotenoides

#### CAROTENOID EXTRACTION FROM *Chlorella SP.* USING MODERATE ELECTRIC FIELD AND ETHANOL

Débora Pez Jaeschke<sup>1\*</sup>, Rosane Rech<sup>2</sup>, Giovana Domeneghini Mercali<sup>2</sup>, Ligia Damasceno Ferreira Marczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Engenheiro Luiz Englert s/n - Porto Alegre, RS 90040-040 – Brazil.

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Avenue, 9500 – Campus do Vale – Building 43.212, Porto Alegre, RS 91501-970 - Brazil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308-5155; Fax: +55 51 3308-3277

E-mail address: [deborapj@enq.ufrgs.br](mailto:deborapj@enq.ufrgs.br)

#### Abstract

In this study, the effect of moderate electric field (MEF) and ethanol concentration on carotenoid extraction from the microalgae *Chlorella sp.* was evaluated. Carotenoid extraction was performed using 0 - 180 V and 25 % (v/v) of ethanol/water solution during 10 min, followed by a diffusive step using 25 – 75 % (v/v) of ethanol/water solution during 50 min. Carotenoid content analyses were performed on the supernatant after each extraction process. Results from this study showed that up to 73 % of the total carotenoid content in the

microalgae could be extracted using a voltage of 180 V and 75 % (v/v) of ethanol. The application of MEF combined with ethanol as solvent proved to be an attractive alternative to extract carotenoids from the microalgae *Chlorella* sp.

**Keywords:** MEF; pigments; microalgae; environmentally friendly solvent

## 1. Introduction

Carotenoids consumption has been associated with health benefits, as cancer, cardiovascular and chronic diseases prevention. These benefits are probably related to their antioxidant capacity. Besides these nutraceutical properties, carotenoids have potential as food colorants and pharmaceutical and cosmetic usages (Rodriguez-Amaya, 2001; Ibañez e Cifuentes, 2013). Microalgae are interesting sources of carotenoids due to its cultivation characteristics, such as good adaptation to changing environmental conditions and the fact that its cultivation does not compete with food production (Ahmed *et al.*, 2014). Green microalgae, as *Chlorellas*, are considered a good source of lutein,  $\beta$ -carotene, zeaxanthin and violaxanthin. (Inbaraj, Chien e Chen, 2006) evaluated the carotenoid profile from *Chlorella pyrenoidosa* microalgae and reported that lutein accounted for 93% of the total carotenoid content ( $125.03 \pm 0.042 \text{ mg g}^{-1}$ ), followed by 2.6% of  $\beta$ -carotene, 2.6% of  $\alpha$ -carotene and 1.3% of zeaxanthin.

In microalgae, carotenoids are closed into the cells by a rigid cell wall and an intact cell membrane; these structures act as barriers, protecting the cell but hampering the extraction of these compounds of interest. Conventional carotenoid extraction methods are time consuming, expensive and harmful, since they often use toxic solvents (Shao *et al.*, 2015). Recently, novel electrical technologies, such as pulsed electric field (PEF), have shown to be an attractive alternatives to extract selectively intracellular compounds from different microalgae species (Goettel *et al.*, 2013; Grimi *et al.*, 2014; Luengo *et al.*, 2014). However, to the best of our knowledge, moderate electric field (MEF) has not been applied for microalgae compounds extraction, although interesting studies were reported on food compounds extraction. (Kulshrestha e Sastry, 2003) evaluated the diffusion of beet dye using MEF (0 - 23.9  $\text{V.cm}^{-1}$  and 0 - 5,000 Hz) and found that diffusion increased when higher voltages and lower frequencies were applied. (Kulshrestha e Sastry, 2010) studied potato and beet cells permeabilization via MEF; the researchers observed that, even when lower voltages were

applied to the food, there was an increase on diffusion rates, suggesting that lower energy demand treatments, as MEF, could be used to intensify the compounds diffusion from inside vegetable cells. Thereby, the aim of this work was to evaluate MEF application in the presence of ethanol, as a pretreatment to carotenoids extraction from microalgae *Chlorella* sp. The influence of different ethanol concentrations on the diffusive step of the extraction process was also evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Microalgae cultivation

The microalgae *Chlorella* sp. was obtained from the culture collection of the Department of Marine Biology at Fluminense Federal University (Niteroi, Brazil). Microalgae cultivation was performed in flat-plate airlift photo bioreactors as described elsewhere (Kochem *et al.*, 2014). The cultivation was performed using modified f1/2 medium (Guillard, 1975) with the  $\text{NaNO}_3$  concentration increased to  $300 \text{ mg L}^{-1}$ . To avoid nutrients starvation,  $1 \text{ mL L}^{-1}$  of phosphate solution ( $5 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) and  $1 \text{ mL L}^{-1}$  of trace metals solution ( $9.8 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $22 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $180 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $6.3 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $4.36 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , and  $3.15 \text{ g}$  of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), were daily added to the photobioreactors. The cultivation was conducted under a semi-continuous mode: four days after the beginning of the cultivation, half of the bioreactors volume ( $1.2 \text{ L}$ ) was collected and centrifuged (*Hitachi*, CR 21GIII,  $10,000 \text{ g}$ ,  $10^\circ\text{C}$ ,  $10 \text{ min}$ ); then, the cultivation medium was used to complete the bioreactors volume. This procedure was repeated every 48 h during 38 days. After centrifugation, the biomass was frozen with liquid nitrogen, freeze-dried (*LIOTOP*, Model L101, Brazil) and homogenized.

### 2.2 Extraction experiments

The MEF apparatus used to performed the experiments comprised a data acquisition system, a power supply, a variable transformer (*Sociedade Técnica Paulista LTDA*, model Varivolt, São Paulo, SP, Brazil), a stabilizer (*Forceline*, model EV 1000 T/2-2, São Paulo, SP, Brazil), a computer and two extraction cells. The extraction cells, EC1 and EC2, are vessels, made of Pyrex glass, with a water jacket and a working volume of  $100 \text{ mL}$  and  $300 \text{ mL}$ , respectively. EC1 was used during the pretreatment step and EC2 during the diffusive step. The electrodes were made of titanium ( $3.5 \text{ cm}$  of height) and were curved to conform EC1 dimensions. The inter-electrode gap of EC1 was between  $4.5 \text{ cm}$  and  $5.0 \text{ cm}$ . More details of the apparatus can be found elsewhere (Mercali *et al.*, 2013).

Before the extraction experiments, the electrical conductivity of the samples was adjusted to  $500 \mu\text{S cm}^{-1}$ . According to (Goullieux e Pain, 2005), electrical conductivities above  $500 \mu\text{S cm}^{-1}$  are considered ideal to conduct electricity. This procedure allowed the application of relatively high voltages without increasing the temperature above  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . This adjustment was necessary because the biomass was cultivated in  $34 \text{ g L}^{-1}$  salt solution, resulting in a high electrical conductivity ( $6 \text{ mS cm}^{-1}$ ). The decrease of the electrical conductivity was achieved by washing the biomass with distilled water, centrifuging and adjusting to the target value using NaCl solution ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ).

The extraction experiments were performed using 4 g of dry biomass and comprised 10 min of a pretreatment and 50 min of a diffusive step. For the pre-treatment, 80 mL of a 25% ethanol solution (v/v) was added to the biomass in EC1; during this step, ethanol concentration in the medium was fixed at 25%, to avoid sparks. During the pretreatment the voltage varied from 0 to 180 V (60 Hz of frequency), and temperature inside the vessel was controlled by means of a water jacket. This procedure decreased the heating rate in order to maintain the temperature below  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . For the diffusive step, ethanol concentrations varied from 25 to 75 % (v/v), according to the experimental design. This step was performed using EC2 cell, mixing the EC1 content with ethanol solution until a final volume of 300 mL was reached. During this diffusive step, temperature in the cell was maintained at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . A magnetic stirrer plate (*IKA C-MAG*, Model HS 10, Brazil) provided mixing inside the vessel during both pre-treatment and diffusive steps.

After the extraction process, all samples were centrifuged ( $4757 \text{ g}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min, *Cientec*, Model CT 5000R, Brazil) and filtered (*Allcrom*, PTFE,  $0.45 \mu\text{m}$ ). Carotenoids analyses were performed using the filtrated supernatant.

### ***2.5 Determination of carotenoid content***

The carotenoid content of the ethanolic extracts was determined using the method described by (Rodriguez-Amaya, 2001) with some modifications. Five grams of ethanolic extract was added to 20 mL of acetone. The samples were homogenized in a vortex (*Phoenix Lufasco*, Model AP 56, Brazil) for 30 s and kept in the dark for 10 min. The partition step was made using ethylic and petroleum ether (1:1). The samples saponification was performed using methanol-KOH solution (10%) overnight. After the saponification, the samples were

washed with distilled water, dried using a rotatory evaporator (*Fisatom*, Model 450-5, Brazil), diluted with ethanol and analyzed on a spectrophotometer set at 450 nm (*PG Instruments Ltd.*, Model T80 UV-Vis, United Kingdom). A similar procedure was used to determine the carotenoid content of the biomass but, in this case, an exhaustive extraction was performed using acetone until no solvent color was observed. The results were expressed in milligrams of lutein per milligram of dried biomass ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

The carotenoid profile of the biomass and the extract with the best extraction yield were analyzed by HPLC (*Waters*, Alliance e2695 Separations Module, USA). The carotenoids extraction from the biomass for HPLC analyses was carried out according to the methodology described by (Mandelli *et al.*, 2012) with some modifications. Dry biomass was macerated with ethyl acetate followed by methanol and centrifuged until the biomass became colorless. The subsequent steps (saponification, washing and drying) were performed according to the same methodology used for spectrophotometric analysis. The chromatographic method was performed as described by (Rodrigues *et al.*, 2014). It was used a chromatography system equipped with quaternary pump, a UV-Vis detector and injection valve with a 20  $\mu\text{L}$  loop (*Rheodyne*, Rohnert Park – CA, USA). The UV-Vis spectra were obtained between 250 nm and 600 nm and the chromatograms were analyzed at 450 nm. Separation was conducted on a C30 YMC column (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm id., *Waters*, Wilmington – DE, USA). The mobile phases comprised eluents A (methanol) and B (methyl tert-butyl ether, MTBE). A linear gradient was applied from 95:5 to 70:30 in the first 30 min, from 70:30 to 50:50 during the subsequent 20 min and maintaining this proportion for the last 15 min. The identification was performed according to the elution order on C30 column, UV-Vis spectrum characteristics and the injection of *all-trans- $\beta$ -carotene* standard (0,125 – 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

## **2.6 Experimental design and statistical data analyses**

The experiments were planned to identify the effect of the voltage (V) and the ethanol concentration (%) on carotenoid extraction from microalgae. Voltage ranged from 0 V to 180 V and ethanol concentration varied from 25 % to 75 %. Voltage range was selected based on the limitations of the MEF equipment. All the extraction conditions were performed in duplicate. Statistical analyses were performed using the software Statistica® (7.0, *Statsoft Inc.*, Tulsa, USA). Statistical significance was determined by ANOVA and Tukey tests with a 95% of confidence level. Experimental data were analyzed using a polynomial regression

model, presented in Equation (1), where  $Y$  represents the carotenoid extracted from the dried biomass ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $X_1$  is the coded variable for voltage ( $V$ ), and  $X_2$  coded variable for ethanol concentration ( $C_{\text{EtOH}}$ ) and  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}$  and  $\beta_{12}$  represent the equation coefficients.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Where

$$X_1 = \frac{V - 90}{90} \quad (2)$$

$$X_2 = \frac{C_{\text{EtOH}} - 50}{25} \quad (3)$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Moderate electric field and ethanol effect

The effect of MEF and ethanol concentration on carotenoid extraction from *Chlorella* sp. was evaluated and the experimental data were used to calculate the polynomial equation coefficients, which are presented in Table 1. The model obtained adequately represents experimental data with a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.987. ANOVA analysis was performed to verify the model significance and the results showed that the model was significant, suggesting an adequate representation of the variables and the response.

The results showing ethanol and MEF influence on carotenoid extraction are presented as a response surface shown in Figure 1. It was observed that carotenoid extraction increased as electrical field strength and ethanol concentration increased. It can be seen also that there is a combined effect of both variables studied with the highest extraction yield at the maximum values of the two variables (180 V and 75 % of ethanol concentration). It is possible to infer that ethanol acted on the cell membrane, which resulted in an osmotic imbalance. It is well known that the hydrophobic portion of ethanol can interact with phospholipid layer of cell membrane leading to a disorder of the membrane physical structure (Goldstein, 1986; Patra *et al.*, 2006). Because of this, ethanol is largely used as sanitizing agent to eliminate microorganisms and its ideal concentration varies depending on the microorganism species, but a 70 % ethanol/water solution is usually used. With this concentration, a high carotenoid extraction yield was obtained in the present work. However, it is important to point out that only the presence of ethanol was not sufficient for carotenoid extraction, being necessary the presence of the electric field.



Table 1. Regression coefficients for the coded variables of carotenoid extraction.

<b>Regression coefficients</b>	<i>p-value</i>	
$\beta_0$	0.068567	0.026218
$\beta_1$	0.235680	0.000000
$\beta_2$	-0.104113	0.021351
$\beta_{11}$	0.340421	0.000000
$\beta_{22}$	0.389362	0.000000
$\beta_{12}$	0.280048	0.000000
<b>blocks</b>	-	0.003575
<b>Regression <math>R^2</math></b>	0.9875	
<b>Regression <i>p-value</i></b>	$1 \times 10^{-11}$	

In microalgae, carotenoids are closed into the chloroplasts that are surrounded by two phospholipidic membranes; MEF probably modify the chloroplasts membrane structure, allowing carotenoids extraction. (Sensoy e Sastry, 2004) evaluated solutes extraction from black tea leaves using MEF and just water as a control. The authors observed that MEF enhanced the extraction from fresh tea leaves and reported an elongation (compression) on the chloroplasts structure on MEF treated samples. This result is in agreement with the ones observed in the present work. As can be seen in Figure 1, even with the highest concentration of ethanol (75 %), the solvent itself was not able to disorder the chloroplast structure, resulting in low carotenoid extraction yield. This could be attributed to low final concentrations of ethanol that resulted from the dilution of the solvent in the cellular medium, which are not enough to disorder chloroplasts membranes.

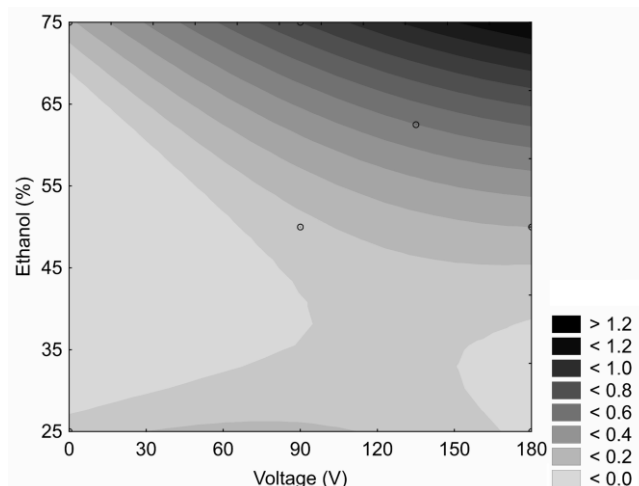


Figure 1. Response surface of carotenoid extraction from algal biomass ( $\text{mg g}^{-1}$ ) under different ethanol concentrations (%) and voltages (V) conditions.

Luengo *et al.* (2014) evaluated the extraction of pigments from the microalgae *Chlorella vulgaris* using PEF. The electrical field strength varied from 10 to 25  $\text{kV cm}^{-1}$  and the frequency of each pulse was 0.5 Hz. The authors evaluated pigment extraction right after PEF treatment and 1 h after the treatment. They observed that 1 h after the extraction process the content of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid was higher comparing to the control (no PEF treatment). Moreover, no pigments were observed when the samples were analyzed right after applying PEF. This was attributed to chloroplasts plasmolysis that occurs by an osmotic imbalance once the cell membrane is permeabilized by PEF treatment indicating that the pigments extraction depends on a diffusion step. In the same study, the authors did not attribute pigments extraction to chloroplasts compression but to the osmotic imbalance on the medium. Therefore, more studies are needed to elucidate the influence of electric field on chloroplasts.

### 3.2 Extraction efficiency

The extraction using MEF and ethanol was compared to the carotenoid exhaustive extraction from biomass. Total carotenoid content on the biomass was found to be  $1.73 \pm 0.09 \text{ mg g}^{-1}$ . The carotenoid content of the extracts, shown in Table 2, ranged from  $0.04 \pm 0.00$  to  $1.21 \pm 0.08 \text{ mg g}^{-1}$ . The standard deviations between duplicate experiments were lower than 10 %. The results showed that using a pre-treatment of MEF and ethanol as solvent allows the extraction of up to 73 % of total carotenoids from the microalgae *Chlorella* sp.. Furthermore, experiments performed with 180 V, evidenced that solvent concentrations of 25 and 50 %

resulted in low extraction yields with 2 and 7 %, respectively. These two experimental points differ statically ( $p < 0.05$ ) from the experiment conducted using 180 V and 75% ethanol concentration. Furthermore, the experimental condition of 135 V and 62.5 % of ethanol showed 20 % of carotenoid extraction which means that there is a high ethanol concentration required for the extraction. In addition, analyzing the experimental conditions using ethanol concentration of 75 % and voltages varying from 0 to 180 V, the influence of the voltage also becomes evident, since 0 V and 90 V yielded 14 % and 41 % of extraction, respectively. This behavior can also be confirmed by analyzing the critical point of the model, 123 V and 36 % of ethanol concentration.

Table 2. Experimental conditions, carotenoid content and extraction yield result for each experimental point.

Voltage (V)	C <sub>EIOH</sub> (%)	Carotenoid content (mg of lutein equivalent g of sample <sup>-1</sup> )	Yield (%)
0	25,0	0.11 ± 0.002 <sup>d</sup>	6%
0	75,0	0.25 ± 0.004 <sup>cd</sup>	14%
90	50,0	0.07 ± 0.004 <sup>d</sup>	4%
90	75,0	0.71 ± 0.013 <sup>b</sup>	41%
135	62,5	0.35 ± 0.021 <sup>c</sup>	20%
180	25,0	0.04 ± 0.001 <sup>d</sup>	2%
180	50,0	0.11 ± 0.007 <sup>d</sup>	7%
180	75,0	1.23 ± 0.028 <sup>a</sup>	73%

<sup>a</sup> mean ± standard deviation; means with the same lowercase letter does not present significant difference ( $p > 0.05$ ).

It is important to point out that conventional extraction methods have the disadvantages of using toxic organic solvents, such as acetone, hexane and ethyl acetate, and being time consuming since they are based on maceration. On the other hand, the methodology applied in this work uses an environmentally friendly solvent, without the need of maceration.

### 3.3 Carotenoid profile of the extracts

HPLC analyses were performed on the biomass and on the best extraction point (180 V, 75 % of ethanol) in order to compare the carotenoid profiles. The chromatograms obtained for the biomass and the extract are presented in Figures 2 and 3, respectively and the peak information are presented in Table 3. The results showed that all-*trans*-lutein was the major carotenoid ( $856.5 \pm 56.2 \mu\text{g g}^{-1}$ ) found in *Chlorella sp.* which represented 68.3 % of the total carotenoid content, followed by all-*trans*-zeaxanthin ( $244.2 \pm 20.4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and all-*trans*- $\beta$ -carotene ( $185.4 \pm 1.9 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Other carotenoids in lower concentrations were identified on the biomass: all-*trans*- $\alpha$ -carotene, 9-13-15-*cis*- $\beta$ -carotene, *cis*-violaxanthin, all-*trans*-violaxanthin and 13-13'-*cis*-lutein. In the extract, the carotenoids all-*trans*-lutein and all-*trans*-zeaxanthin could be identified and represented 68.3 % and 18.7 % of the total content, respectively. Other carotenoids, such as all-*trans*-violaxanthin, *cis*-violaxanthin, 13-13'-*cis*-lutein, accounted for 8.5 % of the total carotenoid content. The peaks of  $\alpha$ - and  $\beta$ - carotene were identified but the intensities were very low. This result showed that the extracted carotenoids were mainly all-*trans*-lutein and all-*trans*-zeaxanthin. Once these carotenoids are more polar due to hydroxyl groups, they interacted with ethanol. Moreover, as all-*trans*-lutein and all-*trans*-zeaxanthin are the major carotenoids on *Chlorella sp.*, ethanol showed to be an adequate solvent for carotenoids extraction.

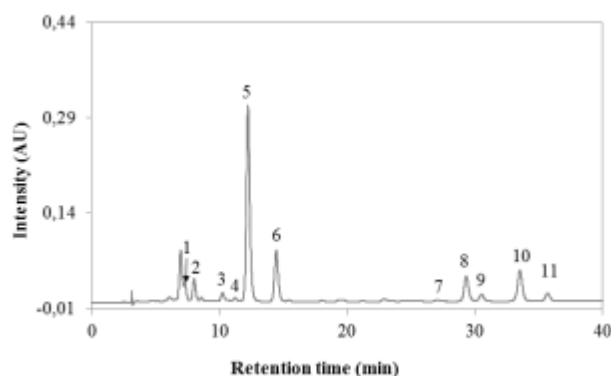


Figure 2. Chromatogram showing carotenoid profile of the biomass from the microalgae *Chlorella sp.*

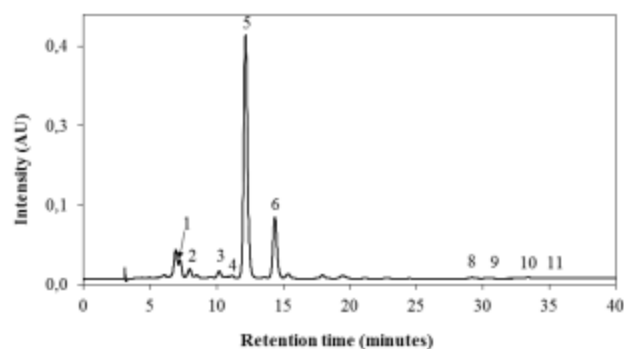


Figure 3. Chromatogram showing carotenoid profile of the best extraction point (180 V, 75 % of ethanol).

Table 3. Retention time of carotenoid peaks observed on chromatograms.

Peak <sup>a</sup>	Carotenoid	Retention time (min) <sup>b</sup>
1	all- <i>trans</i> -violaxantin	7.3
2	<i>cis</i> -violaxanthin	8
3	13- <i>cis</i> -lutein	10.3
4	13'- <i>cis</i> -lutein	11.3
5	all- <i>trans</i> -lutein	12.3
6	all- <i>trans</i> -zeaxanthin	14.5
7	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	27.5
8	all- <i>trans</i> - $\alpha$ -caroteno	29.9
9	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	31.1
10	all- <i>trans</i> - $\beta$ -carotene	34.1
11	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	36.3

<sup>a</sup> Numbered according to the chromatogram shown in Figure 2.

<sup>b</sup> Retention time on the C<sub>30</sub> column.

#### 4. Conclusion

This work studied the application of MEF in the presence of ethanol as a pre-treatment followed by a diffusive step with ethanol as solvent on carotenoid extraction from the

microalgae *Chlorella* sp.. MEF was evaluated with the voltage varying from 0 to 180 V, and ethanol concentration on the diffusive step ranged from 25 to 75 %. This work revealed that there is a combined effect between the two variables studied and the best extraction condition (180 V, 75 % of ethanol) allowed the extraction of up to 73 % of the total carotenoid content. Carotenoids are conventionally extracted with toxic organic solvents, as acetone and ethyl acetate; on the contrary, the extraction methodology evaluated in the present work allowed the use of ethanol (75 %), an environmentally friendly solvent, which was observed to be ineffective without the pre-treatment with MEF. Ethanol acted on cell membrane, causing physical damage to the cell, and MEF promoted cell permeabilization and chloroplasts compression. Carotenoid profile analyses on the extract revealed that the xanthophylls all-*trans*-lutein and all-*trans*-zeaxanthin were the major carotenoids extracted due to their high polarity. Overall, the combination of MEF and ethanol showed to be an attractive alternative process to extract carotenoid from the microalgae *Chlorella* sp.

### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) as a scholarship for the first author and as the PNPB grant.

### References

- Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., & Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry*, 165(0), 300-306.
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, 2(4), 401-408.
- Goldstein, D. B. (1986). Effect of alcohol on cellular membranes. *Annals of Emergency Medicine*, 15(9), 1013-1018.
- Goullieux, A., & Pain, J.-P. (2005). 18 - Ohmic Heating. In D.-W. Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing* (pp. 469-505). London: Academic Press.
- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology*, 153(0), 254-259.
- Guillard, R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In W. Smith & M. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 29-60): Springer US.

- Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 703-709. doi:10.1002/jsfa.6023
- Inbaraj, B. S., Chien, J. T., & Chen, B. H. (2006). Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 193-199.
- Kochem, L. H., Da Fré, N. C., Redaelli, C., Rech, R., & Marcílio, N. R. (2014). Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. *Chemical Engineering & Technology*, 37(1), 59-64.
- Kulshrestha, S., & Sastry, S. (2003). Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2), 189-194.
- Kulshrestha, S. A., & Sastry, S. K. (2010). Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 78-83.
- Luengo, E., Condón-Abanto, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2014). Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. *The Journal of Membrane Biology*.
- Mandelli, F., Yamashita, F., Pereira, J. L., & Mercadante, A. Z. (2012). Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 126-134.
- Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2013). Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. *Food Chemistry*, 136(2), 853-857.
- Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B. W., Karttunen, M. (2006). Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 90(4), 1121-1135.
- Rodrigues, D. B., Flores, É. M. M., Barin, J. S., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2014). Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, 65, Part B, 144-148.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington DC: ILSI Press.
- Sensoy, I., & Sastry, S. K. (2004). Extraction Using Moderate Electric Fields. *Journal of Food Science*, 69(1), FEP7-FEP13.
- Shao, Y., Pan, J., Zhang, C., Jiang, L., & He, Y. (2015). Detection in situ of carotenoid in microalgae by transmission spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*, 112(0), 121-127.





## Artigo 2 – Extração de lipídeos

### EVALUATION OF MODERATE ELECTRIC FIELD AND ETHANOL ON LIPID EXTRACTION FROM *Chlorella SP.*

Débora Pez Jaeschke<sup>1\*</sup>, Rosane Rech<sup>2</sup>, Ligia Damasceno Ferreira Marczak<sup>1</sup>, Giovana Domeneghini Mercali<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Engenheiro Luiz Englert s/n - Porto Alegre, RS 90040-040 – Brazil.

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Avenue, 9500 – Campus do Vale – Building 43.212, Porto Alegre, RS 91501-970 - Brazil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308-5155; Fax: +55 51 3308-3277

E-mail address: [deborapj@enq.ufrgs.br](mailto:deborapj@enq.ufrgs.br)

#### Abstract

Lipid extraction from microalgae *Chlorella sp.* was evaluated using ethanol (25-75 %, v/v) and moderate electric field (MEF). The extraction methodology comprised a pre-treatment using MEF in the presence of ethanol (25 %, v/v) and a diffusive step conducted by varying ethanol concentration from 25 to 75% (v/v). Lipid analyses were performed on the supernatant after the extraction process using sulfo-phospho-vanillin and Bligh & Dyer methods. The results showed that MEF did not significantly affect lipid extraction. On the other hand, the effect of ethanol concentration was significant, yielding up to 83 % of lipid extraction when 75 % of solvent was used.

**Keywords:** MEF; microalgae; environmental friendly solvent; fatty acids.

#### 1. Introduction

Lipids are biological compounds soluble in organic solvents, such as ether, chloroform and benzene. They are divided in nonpolar (triglycerides and cholesterol) and polar (phospholipids) compounds (Fennema, 2007). Fatty acids are the main components of lipid molecules and are constituted of an aliphatic chain, saturated or unsaturated, bonded to a carboxylic acid. Linoleic (C:18:2n6) and  $\alpha$ -linolenic (C18:3n3) acid are considered essential fatty acids, since they cannot be synthesized by human body. These fatty acids, also known as  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids, act in the structural modulation and functional properties at cellular

levels; studies showed that some fatty acids develop an important function in immune and inflammatory cells, decreasing risk of cardiovascular diseases (Park *et al.*; Galli e Calder, 2009). Therefore,  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids are vital for human health and can be found, usually, in marine plants and animals. Nowadays, fish and oil-fish are the most common sources of  $\omega$ -3 fatty acids, and many products enriched with  $\omega$ -3 fatty acid have been developed (Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010). It is well known that some microalgae species are able to synthesize long chain  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids. (Lu, Wang e Yuan, 2015) extracted lipids from *Chlorella* sp. using a mixture of ethyl acetate and ethanol and evaluated the fatty acid profile. The researchers reported that the main fatty acids were palmitic (C16:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and  $\alpha$ -linoleic (C18:3) acids. The gender *Chlorella* produces different amounts of lipids, depending on the species and cultivation conditions, varying from 2 to 22 % in autotrophic conditions (D'oca *et al.*, 2011).

Conventional lipid extraction methods are based on the usage of organic solvents, as methanol and chloroform (Folch, Lees e Stanley, 1957; Bligh e Dyer, 1959), hexane and isopropanol (Hara e Radin, 1978) and methylene chloride and methanol (Chen, Shen e Sheppard, 1981). These conventional methods are commonly performed with dry biomass as sample material because when wet biomass is used, the nonpolar compounds (as lipids) tend to remain in the water phase due to superficial charges of the molecules instead of migrating to the organic phase. For this reason, when wet biomass is used, a pre-treatment extraction method is required to promote cell wall breaking, allowing intracellular components to release into the medium (Concas, Pisu e Cao, 2015). Several breaking methods have been studied: high pressure homogenization, microwave, ultrasound, enzymatic, basic and acid hydrolyses, supercritical fluids, among others. Pulsed electric field (PEE) has been studied as an alternative cellular membrane breaking method to lipid extraction from microalgae (Goettel *et al.*, 2013; Zbinden *et al.*, 2013). Electroporation or electropermeabilization is a membrane phenomenon in which cells are exposed to electric field, promoting an increase of membrane permeability (Sensoy e Sastry, 2004). (Goettel *et al.*, 2013) studied the extraction of intracellular compounds from the microalgae *Auxenochlorella protothecoides* using PEF, with an electrical field strength ranging from 23 to 43 kV cm<sup>-1</sup> and biomass concentration from 36 to 167 g kg<sup>-1</sup>. All conditions tested resulted in water soluble material (carbohydrates, proteins and ionic compounds) release into the suspension, while the nonpolar compounds remained in the cells. The researchers suggested PEF as a pre-treatment for a selective extraction of

soluble compounds; the nonpolar compounds, on the other hand, could be extracted with an adequate solvent after the pre-treatment. Other studies evaluated PEF application on pigments extraction from microalgae (Grimi *et al.*, 2014; Luengo *et al.*, 2014; Parniakov *et al.*, 2015b). Nevertheless, to the best of our knowledge, the application of moderate electric field (MEF) on lipid extraction from microalgae has not been evaluated.

Lipid quantification methods, such as (Bligh e Dyer, 1959), (Folch, Lees e Stanley, 1957) and (Hara e Radin, 1978) have the disadvantage of using relatively large amount of dry biomass (approximately 1 g); beyond that, the drying and extraction process are time and energy consuming. Sulfo-phospho-vanillin method (SPV) is a well-established lipid quantification methodology at medical field and was originally developed using human serum (Vatassery *et al.*, 1981). Recently, this methodology was adjusted and employed for lipid quantification from microalgae ((Mishra *et al.*, 2014) . It has the advantages of being fast and simple, requiring wet and lower amounts of biomass.

This work investigated the influence of MEF as a pre-treatment on lipid extraction from the microalgae *Chlorella* sp. and evaluated the use of ethanol as solvent during the pre-treatment and the diffusive step of the extraction process. Moreover, lipid quantification was compared using the traditional Bligh & Dyer and the SPV methods.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Reagents and solutions

Standards methyl-esters and BHT (butylated hydroxytoluene) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). The solvents, BF<sub>3</sub> (boron trifluoride) and Hexane were all HPLC-grade and were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA) and Dinâmica (Diadema, Brazil), respectively.

### 2.2 Microalgae cultivation

Microalgae *Chlorella* sp. was obtained from the culture collection of the Department of Marine Biology at Fluminense Federal University (Niteroi, Brazil). The cultivation was performed in flat-plates airlift photo bioreactors, described in more details elsewhere (Kochem *et al.*, 2014). The cultivation medium used was the modified f1/2 (Guillard, 1975) with the NaNO<sub>3</sub> concentration increased to 300 mg L<sup>-1</sup>. To avoid nutrients starvation, 1 mL L<sup>-1</sup> of phosphate solution (5 g L<sup>-1</sup> of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) and 1 mL L<sup>-1</sup> of trace metals solution (9.8 mg L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 22 mg L<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mg L<sup>-1</sup> of CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 180 mg

$L^{-1}$  of  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $6.3 \text{ mg } L^{-1}$  of  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $4.36 \text{ g } L^{-1}$  of  $Na_2EDTA$ , and  $3.15 \text{ g}$  of  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , were daily added to the photobioreactors. Microalgae cultivation was maintained for 38 days on a semi-continuous mode: four days after the beginning of the cultivation, half of the bioreactors volume was collected and centrifuged (*Hitachi*, CR 21GIII,  $10,000 \text{ g}$ ,  $10^\circ\text{C}$ ,  $10 \text{ min}$ ); after, the volume in the bioreactors were completed with cultivation medium ( $1.2 \text{ L}$ ); at every 48 h the same procedure was repeated. After centrifugation, the biomass was frozen with liquid nitrogen, freeze-dried (*LIOTOP*, Model L101, Brazil) and homogenized.

### 2.3 Extraction experiments

The extraction experiments comprised 10 min of a pretreatment and 50 min of a diffusive step. For the pre-treatment,  $80 \text{ mL}$  of a  $25 \%$  ethanol solution (v/v) was added to  $4 \text{ g}$  of dry biomass in an extraction cell (EC1); during this step, ethanol concentration in the medium was fixed at  $25 \%$  (v/v) and voltage was set according to an experimental design, ranging from  $0 \text{ V}$  to  $180 \text{ V}$  ( $60 \text{ Hz}$  of frequency). Controlled-temperature water passed through the jacket of the extraction cell to decrease the heating rate and maintain temperature below  $35^\circ\text{C}$ . For the diffusive step, EC1 content was transferred and ethanol solution was added to a second extraction cell (EC2), in order to change ethanol concentration in the medium ( $25 \%$  to  $75 \%$ , v/v), to a final volume of  $300 \text{ mL}$ . During this diffusive step, the cell was connected to a water bath and the temperature was maintained at  $30^\circ\text{C}$ . The product was stirred during all treatments using a magnetic stirrer plate (*IKA C-MAG*, Model HS 10, Germany). Before performing the extraction experiments, electrical conductivity of the samples was adjusted to  $500 \mu\text{S } cm^{-1}$ . This adjustment was made by washing the biomass with water, centrifuging and correcting the electrical conductivity with  $NaCl$  solution ( $2 \text{ g } L^{-1}$ ). This procedure allowed the application of relatively high voltages maintaining the temperature at a maximum of  $35^\circ\text{C}$ .

The apparatus used to performed the experiments comprised a data acquisition system, a power supply, a variable transformer (*Sociedade Técnica Paulista LTDA*, model Varivolt, São Paulo, SP, Brazil), a stabilizer (*Forceline*, model EV 1000 T/2-2, São Paulo, SP, Brazil), a computer and two extraction cells, EC1 and EC2. EC1 and EC2 cells are Pyrex glass vessels of  $100 \text{ mL}$  and  $300 \text{ mL}$ , respectively, with a water jacket. EC1 was used during the pre-treatment step and EC2 during the diffusive step. The electrodes were made of titanium ( $3.5 \text{ cm}$  of height) and were curved to conform EC1 dimensions. The inter-electrode gap of

EC1 was between 4.5 cm and 5.0 cm. More details of the apparatus can be found elsewhere (Mercali *et al.*, 2013).

After the extraction process, the samples were centrifuged (4757 g, 20 °C, 10 min, *Cientec*, Model CT 5000R, Brazil) and filtered (*Allcrom*, PTFE, 0.45 µm). Lipid analyses were performed using the filtrated supernatants.

#### **2.4 Determination of lipid content**

The lipid content of the extracts was determined by two methods, Bligh & Dyer (Bligh e Dyer, 1959) and SPV (Mishra *et al.*, 2014). Bligh & Dyer was performed, initially, using 20 g of ethanolic extract, 20 mL of ethanol and 10 mL of chloroform. Then, the samples were mixed during 30 min using a magnetic stirring plate (*IKA C-MAG*, Model HS 10, Germany); after this step, 10 mL of chloroform and 15 mL of a 10 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution were added to the samples. The chloroform phase was separated and filtered in the presence of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Lipid content was determined by gravimetric difference.

The SPV method comprises basically 5 steps: preparation of phospho-vanillin solution using phosphoric acid, ethanol and vanillin; addition of sulfuric acid to a rich unsaturated lipid sample; a heating step; addition of phospho-vanillin reagent; and spectrophotometer measurement. The SPV method was performed using 100 µL of the extracts. Two milliliters of sulfuric acid was added to the samples, maintaining the temperature at 100 °C with a hot plate (*Fisatom*, 752A, Brazil). After, the samples were cooled and 5 mL of the vanillin solution was added. Samples were kept in the dark for 15 min and the absorbance was read at 530 nm using a spectrophotometer (*PG Instruments Ltd.*, Model T80 UV-Vis, United Kingdom).

Lipid content of the biomass was also determined, using both aforementioned methods. For the Bligh & Dyer method, 0.05 g of dry biomass was used; for the SPV method, 0.05 g of dry biomass was previously hydrated with 2 mL of water and an amount of 100 µL was used to perform the analyses.

#### **2.5 Scanning electron microscope (SEM) analyses**

SEM analyses of the biomass (experiments 0 V and 25 %, 180 V and 25 %, 180 V and 75 %) were performed to detect cell permeabilization. Previously SEM analyses, conducted in a scanning electron microscope (*Hitachi*, Tabletop Microscope TM 3000, Japan), the biomass

was dried at 30 °C during 24 h (*Solab*, SL 102/100, Brazil) and fixed in *stubs* (1 cm of diameter) with a metallic strip.

### **2.6 Analysis of fatty acid methyl esters (FAMES)**

The fatty acid profile of the ethanolic extract with the best yield and the biomass sample were evaluated. Prior to the analysis, transesterification was performed according to the methodology described by (Joseph e Ackman, 1992). This step was performed adding 1.5 mL of a 0.5 N NaOH in methanol solution to the samples (chloroform phase of the Bligh & Dyer method, dried using nitrogen gas); then, samples were heated in a water bath at 100 °C for 5 min and subsequently cooled at room temperature. Next, 2 mL of BF<sub>3</sub> (boron trifluoride) were added to the samples, which were heated again for 30 min at 100 °C and cooled. Later, 5 mL of a saturated NaCl solution (360 g L<sup>-1</sup>) was added to the tubes and the samples were stirred. Then, 1 mL of isooctane was added and, when the separation of phases occurred, isooctane was withdrawn to another tube and the samples were dried using nitrogen gas. Right before injection into the gas chromatographer, samples were diluted with a BHT/hexane solution.. During all this procedure, tubes were kept closed with nitrogen inert atmosphere.

Fatty acid esters were separated in a gas chromatograph (*Shimadzu*, GC – 2010 Plus, Japan) equipped with a capillary column of fused silica (*Shimadzu*, SBL 100, 30 m x 0.25 mm and 0.25 µm of film thickness). The flame ionization detector (FID) and the injection port temperature were 260 °C and 240 °C, respectively. Column temperature was maintained at 50 °C for 1 min and then was increased at 10 °C min<sup>-1</sup> to 250 °C, with a final holding time of 74 min. The carrier gas was hydrogen with a constant injection flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The samples were injected in triplicate. For fatty acid identification, the retention times were compared to methyl-esters standard (Supelco 37 component FAME mix) previously analyzed by gas-chromatography – mass spectrometry (CG-MS).

### **2.7 Experimental design and statistical data analyses**

The experiments were planned to identify the voltage (V) and the ethanol concentration (%) effect on lipid extraction from microalgae. Voltage ranged from 0 V to 180 V and ethanol concentration varied from 25 % to 75 % (v/v). Voltage range was selected based on the limitations of MEF equipment. Statistical significance was determined by ANOVA and Tukey tests with a 95 % of confidence level. Experimental data were analyzed using a polynomial regression model, presented in Equation (1), where *Y* represents the lipid

extracted from the dried biomass ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $X_1$  is the coded variable for voltage (V),  $X_2$  is the coded variable for ethanol concentration ( $C_{EtOH}$ ) and  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}$  and  $\beta_{12}$  represent the equation coefficients. Terms that were not significant were removed from the final model.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Where

$$X_1 = \frac{V - 90}{90} \quad (2)$$

$$X_2 = \frac{C_{EtOH} - 50}{25} \quad (3)$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Ethanol and MEF effect

The effects of ethanol and MEF on lipid extraction were evaluated and the regression coefficients for the coded variables are presented in Table 1. The quadratic models adequately represented the experimental data with coefficients of determination ( $R^2$ ) of 0.959 and 0.956 for Bligh & Dyer and SPV results, respectively.

Table 1. Regression coefficients for the coded variables of the experimental design.

Regression coefficients	Bligh & Dyer		SPV	
		<i>p-value</i>		<i>p-value</i>
$\beta_0$	-	-	-	-
$\beta_1$	-	-	-	-
$\beta_2$	300.5712	0.000000	297.4210	0.0000
$\beta_{11}$	-	-	-	-
$\beta_{22}$	31.7823	0.000018	36,3313	0.0000
$\beta_{12}$	-	-	-	-
<b>blocks</b>	-	-	-	-
<b>Regression <math>R^2</math></b>	0.959		0.956	
<b>Regression <i>p-value</i></b>	1.4E-12		3.8E+02	

Ethanol concentration significantly affected lipid extraction ( $p < 0.05$ ) while MEF showed no effect on the extraction process. The effect of ethanol concentration on lipid extraction using SPV and Bligh & Dyer methods can be seen in Figure 1. It was observed that lipid extraction increased with higher ethanol concentrations. This result is explained by the interaction between ethanol and the phospholipid layer of the cell membrane, leading to a disorder of the membrane physical structure. Pure ethanol is considered less efficient than diluted ethanol for this purpose, being normally used a 70 % ethanol/water solution (v/v) to penetrate the cells and inactive microorganisms (Park *et al.*, 2015). (Gurtovenko e Anwar, 2009) evaluated the effect of ethanol concentration (2.5 to 30 % molar) on phospholipid membranes; according to these authors, concentrations lower than 12 % (mol/mol, 30.5 %, v/v) promoted membrane structure disorder, as well as a decrease on the membrane thickness. Above this concentration, irregularities on the membrane could be observed and the bilayer structure started to be affected. (Grima *et al.*, 1994) evaluated seven solvent mixtures, including ethanol (96 %, v/v), on lipid extraction from the microalgae *Isochrysis galbana*. The authors reported that 96 % ethanol solution extracted approximately 85 % of the total lipid content obtained by the Bligh & Dyer method. This result is in agreement to those obtained in the present work.

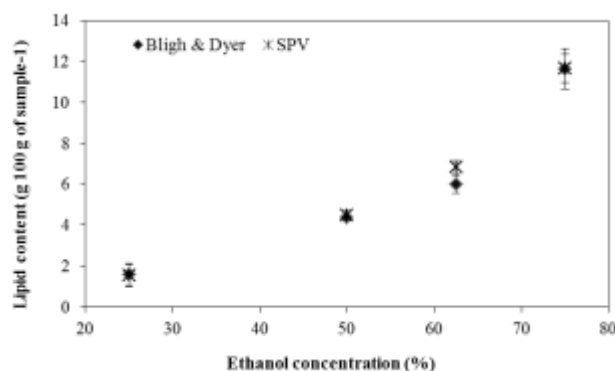


Figure 1. Lipid content obtained at different ethanol concentrations (25 – 75 %, v/v) using SPV and Bligh & Dyer method.

MEF was supposed to act on cell membrane promoting the permeabilization phenomenon. However, this effect was not observed in the present work; the voltage intensity (ranged 0 - 180 V) may not be enough to promote the desirable effect, since some studies have reported pore formation when higher voltages were used (Bouzrara e Vorobiev, 2003; Goettel *et al.*, 2013; Lebovka *et al.*, 2014; Parniakov *et al.*, 2015a). (Zbinden *et al.*, 2013)



evaluated PEF as a pre-treatment on lipid extraction from microalgae and reported that approximately 90 % of the cells were lysed, increasing the lipids extraction. Recently, studies have shown that electrical permeabilization depends on the field strength and pulse parameters (type of pulse and pulse duration) (Vorobiev e Lebovka, 2006); in the present work, the alternate electric field with a senoidal waveform was not capable to promote definitive pore formation. It is presumable that reversible electroporation could be occurred but this phenomenon was not sufficient to increase lipid extraction.

Lipid content and the extraction yield of all extracts analyzed by Bligh & Dyer and SPV methods are shown in Table 2. The extraction yield was determined by the ratio between the lipid content in the extract of each experimental condition with the total lipid content of the biomass determined by an exhaustive extraction.

Table 2. Lipid content using Bligh & Dyer and SPV methods for each experimental condition evaluated.

Voltage (V)	$C_{EtOH}$ (%)	Bligh & Dyer		SPV	
		Lipid content (g/100 g of sample)*	Yield (%)	Lipid content (g/100 g of sample)*	Yield (%)
0	25.0	$1.57 \pm 0.031^{Aef}$	10.7%	$1.56 \pm 0.089^{Ade}$	8.8%
0	75.0	$10.46 \pm 0.97^{Ab}$	70.8%	$11.27 \pm 0.52^{Ab}$	63.8%
90	50.0	$4.29 \pm 0.07^{Ade}$	29.1%	$4.64 \pm 0.11^{Acd}$	26.3%
90	75.0	$12.29 \pm 0.98^{Aab}$	83.3%	$12.20 \pm 0.12^{Ab}$	69.1%
135	62.5	$5.99 \pm 0.60^{Ac}$	40.6%	$5.26 \pm 0.52^{Ac}$	29.8%
180	25.0	$0.49 \pm 0.02^{Af}$	3.3%	$0.48 \pm 0.02^{Ae}$	2.7%
180	50.0	$4.47 \pm 0.06^{Acd}$	30.3%	$4.29 \pm 0.24^{Acd}$	24.3%
180	75.0	$11.92 \pm 0.24^{Ab}$	80.7%	$11.60 \pm 0.77^{Ab}$	65.6%
Total lipid content		$14.76 \pm 0.52^{Aa}$	-	$17.67 \pm 0.42^{Aa}$	-

\* mean  $\pm$  standard deviation; means with the same lowercase letter in the same column does not present significant difference ( $p > 0.05$ ); means with the same capital letter in the same line does not present significant difference ( $p > 0.05$ ).

Comparing the experimental results using the same voltage and different ethanol concentrations, it is observed a high increase of the extraction yield. Results showed that up to 83 % of the total lipid content of the biomass can be extracted when a solution with 75 % of ethanol concentration is used. Results obtained by SPV method did not statistically differ ( $p < 0.05$ ) from those obtained by Bligh & Dyer method, which indicates that SPV method can be used as a simple and fast lipid quantification method from *Chorella* sp.

### 3.2 SEM analyses

The micrographic images of biomass samples submitted to 0 V, 25 % (Figure 2a) and 180 V, 25 % (Figure 2b) did not show visual differences. After the treatments, biomass appeared to be agglomerated and most of the cells presented a regular spherical geometry, corroborating the results discussed previously in the present work. These images show that irreversible electroporation did not occur, once visible damage caused by MEF was not observed. On the other hand, cells submitted to the extraction treatment 180 V, 75 % (Figure 2c) were apparently damaged; cells are compressed and elongated, probably due to ethanol effect on cellular membrane.

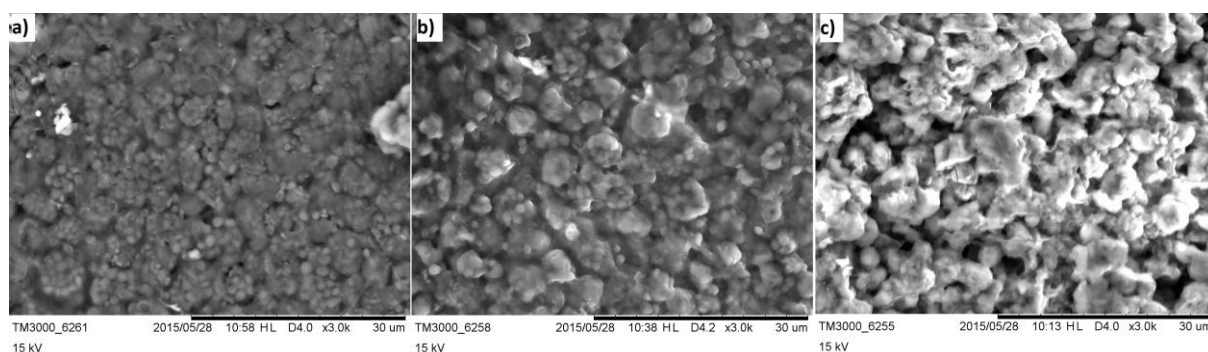


Figure 2. SEM analyses of biomass samples after the extraction treatment (a) 0 V, 25 % (b) 180 V, 25 % and (c) 180 V, 75 %.

### 3.3 Fatty acid methyl esters (FAMES) profile

A gas chromatography analysis was performed to evaluate fatty acid profile on the best extraction condition (75 %) and on the biomass (Figures 3 and 4, Table 3). The major fatty acid found in *Chlorella* sp. was the linoleic acid (C:18:2n6), representing 32 % of the fatty acid content. Among all fatty acids identified, it was found 20 % of palmitic acid (C16:0), 13 % of  $\alpha$ -linoleic acid (C18:3n3), 8 % of stearic acid (C:18:0) and 7% of oleic acid (C18:1n9). In the extract, the fatty acid profile was similar, since the main fatty acids were also linoleic acid (31 %), palmitic acid (24 %),  $\alpha$ -linoleic acid (13 %). This result indicates

that ethanol effectively extracted the high added value fatty acids,  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3. These compounds can be used in food industry (and other applications previously mentioned) and can be extracted using a less harmful and non-toxic solvent.

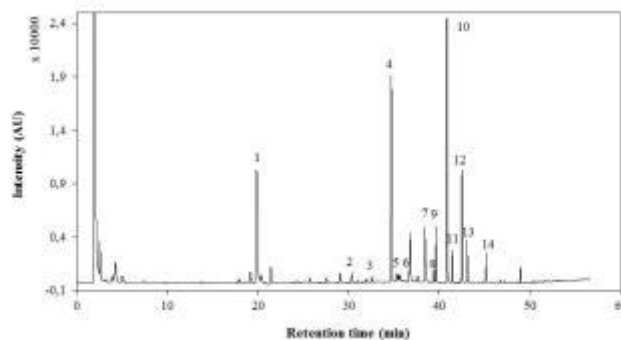


Figure 3. Chromatogram obtained by gas chromatography analysis to identify the biomass fatty acid profile.

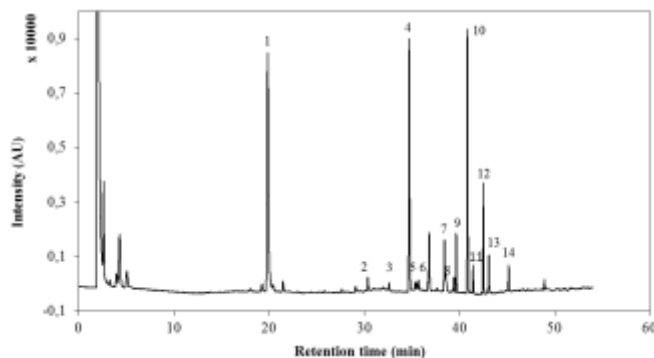


Figure 4. Chromatogram obtained by gas chromatography analysis to identify the extract (180 V, 75 %) fatty acid profile.

Table 3. Retention time of all fatty acids peaks observed in the chromatograms.

Peak <sup>a</sup>	Retention time (min)	Fatty acid
1	19.9	Standard
2	30.3	C:14
3	32.6	C:14:1
4	34.7	C16:0
5	35.3	C:16:1n9
6	35.5	C:16:1n7
7	38.4	C:18:0
8	39.4	C18:1n6c
9	39.6	C18:1n9c
10	40.8	C:18:2n6c
11	41.4	C18:3n6
12	42.5	C18:3n3
13	43.1	C:22:0
14	45.2	C:24:0

<sup>a</sup> numbered according to the chromatograms shown in Figures 2 and 3.

#### 4. Conclusion

This work evaluated MEF application as a pre-treatment and different ethanol concentrations in the diffusive step on the extraction of lipids from the microalgae *Chlorella sp.* The results showed that MEF did not significantly affected lipid extraction; on the other hand, ethanol concentration showed a positive effect on the extraction yield. All conditions using 75 % of ethanol presented the highest extraction results, with an extraction yield up to 83 %. Linoleic, palmitic and  $\alpha$ -linoleic acid were the major fatty acids found in the extract. Ethanol showed to be an adequate solvent for high added value fatty acids extraction. SPV method showed to be an attractive and fast lipid quantification method.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) as a scholarship for the first author and as the PNPB grant.

## References

- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917. doi:10.1139/o59-099
- Bouzzara, H., & Vorobiev, E. (2003). Solid-liquid expression of cellular materials enhanced by pulsed electric field. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 42(4), 249-257.
- Chen, I. S., Shen, C. S. J., & Sheppard, A. J. (1981). Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(5), 599-601. doi:10.1007/BF02672373
- Concas, A., Pisu, M., & Cao, G. (2015). Disruption of microalgal cells for lipid extraction through Fenton reaction: Modeling of experiments and remarks on its effect on lipids composition. *Chemical Engineering Journal*, 263(0), 392-401.
- D'Oca, M. G. M., Viêgas, C. V., Lemões, J. S., Miyasaki, E. K., Morón-Villarreyes, J. A., Primel, E. G., & Abreu, P. C. (2011). Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*, 35(4), 1533-1538.
- Fennema, O. R. (2007). *Fennema's Food Chemistry* (4th ed.).
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Galli, C., & Calder, P. C. (2009). Effects of Fat and Fatty Acid Intake on Inflammatory and Immune Responses: A Critical Review. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55(1-3), 123-139.
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, 2(4), 401-408.
- Grima, E. M., Medina, A. R., Giménez, A. G., Sánchez Pérez, J. A., Camacho, F. G., & García Sánchez, J. L. (1994). Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(9), 955-959. doi:10.1007/BF02542261
- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology*, 153(0), 254-259.
- Guillard, R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In W. Smith & M. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 29-60): Springer US.

- Gurtovenko, A. A., & Anwar, J. (2009). Interaction of Ethanol with Biological Membranes: The Formation of Non-bilayer Structures within the Membrane Interior and their Significance. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(7), 1983-1992. doi:10.1021/jp808041z
- Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90(1), 420-426.
- Joseph, J. D., & Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75(3), 488-506.
- Kochem, L. H., Da Fré, N. C., Redaelli, C., Rech, R., & Marcílio, N. R. (2014). Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. *Chemical Engineering & Technology*, 37(1), 59-64. doi:10.1002/ceat.201300420
- Lebovka, N. I., Mhemdi, H., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2014). Treatment of potato tissue by pulsed electric fields with time-variable strength: Theoretical and experimental analysis. *Journal of Food Engineering*, 137(0), 23-31.
- Lu, W., Wang, Z., & Yuan, Z. (2015). Characteristics of lipid extraction from *Chlorella* sp. cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 191, 433-437.
- Luengo, E., Condón-Abanto, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2014). Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. *The Journal of Membrane Biology*.
- Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2013). Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. *Food Chemistry*, 136(2), 853-857.
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155(0), 330-333.
- Park, H.-S., Ham, Y., Shin, K., Kim, Y.-S., & Kim, T.-J. (2015). Sanitizing Effect of Ethanol Against Biofilms Formed by Three Gram-Negative Pathogenic Bacteria. *Current Microbiology*, 71(1), 70-75. doi:10.1007/s00284-015-0828-4
- Park, K.-H., Kim, J.-Y., Choi, I., Kim, J.-R., & Cho, K.-H.  $\omega$ -6 (18:2) and  $\omega$ -3 (18:3) fatty acids in reconstituted high-density lipoproteins show different functionality of anti-atherosclerotic properties and embryo toxicity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015a). Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *Nannochloropsis*. *Algal Research*, 8, 128-134.
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015b). Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27(0), 79-85.

- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S. M., Sanz, M. T., & Carballido, J. R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *11*(1), 1-12. doi:10.1016/j.ifset.2009.10.006
- Sensoy, I., & Sastry, S. K. (2004). Extraction Using Moderate Electric Fields. *Journal of Food Science*, *69*(1), FEP7-FEP13. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb17861.x
- Vatassery, G. T., Sheridan, M. A., Krezowski, A. M., Divine, A. S., & Bach, H. L. (1981). Use of the sulfo-phospho-vanillin reaction in a routine method for determining total lipids in human cerebrospinal fluid. *Clinical biochemistry*, *14*(1), 21-24. doi:10.1016/0009-9120(81)90120-x
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. I. (2006). Extraction of Intercellular Components by Pulsed Electric Fields. In J. Raso & V. Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry* (pp. 153-193): Springer US.
- Zbinden, M. D. A., Sturm, B. S. M., Nord, R. D., Carey, W. J., Moore, D., Shinogle, H., & Stagg-Williams, S. M. (2013). Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. *Biotechnology and Bioengineering*, *110*(6), 1605-1615. doi:10.1002/bit.24829

## Resultados complementares

### 5.1.1. Calibração da célula ôhmica

Para realizar medidas de condutividade elétrica nas amostras, a célula ôhmica foi calibrada. A calibração se mostrou satisfatória, uma vez foi possível obter o valor da constante da célula,  $L/A$ . O valor de  $L/A$  médio obtido foi  $6,84 \pm 0,76 \text{ cm}^{-1}$ .

### 5.1.2. Cultivos de microalgas

A seguir são apresentados os dados de concentração de biomassa ao longo do tempo para os cultivos realizados. Nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 são apresentados os dados de acompanhamento do cultivo 1 e dos cultivos semi-contínuos 1 e 2.

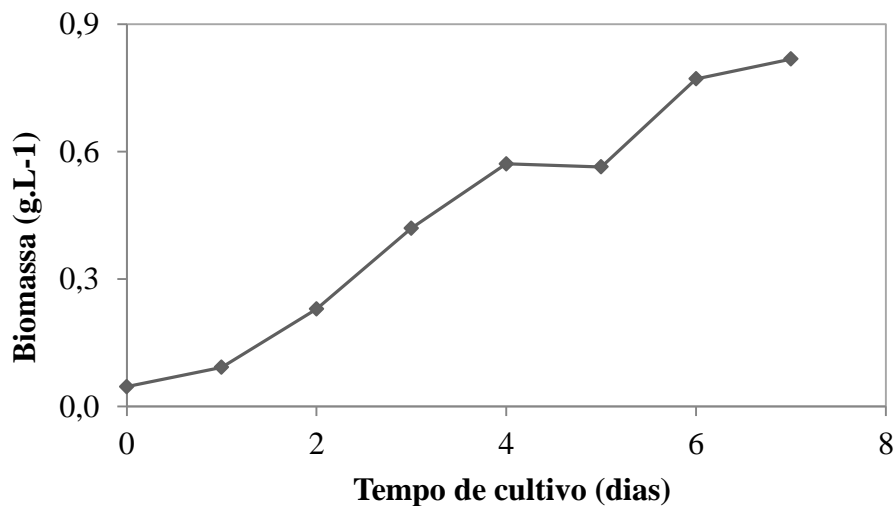


Figura 5. 1. Concentração de biomassa em função do tempo de cultivo para o Cultivo 1.

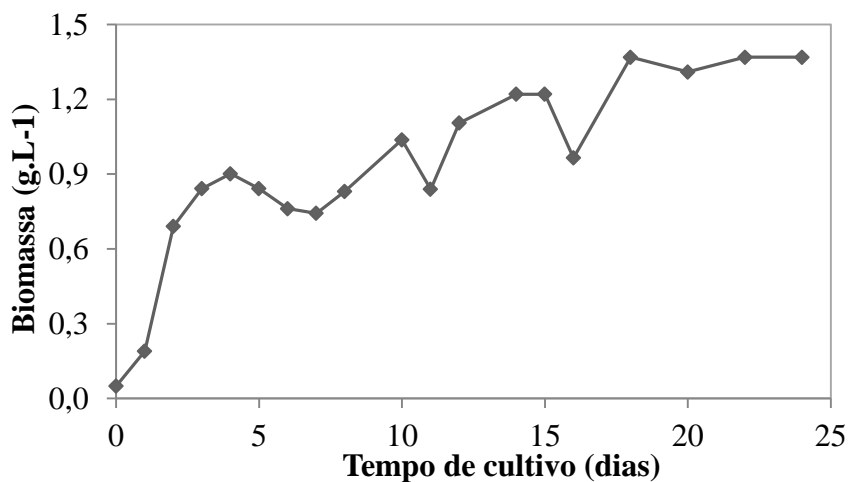


Figura 5.2. Concentração de biomassa em função do tempo de cultivo para o cultivo semi-contínuo 1.



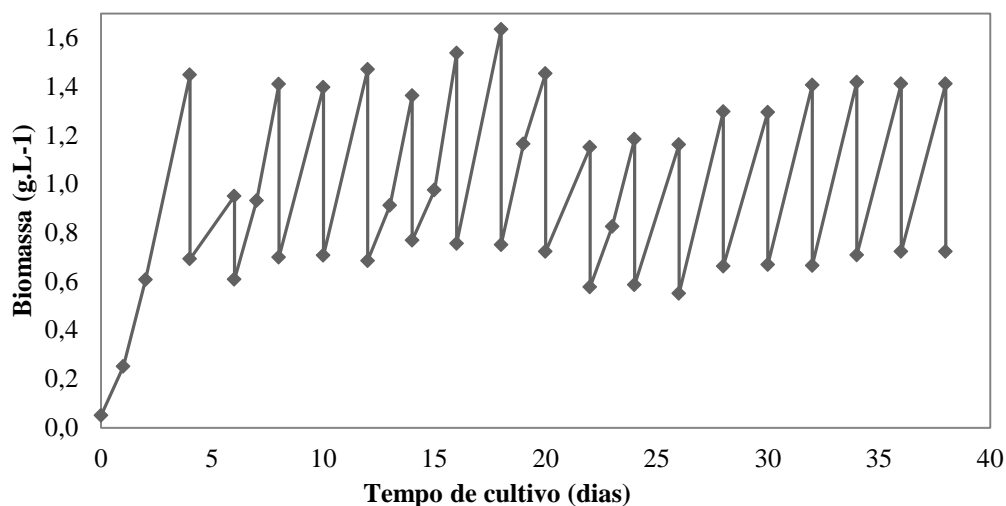


Figura 5. 3. Concentração de biomassa em função do tempo de cultivo para o cultivo semi-contínuo 2.

De maneira geral, os cultivos tiveram o comportamento esperado, isto é, a concentração de biomassa se manteve estável a partir do quarto dia de cultivo. Nos cultivos semi-contínuos, procedeu-se com a retirada de biomassa a partir do quarto dia; nesse caso ocorreram maiores oscilações na concentração de biomassa, principalmente no cultivo semi-contínuo 1, que apresentou concentrações inferiores de biomassa nos dez primeiros dias, se comparado ao final do cultivo e ao cultivo semi-contínuo 2. Acredita-se que esse comportamento se deve a problemas de aeração do reatores. Observou-se que ocorreram variações na linha de ar comprimido durante a noite, assim, houve uma diminuição da concentração de biomassa nos reatores. O mesmo problemas aconteceu quando o Cultivo 1 foi realizado. Contudo, conforme apresentado nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3, em geral, a concentração se manteve estável, sendo possível obter uma quantidade considerável de biomassa ao final de cada um dos cultivos semi-contínuos; ao final do cultivo semi-contínuo 1, obteve-se aproximadamente 20 g de biomassa liofilizada e ao final do cultivo semi-contínuo 2, 40 g de biomassa liofilizada.

### 5.1.3. Permeabilização das células de microalgas

A permeabilização causada por diferentes tratamentos em células de microalga foi avaliada observando o comportamento da condutividade elétrica com a variação da frequência. Os resultados são apresentados na Figura 5.4 e como pode se observar, que as amostras “in natura” e “liofilizada” não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). A amostra que foi submetida a congelamento lento e maceração com pistilo e grau, por sua vez,

apresentou condutividade elétrica superior às demais amostras, indicando que houve o transporte de íons do interior das células para o meio.

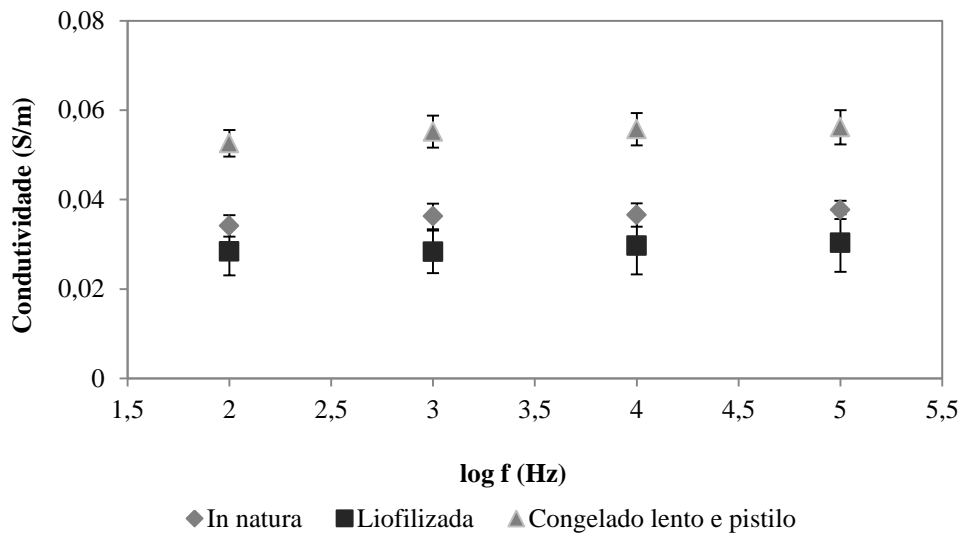


Figura 5.4. Variação da condutividade elétrica com a frequência em amostras de microalgas submetidas a diferentes tratamentos.

Este resultado difere do comportamento da condutividade elétrica em função da frequência apresentado por (Angersbach, Heinz e Knorr, 1999) e mostrado esquematicamente na Figura 5.5. Apesar desta diferença, acredita-se que a amostra que foi congelada lentamente e macerada, que obteve valores de condutividade superiores aos das amostras *in natura* e liofilizada, apresentou maior número de células permeabilizadas. A avaliação do comportamento das amostras liofilizadas indica que as mesmas estavam intactas ou parcialmente intactas, uma vez que apresentaram valores de condutividade elétrica iguais aos das amostras *in natura*. Além disso, de acordo com a literatura, a variação da condutividade elétrica com a frequência depende do tecido biológico e não foram encontrados estudos avaliando a permeabilização de células de microalgas utilizando essa metodologia.

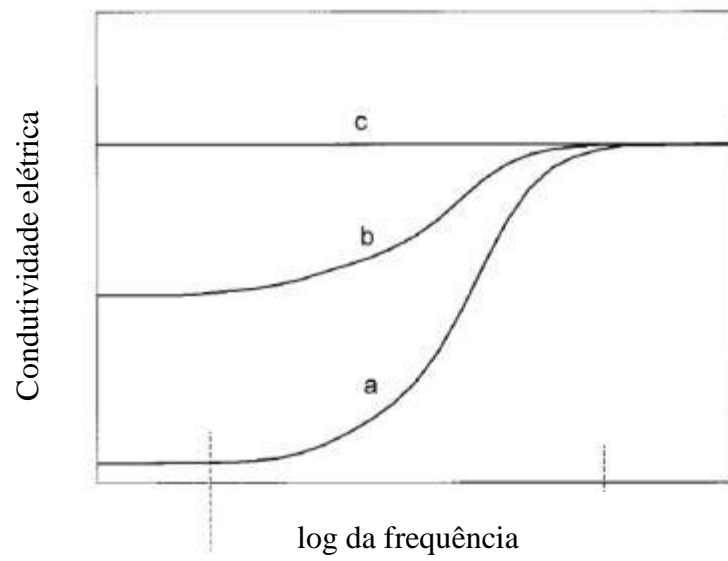


Figura 5.5. Comportamento típico da variação da condutividade elétrica com variações de frequência (kHz a MHz) de tecidos biológicos com (a) células intactas; (b) células intactas e rompidas e (c) células totalmente rompidas.

Fonte: Adaptado de Angersbach, Heinz e Knorr (1999)

## Capítulo 6 - Considerações Finais

Neste capítulo são apresentadas de maneira resumida as principais conclusões deste trabalho que teve como objetivo principal avaliar a influência do campo elétrico moderado na extração de lipídeos e carotenoides de microalga. Os resultados mostraram que o campo elétrico moderado influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) a extração de carotenoides. Esse resultado se deve, possivelmente, ao efeito exercido pelo campo elétrico nos cloroplastos das células de microalga. Contudo, a extração de lipídeos não foi influenciada significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo campo elétrico. O etanol influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) a extração tanto de lipídeos quanto de carotenoides. Nas microalgas, os lipídeos estão presentes nas membranas celulares e na forma de aglomerados no citoplasma, principalmente. Sabe-se que o etanol interage com a membrana celular, promovendo desequilíbrio osmótico intracelular e, conseqüentemente, danificação da estrutura celular. Os resultados mostraram que a concentração de 75 % de solvente apresentou os melhores resultados de extração, tanto para carotenoides como para lipídeos. Esse resultado coincide com o valor de concentração normalmente utilizado para assepsia, 70 %. Além disso, os resultados mostraram que utilizando etanol e campo elétrico, no caso dos carotenoides, e somente etanol, no caso dos lipídeos, foi possível extrair até 73 e 80 % de carotenoides e lipídeos, respectivamente. Portanto, a metodologia estudada no presente trabalho se mostra interessante para extração de compostos de alto valor agregado, como é o caso dos carotenoides e dos ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, em razão de utilizar um solvente ambientalmente amigável e não depender de maceração de amostra. Mais estudos devem ser realizados a fim de otimizar o tempo de extração e elucidar o efeito do campo elétrico moderado nos cloroplastos.

## Sugestões para Trabalhos Futuros

A partir deste trabalho, pode-se elencar algumas sugestões para trabalhos futuros:

- estudar a cinética de extração de lipídeos e carotenoides.
- estudar o efeito do ultrassom na extração de lipídeos e carotenoides e realizar a comparação com o método desenvolvido utilizando campo elétrico moderado.
- testar diferentes concentrações de etanol , acima de 75%, para extração de lipídeos.
- testar a utilização de campo elétrico moderado apenas com água e utilizar concentrações maiores de etanol na parte difusiva.
- realizar estudos de microscopia eletrônica de transmitância para verificar o efeito do campo elétrico nos cloroplastos.
- realizar estudos de modelagem do processo difusivo da extração de lipídeos e carotenoides.



## Referências Bibliográficas

- ABRAHAMSSON, V.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; TURNER, C. Determination of carotenoids in microalgae using supercritical fluid extraction and chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, n. 0, p. 63-68, 8/10/ 2012. ISSN 0021-9673.
- AHMED, F. et al. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **Food Chemistry**, v. 165, n. 0, p. 300-306, 12/15/ 2014. ISSN 0308-8146.
- AMORIM-CARRILHO, K. T. et al. Review of methods for analysis of carotenoids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49-73, 4// 2014. ISSN 0165-9936.
- ANGERSBACH, A.; HEINZ, V.; KNORR, D. Electrophysiological Model of Intact and Processed Plant Tissues: Cell Disintegration Criteria. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 4, p. 753-762, 1999. ISSN 1520-6033.
- BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **FASEB Journal**, v. 3, n. 8, p. 1927-1932, 1989.
- BILAD, M. R.; ARAFAT, H. A.; VANKELECOM, I. F. J. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1283-1300, 11/15/ 2014. ISSN 0734-9750.
- 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, 1959/08/01 1959. ISSN 0576-5544.
- BOUZRARA, H.; VOROBIEV, E. Solid-liquid expression of cellular materials enhanced by pulsed electric field. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 42, n. 4, p. 249-257, 4// 2003. ISSN 0255-2701.
- BUNEA, A. et al. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 649-656, 5/15/ 2008. ISSN 0308-8146.
- CASIMIR C. AKOH, D. B. M. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Third Edition (Food Science & Technology)**. 3. CRC Press, 2008. ISBN 1420046632,9781420046632,9781420046649.
- CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 1// 2011. ISSN 0960-8524.
- CHEN, I. S.; SHEN, C. S. J.; SHEPPARD, A. J. Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 5, p. 599-601, 1981/05/01 1981. ISSN 0003-021X.

- CHO, H. Y.; YOUSEF, A. E.; SASTRY, S. K. Growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus* under ohmic heating. **Biotechnology and bioengineering**, v. 49, n. 3, p. 334-340, 1996. ISSN 1097-0290.
- CONCAS, A.; PISU, M.; CAO, G. Disruption of microalgal cells for lipid extraction through Fenton reaction: Modeling of experiments and remarks on its effect on lipids composition. **Chemical Engineering Journal**, v. 263, n. 0, p. 392-401, 3/1/ 2015. ISSN 1385-8947.
- COOKSEY, K. E. et al. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, n. 6, p. 333-345, 9// 1987. ISSN 0167-7012.
- DE AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 8, p. 845-855, 12// 2005. ISSN 0889-1575.
- DE LA HOZ SIEGLER, H. et al. Improving the reliability of fluorescence-based neutral lipid content measurements in microalgal cultures. **Algal Research**, v. 1, n. 2, p. 176-184, 10// 2012. ISSN 2211-9264.
- DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006. ISSN 0103-8478.
- DOS REIS, L. C. R. et al. Carotenoids, flavonoids, chlorophylls, phenolic compounds and antioxidant activity in fresh and cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1). **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 177-183, 9// 2015. ISSN 0023-6438.
- DOS SANTOS, R. R. et al. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 95-99, 1// 2015. ISSN 1350-4177.
- D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1533-1538, 4// 2011. ISSN 0961-9534.
- EUGÈNE VOROBIEV, N. L. **Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials**: Springer. 1 2008.
- FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3th. Marcel Dekker, Inc., 1996. ISBN 0-8247-9691-8.
- Fennema's Food Chemistry**. 4th. 2007. ISBN 0849392721.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- GALLI, C.; CALDER, P. C. Effects of Fat and Fatty Acid Intake on Inflammatory and Immune Responses: A Critical Review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 55, n. 1-3, p. 123-139, 2009. ISSN 0250-6807.
- GOETTEL, M. et al. Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. **Algal Research**, v. 2, n. 4, p. 401-408, 10// 2013. ISSN 2211-9264.
- GOLDSTEIN, D. B. Effect of alcohol on cellular membranes. **Annals of Emergency Medicine**, v. 15, n. 9, p. 1013-1018, 9// 1986. ISSN 0196-0644.



- GOTO, M. et al. Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical dimethyl ether. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, n. 0, p. 245-251, 1// 2015. ISSN 0896-8446.
- GOULLIEUX, A.; PAIN, J.-P. 18 - Ohmic Heating. In: SUN, D.-W. (Ed.). **Emerging Technologies for Food Processing**. London: Academic Press, 2005. p.469-505. ISBN 978-0-12-676757-5.
- GRANADO-LORENCIO, F. et al. In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 747-752, 5/15/ 2009. ISSN 0308-8146.
- GRIMA, E. M. et al. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 9, p. 955-959, 1994/09/01 1994. ISSN 0003-021X.
- GRIMI, N. et al. Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. **Bioresource Technology**, v. 153, n. 0, p. 254-259, 2// 2014. ISSN 0960-8524.
- GUEDES, A. C. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 478-482, 5// 2013. ISSN 0260-8774.
- GUILLARD, R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**: Springer US, 1975. cap. 3, p.29-60. ISBN 978-1-4615-8716-3.
- GURTOVENKO, A. A.; ANWAR, J. Interaction of Ethanol with Biological Membranes: The Formation of Non-bilayer Structures within the Membrane Interior and their Significance. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 7, p. 1983-1992, 2009/02/19 2009. ISSN 1520-6106.
- HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420-426, 10/1/ 1978. ISSN 0003-2697.
- IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 703-709, 2013. ISSN 1097-0010.
- INBARAJ, B. S.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, n. 1-2, p. 193-199, 1/13/ 2006. ISSN 0021-9673.
- JEMAI, A. B.; VOROBIEV, E. Effect of moderate electric field pulses on the diffusion coefficient of soluble substances from apple slices. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, n. 1, p. 73-86, 2002. ISSN 1365-2621.
- JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186-193, 1// 2011. ISSN 0960-8524.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 488-506, 1992.

KHAN, S. A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 12// 2009. ISSN 1364-0321.

KIRAN, B.; KUMAR, R.; DESHMUKH, D. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. **Energy Conversion and Management**, v. 88, n. 0, p. 1228-1244, 12// 2014. ISSN 0196-8904.

KNIGHT, J. A.; ANDERSON, S.; RAWLE, J. M. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids. **Clin Chem**, v. 18, n. 3, p. 199-202, Mar 1972. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147.

KOCHEM, L. H. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014. ISSN 1521-4125.

KRZEMIŃSKA, I. et al. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 72-77, 11// 2015. ISSN 0960-8524.

KULSHRESTHA, S.; SASTRY, S. Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 4, n. 2, p. 189-194, 6// 2003. ISSN 1466-8564.

KULSHRESTHA, S. A.; SASTRY, S. K. Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 78-83, 1// 2010. ISSN 1466-8564.

KUSNADI, C.; SASTRY, S. K. Effect of moderate electric fields on salt diffusion into vegetable tissue. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 329-336, 6// 2012. ISSN 0260-8774.

LEBOVKA, N. I. et al. Treatment of potato tissue by pulsed electric fields with time-variable strength: Theoretical and experimental analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 137, n. 0, p. 23-31, 9// 2014. ISSN 0260-8774.

LEU, S.; BOUSSIBA, S. Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 169-183, 2014/06/01 2014. ISSN 1550-9087.

LI, Z. et al. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9128-9134, 10// 2011. ISSN 0960-8524.

LIANG, K. et al. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 1, p. 311-318, 2013/02/01 2013. ISSN 0921-8971.

LIAU, B.-C. et al. Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 169-175, 11// 2010. ISSN 0896-8446.

- LIMA, M.; HESKITT, B. F.; SASTRY, S. K. DIFFUSION OF BEET DYE DURING ELECTRICAL AND CONVENTIONAL HEATING AT STEADY-STATE TEMPERATURE1. **Journal of food process engineering**, v. 24, n. 5, p. 331-340, 2001. ISSN 1745-4530.
- LIMA, M.; SASTRY, S. K. The effects of ohmic heating frequency on hot-air drying rate and juice yield. **Journal of Food Engineering**, v. 41, n. 2, p. 115-119, 8// 1999. ISSN 0260-8774.
- LIMÓN, P. et al. Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts. **Food Chemistry**, v. 175, n. 0, p. 203-211, 5/15/ 2015. ISSN 0308-8146.
- LOGHAVI, L.; SASTRY, S. K.; YOUSEF, A. E. Effect of moderate electric field on the metabolic activity and growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 872-881, 2007. ISSN 1097-0290.
- LOURENÇO, S. D. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações**. 2006.
- LU, W.; WANG, Z.; YUAN, Z. Characteristics of lipid extraction from *Chlorella* sp. cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 433-437, 9// 2015. ISSN 0960-8524.
- LUENGO, E. et al. Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. **The Journal of Membrane Biology**, 2014.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO<sub>2</sub> and ethanol as cosolvent. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, n. 1, p. 104-113, 7/15/ 2009. ISSN 1385-8947.
- MANDELLI, F. et al. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 126-134, 2012. ISSN 1517-8382.
- 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, 1// 2010. ISSN 1364-0321.
- MENDEZ, L. et al. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. **Applied Energy**, v. 129, n. 0, p. 238-242, 9/15/ 2014. ISSN 0306-2619.
- MERCALI, G. D. et al. Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 853-857, 1/15/ 2013. ISSN 0308-8146.
- MISHRA, S. K. et al. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. **Bioresource Technology**, v. 155, n. 0, p. 330-333, 3// 2014. ISSN 0960-8524.
- OHSE, S. et al. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. **Idesia (Arica)**, v. 33, p. 93-101, 2015. ISSN 0718-3429.
- PAPCHENKO, A. Y. et al. **Electroplasmolyzer for processing vegetable stock**: Google Patents 1988.

PARK, H.-S. et al. Sanitizing Effect of Ethanol Against Biofilms Formed by Three Gram-Negative Pathogenic Bacteria. **Current Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 70-75, 2015/07/01 2015. ISSN 0343-8651.

PARK, K.-H. et al.  $\omega$ -6 (18:2) and  $\omega$ -3 (18:3) fatty acids in reconstituted high-density lipoproteins show different functionality of anti-atherosclerotic properties and embryo toxicity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, ISSN 0955-2863.

PARNIAKOV, O. et al. Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *Nannochloropsis*. **Algal Research**, v. 8, p. 128-134, 3// 2015a. ISSN 2211-9264.

Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, n. 0, p. 79-85, 2// 2015b. ISSN 1466-8564.

PATRA, M. et al. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 4, p. 1121-1135, 12/02. ISSN 0006-3495/1542-0086.

PRATHIMA DEVI, M.; SWAMY, Y. V.; VENKATA MOHAN, S. Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation. **Bioresource Technology**, v. 142, n. 0, p. 278-286, 8// 2013. ISSN 0960-8524.

PRAVEENKUMAR, R. et al. Improved biomass and lipid production in a mixotrophic culture of *Chlorella* sp. KR-1 with addition of coal-fired flue-gas. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 500-505, 11// 2014. ISSN 0960-8524.

PUÉRTOLAS, E. et al. Improving mass transfer to soften tissues by pulsed electric fields: fundamentals and applications. **Annual review of food science and technology**, v. 3, p. 263-282, 2012. ISSN 1941-1413.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004.

RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, Part B, p. 144-148, 11// 2014. ISSN 0963-9969.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington DC: ILSI Press, 2001. 60 ISBN 1-57881-072-8.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010.

SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, n. 0, p. 265-278, 7// 2014. ISSN 1364-0321.

SALENGKE, S.; SASTRY, S. K. Effect of ohmic pretreatment on the drying rate of grapes and adsorption isotherm of raisins. **Drying technology**, v. 23, n. 3, p. 551-564, 2005. ISSN 0737-3937.

- SCHREIER, P. J.; REID, D. G.; FRYER, P. J. Enhanced diffusion during the electrical heating of foods. **International journal of food science & technology**, v. 28, n. 3, p. 249-260, 1993. ISSN 1365-2621.
- SENSOY, I.; SASTRY, S. K. Extraction Using Moderate Electric Fields. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 1, p. FEP7-FEP13, 2004. ISSN 1750-3841.
- SEO, T. et al. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 8, p. 2214-2222, 2005.
- SHAO, Y. et al. Detection in situ of carotenoid in microalgae by transmission spectroscopy. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 112, n. 0, p. 121-127, 3// 2015. ISSN 0168-1699.
- SHARMA, K. K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, v. 5, n. 5, p. 1532-1553, 2012.
- SINGH, P. et al. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, n. 0, p. 22-29, 2/15/ 2015. ISSN 1369-703X.
- SKORUPSKAITE, V.; MAKAREVICIENE, V.; LEVISAUSKAS, D. Optimization of mixotrophic cultivation of microalgae *Chlorella* sp. for biofuel production using response surface methodology. **Algal Research**, v. 7, n. 0, p. 45-50, 1// 2015. ISSN 2211-9264.
- SOMAVAT, R.; MOHAMED, H. M. H.; SASTRY, S. K. Inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores under ohmic and conventional heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 194-198, 11// 2013. ISSN 0023-6438.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2// 2006. ISSN 1389-1723.
- SUDHEENDRAN, S.; CHANG, C. C.; DECKELBAUM, R. J. N-3 vs. saturated fatty acids: Effects on the arterial wall. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4-6, p. 205-209, 2010.
- TIBBETTS, S. M. et al. Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. **Algal Research**, ISSN 2211-9264.
- VATASSERY, G. T. et al. Use of the sulfo-phospho-vanillin reaction in a routine method for determining total lipids in human cerebrospinal fluid. **Clinical biochemistry**, v. 14, n. 1, p. 21-24, 1981/02// 1981. ISSN 0009-9120.
- VOROBIEV, E.; LEOVKA, N. I. Extraction of Intercellular Components by Pulsed Electric Fields. In: RASO, J. e HEINZ, V. (Ed.). **Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry**: Springer US, 2006. cap. 6, p.153-193. (Food Engineering Series). ISBN 978-0-387-31053-4.
- WANG, W. C.; SASTRY, S. K. Effects of thermal and electrothermal pretreatments on hot air drying rate of vegetable tissue. **Journal of Food Process Engineering**, v. 23, n. 4, p. 299-319, 2000. ISSN 1745-4530.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494-5500, 7// 2010. ISSN 0960-8524.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499-507, 12/1/ 2006. ISSN 0168-1656.

ZBINDEN, M. D. A. et al. Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 1605-1615, 2013. ISSN 1097-0290.

ZENG, X. et al. Microalgae bioengineering: From CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, 8// 2011. ISSN 1364-0321.

ÖNCÜ, S. Optimal dosage and dwell time of ethanol lock therapy on catheters infected with *Candida* species. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 360-362, 4// 2014. ISSN 0261-5614.