



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA



# **Extração de carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis* assistida por ultrassom usando *n*-butanol como solvente**

*Autor: Felipe Todescat*

*Orientadora: Lígia Damasceno Ferreira Marczak*

*Co-orientadora: Débora Pez Jaeschke*

Porto Alegre, julho de 2017.



## Sumário

|  |     |
|--|-----|
| Sumário  | i   |
| Agradecimentos   | ii  |
| Resumo   | iii |
| Lista de Figuras   | iv  |
| Lista de Tabelas   | v   |
| 1 Introdução   | 1   |
| 2 Objetivos  | 2   |
| 2.1 Objetivo geral   | 2   |
| 2.2 Objetivos específicos  | 2   |
| 3 Revisão Bibliográfica e Fundamentação Teórica                          | 3   |
| 3.1 Microalgas   | 3   |
| 3.2 Carotenoides   | 3   |
| 3.2.1 Carotenoides na saúde humana                                       | 5   |
| 3.2.2 Luteína  | 6   |
| 3.3 Extração de carotenoides   | 6   |
| 3.4 Ultrassom como método de pré-tratamento de extração                  | 8   |
| 4 Materiais e Métodos  | 12  |
| 4.1 Experimentos de extração utilizando o ultrassom                      | 12  |
| 4.1.1 Preparo da biomassa – pesagem e dissolução                         | 13  |
| 4.1.2 Pré-tratamento de extração – aplicação de ultrassom                | 13  |
| 4.1.3 Etapa Difusiva   | 15  |
| 4.2 Análise do teor de carotenoides                                      | 15  |
| 4.2.1 Partição   | 16  |
| 4.2.2 Saponificação  | 17  |
| 4.2.3 Lavagem das amostras e passagem para balão volumétrico             | 17  |
| 4.2.4 Preparação das amostras e leitura em espectrofotômetro de absorção | 18  |
| 4.3 Extração exaustiva   | 19  |
| 4.4 Análise estatística  | 19  |
| 5 Resultados e discussão   | 21  |
| 5.1 Teor de carotenoides no extrato e rendimento da extração             | 21  |
| 5.2 Aplicação da metodologia experimental em amostras mais concentradas  | 24  |
| 6 Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros                          | 25  |
| 7 Referências  | 26  |

## **Agradecimentos**

Às minhas orientadoras, Prof.<sup>a</sup> Lígia Damasceno Ferreira Marczak, primeiramente pela disponibilidade e oportunidade de fazer parte do LATEPA e realizar este trabalho e à Débora Pez Jaeschke, por todos os ensinamentos, paciência e empenho demonstrados durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais, Luiz e Márcia, pelo amor, incentivo e apoio ao longo dos anos.

Ao meu irmão Rodrigo, por estar sempre presente.

A todo o grupo do LATEPA, em especial à bolsista Laura, pela ajuda no trabalho.

Aos meus amigos.

A todos que fizeram parte da minha formação, direta ou indiretamente.

## Resumo

Microalgas são microrganismos unicelulares e de crescimento rápido que realizam fotossíntese, necessitando apenas luz, água, carbono e alguns nutrientes para o seu crescimento. Esses microrganismos produzem uma gama de produtos de alto valor agregado, dentre os quais podem ser destacados os carotenoides. Esses compostos possuem propriedades antioxidantes, o que os torna interessantes em diversas aplicações industriais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a tecnologia de ultrassom e o uso de *n*-butanol na extração de carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis*. O ultrassom foi aplicado durante uma etapa de pré-tratamento de extração, com intensidades variando de 0 a 50%, por 10 minutos. Após o pré-tratamento, realizou-se uma etapa difusiva, com duração de 50 minutos. As extrações foram realizadas com concentrações de *n*-butanol variando entre 25 e 75 % (v/v). Após as extrações, foram realizadas análises do teor de carotenoides nos extratos. O rendimento das extrações foi calculado com base na quantidade total de carotenoides na microalga, valor obtido através de extração exaustiva da biomassa. Os resultados mostraram uma influência positiva da intensidade do ultrassom no rendimento das extrações, possivelmente por causar a ruptura das células, facilitando o contato entre solvente e o material intracelular. Já a concentração de butanol apresentou uma influência negativa, que pode ser explicada pela baixa polaridade do solvente. Assim, em concentrações mais baixas de *n*-butanol, a maior quantidade de água no sistema propiciou uma melhor dissolução da biomassa além de aumentar a polaridade do sistema, possibilitando a desestruturação da membrana celular das células, aumentando o rendimento de extração. O melhor resultado obtido nas extrações foi para o ponto com ultrassom a 50 % e 25 % de butanol, apresentando rendimento de 41,1 %. A metodologia avaliada no presente trabalho se mostrou uma boa alternativa para a extração de carotenoides de microalgas em comparação com o etanol, com a utilização de baixas concentrações de solvente (25 %, v/v).

## Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 3.1:</b> Estrutura química de alguns carotenoides. ....  | 4  |
| <b>Figura 3.2:</b> Comparação entre os espectros de absorção de diferentes carotenoides, sendo (---) licopeno, (- - -) $\gamma$ -caroteno, (-.-.-) $\beta$ -caroteno e (...) $\alpha$ -caroteno..... | 5  |
| <b>Figura 3.3:</b> Esquematização da cavitação. ....   | 9  |
| <b>Figura 3.4:</b> Superfícies celulares de microalgas (barra de escala em ambos os casos corresponde a 1 $\mu$ m). a) Célula sem pré-tratamento. b) Célula pré-tratada com ultrassom. ....          | 10 |
| <b>Figura 4.1:</b> Fluxograma do processo de extração. ....  | 13 |
| <b>Figura 4.2:</b> Aparato experimental utilizado no pré-tratamento: 1) Aparelho de ultrassom; 2) Sonda de ultrassom; 3) Célula encamisada para o pré-tratamento e agitador magnético. ....          | 14 |
| <b>Figura 4.3:</b> Aparato experimental utilizado na etapa difusiva: 1) Banho de resfriamento; 2) Banho de aquecimento; 3) Célula de extração utilizada na etapa difusiva. ....                      | 15 |
| <b>Figura 4.4:</b> Tubo falcon apresentando separação entre duas fases líquidas após centrifugação. ....   | 16 |
| <b>Figura 4.5:</b> a) Representação da lavagem na etapa de partição; b) Representação da etapa de lavagem após a saponificação. ....   | 18 |
| <b>Figura 5.1:</b> Efeitos da concentração de butanol e intensidade de ultrassom na concentração de carotenoides no extrato. ....  | 22 |

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 3.1:</b> Comprimentos de onda de máxima absorção da luteína para diferentes solventes.....  | 6  |
| <b>Tabela 3.2:</b> Solubilidade de alguns álcoois em água e hexano .....  | 8  |
| <b>Tabela 4.1:</b> Diferentes temperaturas do banho de resfriamento de acordo com a intensidade do ultrassom no pré-tratamento da extração..... | 14 |
| <b>Tabela 4.2:</b> Planejamento experimental .....  | 20 |
| <b>Tabela 5.1:</b> Coeficientes do modelo de regressão polinomial para as variáveis reais da extração .....                                     | 21 |
| <b>Tabela 5.2:</b> Concentração de carotenoides e rendimento da extração para os diferentes pontos experimentais avaliados.....                 | 23 |
| <b>Tabela 5.3:</b> Concentração de carotenoides e rendimento da extração para o novo lote de biomassa.....                                      | 24 |



## 1 Introdução

Microalgas são microrganismos unicelulares e fotossintetizantes, capazes de produzir biomassa, liberando oxigênio, e sintetizar diversos produtos de alto valor agregado, como pigmentos, polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Destaca-se, ainda, o apelo sustentável da produção de compostos por microalgas, uma vez que os cultivos podem ser realizados em regiões áridas e com utilização de água salobra, não competindo por terras aráveis com a produção de alimentos.

Os pigmentos encontrados nas microalgas são divididos em clorofilas, ficobilinas e carotenoides, com importantes funções celulares, como a absorção de luz para fotossíntese, fixação de dióxido de carbono e proteção contra iluminação excessiva. Os carotenoides são compostos de grande interesse industrial, e possuem aplicação como aditivos em alimentos, em medicamentos e também na indústria de cosméticos, com aplicação em cremes de proteção solar. Ainda, há diversos estudos recentes relacionando o consumo de carotenoides com benefícios à saúde humana, principalmente devido à atividade antioxidante desses compostos, que estão relacionados com a prevenção do câncer e de doenças degenerativas.

A extração de carotenoides normalmente é realizada com solventes orgânicos tóxicos, como hexano e metanol. Essas metodologias dificultam a aplicação industrial desses compostos, uma vez que etapas de evaporação do solvente e purificação do composto de interesse devem ser realizadas para aplicação em alimentos ou na indústria farmacêutica, por exemplo. Dessa forma, metodologias alternativas vêm sendo estudadas com o objetivo de minimizar os gastos energéticos e utilizar solventes sustentáveis e menos agressivos.

Nesse contexto, no presente trabalho foi avaliada uma metodologia alternativa de extração de carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis* com a aplicação de um pré-tratamento com ultrassom e usando *n*-butanol como solvente de extração.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o uso de *n*-butanol e a tecnologia de ultrassom na extração de carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis*.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- realizar o pré-tratamento de extração com a utilização do ultrassom, determinando a melhor condição de operação (intensidade do ultrassom);
- determinar a melhor concentração do solvente *n*-butanol para a extração;
- comparar o *n*-butanol como solvente de extração de carotenoides da microalga em questão com o etanol, já utilizado em trabalhos anteriores seguindo a mesma metodologia.

### 3 Revisão Bibliográfica e Fundamentação Teórica

#### 3.1 Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares, em sua maioria eucariontes e que realizam fotossíntese, produzindo biomassa utilizando luz solar, água, dióxido de carbono e alguns nutrientes como fósforo e nitrogênio. O interesse no estudo das microalgas tem aumentado em função do apelo sustentável desses microrganismos: os cultivos de microalgas não competem com a produção agrícola por terras aráveis ou água, podendo ser realizados em terras improdutivas, até mesmo áridas e com utilização de água salgada, necessitando, porém, de boa incidência de luz solar (Borowitzka & Moheimani, 2013; Leu & Boussiba, 2014).

Além disso, é possível a obtenção de diversos produtos de alto valor agregado a partir destes microrganismos, como pigmentos, polissacarídeos, proteínas e lipídeos (Koller, Muhr, & Braunnegg, 2014; Leu & Boussiba, 2014). Dentre esses compostos, os lipídeos têm sido estudados, principalmente, para a produção de biodiesel; as elevadas concentrações de lipídeos encontradas nas células de algumas espécies de microalgas (de 20 a 50 % da massa seca), associadas às elevadas taxas de crescimento, tornam esses microrganismos interessantes para essa finalidade. Outra vantagem na produção de biocombustíveis a partir de microalgas é o fato de que a área de plantio necessária é significativamente inferior quando comparada com outros vegetais para um mesmo rendimento (Brennan & Owende, 2010; Chisti, 2007). Ainda, é importante ressaltar que algumas espécies de microalgas sintetizam ácidos graxos dos tipos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, que possuem aplicação como aditivos na indústria de alimentos, bem como em suplementação alimentar direta (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006).

A respeito dos pigmentos constituintes das microalgas pode-se dizer que estes possuem importantes funções nas células, como a absorção de luz para fotossíntese, fixação de CO<sub>2</sub> e proteção da célula contra iluminação excessiva. Ainda, esses compostos determinam a coloração das espécies e são divididos em três grupos principais: clorofilas (verdes), carotenoides (com cores que variam de tons amarelados a vermelho) e ficobilinas (vermelhas ou azuis). As ficobilinas podem representar até 8 % do peso seco de algumas espécies, enquanto que a quantidade de carotenoides varia entre 0,1 a 0,2 %, podendo o conteúdo de  $\beta$ -caroteno atingir até 14 % em alguns casos. Já para as clorofilas, esse valor fica em torno de 0,5 a 1,0 % (Kim, 2015; Koller et al., 2014). A seguir, são apresentados maiores detalhes sobre os carotenoides, pigmentos estudados no presente trabalho.

#### 3.2 Carotenoides

Os carotenoides pertencem a um grupo de pigmentos orgânicos sintetizados naturalmente por organismos fotossintetizantes, como plantas, algas e alguns fungos e bactérias, sendo responsáveis pelas colorações em tons de amarelo, laranja e vermelho. Também são encontrados em frutas, folhas, verduras e também em animais aquáticos, que se alimentam de plantas que contêm tais pigmentos. Alguns exemplos de alimentos que contêm carotenoides são: milho (luteína), cenoura ( $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno) e tomate (licopeno). No entanto, vegetais de outras colorações também podem apresentar esses compostos. O que ocorre, nesses casos, é que os carotenoides acabam sobrepostos por outros pigmentos, como as clorofilas (Fennema, 2007).

Até o momento, mais de 700 estruturas diferentes de carotenoides foram identificadas, sendo algumas delas exemplificadas na Figura 3.1. Como é possível observar, as estruturas dessas moléculas possuem, em geral, uma cadeia de 40 carbonos, sendo possíveis diferentes conformações, o que ajuda a explicar o grande número de compostos diferentes (Fennema, 2007).

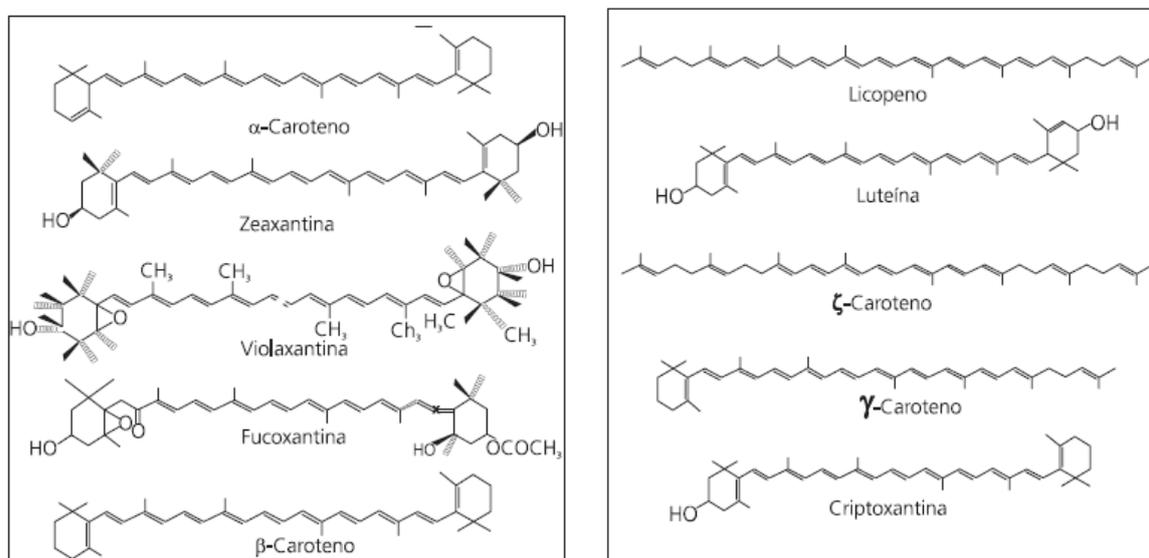


Figura 3.1: Estrutura química de alguns carotenoides. Fonte: Ambrósio, Campos, & De Faro (2006).

Os carotenoides são divididos em dois grupos: os carotenos e as xantofilas. Os primeiros correspondem aos hidrocarbonetos, altamente apolares, como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno. As xantofilas, por sua vez, são formadas através de hidroxilação ou epoxidação dos carotenos, tendo a presença de átomos de oxigênio em suas moléculas e, portanto, apresentam características mais polares do que o grupo anterior. Exemplos de xantofilas são a luteína e a criptoxantina (Ambrósio et al., 2006). Apesar dessa divisão, ambas as classes são consideradas lipofílicas, sendo os compostos solúveis em óleos e solventes orgânicos (Fennema, 2007).

Os comprimentos de onda de absorção dos carotenoides variam entre 350 a 500 nm, o que ocasiona suas respectivas colorações. Nessa faixa, as clorofilas não conseguem absorver energia solar, ao contrário dos carotenoides, que transferem a energia às clorofilas. Assim, os carotenoides são considerados pigmentos auxiliares da fotossíntese nas plantas. Além disso, esses pigmentos também atuam como uma espécie de inibidores da luz solar quando em excesso, protegendo as células através da captura de radicais livres, uma vez que apresentam características antioxidantes (Koller et al., 2014).

Ainda sobre os espectros de absorção dos carotenoides, em geral, cada um apresenta três picos de absorção, que variam de acordo com o solvente utilizado, sendo que quanto maior o número de duplas ligações conjugadas na molécula, maiores são os comprimentos de onda absorvidos pelo carotenoide. O licopeno, por exemplo, é o carotenoide que absorve nos maiores comprimentos de onda por ser o composto mais insaturado e acíclico, com 11 ligações duplas conjugadas. Os picos de absorção do licopeno quando dissolvido

em éter de petróleo são 444, 470 e 502 nm (Rodríguez-Amaya, 2001). A Figura 3.2 faz uma comparação entre os espectros de diferentes carotenoides nesse solvente.

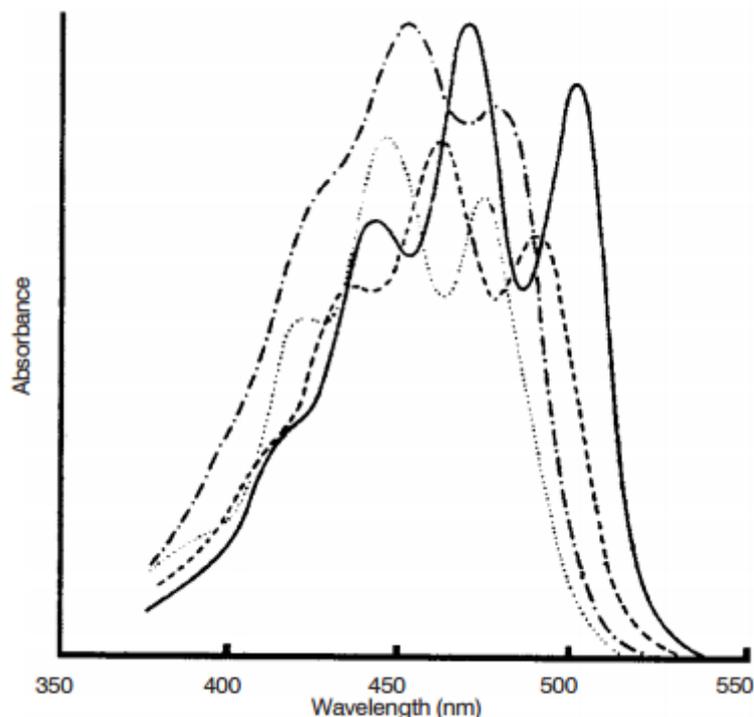


Figura 3.2: Comparação entre os espectros de absorção de diferentes carotenoides, sendo (---) licopeno, (- - -)  $\gamma$ -caroteno, (-.-.-)  $\beta$ -caroteno e (...)  $\alpha$ -caroteno. Fonte: Rodríguez-Amaya (2001).

### 3.2.1 Carotenoides na saúde humana

O potencial antioxidante dos carotenoides é uma das mais importantes características atribuídas a esses compostos. Esta capacidade de serem facilmente oxidados decorre das ligações duplas conjugadas entre carbonos nas moléculas, possibilitando a captura dos oxigênios singletes e radicais livres presentes no meio. A energia dos singletes excitados é absorvida pela cadeia do carotenoide, que fica num estado de triplete, voltando à estabilidade com a liberação do excesso de energia em forma de calor (Sun, Li, Zhou, & Jiang, 2015).

De todos os carotenoides antioxidantes, a astaxantina se destaca, sendo considerada um ótimo antioxidante natural. Além disso, a astaxantina ajuda a proteger a pele da foto-oxidação produzida por raios ultravioleta, sendo utilizada em cremes de proteção solar, e também auxilia na produção de anticorpos, na prevenção do câncer e em terapias contra tumores (Koller et al., 2014).

O  $\beta$ -caroteno também pode ser citado como um importante carotenoide, participando da síntese na retina para geração de rodopsina (proteína essencial para a visão em condições de baixa luminosidade, cuja falta pode causar a cegueira noturna) e sendo um dos precursores da vitamina A, motivo pelo qual é utilizado como suplemento vitamínico. Ainda, devem ser mencionadas a luteína e a zeaxantina, atuantes na prevenção da degeneração macular e da catarata (Koller et al., 2014). A seguir são apresentados mais detalhes sobre a luteína, carotenoide majoritário da microalga estudada no presente trabalho.

### 3.2.2 Luteína

A microalga utilizada no presente estudo (*Heterochlorella luteoviridis*) apresenta a luteína como carotenoide majoritário (68,7 % do conteúdo total de carotenoides) (Jaeschke, Menegol, Rech, Mercali, & Marczak, 2016). Além da luteína, a zeaxantina e o  $\beta$ -caroteno estão presentes em quantidades significativas (19,5 e 14,8 % do total, respectivamente).

Do grupo das xantofilas, com características mais polares, a luteína está presente em diversas frutas, vegetais e flores, tendo como maior fonte comercial a flor de calêndula, que contém de 0,6 a 2,5 % de xantofilas em base seca, das quais cerca de 88 a 92 % são zeaxantina e luteína, sendo esta o carotenoide majoritário (Tsao, Yang, Young, Zhu, & Manolis, 2004). A flor de calêndula, porém, apresenta diversas restrições no que concerne à extração do composto em questão, uma vez que sua produção depende de fatores como estação do ano e área para cultivo. Dessa forma, as microalgas se mostram como uma alternativa importante para as fontes de luteína (Sun et al., 2015).

A luteína, como foi abordado na seção anterior, tem importante função antioxidante para o organismo humano, principalmente em relação à visão, uma vez que é um constituinte da retina. Ainda, estudos mostram inibição pela luteína da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL – low-density lipoprotein), sendo responsável por interromper o avanço de doenças cardiovasculares, além de que uma dieta com ingestão desse carotenoide também tem efeito na prevenção de aterosclerose em estágios iniciais (Sun et al., 2015).

A respeito do espectro de absorção da luteína, a Tabela 3.1 relaciona diferentes solventes com seus picos de absorção para a luteína, sendo o comprimento de onda intermediário o que apresenta absorvância mais elevada. Na seção seguinte será abordada a análise de carotenoides, bem como a escolha do comprimento de onda adequado para tal.

Tabela 3.1: Comprimentos de onda de máxima absorção da luteína para diferentes solventes. Adaptado de Rodriguez-Amaya, (2001).

| Solvente         | Comprimento de onda máximo (nm) |     |     |
|------------------|---------------------------------|-----|-----|
| Clorofórmio      | 435                             | 458 | 485 |
| Etanol           | 422                             | 445 | 474 |
| Éter de Petróleo | 421                             | 445 | 474 |

### 3.3 Extração de carotenoides

Tradicionalmente, a extração de carotenoides tem sido realizada através da utilização de solventes orgânicos, tais como hexano, éter de petróleo e metanol, com elevada toxicidade. Dessa forma, novos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de buscar solventes menos agressivos.

Nos processos de extração, além da escolha de um solvente adequado, com afinidade com o composto a ser extraído, também se faz necessária a seleção de um tempo de extração adequado, para obter rendimentos satisfatórios. Na maioria das vezes, quanto menos agressivo for o solvente, maior deverá ser o tempo de contato. Isso pode ser intencional, de forma a não danificar os componentes de interesse, como ocorreria com a utilização de algum composto mais agressivo (Henriques, Silva, & Rocha, 2007).

Além disso, podem-se utilizar métodos de pré-tratamentos de extração, que se dividem basicamente em dois grupos: mecânicos e não mecânicos. Como exemplos de métodos mecânicos, pode-se citar a aplicação de ultrassom e também técnicas de choque térmico, com congelamento e descongelamento do material, o que pode ser feito de forma lenta ou rápida. Já no caso dos métodos não-mecânicos, a desestabilização da célula ocorre quimicamente, pela interação com o solvente utilizado (Henriques et al., 2007).

No presente estudo, em busca de solventes alternativos e mais sustentáveis do que os orgânicos comumente utilizados, foi escolhido o *n*-butanol, uma vez que este pode ser produzido de forma sustentável por fermentação bacteriana e existem poucos registros na literatura acerca de sua utilização na extração de carotenoides. Dessa forma, o *n*-butanol pode competir com o sintético no mercado químico, além de ser também um melhor biocombustível quando comparado com o bioetanol, por apresentar maior densidade energética e desempenho. Seu custo de produção, porém, ainda é elevado para ter um preço competitivo industrialmente (Green, 2008).

Ainda, segundo Green (2008), o caminho convencional para produção de biobutanol é por via da fermentação ABE, que leva esse nome por gerar, principalmente, acetona, butanol e etanol. Nesse processo, bactérias do gênero *Clostridia* são utilizadas para converter carboidratos (açúcares ou amido) nos solventes em questão. Em seus estudos acerca do biobutanol, Kumar & Gayen (2012) concluíram que uma boa solução para um aumento de produção é a introdução de genes produtores de butanol das bactérias *Clostridia* em organismos bastante tolerantes a esse solvente. Há, também, tentativas de produção aeróbica com organismos geneticamente modificados, como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Apesar de haver pouca informação na literatura acerca da utilização de butanol para extração de carotenoides, o *t*-butanol já foi utilizado por Mulchandani & Kar (2015) na extração de lipídeos de *Chlorella saccharophila* utilizando homogeneização de alta pressão seguida por partição em três fases (TPP, na sigla em inglês). Nesse procedimento, um máximo de  $89,91 \pm 3,69$  % (m/m) de lipídeos pode ser recuperado, sendo que também foram obtidas proteínas como subproduto.

Além disso, Martinson & Plumley (1995) utilizaram *sec*-butanol e *n*-butanol na extração de pigmentos e lipídeos de algumas microalgas e compararam os rendimentos de ambos os solventes através da fluorescência induzida pela clorofila extraída. A diferença entre os dois solventes foi significativa, com o *sec*-butanol extraíndo 98 % e o *n*-butanol apenas 37 % do conteúdo total de clorofila da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Na Tabela 3.2 estão mostradas as solubilidades em água e hexano de alguns álcoois, para fins de comparação entre suas polaridades, e, como esperado, a tendência é que as moléculas apresentem uma característica mais apolar conforme a cadeia carbônica aumenta.

Tabela 3.2: Solubilidade de alguns álcoois em água e hexano. Adaptado de Martins, Araújo, & Bittencourt (2013).

| Substância         | Solubilidade (g/100 g de solvente) |        |
|--------------------|------------------------------------|--------|
|                    | Água*                              | Hexano |
| Metanol            | ∞                                  | 3,8    |
| Etanol             | ∞                                  | ∞      |
| Propanol           | ∞                                  | ∞      |
| <i>n</i> -Butanol  | 7,9                                | ∞      |
| <i>s</i> -Butanol  | 12,5                               | ∞      |
| <i>t</i> -Butanol  | ∞                                  | ∞      |
| <i>n</i> -Pentanol | 2,3                                | ∞      |

\* em g de álcool / 100 g de solvente a 20 °C. O símbolo ∞ significa que a substância é completamente miscível no solvente.

### 3.4 Ultrassom como método de pré-tratamento de extração

O uso de tecnologias como o ultrassom no pré-tratamento de processos de extração tem sido bastante estudado, uma vez que a aplicação dessa tecnologia facilita o contato entre o solvente e o material, através do fenômeno de cavitação (Figura 3.3). Esse fenômeno é caracterizado pela formação de microbolhas devido a zonas de compressão e rarefação, ocasionadas pela passagem de ondas ultrassônicas em meios líquidos. Essas microbolhas podem atingir um tamanho crítico e entrar em colapso de maneira rápida. Com o rompimento das bolhas, são geradas regiões de altas pressões e temperaturas locais, fornecendo energia suficiente ao sistema para danificar a estrutura da matriz utilizada no processo de extração (Ma et al., 2014).

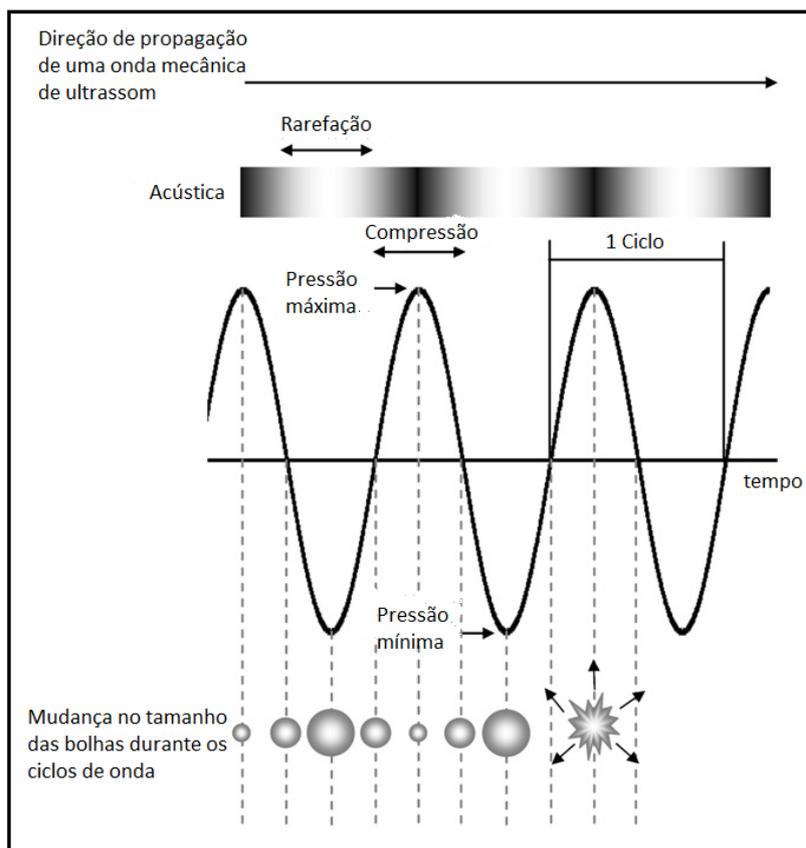


Figura 3.3: Esquemática da cavitação. Adaptado de Soria & Villamiel (2010).

A Figura 3.4 compara uma célula de microalga *Chlorella sp.* antes e após a aplicação de ultrassom em pré-tratamento para extração de lipídeos, com as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. O rompimento da célula pode ser claramente notado, tendo sido esta fragmentada em diversas partes. O estudo de Ma et al. (2014) também mostrou a existência de uma espécie de fase *lag* no efeito do ultrassom, uma vez que não se observou rompimento com pré-tratamento por tempos inferiores a 5 minutos. Além disso, através da mesma técnica de microscopia, observou-se que ainda havia células inalteradas ao final do procedimento, realizado por 10 e 20 minutos, numa frequência de 40 Hz, com uma potência de aproximadamente 200 W (as dimensões da sonda não foram especificadas) e tendo água ultrapura como solvente.

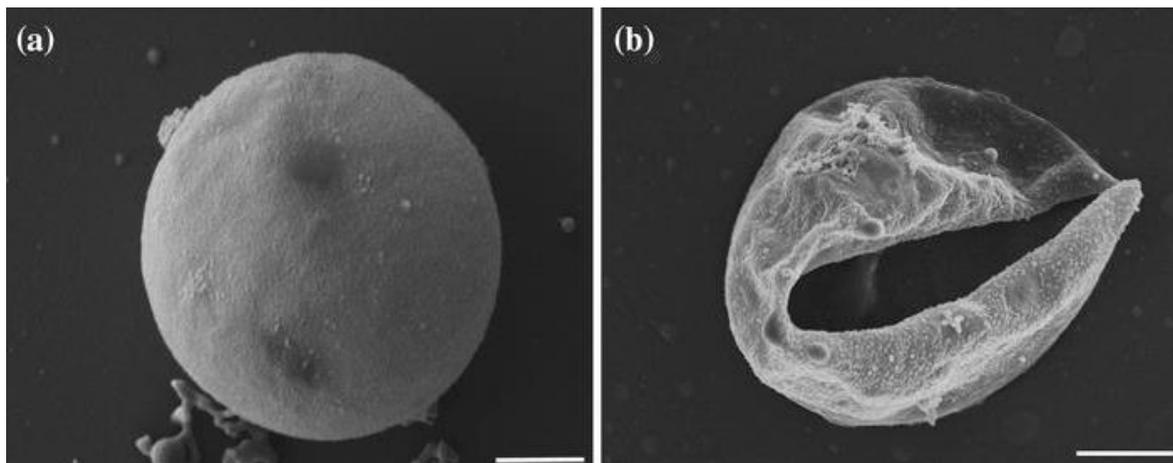


Figura 3.4: Superfícies celulares de microalgas (barra de escala em ambos os casos corresponde a 1  $\mu\text{m}$ ). a) Célula sem pré-tratamento. b) Célula pré-tratada com ultrassom. Adaptado de Ma et al. (2014).

Apesar dos pontos positivos, a escolha dos parâmetros para utilização do ultrassom, como o tempo de aplicação, potência, frequência e temperatura deve ser cuidadosamente estudada, uma vez que a aplicação dessa tecnologia na indústria de alimentos também pode colaborar para a degradação dos compostos afetados. Como mencionado anteriormente, o rompimento das bolhas pela cavitação gera uma região de temperatura e pressão elevadas, os *hot-spots*, que podem chegar a aproximadamente 5000 K e 1000 atm, fornecendo energia suficiente ao meio para acelerar reações de degradação (Pingret & Chemat, 2013).

Alguns dos efeitos negativos mais notáveis da aplicação do ultrassom na indústria alimentícia que podem ser citados são:

- modificação de cor, como no caso do suco de tomate, decorrente da isomerização e consequente perda de pigmentos de carotenoides (Adekunte, Tiwari, Cullen, Scannell, & Donnell, 2010).
- degradação de antioxidantes, como o licopeno em extração assistida por ultrassom (Pingret & Chemat, 2013).
- modificação de sabor, referido como rançoso após o tratamento, e também degradação de gorduras em alimentos ricos em lipídeos, embora não se tenha ainda uma certeza a respeito do mecanismo através do qual essa degradação induzida pela cavitação ocorre (Pingret & Chemat, 2013).

Deenu, Naruenartwongsakul, & Kim (2013) estudaram a extração de luteína da microalga *Chlorella vulgaris* com auxílio de ultrassom e etanol como solvente. No trabalho, três metodologias de extração foram utilizadas: extração com ultrassom e com fase de pré-tratamento enzimático, extração com ultrassom e extração convencional. Os pesquisadores concluíram que a utilização da sonda de ultrassom aumentou o rendimento da extração, bem como reduziu o tempo do procedimento, devido ao rompimento das células ocasionado pelas ondas ultrassônicas. Além disso, a utilização dessa tecnologia não modificou a cor ou estrutura química da luteína, nem reduziu sua atividade antioxidante, sendo recomendada, por fim, a extração com ultrassom sem pré-tratamento enzimático,

pois, embora o rendimento tenha sido maior nesse caso, o custo da operação foi o mais elevado.

Macías-sánchez et al. (2009) estudaram a extração de carotenoides e clorofilas da microalga *Dunaliella salina* com utilização de ultrassom e fluido supercrítico, comparando os resultados. No caso do ultrassom, os solventes utilizados foram *N, N*-dimetilformamida (DMF) e metanol, enquanto que para o outro método o solvente escolhido foi dióxido de carbono. Após a realização dos experimentos, concluiu-se que o melhor rendimento de extração se deu com a aplicação de ultrassom aliada ao solvente DMF, sendo bastante superior ao metanol, cuja utilização forneceu os piores resultados dentre as três alternativas.

Uma vez apresentada a revisão bibliográfica e a fundamentação teórica para o estudo da aplicação de ultrassom com o uso de *n*-butanol para a extração de carotenoides de microalgas, passa-se agora à apresentação dos materiais e métodos empregados na execução do presente trabalho.

## 4 Materiais e Métodos

No presente capítulo será apresentada a metodologia utilizada para a realização dos experimentos de extração de carotenoides assistida por ultrassom da microalga *Heterochlorella luteoviridis*. Também serão apresentados os procedimentos utilizados na análise da concentração desses compostos no extrato, bem como a metodologia empregada para realizar a extração exaustiva. Cabe salientar que todos os pontos do experimento com ultrassom foram realizados em duplicata, com exceção das extrações exaustivas, feitas em triplicata.

Originalmente, seriam testados pontos com intensidade de ultrassom de 100 e 75 %, porém não foi possível um controle eficaz da temperatura do sistema, conforme será explicado posteriormente. Portanto, avaliaram-se concentrações de butanol de 25 a 75 % (v/v) e intensidades do ultrassom de 0 a 50 %. O tempo de duração do pré-tratamento e da etapa difusiva utilizados basearam-se em estudo anterior de Jaeschke, Rech, Marczak, & Mercali (2017), para que a comparação entre os dois trabalhos fosse possível.

A biomassa utilizada foi cultivada anteriormente por pesquisadores do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA). Previamente à realização dos cultivos em fotobiorreatores, as microalgas foram pré-inoculadas em mesa agitadora com aquecimento (*Oxylab*, Brasil) a 28 °C e 19 rpm. Para tanto, 24 mL de um banco de algas foram adicionados a 240 mL de meio de cultivo em erlenmeyers. Durante o período de pré-inoculação, as amostras foram mantidas sob iluminação (64 W) com o auxílio de lâmpadas eletrônicas.

As condições de cultivo foram definidas com base em estudos prévios realizados no laboratório BioEng, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS. O meio de cultivo foi o f/2 (Guillard, 1975) com algumas modificações: a concentração de nitrato de sódio utilizada foi aumentada para 300 mg L<sup>-1</sup> e foram adicionados diariamente os seguintes nutrientes aos biorreatores: 1 mL L<sup>-1</sup> de solução de fosfato (5 g L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) e 1 mL L<sup>-1</sup> de solução de metais traço (9,8 mg L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 22 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 mg L<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 180 mg L<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 6,3 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4,36 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA e 3,15 g L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O). A temperatura utilizada foi de 28 °C e a aeração foi realizada com ar comprimido (1 L min<sup>-1</sup>).

Deve-se mencionar, ainda, que todos os experimentos de extração e análise foram desenvolvidos nas dependências do Laboratório de Tecnologia de Processamento de Alimentos (LATEPA) e na Central Analítica do Departamento de Engenharia Química da UFRGS.

### 4.1 Experimentos de extração utilizando o ultrassom

As etapas da metodologia de extração avaliada no presente trabalho são descritas em maiores detalhes a seguir. A Figura 4.1 mostra um fluxograma simplificado de todo o processo de extração.

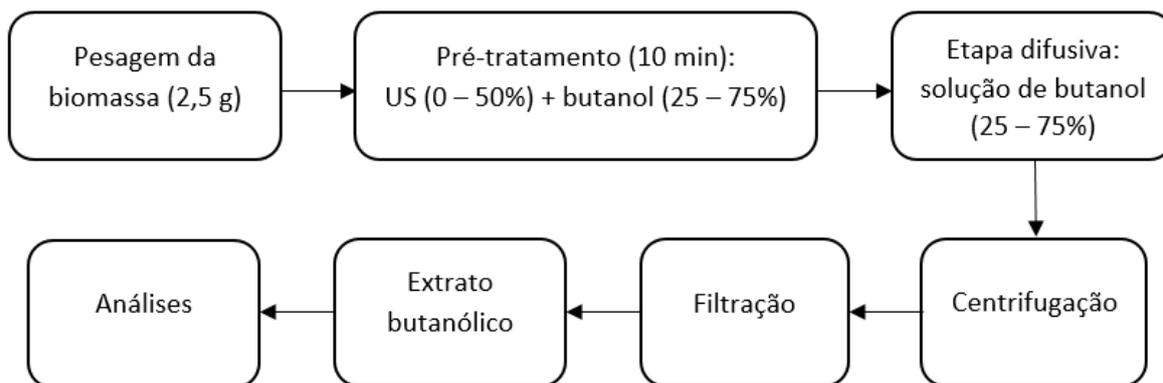


Figura 4.1: Fluxograma do processo de extração.

#### 4.1.1 Preparo da biomassa – pesagem e dissolução

Inicialmente, pesou-se cerca de 2,5 g da microalga liofilizada em balança analítica (*Shimadzu*, Modelo AY 220, Japão), diretamente na célula de extração, anotando-se o valor exato da massa medida.

Na sequência, adicionou-se água à biomassa, num volume correspondente à concentração de butanol para cada ponto experimental, de forma que a soma das quantidades dos fluidos resultasse em um total de 50 mL. A amostra foi, então, posta sob agitação com agitador magnético (*IKA C-MAG*, HS 10, Alemanha), já com todo o aparato experimental montado. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de melhorar dissolução da biomassa em água, antes do contato com o solvente butanol.

#### 4.1.2 Pré-tratamento de extração – aplicação de ultrassom

No presente trabalho, utilizou-se uma sonda de ultrassom (*SONICS*, *Vibra-Cell*, USA, diâmetro da sonda de 1,3 cm, 20 kHz) durante o pré-tratamento de extração por um período de 10 minutos. No aparelho de ultrassom é possível a determinação tanto da intensidade das ondas quanto do tempo de aplicação. Ainda, durante o funcionamento da sonda pode-se monitorar a potência dissipada pelo aparelho, dada em Watts, a qual variou de uma média de cerca de  $9 \text{ W.cm}^{-2}$  na intensidade de 25 % até por volta de  $38 \text{ W.cm}^{-2}$  para 50 %. Durante essa etapa, foi utilizada uma célula encamisada em Pyrex, com volume útil de 100 mL. A Figura 4.2 apresenta o aparato experimental utilizado na etapa de pré-tratamento.

Após cerca de 5 minutos de agitação e posterior adição de butanol ao sistema, iniciou-se o pré-tratamento das amostras. Nessa etapa do procedimento, fez-se necessário o uso do banho frio (*LAUDA*, Alpha RA 12, Alemanha) conectado à célula encamisada. A motivação para tal decorre do grande aquecimento local ocasionado pelo rompimento de bolhas geradas pelas ondas de ultrassom no sistema. A elevação da temperatura dentro da célula torna o meio mais reativo e, por conseguinte, favorece reações de degradação dos carotenoides. Dessa forma, utilizou-se o banho de resfriamento na tentativa de manter a temperatura em  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , o que acabou não sendo possível para o ultrassom nas intensidades correspondentes a 100 % e 75 %, uma vez que a capacidade de retirada de calor do sistema era inferior àquela que a sonda gerava. Além disso, esse controle da temperatura também teve como objetivo evitar um efeito térmico na extração, possibilitando a análise dos efeitos da concentração de butanol e intensidade de ultrassom isoladamente. Nos outros pontos do experimento, porém, o controle foi possível, havendo uma temperatura adequada para sua realização, conforme apresentado na Tabela 4.1.

Assim, previamente à ativação da sonda, colocou-se água de resfriamento para circular pela camisa de troca térmica através das mangueiras que faziam a ligação com o equipamento e, quando o interior da célula atingiu a temperatura desejada (em torno de 12 °C para intensidade de 50 % do ultrassom e 18 °C para 25%), iniciou-se a aplicação das ondas de ultrassom.



Figura 4.2: Aparato experimental utilizado no pré-tratamento: 1) Aparelho de ultrassom; 2) Sonda de ultrassom; 3) Célula encamisada para o pré-tratamento e agitador magnético.

Assim, previamente à ativação da sonda, colocou-se a água de resfriamento para circular pela camisa de troca térmica através das mangueiras que faziam a ligação com o equipamento e, quando o interior da célula atingiu a temperatura desejada (em torno de 12 °C para intensidade de 50 % do ultrassom e 18 °C para 25 %), iniciou-se a aplicação das ondas de ultrassom.

Tabela 4.1: Diferentes temperaturas do banho de resfriamento de acordo com a intensidade do ultrassom no pré-tratamento da extração.

| Intensidade do Ultrassom (%) | Temperatura do banho de resfriamento (°C) |
|------------------------------|---|
| 0                            | 30  |
| 25                           | 16  |
| 50                           | 10  |

No caso dos pontos com intensidade de ultrassom em 0 %, os chamados experimentos controle, todo o aparato foi montado de forma idêntica aos anteriores, no intuito de reduzir fatores capazes de gerar variabilidade entre experimentos. Nesse caso, apenas o

banho quente foi utilizado, com temperatura fixada em 30 °C durante toda a duração. Além disso, outras medidas foram tomadas para dar uniformidade a todos os ensaios, sendo estas a escolha de uma velocidade de agitação padrão e uma posição fixa para a sonda, tanto em relação ao eixo vertical quanto à sua colocação dentro da célula, onde ficou centralizada.

#### 4.1.3 Etapa Difusiva

Após o pré-tratamento, as mangueiras foram desconectadas para que se pudesse verter o conteúdo da primeira da célula de extração utilizada no pré-tratamento para uma segunda, de 300 mL, representada na Figura 4.3, juntamente com o sistema de banhos e mangueiras, e utilizada na etapa subsequente.



Figura 4.3: Aparato experimental utilizado na etapa difusiva: 1) Banho de resfriamento; 2) Banho de aquecimento; 3) Célula de extração utilizada na etapa difusiva.

Na sequência, adicionou-se um total de 190 mL de água e butanol no sistema, em proporção capaz de manter a concentração do solvente nos pontos experimentais em questão. As mangueiras foram, então, conectadas à célula da etapa difusiva; dessa vez, porém, foi utilizado o banho quente (*Polystat*, Cole-Parmer, USA), numa temperatura fixada em 30 °C. A célula também foi tampada, sendo a tampa provida de orifícios, através dos quais foram possíveis leituras da temperatura do sistema com o uso de termômetro.

A etapa difusiva da extração teve duração cronometrada de 50 minutos, cabendo ainda mencionar que a amostra foi mantida sob agitação constante por todo o período.

## 4.2 Análise do teor de carotenoides

O método para análise adotado foi realizado de acordo com o recomendado por Rodriguez-Amaya (2001), com algumas modificações. Além disso, antes do início do

procedimento, foi necessária a centrifugação e filtração dos extratos, como explicado a seguir.

Primeiramente, o conteúdo da célula foi centrifugado (*Sigma*, Z-16KL) por 10 minutos, a 10000 g e à temperatura de 20 °C para que depois o sobrenadante pudesse ser filtrado à vácuo com filtro de 0,45 µm, com o objetivo de eliminar possíveis sólidos capazes de afetar o resultado das análises. Como pode ser visto na Figura 4.4, os tubos falcon ficaram divididos em duas fases líquidas, uma contendo butanol juntamente com os carotenoides dissolvidos e a outra água. Assim sendo, apenas a fase superior foi recolhida para filtração.



Figura 4.4: Tubo falcon apresentando separação entre duas fases líquidas após centrifugação.

Em seguida, três amostras de 5 mL do sobrenadante foram separadas para dar início ao procedimento de análise de carotenoides.

#### 4.2.1 Partição

Esta etapa é necessária para dar maior estabilidade aos compostos extraídos. Dessa forma, a partição foi realizada no mesmo dia da extração, logo após a filtração, e compreende a passagem das amostras para uma fase éter ao invés da permanência em butanol. Para tal, foi utilizado tanto éter de petróleo, com características mais apolares, e éter etílico, mais polar, para que se pudesse solubilizar ao máximo os carotenoides presentes, uma vez que diferentes carotenoides também apresentam diferenças de polaridade.

Para a realização do procedimento, foram utilizados três funis de separação de 250 mL, aos quais se adicionou cerca de 15 mL de água destilada, seguido de 10 mL tanto de éter de petróleo, quanto de éter etílico. Em seguida, os extratos foram adicionados lentamente pelas paredes dos funis através da utilização de pipetas Pasteur de vidro. Após isso, foram realizadas três lavagens em cada um dos funis de separação, de forma a purificar a fase éter, removendo compostos mais polares que eventualmente estivessem presentes no extrato. As lavagens realizaram-se com a adição de água destilada, lentamente e pelas paredes dos recipientes, cuidado necessário para que não ocorresse a formação de emulsões entre as fases, que comprometem as análises e são difíceis de serem quebradas.

Por fim, a fase aquosa foi removida tanto quanto possível sem que os compostos de interesse fossem perdidos, sendo estes coletados em frascos âmbar identificados. Ainda, os funis foram lavados com pequena quantidade de éter etílico, de forma que não houvesse perda de carotenoides em suas paredes. O uso do éter etílico ao invés do éter de petróleo é justificado pois na microalga em estudo, *Heterochlorella luteoviridis*, o carotenoide de maior concentração é a luteína, uma xantofila, de características mais polares, assim como o solvente.

#### 4.2.2 Saponificação

Na etapa da partição todo o extrato é transferido para a fase éter. Os carotenoides, objetos de estudo do presente trabalho, porém, não são os únicos compostos extraídos da microalga em questão. Além destes, podem estar presentes clorofilas e lipídeos nos extratos, que podem interferir nas análises e comprometer os resultados.

Assim sendo, é necessário que se proceda à saponificação, pela reação de esterificação dos lipídeos e hidrólise das clorofilas, permanecendo apenas os carotenoides na fase éter. Para tanto, adicionou-se 20 mL de uma solução de KOH (10 %)-metanol a cada um dos frascos, os quais ficaram armazenados fora do contato direto com a luz por aproximadamente 17 horas, enquanto a reação ocorria, quando se retomou o procedimento de análise.

A importância de se manter as amostras acondicionadas ao abrigo da luz é explicada pelo fato de os carotenoides serem sensíveis à luminosidade, que acelera a degradação desses compostos. Dessa forma, todas as etapas foram realizadas com luminosidade reduzida.

#### 4.2.3 Lavagem das amostras e passagem para balão volumétrico

Passadas as 17 horas da reação de saponificação, adicionou-se novamente cerca de 15 mL de água destilada aos funis de separação e então as amostras foram retornadas a estes, lentamente e pelas paredes dos recipientes, utilizando-se pipetas Pasteur de vidro. A seguir, foram realizadas quatro lavagens sucessivas, com o objetivo de remover a fase alcalina das soluções. O número de lavagens correspondeu ao necessário para que o pH das amostras ficasse neutro.

Na Figura 4.5, a seguir, estão representadas tanto as lavagens da etapa da partição (Figura 4.5a) quanto após a saponificação (Figura 4.5b), notando-se nitidamente, no segundo caso, a remoção das clorofilas na fase inferior, deixando a fase superior com a coloração amarelada correspondente aos carotenoides. Deve-se observar também que a fase inferior deixava de apresentar coloração ao final da última lavagem, o que demonstra a efetiva remoção do conteúdo de interferentes do sistema, como se comprovou posteriormente e será abordado adiante, na próxima seção.

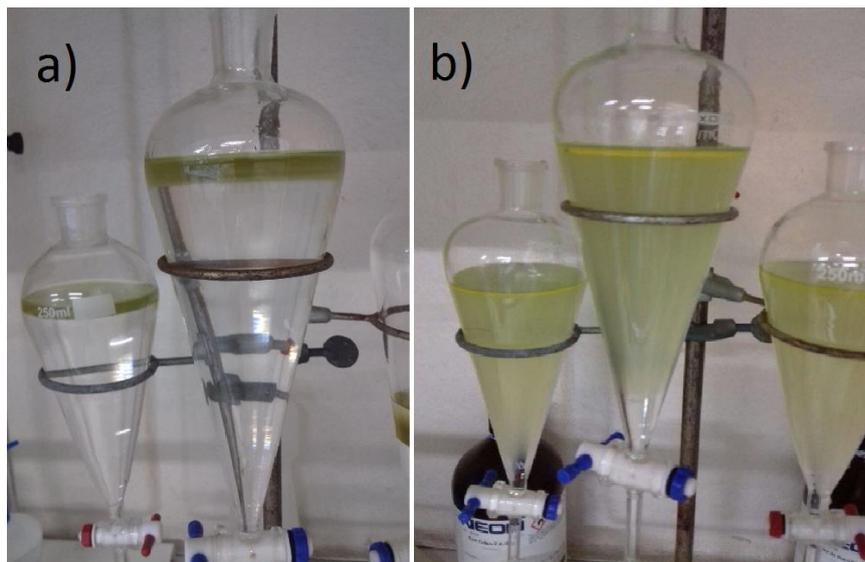


Figura 4.5: a) Representação da lavagem na etapa de partição; b) Representação da etapa de lavagem após a saponificação.

Feitas as lavagens, com a fase aquosa removida tanto quanto possível, foram preparados erlenmeyers contendo duas espátulas de sulfato de potássio (assegurando a remoção completa da fase aquosa das amostras), sendo o conteúdo restante dos funis ali despejados. Após esvaziados, novamente se adicionou uma pequena quantidade de éter etílico para limpeza das paredes dos funis, na tentativa de maximizar a coleta dos carotenoides presentes.

Garantida a ausência de água nas amostras, a fase éter foi pipetada cuidadosamente para dentro de balões volumétricos próprios para uso em rotaevaporador.

#### 4.2.4 Preparação das amostras e leitura em espectrofotômetro de absorção

Estando a fase éter coletada nos balões, procedeu-se à evaporação do solvente em rotaevaporador (*Fisatom*, Modelo 450-5, Brasil), a 30 °C. Após a evaporação do solvente, os carotenoides se encontravam secos e espalhados pelas paredes do balão. Desse modo, para a análise no espectrofotômetro, as amostras tiveram que ser novamente solubilizadas, mas dessa vez com álcool etílico.

Nessa nova etapa, pequenas quantidades do solvente foram adicionadas aos balões, colocados em seguida em um banho de ultrassom por cerca de 30 segundos para facilitar a solubilização, sendo então a solução coletada para completar o volume de balões volumétricos de 2 ou 5 mL, dependendo do ponto experimental em questão. O procedimento é repetido por sucessivas vezes, até que o solvente não apresente mais coloração após o banho de ultrassom, garantindo-se que todos os carotenoides tenham sido dissolvidos. Os balões volumétricos eram agitados, então, para que a solução ficasse homogênea e seus conteúdos transferidos para cubetas a serem utilizadas nas leituras em seguida.

Com as cubetas prontas, foi utilizado um espectrofotômetro de absorção UV-Vis (*PG Instruments Ltd.*, T80 UV-Vis, United Kingdom) para realizar leituras da absorbância das amostras. O comprimento de onda escolhido foi de 445 nm, correspondente ao pico de absorção da luteína, o carotenoide predominante nas amostras, como já mencionado anteriormente, sendo realizadas, então, as três leituras. Além disso, também foram feitas

varreduras no intervalo do espectro entre 750 a 400 nm, com objetivo de verificar se a etapa da saponificação ocorreu satisfatoriamente, não havendo interferência nas leituras por presença de clorofilas, as quais são detectadas através de picos na região por volta de 600 a 700 nm.

De posse dos valores de absorvância no comprimento de onda determinado, foi possível o cálculo da concentração de carotenoides extraídos da microalga através da Equação 3.1, que expressa o resultado em  $\mu\text{g}$  de luteína equivalente/g amostra. Na equação, Abs corresponde ao valor da absorvância medida, V é o volume (mL) de etanol utilizado na diluição, m é a massa de biomassa liofilizada (g), Ac é o coeficiente de absorção da luteína em etanol (2550), Vf é o volume final de solvente utilizado, Cb é a concentração de butanol do ponto experimental e  $V_{\text{extrato}}$  é o volume do extrato utilizado para realização da análise.

$$\text{Concentração de carotenoides} = \frac{\text{Abs} \cdot V \cdot 10000}{\text{Ac} \cdot m} \cdot \frac{V_f \cdot C_b}{V_{\text{extrato}}} \quad (3.1)$$

### 4.3 Extração exaustiva

A extração exaustiva tem como objetivo a quantificação de carotenoides totais presentes na microalga *Heterochlorella luteoviridis*, possibilitando, assim, a avaliação do rendimento das extrações da metodologia avaliada neste trabalho.

A metodologia utilizada foi a proposta por Mandelli, Yamashita, Pereira, & Mercadante (2012), com modificações. Assim, primeiramente procedeu-se à pesagem de 0,2 gramas da biomassa em um cadinho de porcelana, anotando-se a massa exata medida. Na sequência, adicionou-se cerca de 2  $\mu\text{L}$  de água destilada para hidratação das amostras por 15 minutos, quando teve início o processo de maceração.

A maceração foi realizada com utilização de pistilos de porcelana, com sucessivas adições de 2 mL de acetato de etila (foram necessárias sete ou oito, em média, variando entre as amostras) e recolhimento dos extratos até que estes perdessem a cor. Com isso, as próximas adições foram de metanol, sendo necessárias três ou quatro para que os extratos perdessem a cor e a biomassa restante ficasse com coloração acinzentada, indicando o esgotamento dos pigmentos presentes. O restante dos procedimentos para análise foram os mesmos apresentados anteriormente, a partir da etapa da partição.

Como será abordado a seguir, no capítulo de Resultados e Discussão, a concentração de carotenoides na biomassa utilizada para os experimentos do presente trabalho estava abaixo do esperado. Por esse motivo, utilizou-se, também, outro lote de biomassa para realização de experimentos de confirmação da eficácia do método nas condições do ponto de melhor rendimento entre os experimentos anteriores. Também foram realizadas extrações exaustivas dessa nova biomassa, em triplicata.

### 4.4 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos seguindo um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central, totalizando cinco experimentos, realizados em duplicata. Como já foi comentado no início desse capítulo, a intensidade do ultrassom variou de 0 a 50 % e a concentração de butanol de 25 a 75 %. A Tabela 4.2 mostra o planejamento experimental realizado:

Tabela 4.2: Planejamento experimental.

| Ponto experimental | Concentração de butanol (%) | Intensidade do ultrassom (%) |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1                  | 25                          | 0                            |
| 2                  | 75                          | 0                            |
| 3                  | 50                          | 25                           |
| 4                  | 25                          | 50                           |
| 5                  | 75                          | 50                           |

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada com a utilização do *software* Statistica (13.0, Statsoft Inc., Tulsa, USA), através dos testes de Tukey e ANOVA, sendo os dados ajustados ao modelo de regressão polinomial dado pela Equação 3.2:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (3.2)$$

Nessa equação,  $Y$  representa o conteúdo de carotenoides extraídos ( $\mu\text{g/g}$ ) e  $X_1$  e  $X_2$  as variáveis do modelo (intensidade do ultrassom ( $I$ ) e concentração de butanol ( $C_{BuOH}$ ), respectivamente). Já  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_{12}$  são os coeficientes de regressão polinomial do modelo, que serão apresentados no capítulo posterior.

## 5 Resultados e discussão

O presente capítulo apresenta os resultados da extração de carotenoides da metodologia estudada nesse trabalho, comparando com os resultados da extração exaustiva. Além disso, é realizada, ainda, uma comparação entre a utilização do butanol e do etanol como solventes, tendo por base os resultados obtidos por Jaeschke, Rech, Marczak, & Mercali (2017), estudo realizado similarmente aos experimentos do presente trabalho, usando o ultrassom como método de pré-tratamento.

### 5.1 Teor de carotenoides no extrato e rendimento da extração

A Tabela 5.1 apresenta os coeficientes das variáveis reais do modelo linear obtidos para os dados experimentais. O modelo obtido se mostrou adequado para representação dos dados experimentais (coeficiente de determinação de 0,988). Os resultados mostraram que as variáveis concentração de butanol e intensidade do ultrassom foram significativas ( $p < 0,05$ ) e a interação entre as duas variáveis não apresentou efeito significativo, sendo, portanto, excluída do modelo.

Tabela 5.1: Coeficientes do modelo de regressão polinomial para as variáveis reais da extração.

| Coeficientes da regressão        | Carotenoides |            |
|----------------------------------|--------------|------------|
|                                  | Coeficiente  | Valor de p |
| $\beta_0$                        | 35,54        | <0,001     |
| $\beta_1 (I)$                    | 0,81         | <0,001     |
| $\beta_2 (C_{BuOH})$             | -0,28        | <0,001     |
| $\beta_{12} (I \times C_{BuOH})$ | -            | -          |
| $R^2$                            | 0,988        |            |

Os efeitos da concentração de butanol e da intensidade do ultrassom podem ser visualizados na Figura 5.1. Observa-se que quanto maior a intensidade do ultrassom, maior a concentração de carotenoides nos extratos. Ainda, quanto maior a concentração de butanol, menor a concentração de carotenoides. Esse efeito do butanol na extração não era esperado, uma vez que, nos processos de extração, normalmente quanto maior a concentração do solvente, maior o rendimento de extração. Contudo, acredita-se que os resultados obtidos estão relacionados com a baixa polaridade do meio de extração quando concentrações mais altas de butanol foram utilizadas; para desestruturar a membrana celular das microalgas e possibilitar a difusão dos compostos para o meio de extração é necessário que o solvente tenha propriedades mais polares.

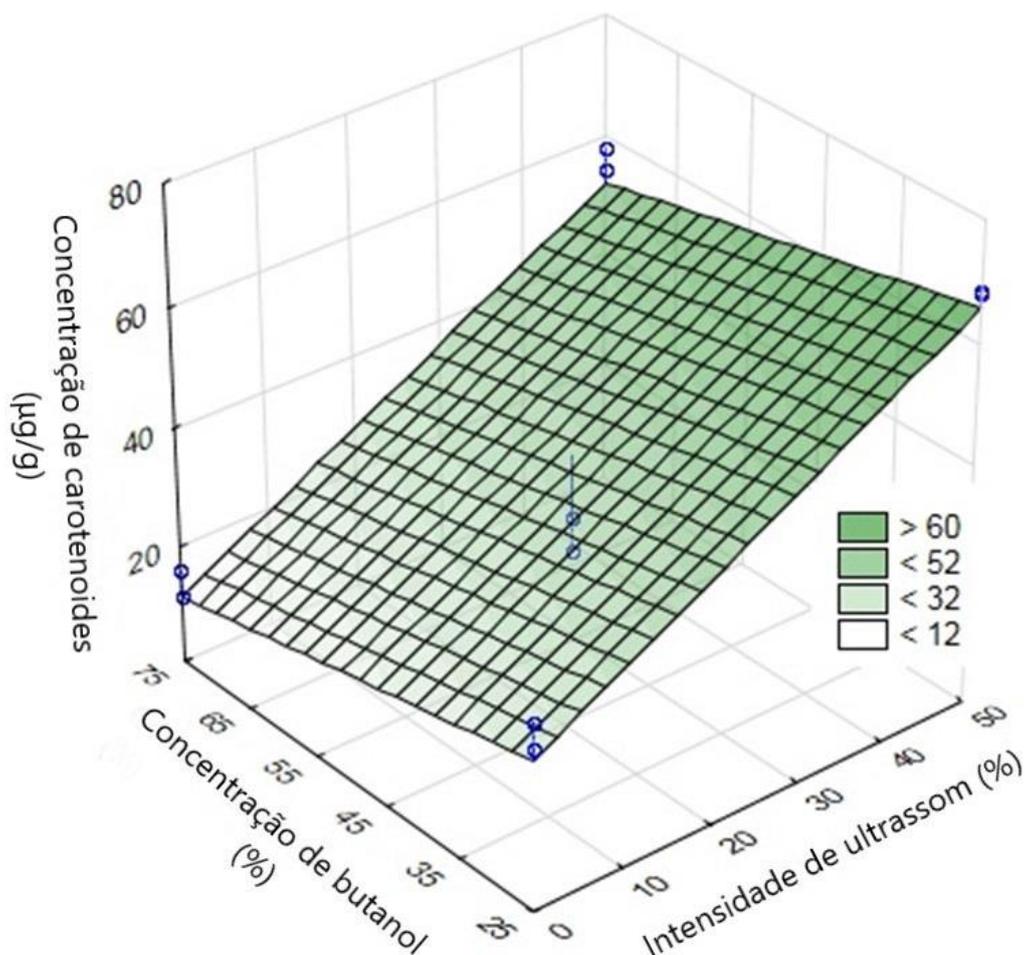


Figura 5.1: Efeitos da concentração de butanol e intensidade de ultrassom na concentração de carotenoides no extrato.

A Tabela 5.2 apresenta a concentração de carotenoides nos extratos e o rendimento das extrações. Os melhores rendimentos de extração (32,5 e 41,1 %) foram obtidos utilizando 50 % da intensidade do ultrassom e concentração de butanol de 75 e 25 %, respectivamente. Nesse caso, a concentração de butanol não influenciou significativamente a extração, uma vez que os pontos 4 e 5 (50 % de intensidade do ultrassom e 25 e 75 % de butanol, respectivamente) não apresentaram diferença significativa. Contudo, se analisarmos os pontos 1 e 2 (experimentos controle, com 25 e 75 % de butanol, respectivamente), podemos observar que quando uma concentração mais elevada de butanol foi utilizada, o rendimento de extração foi inferior. É provável que quando o ultrassom foi utilizado, mesmo em concentrações menores de água, houve o rompimento das células pelos efeitos de cavitação já discutidos. Nos experimentos controle, por outro lado, não houve afinidade química do solvente com a membrana celular de maneira que esta fosse desestabilizada.

É importante ressaltar que os efeitos negativos da concentração de butanol puderam ser, também, percebidos visualmente durante a realização dos experimentos: no ponto 1 (25 % de butanol), a dissolução da biomassa foi superior aos pontos 2 e 3 (75 e 50 % de butanol), devido à maior quantidade de água utilizada. Essa dissolução da biomassa proporcionou maior homogeneidade e maior interação das células com o meio de extração.

Ainda, o ponto 3 (25 % de intensidade do ultrassom e 50 % de butanol), mesmo com aplicação de ultrassom e maior quantidade de água, não apresentou diferença significativa se comparado com os pontos 1 e 2 (controles com 25 e 75 % de butanol). Uma possível explicação para esse resultado é que a intensidade das ondas ultrassônicas pode não ter sido suficiente para facilitar a penetração do solvente numa fração significativa da matriz utilizada. Resultado similar foi apresentado por Ma et al. (2014), já mencionado anteriormente. Esses autores avaliaram o ultrassom como pré-tratamento (200 W, 40 kHz) para a extração de lipídeos usando água como solvente. Os autores realizaram análises de microscopia eletrônica de varredura e verificaram que, após a aplicação de ultrassom, ainda havia células da microalga *Chlorella sp.* inalteradas.

Tabela 5.2: Concentração de carotenoides e rendimento da extração para os diferentes pontos experimentais avaliados. \*

| Ponto experimental | Intensidade do ultrassom (%) | Concentração de butanol (%) | Carotenoides                |                   |
|--------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|
|                    |                              |                             | Concentração (µg/g)         | Rendimento ** (%) |
| 1                  | 0                            | 25                          | 29,38 ± 2,16 <sup>c</sup>   | 17,7              |
| 2                  | 0                            | 75                          | 13,78 ± 2,27 <sup>d</sup>   | 8,3               |
| 3                  | 25                           | 50                          | 25,14 ± 2,85 <sup>cd</sup>  | 15,1              |
| 4                  | 50                           | 25                          | 68,36 ± 0,11 <sup>b</sup>   | 41,1              |
| 5                  | 50                           | 75                          | 56,04 ± 1,92 <sup>b</sup>   | 32,5              |
| Extração exaustiva |                              |                             | 166,38 ± 15,61 <sup>a</sup> | -                 |

\* A concentração de carotenoides é apresentada no seguinte formato: média ± desvio padrão. Resultados com a mesma letra não apresentam diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ).

\*\* O rendimento foi calculado em comparação com o teor médio de carotenoides obtido na extração exaustiva.

Conforme discutido, uma metodologia de extração similar à avaliada no presente trabalho foi estudada em um trabalho anterior utilizando etanol como solvente de extração (Jaeschke et al., 2017). Em ambos os estudos, o pré-tratamento com o ultrassom apresentou efeitos positivos com relação à extração de carotenoides. No estudo com etanol, os melhores rendimentos foram obtidos utilizando intensidades do ultrassom variando entre 40 e 80 %, enquanto que, no presente trabalho, intensidades de 50 % proporcionaram os melhores resultados. Contudo, usando etanol como solvente (75 %, v/v) obtiveram-se rendimentos superiores (80 %), enquanto que com o butanol (25 %, v/v), o rendimento máximo foi de 41,1 %.

Essa diferença pode ser explicada pela polaridade dos dois compostos, uma vez que o etanol é muito mais polar do que o *n*-butanol, sendo completamente miscível em água, enquanto o segundo tem uma miscibilidade de apenas 7,9 g / 100 g de água a 20 °C, como foi mostrado na Tabela 3.2, no capítulo de Revisão Bibliográfica. Dessa forma, sendo a luteína o carotenoide majoritário da microalga *Heterochlorella luteoviridis* e possuindo características mais polares, é evidente que sua afinidade com o etanol é superior.

Pode-se apontar como melhor condição de extração o ponto experimental 4 (50 % de intensidade de ultrassom e 25 % de concentração de butanol), que apresentou rendimento de extração de 41,1 %. A escolha desse ponto se justifica pelo fato de utilizar menor quantidade de solvente para um rendimento semelhante à condição com ultrassom a 50 % e 75 % de butanol, uma vez que a análise estatística, com 95 % de confiança, indica não haver diferença significativa entre esses dois pontos.

É importante ressaltar que, apesar de o butanol ter apresentado rendimentos menores, é possível usar baixas concentrações desse solvente para a extração. Os melhores rendimentos de extração usando etanol foram obtidos usando 75 % de concentração desse solvente. Portanto, essa foi considerada a principal vantagem da metodologia avaliada no presente trabalho: é possível extrair quantidades consideráveis de carotenoides usando a tecnologia de ultrassom como pré-tratamento e quantidades reduzidas de solvente (25 %).

## 5.2 Aplicação da metodologia experimental em amostras mais concentradas

Conforme comentado anteriormente, a biomassa utilizada no presente trabalho apresentou concentrações de carotenoides abaixo do esperado. Essas concentrações mais baixas, possivelmente, são resultado de reações de degradação durante o armazenamento das amostras. Dessa forma, um experimento de extração usando a melhor condição experimental (50 % de intensidade de ultrassom e 25 % de butanol) foi realizado com um lote de biomassa proveniente de um novo cultivo. Esse procedimento foi realizado para confirmar a eficácia da metodologia frente a amostras mais concentradas, uma vez que esta poderia não ser efetiva para tal.

A Tabela 5.3 apresenta as médias e desvios padrão da concentração de carotenoides do novo lote de biomassa, bem como o rendimento do processo de extração, em comparação com a extração exaustiva. Comparando os resultados com os obtidos no primeiro lote, pode-se concluir que os resultados foram similares, uma vez que os rendimentos máximos do primeiro lote variaram de 32,5 a 41,1%. Essas pequenas variações são esperadas, uma vez que os diferentes lotes de microalga avaliados foram obtidos em diferentes cultivos, podendo ocorrer variações nas células.

Tabela 5.3: Concentração de carotenoides e rendimento da extração para o novo lote de biomassa. \*

|  | Extração exaustiva | Extração no ponto ótimo | Rendimento (%) |
|--|--------------------|-------------------------|----------------|
| Concentração de carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ ) | $587,58 \pm 48,91$ | $168,84 \pm 16,59$      | 28,7           |

\* O rendimento foi calculado em comparação com o teor médio de carotenoides obtido na extração exaustiva.

## 6 Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que a concentração de butanol e a utilização da sonda de ultrassom tiveram efeitos significativos na extração de carotenoides.

A influência do ultrassom pode ser claramente percebida na comparação entre os experimentos controle e os pontos com intensidade de 50 %, que apresentaram resultados muito superiores em relação aos primeiros, sendo 41,1 e 17,7 % os melhores rendimentos para as condições com ultrassom a 50 % e sem o uso dessa tecnologia (experimentos controle), respectivamente. Já no caso de intensidade do ultrassom de 25 %, acredita-se que o baixo rendimento obtido se deve a intensidade do ultrassom não ser suficientemente grande para alterar a estrutura de uma fração significativa das células, não propiciando um contato efetivo entre o solvente e o material intracelular.

A respeito da concentração de butanol, esta apresentou uma influência negativa na concentração de carotenoides no extrato, de forma que uma maior quantidade de solvente reduziu o rendimento da extração. Isso pode ser explicado pela baixa polaridade do solvente utilizado, o que reduziu a dissolução das amostras nas concentrações mais altas.

Portanto, a metodologia avaliada no presente trabalho pode ser utilizada como uma metodologia alternativa para a extração de carotenoides, com a vantagem de utilizar quantidades baixas de solvente (25 %).

Para dar continuidade ao trabalho aqui apresentado, algumas sugestões podem ser elencadas para trabalhos futuros:

- avaliar os pontos axiais do planejamento experimental para verificar efeitos quadráticos das variáveis;
- avaliar diferentes temperaturas e estudar a cinética da extração dos carotenoides;
- estudar a extração de lipídeos utilizando a mesma metodologia e solvente;
- realizar análises do perfil de carotenoides nos extratos;
- realizar estudos de microscopia eletrônica de transmitância para avaliar o efeito do ultrassom nas células da microalga.

## 7 Referências

- Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., & Donnell, C. P. O. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, *122*(3), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.026>
- Ambrósio, C. L. B., Campos, F. D. A. C. E. S., & De Faro, Z. P. (2006). Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição*, *19*(2), 233–243. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000200010>
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). Sustainable biofuels from algae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, *18*, 13–25. <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9271-9>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Deenu, A., Naruenartwongsakul, S., & Kim, S. M. (2013). Optimization and Economic Evaluation of Ultrasound Extraction of Lutein from *Chlorella vulgaris*, *1162*, 1151–1162. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0213-8>
- Fennema, O. R. (2007). *Fennema's Food Chemistry* (4th ed.).
- Green, E. M. (2008). Fermentative production of butanol — the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.004>
- Guillard, R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 29–60). Springer, US.
- Henriques, M.; Silva, A.; Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: A simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.: A. Mendez-Vilas Ed. 2007*, (July 2014).
- Jaeschke, D. P., Menegol, T., Rech, R., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2016). Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. *Process Biochemistry*, *51*(10), 1636–1643. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.016>
- Jaeschke, D. P., Rech, R., Marczak, L. D. F., & Mercali, G. D. (2017). Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresource Technology*, *224*, 753–757. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.107>
- Kim, S.-K. (2015). *Handbook of Marine Microalgae*.

- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6(PA), 52–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Kumar, M., & Gayen, K. (2012). Developments in biobutanol production : New insights. *Applied Energy*, 88(6), 1999–2012. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.055>
- Leu, S., & Boussiba, S. (2014). Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae. *Industrial Biotechnology*, 10(3), 169–183.  
<https://doi.org/10.1089/ind.2013.0039>
- Ma, Y.-A., Cheng, Y.-M., Huang, J.-W., Jen, J.-F., Huang, Y.-S., & Yu, C.-C. (2014). Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 1543–1549.  
<https://doi.org/10.1007/s00449-014-1126-4>
- Macías-sánchez, M. D., Mantell, C., Rodríguez, M., De, E. M., Lubián, L. M., & Montero, O. (2009). Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, 77, 948–952.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.032>
- 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(1), 126–134. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100014>
- Martins, C. R., Araújo, W., & Bittencourt, J. (2013). Solubilidade das Substâncias Orgânicas. *Química Nova*, 36(8), 1248–1255.
- Martinson, T. A., & Plumley, F. G. (1995). One-Step Extraction and Concentration of Pigments and Acyl Lipids by sec-Butanol from in Vitro and in Vivo Samples. *Analytical Biochemistry*, 228, 123–130.
- Mulchandani, K., Kar, J. R., & Singhal, R. S. (2015). Extraction of Lipids from *Chlorella saccharophila* Using High-Pressure Homogenization Followed by Three Phase Partitioning. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 176, 1613–1626.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1665-4>
- Pingret, D., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing : A review. *Food Control*, 31(2), 593–606.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. (I. Press, Ed.). Washington DC.
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food : a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.  
<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>

Sun, Z., Li, T., Zhou, Z., & Jiang, Y. (2015). Microalgae as a Source of Lutein : Chemistry , Biosynthesis , and Carotenogenesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/10>

Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., Zhu, H., & Manolis, T. (2004). Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1045*(1), 65–70.