

BRUNO BEZERRA VIEIRA

**INDICADORES DE ROMPIMENTO MECÂNICO DE CÉLULAS VISANDO A  
EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DE *Scenedesmus obliquus***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

V658i  
2019

Vieira, Bruno Bezerra, 1990-  
Indicadores de rompimento mecânico de células visando a  
extração de biocompostos de *Scenedesmus obliquus* / Bruno  
Bezerra Vieira. – Viçosa, MG, 2019.  
xii, 169 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcio Aredes Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Microalgas. 2. Células - Mecanismos de controle.
  3. Indicadores biológicos. 4. Extração (Química).
- I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia  
Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
II. Título.

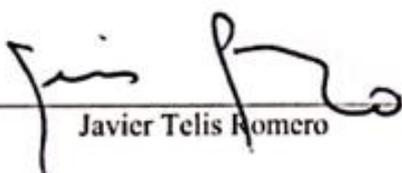
CDD 22. ed. 579.833

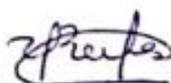
BRUNO BEZERRA VIEIRA

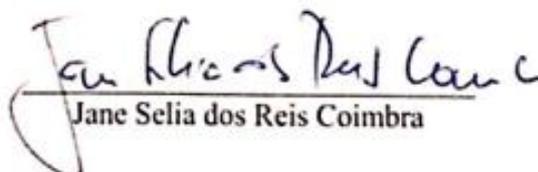
**INDICADORES DE ROMPIMENTO MECÂNICO DE CÉLULAS VISANDO A  
EXTRAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DE *Scenedesmus obliquus***

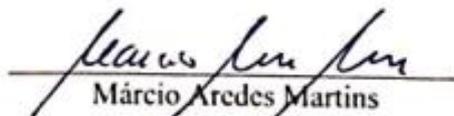
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Javier Telis Romero

  
\_\_\_\_\_  
Yordanka Reyes Cruz

  
\_\_\_\_\_  
Jane Selia dos Reis Coimbra

  
\_\_\_\_\_  
Márcio Aredes Martins  
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais e avós por serem sempre a força motriz e a luz que guiam meus caminhos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em todas as formas de cada crença, por ser motivação, guia e consolo nos momentos difíceis.

À minha mãe Geralda e ao meu pai Lacir pela incessante dedicação à minha vida, por serem a razão de tudo. A vocês todo amor e gratidão.

Às minhas irmãs Layane, Sarah e Tamara pelo companheirismo de vida e incentivo de sempre.

À minha avó Maria Aparecida por ser meu exemplo de luta e perseverança.

Ao meu avô Adão pela referência de felicidade, criatividade e resiliência.

Ao Professor Márcio Aredes por estes 6 anos de oportunidades e orientação. Gratidão por toda confiança e aprendizado.

Ao meu coorientador Professor Eduardo Basílio pelo apoio durante a execução do trabalho. Em especial à Professora Rita Superbi, minha coorientadora e amiga pessoal.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Biocombustíveis por estes anos de ajuda mútua, em especial à Paula, amiga fiel da vida e desta jornada de mestrado.

Aos meus amigos de vida que sempre me acolhem e tornam toda a caminhada mais leve. Que possamos sempre viver um grande ENCONTRO. Em especial ao Leonardo pelo companheirismo e incentivo em todos os momentos.

À UFV e a todos os programas sociais do governo por ter permitido que eu convivesse com uma grande diversidade de pessoas que trouxeram a mim grandes ensinamentos.

A todas as pessoas que lutam todos os dias por uma sociedade mais justa, mais inclusiva, livre de preconceitos e pela educação como causa de vida. A vocês toda minha admiração.

À PETROBRÁS e à CAPES, por todo aporte financeiro e de concessão de bolsa para a realização da minha pesquisa.

## RESUMO

VIEIRA, Bruno Bezerra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Indicadores de rompimento mecânico de células visando a extração de biocompostos de *Scenedesmus obliquus***. Orientador: Marcio Aredes Martins. Coorientadores: Rita de Cássia Superbi de Sousa e Eduardo Basílio de Oliveira.

Estima-se que o planeta será habitado por 11,2 bilhões de pessoas até 2100, e espera-se que aumentem em 28% e 43% para energia e alimentos, respectivamente. As microalgas são um grupo diverso de microrganismos que apresentam alto potencial para atender a demanda global por alimentos e energia. As cepas de microalgas melhoradas acumulam altos níveis de lipídios, proteínas e carboidratos que podem ser usados para a produção de biodiesel, alimentos e bioetanol, respectivamente. No entanto, é necessário interromper as células microalgas para extrair os metabólitos bioquímicos mencionados acima, e o desafio atual nas culturas de microalgas é a avaliação em tempo real do grau de ruptura celular durante o processamento a jusante. Portanto, a presente dissertação descreve a avaliação de potenciais indicadores de ruptura celular de microalgas que permitem a avaliação em tempo real e a otimização de sistemas de ruptura celular e a otimização dos processos de extração de compostos bioquímicos presentes na biomassa úmida. Por essa razão, a promissora microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 foi cultivada sob condições fotoautotróficas para produção de biomassa e melhoramento dos processos de extração de compostos bioquímicos. A extração de carboidratos foi otimizada utilizando diferentes concentrações de ácido, temperaturas e tempos de retenção. A extração dos lipídeos foi ajustada usando diferentes sistemas de agitação, concentrações de biomassa e tempos de retenção. A extração dos pigmentos fotossintéticos foi avaliada usando diferentes concentrações de etanol. A biomassa de *S. obliquus* BR003 foi moída e misturada com biomassa não moída para produzir amostras com diferentes proporções de células rompidas. Essas amostras foram formuladas para conter 0, 25, 50, 75 ou 100% de células rompidas, resultando em 5 níveis de ruptura, e usadas para avaliar os indicadores potenciais de rompimento de microalgas. Os indicadores avaliados foram carboidratos neutros, lipídios totais, carotenóides totais, clorofila a, clorofila b, clorofilas totais, proteínas hidrossolúveis totais, aminoácidos totais, compostos nitrogenados, peso seco e reologia. Os seguintes indicadores mostraram uma forte correlação com o grau de disrupção celular: lipídios totais, carotenóides, clorofila a, clorofila b, clorofilas totais, proteínas hidrossolúveis totais, compostos nitrogenados e parâmetros reológicos. Por outro lado, carboidratos neutros, aminoácidos totais, perda de massa apresentaram baixa correlação com o grau de ruptura celular e, portanto, não são indicados para avaliação em tempo real da ruptura de células em equipamentos industriais.

## ABSTRACT

VIEIRA, Bruno Bezerra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Indicators of mechanical rupture of cells aiming the extraction of biocomposites of *Scenedesmus obliquus***. Adviser: Marcio Aredes Martins. Co-advisers: Rita de Cássia Superbi de Sousa and Eduardo Basílio de Oliveira.

It is estimated that the planet will be inhabited by 11.2 billion people until 2100, and it has been expected an increasing demand of 28% and 43% for energy and food, respectively. Microalgae are a diverse group of microorganisms which show a high potential to fulfill the global demand for food and energy. Improved microalgae strains accumulate high levels of lipids, proteins, and carbohydrates that can be used for production for production of biodiesel, food and bioethanol, respectively. However, it is necessary to disrupt the microalgae cells to extract the biochemical metabolites mentioned above, and a current challenge in microalgae crops is the real-time evaluation of the degree of cell disruption during the downstream processing. Therefore, this present dissertation describes the evaluation of potential indicators of microalgae cell disruption that allow the real-time evaluation and optimization of cell rupture systems, and the optimization of extraction processes of biochemical compounds present in wet biomass. For that reason, the promising microalgae *Scenedesmus obliquus* BR003 was cultivated under photoautotrophic conditions for biomass production and improvement of the extraction processes of biochemical compounds. The extraction of carbohydrates was optimized using different concentrations of acid, temperatures and retention times. Extraction of lipids was adjusted using different agitation systems, biomass concentrations and retention times. Extraction of photosynthetic pigments was evaluated using different concentrations of ethanol. Biomass of *S. obliquus* BR003 was ball milled and blended with non-milled biomass to produce samples with different proportions of disrupted cells. These samples were formulated to contain 0, 25, 50, 75 or 100% of disrupted cells, resulting in 5 levels of rupture, and used to evaluate the potential indicators of microalgae cell disruption. Indicators evaluated were neutral carbohydrates, total lipids, total carotenoids, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophylls, total hydrosoluble proteins, total amino acids, nitrogen compounds, dry weight, and rheology. The following indicators showed a strong correlation with the degree of cell disruption: total lipids, carotenoids, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophylls, total hydrosoluble proteins, nitrogen compounds, and rheological parameters. On the other hand, neutral carbohydrates, total amino acids and mass loss showed a poor correlation with the degree of cell disruption, and therefore, they are not indicated for real-time evaluation of cell rupture in industrial equipment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cultivo e processamento da biomassa da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003. ....	11
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática dos experimentos realizados. ....	12
<b>Figura 3.</b> Sistema de agitação por tamboramento. ....	21
<b>Figura 4.</b> Mesa de agitação orbital para extração de lipídeos. ....	22
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da composição da biomassa. ....	32
<b>Figura 6.</b> Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a hidrólise do amido. ....	37
<b>Figura 7.</b> Identidade do modelo: análise de regressão entre a absorvância medida e a predita (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste. ....	37
<b>Figura 8.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise do amido no tempo de 120 minutos, com absorvância em função da temperatura (°C) e concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol L <sup>-1</sup> ). ....	39
<b>Figura 9.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) da hidrólise do amido na concentração de 4,0 mol L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , com absorvância em função do tempo (min) e da temperatura (°C). ....	39
<b>Figura 10.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise do amido na temperatura 80°C, com absorvância em função do tempo (min) e concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol L <sup>-1</sup> ). ....	40
<b>Figura 11.</b> Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a hidrólise da biomassa. ....	41
<b>Figura 12.</b> Identidade do modelo: análise de regressão entre a absorvância medida e a predita (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste. ....	42
<b>Figura 13.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise da biomassa na concentração de 4,0 mol L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , com absorvância em função do tempo (min) e da temperatura (°C). ....	43
<b>Figura 14.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise da biomassa no tempo de 120 minutos, com absorvância em função da temperatura (°C) e concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol L <sup>-1</sup> ). ....	44
<b>Figura 15.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise da biomassa na temperatura 80°C, com absorvância em função do tempo (min) e concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mol L <sup>-1</sup> ). ....	44
<b>Figura 16.</b> Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de tamboramento. ....	47
<b>Figura 17.</b> Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos. ....	47
<b>Figura 18.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) da extração de lipídeos no sistema de tamboramento em função do tempo (min) e concentração de biomassa (% m/m). ....	49
<b>Figura 19.</b> Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de mesa agitadora. ....	50
<b>Figura 20.</b> Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos. ....	51
<b>Figura 21.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da extração de lipídeos no sistema de mesa de agitação orbital em função do tempo (min) e concentração de biomassa (% m/m). ....	52
<b>Figura 22.</b> Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de vórtex. ....	53

<b>Figura 23.</b> Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos. ....	53
<b>Figura 24.</b> Espectro de absorção do extrato de pigmentos em solução alcoólica 50 % etanol. ....	55
<b>Figura 25.</b> Espectro de absorção do extrato de pigmentos em solução alcoólica 90 % etanol. ....	56
<b>Figura 26.</b> Variação dos teores de carotenóides extraídos em função da fração em volume de etanol.	56
<b>Figura 27.</b> Variação dos teores de clorofila a extraídos em função da fração em volume de etanol. ..	57
<b>Figura 28.</b> Variação dos teores de clorofila b extraídos em função da fração em volume de etanol. ..	57
<b>Figura 29.</b> Variação dos teores de clorofila total extraídos em função da fração em volume de etanol. .....	58
<b>Figura 30.</b> Dispersão dos dados de concentração de proteínas em função do nível de rompimento. .	60
<b>Figura 31.</b> Dispersão dos dados de concentração de carboidratos em função do nível de rompimento. .....	62
<b>Figura 32.</b> Dispersão dos dados do teor de lipídeos em função do nível de rompimento.....	64
<b>Figura 33.</b> Dispersão dos dados do teor de carotenóides em função do nível de rompimento. ....	65
<b>Figura 34.</b> Dispersão dos dados do teor de clorofila a em função do nível de rompimento. ....	66
<b>Figura 35.</b> Dispersão dos dados do teor de clorofila b em função do nível de rompimento. ....	66
<b>Figura 36.</b> Dispersão dos dados do teor de clorofila total em função do nível de rompimento. ....	67
<b>Figura 37.</b> Espectros de absorção na região do ultravioleta do extrato sobrenadante de suspensões de microalgas rompidas e concentração de tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH=6,8).....	68
<b>Figura 38.</b> Dispersão dos dados de absorbância dos compostos nitrogenados em função do nível de rompimento. ....	69
<b>Figura 39.</b> Dispersão dos dados de teor de perda de massa em função do nível de rompimento. ....	71
<b>Figura 40.</b> Reograma de dados médios com representação das 3 rampas analisadas, subida 1 (●), descida 1 (■) e subida 2 (○) da biomassa de microalgas sem rompimento.....	72
<b>Figura 41.</b> Reograma de dados médios das suspensões de microalgas sem rompimento, subida 2, com representação do intervalo de confiança a 95% para cada ponto experimental. ....	73
<b>Figura 42.</b> Reograma de dados médios das suspensões de microalgas sem rompimento, subida 2, com representação da viscosidade aparente em função da taxa de deformação. ....	73
<b>Figura 43.</b> Ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo Newtoniano.....	74
<b>Figura 44.</b> Ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Bingham.....	75
<b>Figura 45.</b> Ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Ostwald de Waele. ....	75
<b>Figura 46.</b> Ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Herschel-Bulkley. ....	76

<b>Figura 47.</b> Reograma de dados médios com representação das 3 rampas analisadas, subida 1 (●), descida 1 (■) e subida 2 (○) da biomassa de microalgas rompidas.....	77
<b>Figura 48.</b> Reograma de dados médios das suspensões de microalgas rompidas, subida 2, com representação do intervalo de confiança a 95% para cada ponto experimental. ....	78
<b>Figura 49.</b> Reograma de dados médios das suspensões de microalgas rompidas, subida 2, com representação da viscosidade aparente em função da taxa de deformação. ....	78
<b>Figura 50.</b> Regressão linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas rompidas, modelo Newtoniano.....	79
<b>Figura 51.</b> Regressão linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas rompidas, modelo de Bingham. ....	80
<b>Figura 52.</b> Regressão não-linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas rompidas, modelo de Ostwald de Waele. ....	80
<b>Figura 53.</b> Regressão não-linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas rompidas, modelo de Herschel-Bulkley.....	81
<b>Figura 54.</b> Análise de identidade dos modelos reológicos das microalgas sem rompimento (eixo x) e microalgas rompidas (eixo y), modelo Ostwald-de-Waele. ....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Meio de cultura L4-m.....	10
<b>Tabela 2.</b> Variáveis e níveis da otimização da hidrólise .....	20
<b>Tabela 3.</b> Matriz de contraste dos coeficientes do DCCR a 3 variáveis.....	20
<b>Tabela 4.</b> Variáveis e níveis da otimização da extração nos sistemas de tamboramento e mesa de agitação orbital.....	23
<b>Tabela 5.</b> Variáveis e níveis da otimização da extração no sistema de agitação do tipo vórtex.....	23
<b>Tabela 6.</b> Matriz de contraste dos coeficientes do DCCR a 2 variáveis para os sistemas de mesa de agitação orbital e tamboramento .....	23
<b>Tabela 7.</b> Matriz de contraste dos coeficientes do DCCR a 2 variáveis para extração no sistema de agitação do tipo vórtex .....	24
<b>Tabela 8.</b> Otimização da extração de pigmentos fotossintéticos de biomassa úmida .....	25
<b>Tabela 9.</b> Potenciais indicadores de rompimento celular .....	26
<b>Tabela 10.</b> Biomassas secas com níveis distintos de rompimento .....	26
<b>Tabela 11.</b> Teores de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas da biomassa peneirada e sem lavagem .....	33
<b>Tabela 12.</b> Teor de insolúveis dos fertilizantes .....	34
<b>Tabela 13.</b> Teor de lipídeos da linhagem <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 e comparação com valores reportados da literatura.....	34
<b>Tabela 14.</b> DCCR a 3 variáveis para hidrólise do amido .....	36
<b>Tabela 15.</b> Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo .....	38
<b>Tabela 16.</b> Coeficientes do modelo do teor de carboidratos em função da temperatura (T), concentração do ácido (C) e tempo (t) .....	38
<b>Tabela 17.</b> DCCR a 3 variáveis para hidrólise da biomassa.....	41
<b>Tabela 18.</b> Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo .....	42
<b>Tabela 19.</b> Coeficientes do modelo do teor de carboidratos em função da temperatura (T), concentração do ácido (C) e tempo (t) .....	43
<b>Tabela 20.</b> Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de tamboramento .....	46
<b>Tabela 21.</b> Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo .....	48
<b>Tabela 22.</b> Coeficientes do modelo do teor de lipídeos em função da concentração de biomassa (C) e tempo (t) para o sistema de agitação por tamboramento.....	48
<b>Tabela 23.</b> Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de mesa de agitação orbital .....	49
<b>Tabela 24.</b> Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo .....	51

<b>Tabela 25.</b> Coeficientes do modelo do teor de lipídeos em função da concentração de biomassa (C) e tempo (t) para o sistema de mesa de agitação orbital.....	51
<b>Tabela 26.</b> Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de vórtex.....	52
<b>Tabela 27.</b> Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo .....	54
<b>Tabela 28.</b> Teor, em mg g <sup>-1</sup> , de pigmentos fotossintéticos a partir de soluções alcoólicas em diferentes frações .....	55
<b>Tabela 29.</b> Análise da regressão do teor de pigmentos em função da fração de etanol.....	59
<b>Tabela 30.</b> Absorbância, concentração e teor do extrato de proteínas solúveis a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.....	60
<b>Tabela 31.</b> Análise das regressões lineares da curva padrão de BSA e do teor de proteínas em função do nível de rompimento.....	61
<b>Tabela 32.</b> Coeficientes da regressão linear da curva padrão de glicose.....	62
<b>Tabela 33.</b> Absorbância, concentração e teor do extrato de carboidratos solúveis a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.....	62
<b>Tabela 34.</b> Teor de lipídeos a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular .....	63
<b>Tabela 35.</b> Análise da regressão linear do teor de lipídeos em função do nível de rompimento .....	64
<b>Tabela 36.</b> Concentração de pigmentos fotossintéticos a partir da biomassa em distintos níveis de rompimento celular .....	65
<b>Tabela 37.</b> Análise da regressão linear da validação dos teores de pigmentos como indicadores de rompimento celular .....	67
<b>Tabela 38.</b> Absorbância no 260 nm em diferentes solventes níveis de rompimento celular.....	69
<b>Tabela 39.</b> Absorbâncias dos compostos nitrogenados solúveis a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.....	69
<b>Tabela 40.</b> Coeficientes da regressão linear da absorbância em 260 nm em função do nível de rompimento .....	70
<b>Tabela 41.</b> Teores de perda de massa de biomassas com distintos níveis de rompimento.....	70
<b>Tabela 42.</b> Análise de regressão dos modelos reológicos .....	74
<b>Tabela 43.</b> Análise de regressão dos modelos reológicos .....	79
<b>Tabela 44.</b> Modelos reológicos para biomassas sem rompimento e rompidas.....	81

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
3.1. Microalgas .....	4
3.2. Rompimento celular .....	4
3.3 Indicadores de rompimento celular.....	8
4. METODOLOGIA .....	10
4.1. O cultivo da biomassa.....	10
4.2. O processamento da biomassa .....	13
4.3. Análise de composição centesimal .....	14
4.3.1. Teor de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas.....	14
4.3.2. Teor de proteínas .....	15
4.3.3. Teor de carboidratos .....	16
4.3.4. Teor de lipídeos .....	17
4.3.5. Teor de pigmentos .....	18
4.4. Otimização da extração de compostos intracelulares de biomassa úmida.....	19
4.4.1. Carboidratos .....	19
4.4.2. Lipídeos .....	21
4.4.3. Pigmentos .....	24
4.5. Validação de indicadores de rompimento celular.....	25
4.5.1. Preparação das biomassas secas com 5 níveis de rompimento .....	26
4.5.2. Preparação das biomassas úmidas com 5 níveis de rompimento .....	27
4.5.3. Análise dos teores de biocompostos e propriedades físicas .....	27
4.5.3.1. Teor de proteínas solúveis.....	28
4.5.3.2. Teor de carboidratos solúveis.....	28
4.5.3.3. Teor de compostos nitrogenados.....	28
4.5.3.4. Teor de lipídeos .....	29
4.5.3.5. Teor de pigmentos .....	29
4.5.3.6. Teor de perda de massa .....	30
4.5.3.7. Propriedades reológicas.....	30
4.5.4. Avaliação dos indicadores de rompimento celular.....	31
5. RESULTADOS .....	32

5.1.	Análise de composição centesimal .....	32
5.1.1.	Teor de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas .....	32
5.1.2.	Teor de lipídeos .....	34
5.1.3.	Teor de proteínas .....	35
5.1.4.	Teor de carboidratos .....	35
5.2.	Otimização de extração de biocompostos de biomassa úmida .....	35
5.2.1.	Carboidratos .....	35
5.2.1.1.	Hidrólise do amido .....	35
5.2.1.2.	Hidrólise da biomassa .....	40
5.2.2.	Lipídeos .....	46
5.2.2.1.	Sistema de agitação por tamboramento .....	46
5.2.2.2.	Sistema de mesa de agitação orbital .....	49
5.2.2.3.	Sistema de agitação por vórtex .....	52
5.2.3.	Pigmentos .....	54
5.3.	Validação como indicador de rompimento celular .....	59
5.3.1.	Teor de proteínas solúveis .....	59
5.3.2.	Teor de carboidratos solúveis .....	61
5.3.3.	Teor de lipídeos .....	63
5.3.4.	Teor de pigmentos .....	65
5.3.5.	Teor de compostos nitrogenados .....	68
5.3.6.	Teor de perda de massa .....	70
5.3.7.	Propriedades reológicas .....	71
6.	CONCLUSÃO .....	84
7.	REFERÊNCIAS .....	85
8.	APÊNDICE .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

Projeções da (ORGANIZATION, 2017) estimam que o planeta será habitado por 9,8 bilhões de pessoas em 2050 e por 11,2 bilhões em 2100. Este aumento populacional, juntamente com os avanços tecnológicos fazem com que a produção de alimentos necessite aumentar, no mínimo 43% (LANZ; DIETZ; SWANSON, 2018) e a de energia em 28% (SAITO et al., 2018) para que a demanda global futura seja suprida. Neste cenário, a produção de microalgas pode contribuir substancialmente para o atendimento destas necessidades globais.

As microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes que crescem em ambientes aquáticos, capazes de acumular lipídeos, proteínas e polissacarídeos (DAO et al., 2018). O teor de cada um destes metabólitos varia de acordo com a espécie da microalga (SHUBA; KIFLE, 2018). No contexto de biorrefinaria, os lipídios acumulados como reserva de energia podem ser extraídos, refinados e convertidos a biodiesel (FARIED et al., 2017); os carboidratos podem ser fermentados e convertidos a álcoois (RIZZA et al., 2017); e as proteínas e os pigmentos podem ser utilizados como alimento (SMETANA et al., 2017). Além da alta em biomassa, as microalgas apresentam elevada capacidade de assimilação de carbono da atmosfera, contribuindo significativamente com o meio ambiente na mitigação de emissões de carbono (RASLAVIČIUS; STRIŪGAS; FELNERIS, 2018).

O processo de produção industrial de compostos a partir de microalgas é formado pelas etapas de cultivo da biomassa, rompimento celular, extração dos compostos de interesse, refino e purificação. O cultivo desses microorganismos é realizado em tanques abertos (*raceways*) ou em fotobiorreatores fechados (TAN et al., 2017). Os métodos de rompimento celular podem ser químicos, como o rompimento por ácidos fortes, enzimáticos (WANG et al., 2016); ou mecânicos, como a homogeneização industrial, moagem e utilização de ultrassom (LEE et al., 2017). O processo de extração é realizado por ação de solventes e geralmente é conduzido em sistemas de mistura e posterior separação de fases (VENKATA SUBHASH et al., 2017).

Os métodos mecânicos de rompimento celular, de maneira geral, preservam mais a estrutura dos compostos de interesse (POSTMA et al., 2017), uma vez que minimizam as reações paralelas com os compostos químicos que são adicionados ao sistema, quando ocorre um rompimento por agentes químicos. Dentre as operações unitárias para o rompimento mecânico, a moagem em moinho de bolas é caracterizada por colisões físicas de esferas de metal com as células das microalgas causando a sua desintegração. É uma operação unitária considerada de alta eficiência de rompimento, capaz de processar grande volume de biomassa

por batelada, facilidade na separação gravitacional da biomassa rompida. A principal desvantagem é o alto consumo de energia em larga escala (PHONG, 2018).

O custo da produção de combustíveis, alimentos e outras moléculas a partir de biomassa de microalgas, na maioria das vezes não é competitivo com os custos de produção de produtos similares originados de outras fontes de matéria prima (GUPTA; SHASTRI; BHARTIYA, 2016). A etapa de rompimento das células de microalgas compõe importante parcela do custo de processamento da biomassa, pois requer uso intensivo de energia. No entanto, essa etapa é imprescindível para a liberação dos compostos intracelulares (YAP et al., 2015).

Para a otimização dos processos de rompimento celular é necessário o estabelecimento de indicadores de rompimento celular. SPiden et al. (2013) estudaram indicadores quantitativos de rompimento de células de *Saccharomyces cerevisiae*, relacionando contagem de células intactas, análises espectrofotométricas, análise da perda de massa das células com o nível de rompimento celular em um sistema de homogeneização industrial. Ansari et al. (2018) investigaram o efeito de algumas técnicas de rompimento nos teores de lipídeos, carboidratos e proteínas. Rivera et al. (2018) estudaram o efeito de dois tipos de rompimento celular no teor total e nas diferentes frações de lipídeos, sendo elas os lipídeos neutros, os lipídeos polares, os ácidos graxos e os triacilgliceróis. Todos os compostos ou propriedades físicas da biomassa que variam os seus teores em função do nível de rompimento celular possui potencial de serem utilizados como indicador quantitativo de fragmentação.

Com o exposto, essa dissertação teve por objetivo estabelecer indicadores de rompimento celular mecânico, determinados a partir da biomassa úmida de concentração aproximada 10% (m/m). Os indicadores selecionados foram compostos celulares ou propriedades físicas que estivessem relacionadas com o nível de rompimento celular. Ainda foram estabelecidas variáveis de processo otimizadas para a extração de carboidratos, lipídeos e pigmentos a partir da biomassa úmida. A determinação dos indicadores de rompimento celular é fundamental para a melhoria da eficiência e o acompanhamento de processos em tempo real. A otimização da extração dos compostos por via úmida elimina a etapa prévia de secagem da biomassa, operação unitária esta que é de alto custo em biorefinarias de microalgas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar indicadores quantitativos de rompimento de células de *Scenedesmus obliquus* BR003 por processos mecânico, objetivando a extração de compostos celulares em biorefinaria.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Realizar a caracterização físico-química da biomassa por meio da determinação de umidade e teores de massa seca, cinzas, massa seca livre de cinzas, proteínas, carboidratos e lipídeos totais;
- Otimizar a extração de carboidratos, lipídeos e pigmentos a partir de suspensões aquosas da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003;
- Avaliar o potencial de utilização de teores de conteúdos celulares como indicadores do nível de rompimento celular;
- Avaliar o potencial de utilização de propriedades físicas da biomassa como indicadores do nível de rompimento celular.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1. Microalgas**

Milhares de espécies de microalgas foram identificadas e estudadas. Algumas algas possuem características que as tornam promissoras como fonte de matéria prima para a produção de biocombustíveis (biodiesel, bietanol e biometano) e outros produtos gerados a partir da biomassa. É desejável que a microalga possua alta taxa de crescimento, possua resistência às variações das condições de cultivo, possua alto teor do metabólito desejado, colheita facilitada e características fisiológicas que facilitem a extração dos compostos, como baixa rigidez da parede celular (SCHÜLER et al., 2017).

#### **3.2. Rompimento celular**

O rompimento celular de microalgas é fundamental para o acesso de solventes aos metabólitos de interesse como carboidratos, lipídeos e proteínas. Lee et al. (2017) discutem sobre a importância da etapa de rompimento celular no processo de extração de compostos intracelulares de interesse.

Alguns processos de rompimento celular são descritos na literatura, sendo divididos em processos físicos e químicos. Os processos físicos incluem a utilização de ultrassom (LECINA et al., 2017), moagem (MONTALESCOT et al., 2015), homogeneização de alta pressão (XIE et al., 2016), micro-ondas (CHENG et al., 2013), cavitação hidrodinâmica (LEE; HAN, 2015), explosão a vapor (POHNDORF et al., 2016; LORENTE et al., 2017) e campo elétrico pulsado (PARNIAKOV et al., 2015). Os processos de moagem e homogeneização são também denominados métodos mecânicos de rompimento, por usarem primariamente a força como elemento de ruptura. Dentre os processos de rompimento químico podemos citar a utilização de ácidos (WANG et al., 2016a), líquidos iônicos (SHANKAR et al., 2017) e de enzimas (SIERRA; DIXON; WILKEN, 2017).

A necessidade de rompimento celular para uma extração efetiva de metabólitos é discutida por Yap et al. (2015). Estes autores realizaram um trabalho no qual avaliaram o desempenho de extração de lipídeos a partir de biomassas com níveis de pressão diferentes e, por consequência, rompimento celular distinto. O sistema de rompimento utilizado foi a homogeneização de alta pressão, sendo que a extensão da ruptura foi medida por contagem de células intactas. A recuperação de lipídeos aumentou de 5 para 70 % dos lipídeos totais quando a porcentagens de células rompidas subiu de 0 para 80 %.

Lee; Lewis; Ashman (2013) utilizaram a técnica de microscopia de força atômica (MFA) para determinar a força e a energia necessárias para o rompimento de uma única célula de *Tetraselmis suecica*. De acordo com o trabalho, uma energia específica igual a 673 J/kg de biomassa seca é necessária para que o rompimento celular ocorra para a espécie em estudo. Este dado evidencia a baixa eficiência energética dos métodos de rompimento existentes. De acordo com os mesmos autores, a técnica que possui menor consumo específico de energia é a cavitação hidrodinâmica, que demanda 5 vezes mais energia que a necessária para o rompimento das células.

Dos processos de rompimento químico, a utilização de ácidos fortes é um tratamento que se destaca dos demais por apresentar alta eficiência de liberação de metabólitos celulares como carboidratos e lipídeos (DONG et al., 2016). Os líquidos iônicos, são tóxicos em sua maioria, comprometendo a sustentabilidade do processo (QURAIISHI et al., 2017). As enzimas ainda possuem alto custo e necessitam de maior controle de processo. Além da vantagem da alta eficiência de rompimento, o tratamento ácido ainda pode ser realizado com ácidos orgânicos (WANG et al., 2016b) que possuem maior biodegradabilidade em relação aos ácidos inorgânicos que apresentam alta toxicidade acarretando diversos problemas ambientais.

Wang et al. (2016b) estudaram a utilização de ácido fórmico como alternativa ao uso de ácido clorídrico no processo de rompimento químico. A cepa de microalga utilizada para o estudo foi *Chlorella protothecoides*. A microalga foi tratada com o ácido clorídrico na razão em massa de 1,5:1 de ácido:biomassa seca, com o ácido fórmico na razão de 6,4:1 de ácido:biomassa seca, além da combinação dos dois ácidos. Todos os tratamentos foram submetidos ao aquecimento a 100°C por 30 min e resposta obtida foi o teor total de lipídeos, além da identificação dos mesmos por cromatografia gasosa. O estudo concluiu que, para a biomassa seca, os teores de lipídeos obtidos pelo rompimento com ácido clorídrico, fórmico e a mistura não possuem diferença significativa e foram de  $47,2 \pm 2,6$ ,  $46,7 \pm 0,8$  e  $45,6 \pm 0,8$ , respectivamente. Os autores ainda concluíram que somente o ácido fórmico não é capaz de romper as células de microalgas em suspensão aquosa, porém quando este é combinado com pequenas quantidades de ácido clorídrico esta mistura é capaz de romper as células na mesma proporção que o ácido clorídrico puro.

Dong et al. (2016) utilizaram a metodologia de superfície de resposta (MSR) para investigar o efeito da temperatura, na faixa de 120 a 170°C, e da concentração de ácido sulfúrico entre 0 e 4% (v/v) na resposta de liberação de lipídeos e carboidratos. As cepas de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus* e *Nannochloropsis granulata* foram investigadas. Para todas as

cepas e condições utilizadas a combinação da maior concentração de ácido e da maior temperatura aumentaram a resposta de liberação de lipídeos. Analisou-se os efeitos separadamente e concluiu-se que o aumento da concentração do ácido impacta mais o rompimento do que o aumento da temperatura. O maior rendimento de extração foi de 87 % dos lipídeos totais para a cepa de *Nannochloropsis granulata*.

Rizza et al. (2017) estudaram a hidrólise ácida de uma cepa de *Desmodemus sp.* com o objetivo de maximizar a extração de açúcares para a produção de bioetanol. Verificou-se que a condição operacional ótima foi a utilização da biomassa de concentração de 10% em peso seco, 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v / v) e 120 ° C durante 30 min. Nesta condição houve liberação de até 95% do teor total de açúcares.

Dos processos de rompimento mecânico, a homogeneização a alta pressão tem se mostrado promissora quanto à eficiência do rompimento celular, apesar de ainda consumir grandes quantidades de energia, como apontado no trabalho de Spiden et al. (2013). Neste sentido, a compreensão do mecanismo de rompimento celular nos homogeneizadores é fundamental para o estabelecimento de um processo viável de rompimento celular microalgal.

A homogeneização industrial é uma operação unitária que consiste do escoamento a alta pressão de uma suspensão sobre uma seção anular cilíndrica e estreita presente numa válvula do homogeneizador. Este escoamento produz tensões de cisalhamento nas partículas presentes na suspensão, sendo capaz de fracioná-las em partículas menores e mais homogêneas, como ocorre com os glóbulos de gordura na homogeneização de leite Gul et al. (2017). Para fins de rompimento celular, o homogeneizador é usado para produzir tensões de cisalhamento em células de microrganismos (microalgas, por exemplo) com o objetivo de romper a estrutura da parede celular e obter compostos intracelulares de interesse (ANGLES et al., 2017).

Yap et al. (2015) avaliaram o rompimento celular de *Nannochloropsis sp.* Foi investigada a eficiência de ruptura das células em suspensões de concentrações de sólidos iguais a 0,25 %, 2,5 % e 25 % (m/m) numa única passagem através do homogeneizador, com variação de pressão de 30 a 150 MPa. Um estudo prévio dos mesmos autores mostrou que a concentração de sólidos influenciou de forma significativa a operação do homogeneizador e não sobre o rompimento, sendo este exclusivamente dependente da pressão de operação. Concentrações de até 30 % m/m de lipídeos foram encontradas pelos autores.

Angles et al. (2017) estudaram o rompimento celular por homogeneização a alta pressão e as mudanças fisiológicas de cepas *Nannochloropsis sp.* submetidas ao crescimento com e sem restrição de nitrogênio. As suspensões da microalga foram homogeneizadas a

pressões que variaram de 100 até 270 MPa. Para ambas as condições de cultivo, a taxa de rompimento aumentou com o nível de pressão. Porém, para as microalgas que cresceram sem restrição de nitrogênio a taxa de ruptura variou entre 20 e 58%, enquanto que em condições de restrição de nitrogênio, as taxas de ruptura foram menores, entre 11 e 48% para os mesmos tratamentos de pressão. Os autores concluíram que houve uma modificação na robustez da parede celular da microalga o que impactou diretamente o rompimento e o consumo de energia do processo.

O moinho de bolas é um equipamento geralmente utilizado para a redução da granulometria de diversos materiais. Consiste de um cilindro contendo uma ou mais esferas metálicas. O movimento deste cilindro provoca atrito entre as esferas e as paredes e cisalhamento no material de interesse. A operação unitária de moagem consiste da utilização desse cisalhamento no material para o rompimento da parede celular das microalgas.

Montalescot et al., (2015) estudaram a ruptura de duas linhagens de microalgas em moinho de bolas. Os autores usaram a contagem de células intactas e o teor de proteínas liberadas no meio para inferir a extensão do rompimento celular. Foi estudada a cinética de rompimento celular e o modelo para a mesma foi gerado. A totalidade das células das duas cepas foram rompidas em condições de alta pressão no moinho de bolas igual a 250 (Mpa).

Postma et al., (2015) realizaram uma otimização do rompimento da microalga *Chlorella vulgaris*, tendo como variáveis de estudo a concentração de biomassa dentro do moinho e a velocidade do agitador. A resposta utilizada na otimização foi o rendimento de proteínas solúveis, consumo de energia e tempo de processo. A desintegração das células atingiu 99% num tempo de processo igual a 500 segundos, concentração da biomassa de 85 g L<sup>-1</sup> e velocidade de agitador igual a 9 m s<sup>-1</sup>. Porém, a partir de 250 segundos já foi possível observar 95% de rompimento celular.

Günerken et al. (2017) utilizaram a citometria de fluxo para monitorar o rompimento celular de duas culturas de *Chlorella* sp.. O rompimento também foi avaliado por contagem direta de células para a validação da citometria, que se mostra uma técnica mais rápida e precisa. Após 50 minutos de moagem foi possível observar a redução da contagem de células de 100 para 1 e 4% para as duas cepas analisadas, considerando a contagem manual. Os dados da citometria de fluxo seguiram a mesma tendência de redução temporal das células quando comparada à contagem manual.

Postma et al. (2017) avaliaram o efeito do tamanho de partículas na desintegração, liberação de compostos solúveis no meio aquoso e o consumo de energia no rompimento de 3

cepas de microalgas em moinho de bolas. Os autores relataram a liberação de mais de 99% da proteína total das células em 400 segundos, atestando alto índice de rompimento celular. Já a liberação de carboidratos foi mais lenta e até o final do experimento realizado (1000 segundos) não foi possível observar um patamar estabilizado bem definido.

Zinkoné et al., (2018) em seus estudos com rompimento celular de *Chlorella sorokiniana* objetivaram estabelecer a relação entre as variáveis de processo da moagem em moinho de bolas com a cinética de rompimento e com a pureza de alguns metabólitos intracelulares liberados para o meio extracelular. Em todas as condições avaliadas o rompimento mínimo encontrado foi de 90% das células.

### **3.3 Indicadores de rompimento celular**

Pode-se definir indicadores de rompimento celular como aqueles compostos celulares ou propriedades físicas que possuem seus valores alterados proporcionalmente com níveis crescentes de rompimento. A identificação de indicadores é fundamental para a otimização dos sistemas de ruptura das células e extração de metabólitos de interesse comercial.

Spiden et al. (2013) compararam diversos indicadores quantitativos de rompimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a ruptura em homogeneizador de alta pressão. Dentre os potenciais indicadores, foram estudados a contagem de células íntegras, liberação de proteínas, turbidez e absorção no ultra violeta, distribuição de tamanho de partícula, análise de perda de massa, e variações na viscosidade. A pressão de homogeneização dos experimentos variou de 100 a 1500 bar. Todos os indicadores possuíram relação direta com o nível de rompimento. Modelos do tipo exponencial foram ajustados aos dados de cada indicador, exceto a distribuição do tamanho de partículas.

Ansari et al. (2018) estudaram o rendimento de extração de lipídeos, carboidratos e proteínas em função de diferentes técnicas de secagem e rompimento celular. As técnicas de rompimento utilizadas foram micro-ondas, autoclave, ultrassom e rompimento osmótico. Todos os metabólitos possuíram rendimentos de extração mais altos, quando se comparou às biomassas sem tratamento e rompida, o que evidencia a utilização dos mesmos como indicadores de rompimento celular.

Phong et al. (2018) analisaram o efeito de diferentes tratamentos de rompimento na liberação de proteínas das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris*. Os tratamentos foram o ultrassom e a hidrólise alcalina, sendo eles avaliados de forma separada e combinada. Foram também utilizados distintos solventes para a extração, sendo eles, água,

etanol e isopropanol. O processo de ultrassom de alta potência aumentou de duas a três vezes o teor de extrato de proteínas em relação ao tratamento controle para os três solventes analisados. O efeito do tratamento alcalino também foi de aumentar a extração de proteínas, exceto para o caso onde foi usado propanol como solvente. Quando comparado ao tratamento de ultrassom, o alcalino se mostrou mais eficiente. Isto se deve ao fato do álcali forte utilizado (KOH) possuir maior especificidade e reagir diretamente com a parede celular e também ao fato de que as proteínas de microalgas serem mais solúveis em pH alcalino. O tratamento combinado dos dois tipos de rompimento foi mais eficiente do que cada um individual. Os resultados mostram que o teor de proteínas é um indicador de rompimento celular.

Xie et al. (2016) utilizaram seis métodos de rompimento celular da microalga *Desmodesmus* sp. e os compararam quanto à liberação de carotenóides. Foi também realizada a otimização das condições de rompimento, do consumo energético e foi proposto um modelo cinético de rompimento no sistema. A resposta de rompimento foi medida indiretamente pelo teor de carotenóides e clorofilas. Os seis métodos utilizados foram o moinho de bolas, homogeneização a alta pressão, micro-ondas, autoclave, choque osmótico e ultrassom. Os únicos métodos que foram eficientes no rompimento foram a homogeneização a alta pressão ( $7,9 \pm 0,3$  mg / g) e o moinho de bolas ( $8,2 \pm 0,3$  mg / g). Os teores de carotenóides e clorofilas extraídos aumentaram com os níveis de pressão e passagens no sistema de alta pressão, o que indica que estes índices são potenciais indicadores de rompimento celular.

Rivera et al. (2018) analisaram a variação do teor lipídico e o perfil dos mesmos da microalga *Parachlorella kessleri* submetida aos tratamentos de rompimento no homogeneizador a alta pressão e no moinho de bolas. As frações dos lipídeos, consideradas no estudo, foram de lipídeos neutros, ácidos graxos livres e triacilgliceróis. Os resultados mostraram um aumento de até 81% na extração dos lipídeos após os rompimentos. O teor de ácidos graxos livres aumentou com o nível de rompimentos, devido às reações paralelas com enzimas intracelulares. Como os lipídeos também possuem seu teor aumentado com o nível de rompimento celular, este também é um potencial indicador de rompimento para microalgas.

## 4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biocombustíveis, vinculado ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA), e no Departamento de Química (DEQ), ambos pertencentes a Universidade Federal de Viçosa (UFV), Estado de Minas Gerais. A matéria-prima para o desenvolvimento do projeto foi a microalga da linhagem *Scenedesmus obliquus* BR003.

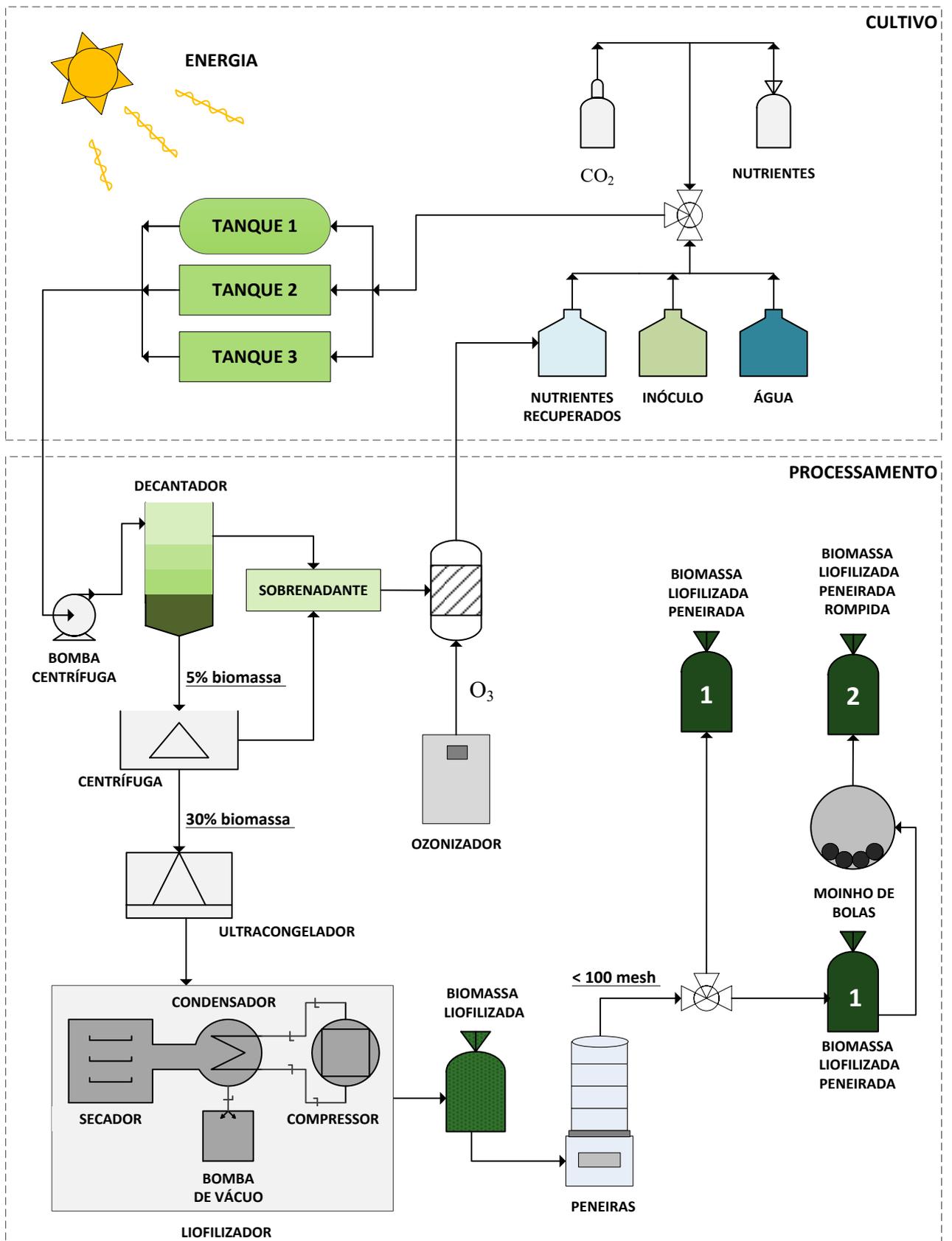
O trabalho foi desenvolvido em 5 etapas, sendo elas o cultivo, o processamento, a análise de composição centesimal, a otimização da extração de compostos da biomassa úmida, além da determinação de indicadores de rompimento celular mecânico. É importante destacar que os estudos de otimização realizados para a análise dos conteúdos celulares objetivaram elevar o desempenho dos métodos quanto à extração a partir de biomassa úmida, visto que os métodos consagrados em literatura consideram a extração a partir de biomassa seca. As Figura 1 e Figura 2 descrevem os fluxogramas que esquematizam todo o desenvolvimento do trabalho.

### 4.1. O cultivo da biomassa

O cultivo fotoautotrófico foi realizado na planta piloto de produção de microalgas do Laboratório de Biocombustíveis em tanque do tipo *raceway*, com área superficial de 20 m<sup>2</sup>, volume total de 4000 L e 20 cm de lâmina, em cultivo por batelada, aberto e sujeito às intempéries climáticas, com fotoperíodo natural, pH controlado entre 6,5 e 7,5 a uma temperatura média de 27°C. A agitação do tanque, para manutenção das células em suspensão, foi mantida por injeção de ar, produzido por compressor (CR-8, IBRAM, Brasil) em 1 poço localizado na posição central do tanque. O meio de cultura L4-m (Tabela 1) foi composto pela mistura de fertilizantes agrícolas e água de abastecimento submetida a desinfecção com gás ozônio. Gás de combustão, oriundo da incineração de resíduos sólidos e contendo em média 12% de CO<sub>2</sub>, foi injetado no cultivo como fonte de carbono. A concentração de biomassa do cultivo, após o mesmo atingir a fase estacionária de crescimento foi de cerca de 0,8 g L<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Meio de cultura L4-m

Fertilizante (macronutriente)	[mg L <sup>-1</sup> ]	Micronutriente	[mg L <sup>-1</sup> ]
Uréia	180,0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
Cloreto de Potássio	173,9	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
Super Fosfato Simples	114,3	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	71,0	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,08
Sulfato de Ferro Monohidratado	13,3	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02



**Figura 1.** Cultivo e processamento da biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003.

## EXPERIMENTOS

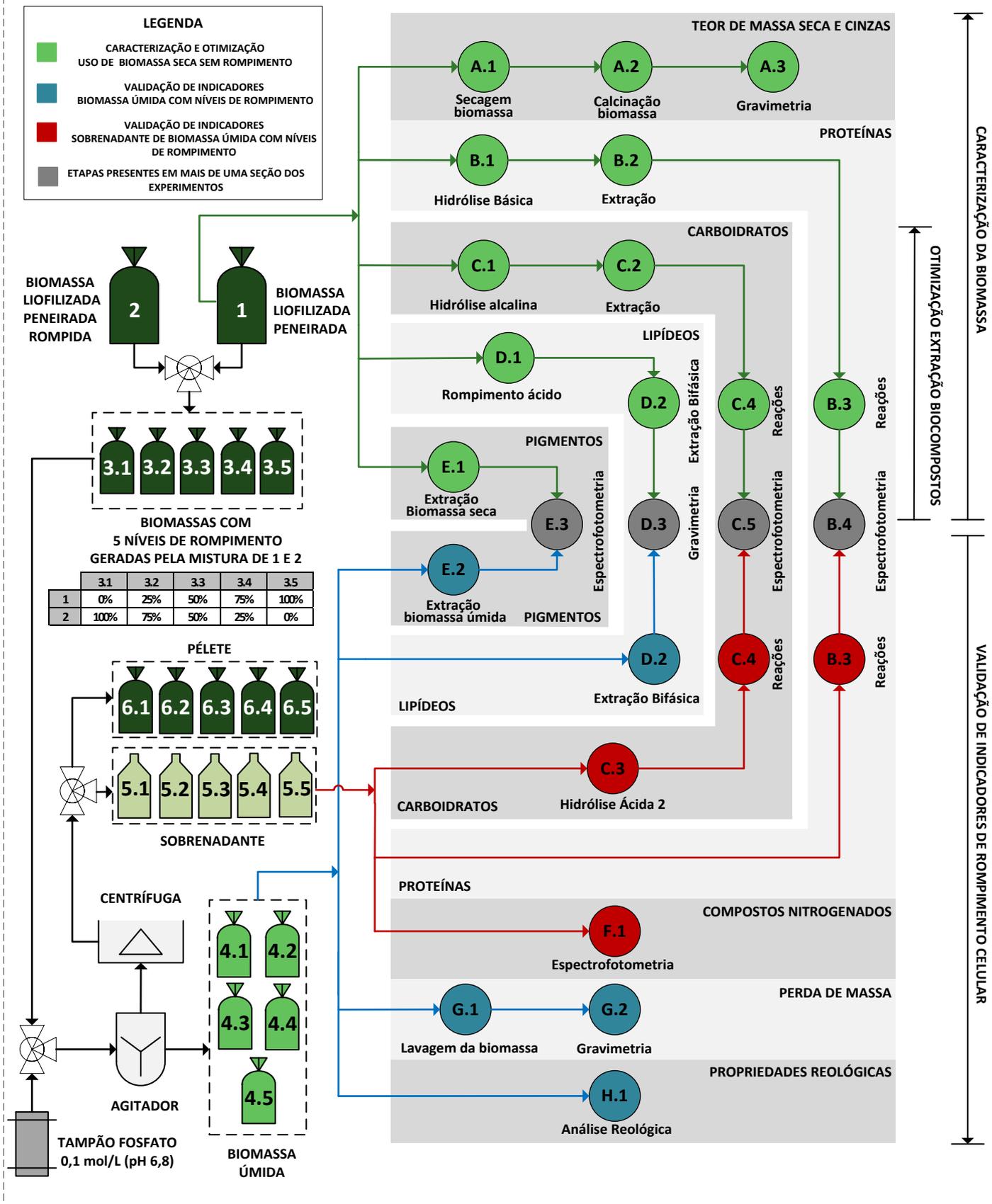


Figura 2. Representação esquemática dos experimentos realizados.

## 4.2. O processamento da biomassa

Após o cultivo, a suspensão de biomassa foi conduzida a um decantador (RISAM, Brasil) de 750 litros, sendo submetida à duas operações unitárias de separação sólido-líquido, a floculação e a decantação. O pH do meio foi ajustado para 10 e o floculante (polímero catiônico P044, Petrobras, Brasil) foi adicionado até a concentração de 10 ppm. O sistema foi agitado lentamente por 10 minutos e, posteriormente, permaneceu em repouso por 3 horas. Ao final deste processo de espessamento, duas fases distintas foram separadas, o sobrenadante e a lama de biomassa cuja concentração aproximada foi de 5% (m/v) ou 50 g L<sup>-1</sup>.

A fase sobrenadante, que possuía baixa concentração celular e nutrientes remanescentes ao cultivo, foi submetida a um processo de ozonização, onde ocorreu a esterilização do meio e a oxidação de alguns compostos para que os mesmos pudessem ser absorvidos pelas microalgas em uma nova batelada de produção de biomassa.

A lama de biomassa (5% m/v) foi centrifugada (*Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific*, EUA) a 4500g por 10 min para que a concentração resultante deste processo fosse de 30% (m/v). Após este processo a lama foi acondicionada em bandejas descartáveis de alumínio, congelada em ultracongelador (CL374-80V, ColdLab, Brasil) a -80°C e liofilizada (LP510, LioTop, Brasil). A biomassa resultante se encontrava sob a forma de flocos finos e secos.

Os flocos de biomassa liofilizada foram submetidos à maceração com auxílio de um gral e um pistilo de porcelana e com aplicação de uma força pequena, necessária apenas à desintegração dos mesmos. O cisalhamento intenso na maceração poderia levar as células ao rompimento, o que não era o objetivo desta etapa. Após sutil maceração, a biomassa foi colocada em um sistema vibratório de classificação granulométrica composto de 5 peneiras de diferentes malhas (24, 28, 32, 50 e 100 mesh). A fração que ficou retida no fundo do sistema, isto é, a biomassa cuja granulometria foi inferior a 100 mesh, foi a escolhida para a realização de todos os experimentos do projeto. Esta biomassa encontrava-se como um pó fino, homogêneo e com teor de umidade de aproximadamente 10% (m/m), representada por “biomassa 1” nas Figura 1 e Figura 2.

Uma fração da “biomassa 1” foi submetida a um rompimento mecânico em moinho de bola (MR350, TECNAL, Brasil) em bateladas de 10 gramas de biomassa e 5 minutos de rompimento. As biomassas resultantes de todas as bateladas foram misturadas resultando na “biomassa 2” (Figura 1 e Figura 2).

Após a realização de todas as operações unitárias descritas, os dois lotes de biomassa (1 e 2) foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Metalfrio 406 L, Brasil). Foram produzidas quantidades suficientes para a realização de todo o projeto, garantindo assim a homogeneidade dos experimentos e a minimização de erros experimentais sistemáticos.

Para o estudo optou-se pela liofilização da biomassa para garantir a uniformidade da matéria-prima do trabalho. Quando foi necessário trabalhar com a biomassa úmida a mesma foi ressuspensa em tampão fosfato ( $\text{pH}=6,8$ ) para evitar choque osmótico nas células.

### **4.3. Análise de composição centesimal**

A análise de composição centesimal foi realizada pela determinação do teor de umidade, massa seca, cinzas, massa seca livre de cinzas, carboidratos, proteínas, lipídeos e pigmentos, visto que a biomassa de microalgas é composta, quase em sua totalidade, por estas frações de compostos. A biomassa utilizada nesta etapa do projeto foi a liofilizada e peneirada, representada pela biomassa 1 nas Figura 1 e Figura 2.

Os experimentos da análise de composição centesimal foram realizados em quintuplicatas. A análise da precisão dos experimentos foi realizada por meio do cálculo das médias ( $\mu$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ), coeficiente de variação (CV, %), erro padrão e intervalo de confiança (IC). O coeficiente de variação máximo admissível para os experimentos foi de 5%.

#### **4.3.1. Teor de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas**

As análises do teor de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas foram realizadas de acordo com Baxter e Rexing (2017). As etapas envolvidas foram a secagem da biomassa (A.1), calcinação biomassa (A.2) e gravimetria (A.3).

Cadinhos de porcelana de 25 mL foram mantidos a  $550^{\circ}\text{C}$  em um forno mufla por 5 horas para a eliminação de traços de matéria orgânica. Após este período o forno foi desligado e resfriado fechado até o mesmo atingir  $105^{\circ}\text{C}$ . Neste momento os cadinhos foram transferidos para dessecadores até o seu total resfriamento, sendo em seguida pesados (Peso1) em balança analítica (AUW220D, Shimadzu, Japão).

- Secagem (A.1): aproximadamente 0,2 gramas de biomassa foram pesados (Peso 2) diretamente nos cadinhos de porcelana. Os mesmos foram colocados em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  por 12 horas e, em seguida, foram resfriados em dessecador e pesados em balança analítica (Peso 3).

- Calcinação (A.2): os cadinhos, juntamente com a biomassa seca foram acondicionados em forno mufla a 550 °C por 5 horas. Após este tempo e subsequente resfriamento da mufla fechada até atingir 105 °C, os cadinhos contendo as cinzas foram dispostos em dessecador. O conjunto foi então pesado em balança analítica (Peso 4).
- Gravimetria (A.3): Os teores de umidade (% m/m), massa seca (% m/m) foram determinados por gravimetria após a etapa de secagem e o teor de cinzas (% m/m) e massa seca livre de cinzas (% m/m) após a calcinação. Os teores de massa seca, umidade, cinzas e massa seca livre de cinzas foram calculados por meio das Equação 1, Equação 2, Equação 3 e Equação 4.

$$\text{Teor de massa seca (\% m/m)} = \frac{(\text{Peso 3}) - (\text{Peso 1})}{(\text{Peso 2}) - (\text{Peso 1})} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Teor de umidade (\% m/m)} = 100 - \frac{\text{Teor de massa seca (\% m/m)}}{\text{Teor de massa seca (\% m/m)}} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Teor de cinzas (\% m/m)} = \frac{(\text{Peso 4}) - (\text{Peso 1})}{(\text{Peso 2}) - (\text{Peso 1})} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Teor de massa seca livre de cinzas (\% m/m)} = 100 - \frac{\text{Teor de umidade (\% m/m)}}{\text{Teor de umidade (\% m/m)}} - \frac{\text{Teor de cinzas (\% m/m)}}{\text{Teor de cinzas (\% m/m)}} \quad \text{Equação 4}$$

Foram realizadas 5 repetições de cada experimento e calculados a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação (CV %) e o intervalo de confiança a 95%.

#### 4.3.2. Teor de proteínas

A estimativa do teor de proteínas solúveis totais foi realizada de acordo com o método descrito por (BRADFORD, 1976), por meio das etapas de hidrólise alcalina (B.1), extração (B.2), reações (B.3) e espectrofotometria (B.4).

O reagente de Bradford foi preparado a partir de reagentes da *Sigma-Aldrich, St. Louis*, EUA. Uma amostra de 100 mg de *Coomassie Brilliant Blue G-250* foi dissolvido em 50 mL de etanol a 95%. A esta solução foi adicionado um volume de 100 mL de ácido fosfórico a 85% (m/v), sendo o volume final completado para 1 litro. A solução final possuiu as concentrações finais de 0,01% (m/v) de *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 4,7% (m/v) de etanol e 8,5% (m/v) de ácido fosfórico.

- Hidrólise alcalina (B.1): uma amostra de 5 mg de biomassa foi pesada em balança analítica (AUW220D, *Shimadzu*, Japão). Adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e a mistura foi mantida a 95 °C em banho ultratermostatizado (0214M2, Quimis, Brasil) por 30 minutos. A amostra foi resfriada em banho de gelo e neutralizada com 200  $\mu\text{L}$  de HCl 0,4 mol  $\text{L}^{-1}$ .
- Extração (B.2): para a extração das proteínas solúveis, o produto da hidrólise foi centrifugado (*Heraus Multifuge X3R*, *Thermo Scientific*, EUA) a 10000g por 5 min. O sobrenadante seguiu para a quantificação e o pélete foi descartado.
- Reações (B.3): Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 1 mL do reagente de Bradford foram pipetados em microtubos de 2 mL. As reações entre o sobrenadante e o reagente de Bradford ocorreram a temperatura ambiente (20°C) em agitação a 200 rpm em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 10 minutos.
- Espectrofotometria (B.4): alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  do produto reacional foram pipetadas em microplacas de 96 poços e a leitura espectrofotométrica (*Multiskan GO Microplate*, *Thermo Scientific*, EUA) foi realizada no comprimento de onda de 595 nm. O teor de proteínas foi determinado por meio de uma curva padrão de BSA (albumina de soro bovino), gerada a partir de uma solução estoque de 1600 mg  $\text{L}^{-1}$  de albumina de soro bovino (BSA) (*Sigma-Aldrich*, *St. Louis*, EUA), com concentrações de 0 a 480 mg  $\text{L}^{-1}$ . A BSA foi dissolvida em uma solução de NaCl 0,15 mol  $\text{L}^{-1}$ .

#### 4.3.3. Teor de carboidratos

Para a determinação do teor de carboidratos foi utilizado o método fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956) adaptado por Masuko et al. (2005) em microplacas. Foram realizadas as etapas de hidrólise da biomassa (C.1), extração (C.2), reações (C.4) e espectrofotometria (C.5).

- Hidrólise ácida (C.1): A etapa de hidrólise foi necessária para a conversão dos dissacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos em monossacarídeos. Aproximadamente 20 mg de biomassa foram pesados em balança analítica (AUW220D, *Shimadzu*, Japão) em microtubos de 2 mL. Em seguida, foram pipetados 2 mL de ácido sulfúrico 1 mol  $\text{L}^{-1}$  e o sistema foi mantido em banho ultratermostatizado (0214M2, Quimis, Brasil), a 80°C por 30 min.
- Extração (C.2): os monossacarídeos gerados pelas reações de hidrólise se encontravam dispersos na fase aquosa. Para a extração destes compostos, a suspensão foi centrifugada

(*Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA*) a 10000g por 10 minutos e o sobrenadante separado do precipitado.

- Reações (C.4): alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram pipetadas em microtubos de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico concentrado (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) e 180  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de fenol (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) a 5% m/m. Após a adição dos reagentes, os microtubos foram agitados por 10 segundos em agitador do tipo vórtex (TS200, ARSEC, Brasil) a 3200 rpm e mantidos em banho ultratermostatizado a 90 °C por 5 minutos, sendo resfriados logo em seguida em banho de gelo.
- Espectrofotometria (C.5): Após o resfriamento, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram pipetadas em microplacas de 96 poços e a leitura espectrofotométrica (*Multiskan GO Microplate, Thermo Scientific, EUA*) foi realizada no comprimento de onda de 490 nm. A determinação da concentração dos carboidratos se fez pelo cálculo a partir de uma curva padrão que foi construída a partir da diluição de uma solução estoque de 600 mg L<sup>-1</sup> de glicose com concentrações que variaram de 0 a 450 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.4. Teor de lipídeos

Para a determinação do teor de lipídeos foi utilizado o protocolo de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (FEDERATION, 1986), modificado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biocombustíveis da Universidade Federal de Viçosa (UFV) para ser utilizado na biomassa de microalgas. O método consistiu das etapas de hidrólise ácida (D.1), extração bifásica (D.2) e gravimetria (D.3).

- Hidrólise ácida (D.1): uma amostra de 0,5 gramas de biomassa foi pesada em balança analítica (AUW220D, *Shimadzu, Japão*) em tubos de 50 mL. Foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico (HCl) 8 mol L<sup>-1</sup> em cada tubo. Em seguida, estes foram mantidos em banho ultratermostatizado (0214M2, Quimis, Brasil) a 70°C por 30 minutos, sendo, posteriormente, resfriados em banho de gelo.
- Extração bifásica (D.2): após a hidrólise, cada tubo recebeu uma alíquota de 5 mL de etanol anidro (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) e foram agitados em vórtex (TS200, ARSEC, Brasil) a 3200 rpm por 20 segundos. A seguir, 25 mL de uma mistura de 50% (v/v) de Éter etílico e 50% (v/v) de Éter de petróleo foram adicionados e os tubos foram agitados em vórtex a 3200 rpm por 30 segundos. Após o decorrido tempo, os tubos foram centrifugados (*Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA*) a 10000g por 5 minutos. A fase extrato

(solvente) foi separada e disposta em Erlenmeyer de 50 mL previamente seco (102 °C, 5 horas) e pesado (Peso 1). O processo de extração foi repetido 3 vezes, sendo que nas segunda e terceira extrações foram adicionados 2,5 mL de etanol anidro e 25 mL da mistura de solventes à fase aquosa que restou da extração anterior.

- Gravimetria (D.3): os Erlenmeyers com os extratos das 3 etapas foram levados à secagem a 102°C por 24 horas (Peso 2). A diferença entre as massas do Erlenmeyer com a amostra de óleo seca e vazio em relação à biomassa inicial (Peso 3) determinou o teor de lipídeos % (m/m), expresso pela Equação 5.

$$\text{Teor de lipídeos} \quad (\% \text{ m/m}) = \frac{(\text{Peso 2}) - (\text{Peso 1})}{(\text{Peso 3})} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Foram realizadas 5 repetições de cada experimento e calculados a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação (CV %) e o intervalo de confiança a 95%.

#### 4.3.5. Teor de pigmentos

A análise dos pigmentos fotossintéticos foi realizada por espectrofotometria de acordo com o protocolo descrito por Hynstova et al. (2018). O protocolo foi composto das etapas de extração (E.1) e espectrofotometria (E.3).

- Extração (E.1): aproximadamente 0,5 gramas de biomassa foi adicionada a um grau de porcelana congelado previamente com nitrogênio líquido, sendo macerada com o pistilo por cerca de 5 minutos. Amostras 20 mg de biomassa macerada foram pesadas em microtubos de 2 mL e mantidas em banho de gelo. Alíquotas de 2 mL de etanol anidro (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) gelado foram adicionadas aos tubos e os mesmos foram agitados em vórtex (TS200, ARSEC, Brasil) a 3200 rpm por 10 segundos. A seguir foram mantidos em banho de gelo e posteriormente centrifugados (*Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA*) a 10000g por 5 minutos.
- Espectrofotometria (E.3): Após a separação de fases, alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços e a leitura espectrofotométrica (*Multiskan GO Microplate, Thermo Scientific, EUA*) foi realizada nos comprimentos de onda de 470 nm, 645 nm e 662 nm. A determinação da concentração de carotenóides, clorofila a, clorofila b e clorofila total se fez pelo cálculo a partir das Equação 6, Equação 7, Equação 8 e Equação 9.

$$C_a = 11.24 * A_{662} - 2.04 * A_{645} \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad \text{Equação 6}$$

$$C_b = 20.13 * A_{645} - 4.19 * A_{662} \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad \text{Equação 7}$$

$$C_t = 7.05 * A_{662} + 18.09 * A_{645} \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad \text{Equação 8}$$

$$C_c = (1000 * A_{470} - 1.90 * C_a - 63.14 * C_b)/214 \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad \text{Equação 9}$$

O tempo de análise foi cronometrado. Entre a adição do solvente, agitação e a centrifugação foram exatos 4 minutos. A centrifugação durou 5 minutos e a leitura espectrofotométrica 1 minuto, totalizando 10 minutos de análise. Durante todo o procedimento os microtubos foram mantidos em banho de gelo e em suporte fechado para que as amostras se mantivessem em ambiente na ausência de luz a fim de evitar a fotodegradação dos pigmentos.

#### 4.4. Otimização da extração de compostos intracelulares de biomassa úmida

A secagem de microalgas depende de grandes quantidades de energia, visto que as lamas de microalgas do processamento se encontram em baixas concentrações de sólidos. O alto custo envolvido neste processo faz com que sejam necessários processos de extração de biocompostos de interesse a partir da biomassa úmida.

Neste projeto foram realizadas otimizações que objetivaram maximizar a extração de biocompostos a partir da biomassa úmida. Foram realizadas as otimizações da hidrólise da biomassa para a extração de carboidratos, da extração de lipídeos a partir de uma mistura de solventes orgânicos em 3 sistemas de agitação diferentes e da extração de pigmentos em etanol na presença de água.

##### 4.4.1. Carboidratos

As microalgas possuem carboidratos estruturais e de reserva. O amido é o principal polissacarídeo de reserva. Assim, para otimizar as condições de hidrólise da biomassa e maximizar a extração dos carboidratos, um estudo sobre as condições de hidrólise do amido e da biomassa foi realizado, por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

Foram realizados delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR) com 3 variáveis, totalizando 19 combinações entre os níveis dos fatores de interesse, sendo 8 pontos cúbicos (+1 e -1), 6 pontos axiais (+ $\alpha$  e - $\alpha$ ) e 5 repetições no ponto central. As variáveis analisadas foram a temperatura (°C), o tempo (min) e a concentração do ácido sulfúrico (mol L<sup>-1</sup>). A variável resposta dos planejamentos foi o teor de carboidratos totais determinado pelo método fenol sulfúrico. A Tabela 2 representa as variáveis e os níveis que foram avaliados na

otimização da hidrólise, enquanto a Tabela 3 é a matriz de contraste dos coeficientes codificados e decodificados do DCCR executado.

As etapas de análise da resposta foram a hidrólise da biomassa (B.1), extração (B.2), reações (B.4) e espectrofotometria (B.5), exatamente como descritas na seção 4.3.3. A única diferença ocorre na etapa de hidrólise, onde as condições de processo (temperatura, concentração de ácido sulfúrico e tempo) foram as descritas na Tabela 3 para cada unidade experimental.

**Tabela 2.** Variáveis e níveis da otimização da hidrólise

Variável	Nível				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Temperatura (°C)	29,8	40	55	70	80,2
Tempo (min)	9,5	30	60	90	110
Conc. Ácido (mol L <sup>-1</sup> )	0,3	1	2	3	3,68

Os experimentos foram realizados em duplicata para os pontos fatoriais e axiais (1 a 14). Os pontos 15 a 19 já são repetições do ponto central, sendo executado apenas uma vez cada.

**Tabela 3.** Matriz de contraste dos coeficientes do DCCR a 3 variáveis

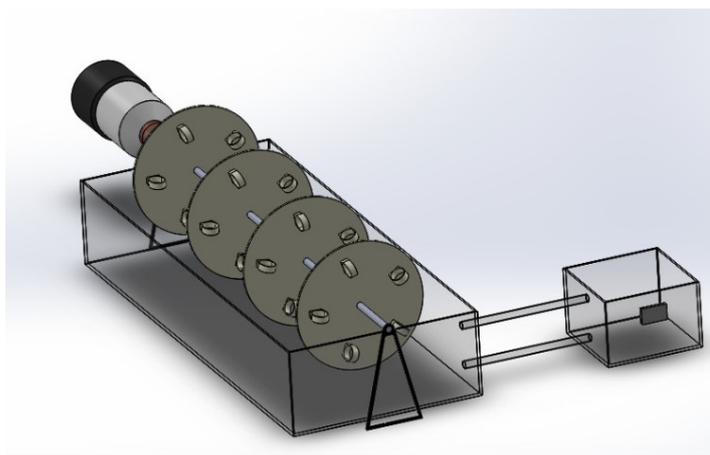
Ensaio	Codificado			Decodificado		
	Temp. (°C)	Tempo (s)	Conc. Ácido (mol/L)	Temp. (°C)	Tempo (s)	Conc. Ácido (mol/L)
1	-1	-1	-1	40	30	1
2	-1	-1	1	40	30	3
3	-1	1	-1	40	90	1
4	-1	1	1	40	90	3
5	1	-1	-1	70	30	1
6	1	-1	1	70	30	3
7	1	1	-1	70	90	1
8	1	1	1	70	90	3
9	-1,682	0	0	29,8	60	2
10	1,682	0	0	80,2	60	2
11	0	-1,682	0	55	9,5	2
12	0	1,682	0	55	110	2
13	0	0	-1,682	55	60	0,30
14	0	0	1,682	55	60	3,68
15	0	0	0	55	60	2
16	0	0	0	55	60	2
17	0	0	0	55	60	2
18	0	0	0	55	60	2
19	0	0	0	55	60	2

Os efeitos de cada variável foram calculados, bem como os coeficientes do modelo proposto. A análise de significância dos efeitos foi realizada a partir das diferenças estatísticas dos efeitos e dos respectivos erros padrões por meio do teste t a um nível de significância de 5%. O modelo ajustado foi avaliado pela falta de ajuste, por meio da Análise de Variância (ANOVA), análise de identidade e a análise de distribuição dos resíduos. A análise de identidade foi realizada por meio da regressão linear do gráfico gerado pelos valores medidos e preditos do modelo. Após todas as análises descritas, o ponto ótimo de cada variável foi determinado.

#### 4.4.2. Lipídeos

Para otimizar a extração dos lipídeos foram realizados estudos do rendimento de extração de óleo em 3 sistemas de agitação diferentes sendo eles o vórtex, a mesa de agitação orbital e o sistema de tamboramento, por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

O sistema de tamboramento consiste de um disco com garras acopladas onde são encaixados tubos de 50 mL. Os discos possuem um eixo central responsável por fazer os mesmos girarem a velocidades controladas. A cada giro, os tubos são invertidos a 180° fazendo com que o fluido interior seja misturado por tombamento. Uma representação esquemática do sistema, montado pela equipe do Laboratório de Biocombustíveis, está exibida na Figura 3.



**Figura 3.** Sistema de agitação por tamboramento.

O sistema de agitação orbital que foi utilizado está representado na Figura 4. Neste sistema os tubos de 50 mL foram dispostos na horizontal.



**Figura 4.** Mesa de agitação orbital para extração de lipídeos.

A velocidade de agitação dos tubos em cada sistema era diferente. Para o sistema tipo mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil), a velocidade foi de 300 rpm. O sistema de tamboramento, que possuía um diâmetro de 24 cm, trabalhou a 50 rpm. O vórtex (TS200, ARSEC, Brasil) foi utilizado em sua velocidade máxima de 3200 rpm.

Foram realizados delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR) com 2 variáveis, totalizando 11 combinações entre os níveis dos fatores de interesse, sendo 4 pontos cúbicos (+1 e -1), 4 pontos axiais (+ $\alpha$  e - $\alpha$ ) e 3 repetições no ponto central. As variáveis analisadas foram a concentração de biomassa (% m/v) e o tempo de extração (min). A variável resposta dos planejamentos foi o teor de lipídeos determinado pelo método Schmid-Bondzynski-Ratzlaff. As Tabela 4 e Tabela 5 apresentam as variáveis e os níveis que foram avaliadas na otimização da extração, enquanto as Tabela 6 e Tabela 7 representam as matrizes de contraste dos coeficientes codificados e decodificados dos DCCR propostos.

As etapas de análise consistiram da hidrólise ácida (D.1), extração bifásica (D.2) e gravimetria (D.3), como descritas na seção 4.3.4, com algumas diferenças na etapa de hidrólise ácida e extração bifásica. Na etapa de hidrólise ácida, as quantidades de biomassa, ácido e água foram as descritas pelas Tabela 6 e Tabela 7 para cada unidade amostral. A relação de

quantidade de ácido (mol)/biomassa (g) foi constante para todos os experimentos, visto que a concentração do ácido não era um fator variável do processo.

Foi executado um planejamento experimental em cada sistema de agitação, sendo avaliados diferentes tempos de extração para cada unidade experimental. Estes tempos foram os descritos nas Tabela 6 e Tabela 7.

Os experimentos foram realizados em duplicata para os pontos fatoriais e axiais (1 a 8). Os pontos 9 a 11 já são repetições do ponto central, sendo executado apenas uma vez cada.

**Tabela 4.** Variáveis e níveis da otimização da extração nos sistemas de tamboramento e mesa de agitação orbital

Variável	Nível				
	-1,41	-1	0	1	1,4
Concentração Biomassa (%m/m)	6,586	7	8	9	9,4
Tempo (min)	13,787	20	35	50	56,2

**Tabela 5.** Variáveis e níveis da otimização da extração no sistema de agitação do tipo vórtex

Variável	Nível				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Concentração Biomassa (%m/m)	6,586	7	8	9	9,4
Tempo (s)	18,78	25	40	55	61,21

**Tabela 6.** Matriz de contraste dos coeficientes do DCCR a 2 variáveis para os sistemas de mesa de agitação orbital e tamboramento

Ensaio	Codificado		Decodificado		Quantidades		
	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	Biomassa (g)	HCl 8 mol L <sup>-1</sup> (mL)	Água (mL)
1	-1	-1	7,0	20,0	0,35	3,5	1,5
2	1	-1	9,0	20,0	0,45	4,5	0,5
3	-1	1	7,0	50,0	0,35	3,5	1,5
4	1	1	9,0	50,0	0,45	4,5	0,5
5	-1,414	0	6,6	35,0	0,33	3,3	1,2
6	1,414	0	9,4	35,0	0,47	4,7	0,3
7	0	-1,414	8,0	13,8	0,4	4,0	1,0
8	0	1,414	8,0	56,2	0,4	4,0	1,0
9	0	0	8,0	35,0	0,4	4,0	1,0
10	0	0	8,0	35,0	0,4	4,0	1,0
11	0	0	8,0	35,0	0,4	4,0	1,0

**Tabela 7.** Matriz de contraste dos coeficientes do DCCR a 2 variáveis para extração no sistema de agitação do tipo vórtex

Ensaio	Codificado		Decodificado		Quantidades		
	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	Biomassa (g)	HCl 8 mol L <sup>-1</sup> (mL)	Água (mL)
1	-1	-1	7,0	25,0	0,35	3,5	1,5
2	1	-1	9,0	25,0	0,45	4,5	0,5
3	-1	1	7,0	55,0	0,35	3,5	1,5
4	1	1	9,0	55,0	0,45	4,5	0,5
5	-1,414	0	6,6	40,0	0,33	3,3	1,2
6	1,414	0	9,4	40,0	0,47	4,7	0,3
7	0	-1,414	8,0	18,78	0,4	4,0	1,0
8	0	1,414	8,0	61,21	0,4	4,0	1,0
9	0	0	8,0	40,0	0,4	4,0	1,0
10	0	0	8,0	40,0	0,4	4,0	1,0
11	0	0	8,0	40,0	0,4	4,0	1,0

Os efeitos de cada variável foram calculados, bem como os coeficientes do modelo proposto. A análise de significância dos efeitos foi realizada a partir das diferenças estatísticas dos efeitos e dos respectivos erros padrões por meio do teste t a um nível de significância de 5%. O modelo ajustado foi avaliado pela falta de ajuste, por meio da Análise de Variância (ANOVA), análise de identidade e a análise de distribuição dos resíduos. A análise de identidade foi realizada por meio da regressão linear do gráfico gerado pelos valores medidos e preditos do modelo. Após todas as análises descritas, o ponto ótimo de cada variável foi determinado.

#### 4.4.3. Pigmentos

A extração de pigmentos de biomassa de microalgas ocorre por meio de solventes anidros, geralmente acetona ou etanol (DAMERGI et al., 2017). A otimização da extração de pigmentos a partir da biomassa úmida foi realizada por meio da avaliação do teor de carotenóides, clorofila a, clorofila b e clorofila total em função da fração de etanol presente na mistura de etanol/água utilizada. A Tabela 8 expressa as frações de etanol, e as quantidade de cada componente da mistura em cada experimento.

**Tabela 8.** Otimização da extração de pigmentos fotossintéticos de biomassa úmida

<b>ID</b>	<b>Fração de Etanol</b>	<b>Etanol (mL)</b>	<b>Água (mL)</b>	<b>Biomassa (g)</b>
1	0	0	1,5	0,15
2	0,2	0,3	1,2	0,12
3	0,3	0,45	1,05	0,105
4	0,4	0,6	0,9	0,09
5	0,5	0,75	0,75	0,075
6	0,6	0,9	0,6	0,06
7	0,7	1,05	0,45	0,045
8	0,8	1,2	0,3	0,03
9	0,9	1,35	0,15	0,015
10	1,0	2,0	0	0,02

As etapas de análise foram a hidrólise da biomassa (D.1) e a espectrofotometria (E.3), exatamente como descritas na seção 4.3.5. A única diferença se dá na etapa de extração, onde o etanol anidro foi substituído por uma mistura de etanol anidro e água nas proporções expressas na Tabela 8 para cada ponto experimental.

O ponto ótimo de extração de biomassa úmida foi aquele no qual foi possível extrair pelo menos 85% do total de pigmentos em relação ao extraído com etanol anidro.

Hynstova et al. (2018) relataram que a absorção máxima de cada tipo de pigmento varia fortemente com o tipo de solvente. Para avaliar este fato foi realizada uma varredura para a obtenção do espectro de absorção dos pigmentos para cada unidade experimental presente na Tabela 8.

#### **4.5. Validação de indicadores de rompimento celular**

Indicadores de rompimento celular são definidos como aqueles compostos ou propriedades físico-químicas que variam suas unidades de acordo com o nível de rompimento celular, preferencialmente de forma linear. Neste projeto, associou-se o nível de rompimento celular com o número de células totalmente rompidas ou danificadas no total de células presentes em uma amostra da biomassa.

Para a realização dos experimentos foram adotados 5 níveis de rompimento celular, sendo eles 0, 25, 50, 75 e 100%. Para cada uma destes 5 lotes de biomassas foram determinados os teores de biocompostos ou as propriedades físico-químicas que potencialmente são indicadores de rompimento celular, representados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Potenciais indicadores de rompimento celular

<b>ID</b>	<b>Potencial indicador de rompimento celular</b>
<b>Teor de biocompostos</b>	<b>B</b> Teor de proteínas solúveis
	<b>C</b> Teor de carboidratos solúveis
	<b>D</b> Teor de lipídeos totais
	<b>E</b> Teor de pigmentos
	<b>F</b> Teor de compostos nitrogenados
<b>Propriedades físico-químicas</b>	<b>G</b> Teor de perda de massa
	<b>H</b> Propriedades reológicas

Para a realização desta seção de experimentos foram executadas as etapas de preparação das biomassas secas, das biomassas úmidas, a execução dos protocolos e avaliação de cada indicador de rompimento celular.

#### 4.5.1. Preparação das biomassas secas com 5 níveis de rompimento

As biomassas com níveis distintos de rompimento foram produzidas por meio de composições mássicas das “biomassa 1” e “biomassa 2”. A Tabela 10 expressa as quantidades de biomassa 1 e 2 que foram misturadas para produzir cada 100 gramas de biomassa com nível de rompimento diferente.

**Tabela 10.** Biomassas secas com níveis distintos de rompimento

<b>ID</b>	<b>Nível de Rompimento</b>	<b>Biomassa 1 (g)</b>	<b>Biomassa 2 (g)</b>
<b>3.1</b>	0%	100	0
<b>3.2</b>	25%	75	25
<b>3.3</b>	50%	50	50
<b>3.4</b>	75%	25	75
<b>3.5</b>	100%	0	100

A biomassa de 0% de rompimento foi a biomassa 1, representada nas Figura 1 e Figura 2. Após todas as operações unitárias que foram necessárias desde o cultivo até obtenção da biomassa liofilizada e peneirada (1), esperou-se que uma pequena parte das células estivessem danificadas, o que não comprometeu a definição desta biomassa como sendo o nível 0%. Todos

os protocolos foram executados nesta biomassa e os teores e valores dos compostos e propriedades físicas considerados como o valor mínimo de referência.

A biomassa de 100% de rompimento foi a biomassa 2, representada nas Figura 1 e Figura 2. Não houve garantia de que todas as células estavam rompidas ou danificadas, mas para fins destes experimentos esta biomassa foi considerada como 100%, isto é, a biomassa com o máximo de rompimento. Micrografias de luz foram realizadas para aferição do rompimento das células. As biomassas de 25, 50 e 75% de rompimento foram produzidas pela mistura das biomassas 1 e 2 (0 e 100%), de acordo com a Tabela 10. A partir de todo o processo descrito foram gerados 5 lotes de biomassas (3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5, Figura 2), que estavam secas e possuíam 5 distintos níveis de rompimento.

#### **4.5.2. Preparação das biomassas úmidas com 5 níveis de rompimento**

Amostras de cada um dos 5 lotes de biomassa seca, 3.1 a 3.5 (Figura 2), foram misturadas a uma solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,8, em tubos de 50 mL, a uma concentração de 10% (m/v). Os tubos foram mantidos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 30 minutos a 300 rpm. Após este tempo, foram geradas 5 suspensões de microalgas a 10% (m/v) de concentração (4.1 a 4.5, Figura 2), cada uma associada a um nível de rompimento celular diferente (0 a 100%).

Uma fração de cada uma destas suspensões, 4.1 a 4.5 (Figura 2), foi utilizada para a avaliação dos indicadores D, E, G, e H (Tabela 9). O restante foi centrifugado (*Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA*) a 14000g por 5 minutos para a obtenção dos sobrenadantes (5.1 a 5.5, Figura 2) para a avaliação dos indicadores B, C, F e G (Tabela 9), e dos péletes (6.1 a 6.5, Figura 2) que foram descartados.

#### **4.5.3. Análise dos teores de biocompostos e propriedades físicas**

Os teores de proteínas solúveis (B, Tabela 9), carboidratos solúveis (C, Tabela 9) e compostos nitrogenados solúveis (F, Tabela 9) foram determinados a partir dos sobrenadantes (5.1 a 5.5, Figura 2) oriundos da centrifugação das 5 biomassas úmidas (4.1 a 4.5, Figura 2).

#### **4.5.3.1. Teor de proteínas solúveis**

A extração das proteínas solúveis foi realizada por meio da mistura das biomassas com 5 níveis de rompimento distintos com tampão fosfato (pH=6,8) 0,1 mol L<sup>-1</sup> em uma concentração de 10% (m/v) em microtubos de 2 mL. Estes tubos foram mantidos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 15 minutos e posteriormente centrifugados (*Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA*) a 20000g por 10 minutos. Os sobrenadantes destes sistemas foram separados e seguiram para a análise de proteínas por meio das etapas de reações (B.3) com o reagente de Bradford e espectrofotometria (B.4), exatamente como descrito na seção 4.3.2.

#### **4.5.3.2. Teor de carboidratos solúveis**

A extração dos carboidratos solúveis foi realizada por meio da mistura das biomassas com 5 níveis de rompimento distintos com tampão fosfato (pH=6,8) 0,1 mol L<sup>-1</sup> em uma concentração de 10% (m/v) em microtubos de 2 mL. Estes tubos foram mantidos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 15 minutos e posteriormente centrifugados (*Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA*) a 20000g por 10 minutos. Os sobrenadantes destes sistemas foram separados. O teor de carboidratos solúveis foi determinado por meio das etapas de hidrólise ácida 2 (C.3), reações (C.4) e espectrofotometria (C.5).

- Hidrólise ácida 2 (C.3): Uma alíquota de 500 µL de sobrenadante foi pipetada em microtubos de 2 mL. Em seguida, foram pipetados 1,5 mL de ácido sulfúrico 4 mol L<sup>-1</sup>, de modo que a concentração final do ácido no microtubo fosse de 3,0 mol L<sup>-1</sup>. O sistema foi mantido em banho ultratermostatizado (0214M2, Quimis, Brasil), a 90°C por 1 hora e 30 min.

As etapas de reações (C.4) e espectrofotometria (C.5) foram realizadas exatamente como descrito na seção 4.3.3.

#### **4.5.3.3. Teor de compostos nitrogenados**

A extração dos compostos nitrogenados solúveis foi realizada por meio da mistura das biomassas com 5 níveis de rompimento distintos com tampão fosfato (pH=6,8) 0,1 mol L<sup>-1</sup> em uma concentração de 10% (m/v) em microtubos de 2 mL. Estes tubos foram mantidos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 15 minutos e posteriormente centrifugados (*Heraus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA*) a 20000g por 10 minutos. Os

sobrenadantes destes sistemas foram separados. A determinação do teor de compostos nitrogenados ocorreu em etapa única de espectrofotometria (F.1).

- Espectrofotometria (F.1): Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram diluídas em 900  $\mu\text{L}$ . Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  desta diluição foram pipetados em microplacas de 96 poços. Foram realizadas varreduras espectrais na região do ultravioleta (UV), de 200 a 400 nm. Foram identificados picos na região do 260 nm. A absorbância no comprimento de onda 260 nm foi utilizada como indicativo da presença de compostos nitrogenados.

Os teores de lipídeos (D, Tabela 9), pigmentos (E, Tabela 9), perda de massa (G, Tabela 9) e propriedades reológicas (H, Tabela 9) foram determinados a partir das 5 biomassas úmidas (4.1 a 4.5, Figura 2).

#### **4.5.3.4. Teor de lipídeos**

A extração dos lipídeos foi realizada por meio da mistura das biomassas com 5 níveis de rompimento distintos com tampão fosfato ( $\text{pH}=6,8$ )  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em uma concentração de 10% (m/v) em tubos de 50 mL. Estes tubos foram mantidos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 15 minutos. A seguir, a determinação do teor de lipídeos ocorreu por meio das etapas de extração bifásica (D.2) e gravimetria (D.3), exatamente como descritos na seção 4.3.4. Existiu apenas uma única diferença na etapa D.2. A otimização da extração dos lipídeos que foi realizada, mostrou que o rendimento de lipídeos é máximo com a homogeneização dos tubos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) a 300 rpm por 30 minutos em cada extração. Assim, a agitação por vórtex na etapa D.2 foi substituída por estas condições ótimas.

#### **4.5.3.5. Teor de pigmentos**

A extração dos pigmentos foi realizada por meio da mistura das biomassas com 5 níveis de rompimento distintos com tampão fosfato ( $\text{pH}=6,8$ )  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em uma concentração de 10% (m/v) em microtubos de 2 mL. Estes tubos foram mantidos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 15 minutos e seguiram para a determinação do teor de pigmentos que ocorreu por meio das etapas de extração da biomassa úmida (E.2) e espectrofotometria (E.3).

- Extração biomassa úmida (E.2): As condições de extração da biomassa úmida foram determinadas pela otimização realizada anteriormente. Uma amostra de 300  $\mu\text{L}$  de cada uma das 5 biomassas úmidas (10% m/v) foram dispostas em microtubos de 2 mL, sendo

acrescentado a seguir 1200  $\mu\text{L}$  de etanol anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos e em seguida centrifugados (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA) a 20000g por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e seguiu para a análise espectrofotométrica.

- Espectrofotometria (E.3): A análise espectrofotométrica ocorreu como descrito na seção 4.3.5.

#### **4.5.3.6. Teor de perda de massa**

A análise de perda de massa foi realizada em duas etapas, sendo elas a lavagem da biomassa (H.1) e gravimetria (H.2).

- Lavagem da biomassa (H.1): amostras de 5 mL da suspensão de biomassa úmida (10% m/m) foram dispostas em tubos de 50 mL. Adicionou-se 30 mL de tampão fostato,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=6,8$ , a cada tubo, sendo estes mantidos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 15 minutos. Após agitação, os tubos foram centrifugados (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA) a 14000 xg por 10 minutos. Foram pipetados 25 mL do sobrenadante que foram dispostos em erlenmeyers de 250 mL previamente secos ( $102 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 horas) e pesados em balança analítica (AUW220D, Shimadzu, Japão). A seguir foram adicionados aos tubos 25 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=6,8$ , e os tubos foram novamente agitados e centrifugados nas mesmas condições anteriores. Este processo foi repetido 4 vezes, totalizando 5 bateladas de lavagens da biomassa, gerando um total de 125 mL de sobrenadante contendo os compostos solúveis extraídos da biomassa.
- Gravimetria (D.3): os erlenmeyers com os extratos das 5 etapas de lavagem foram levados à secagem a  $102^\circ\text{C}$  por 48 horas. A diferença entre as massas do erlenmeyer com o extrato do sobrenadante e vazio em relação à biomassa inicial determinou o teor de perda de massa % (m/m).

#### **4.5.3.7. Propriedades reológicas**

A análise das propriedades reológicas das suspensões de microalgas foi realizada por meio da mistura das biomassas com 0% (4.1, Figura 2) e 100% (4.5, Figura 2) de rompimento com tampão fosfato ( $\text{pH}=6,8$ )  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em uma concentração de 10% (m/v) em tubos de 50 mL. Estes tubos foram mantidos em mesa de agitação orbital (MA 140/CF, Marconi, Brasil) por 15 minutos e posteriormente as suspensões analisadas, em etapa única (I.1) no reômetro.

Os experimentos foram conduzidos no reômetro RHEOTEST® RN 4.1 (Rheotest, Alemanha). O reômetro aplicou uma variação linear de aumento da taxa de deformação com tempo. Para cada amostra de 20 mL foram realizadas 3 rampas distintas e sequenciais, sendo a primeira com a variação crescente da taxa de deformação (0 a 2000 s<sup>-1</sup>, subida 1), a segunda com a variação decrescente (2000 a 0 s<sup>-1</sup>, descida 1) e a terceira novamente com variação crescente (0 a 2000 s<sup>-1</sup>, subida 2). O tempo de análise foi de 900 s para cada rampa e a temperatura foi controlada por um banho termocirculador, mantido à 25°C. Foram coletados dados de tempo, taxa de deformação (s<sup>-1</sup>), tensão de cisalhamento (mPa) e viscosidade aparente (Pa s) em intervalo de tempo de 3 segundos, totalizando 300 pontos para cada curva.

A análise reológica consistiu de 6 repetições para as amostras de microalgas sem rompimento e 3 repetições para as microalgas rompidas. Foram gerados os reogramas para cada repetição, para os dados médios com representação do intervalo de confiança de cada ponto da curva, além do reograma com ajuste do modelo reológico e das 3 rampas distintas em um único gráfico. O modelo considerado para o ajuste dos dados experimentais foram o modelo da Lei de Potência.

#### **4.5.4. Avaliação dos indicadores de rompimento celular**

Um bom indicador é aquele que apresentar resultados estatisticamente diferentes para biomassas com níveis de rompimento distintos. Para a avaliação dos indicadores de rompimento celular foram executados os protocolos com as suspensões de biomassa (4.1 a 4.5, Figura 2) e com os sobrenadantes (5.1 a 5.5, Figura 2). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) a 5% de significância ( $\alpha=0,05$ ), onde o tratamento avaliado foi o nível de rompimento celular (0 a 100%).

Para os indicadores em que a ANOVA foi significativa (p-valor < 0,05), isto é, níveis de rompimento distintos geraram distintos resultados nos teores de biocompostos ou nas propriedades físico-químicas, foram realizadas análises adicionais. Para estes casos foram gerados gráficos de dispersão dos dados, análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados no software SigmaPlot 11.0, bem como a análise de variância (ANOVA) da regressão e a análise de distribuição dos resíduos de cada modelo gerado. Assim, foi possível obter modelos que relacionassem os teores de biocompostos ou propriedades físico-químicas com o nível de rompimento celular.

## 5. RESULTADOS

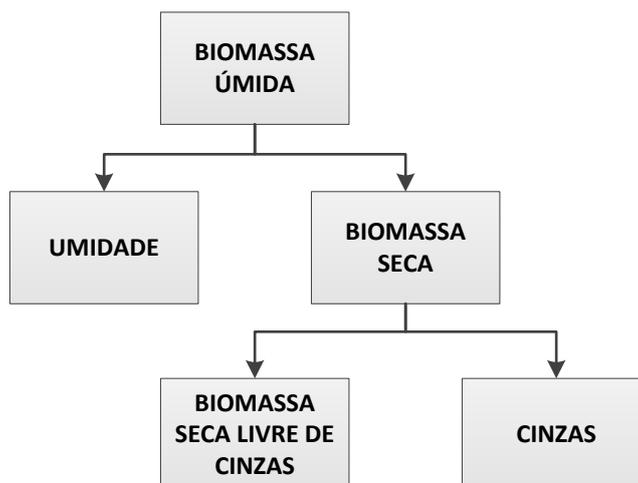
Os experimentos foram conduzidos conforme planejamento experimental e os resultados são apresentados em três seções: análise da composição centesimal, otimização da extração de biocompostos a partir da biomassa úmida e análise de indicadores de rompimento celular mecânico.

### 5.1. Análise de composição centesimal

A composição centesimal da biomassa foi expressa em teores de umidade, massa seca, cinzas, massa seca livre de cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos.

#### 5.1.1. Teor de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas

A biomassa úmida representa a totalidade da biomassa (100%). Esta é composta do teor de umidade e da biomassa seca. Esta última ainda é composta do teor de cinzas e da biomassa seca livre de cinzas, como expresso na Figura 5.



**Figura 5.** Representação esquemática da composição da biomassa.

A biomassa obtida posteriormente à classificação granulométrica foi dividida em dois lotes. No primeiro lote não foi realizada nenhuma operação unitária adicional, sendo o mesmo utilizado da forma em que se encontrava. O segundo lote foi submetido a lavagens sucessivas com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> para a retirada de compostos solúveis e seguida de secagem em estufa a 105 °C até massa constante.

A Tabela 11 apresenta os valores médios e o intervalo de confiança a 95% do teor de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas para a biomassa sem lavagem e para a biomassa lavada. Os dados completos das análises se encontram no Apêndice A.

**Tabela 11.** Teores de umidade, massa seca, cinzas e massa seca livre de cinzas da biomassa peneirada e sem lavagem

Parâmetro	Teor (% m/m)			
	Sem lavagem		Lavada	
Teor de Umidade	9,0331	± 0,5622	8,0458	± 0,8272
Teor de Massa seca	90,9669	± 0,5622	91,9542	± 0,8271
Teor de Cinzas	36,2197	± 0,3818	36,1210	± 0,2123
Teor de massa seca livre de Cinzas	54,7473	± 0,7187	55,8332	± 0,9002

Os autores Miranda et al. (2018) realizaram um trabalho de análise de viabilidade da utilização da biomassa de *Scenedesmus* sp. para fins energéticos. O teor de cinzas dessa biomassa submetida ao processo de peletização foi de 18,02 % em massa. Os autores compararam todos os resultados de caracterização com dados da ISO 17225-6, que estabelece padrões para biodiesel de diversas fontes. Para as biomassas aquáticas, as cinzas deveriam compor de 6 a 10 % no máximo da biomassa total.

Gong et al. (2019) avaliaram a substituição parcial da farinha de peixe pela biomassa da microalga *Scenedesmus* sp.. Na caracterização da biomassa os autores encontraram um teor de cinzas médio de 8,3% em massa.

Tomás-Almenar et al. (2018) cultivaram a *Scenedesmus almeriensis* em efluente residual da produção de suínos para alimentação de truta arco-íris e verificaram teor de cinzas de 17,7% em massa na biomassa. Assim, por meio dos valores reportados na literatura para o gênero *Scenedesmus*, conclui-se que o teor de cinzas tem relação estreita com as variáveis de crescimento celular, como o meio e condições de cultivo.

Diante dos teores de cinza observados para a biomassa de *Scenedesmus* sp., não foi possível estabelecer um valor de referência, tendo em vista que a variação dos mesmos foi alta. O teor de cinzas encontrado neste estudo (36,2 %, Tabela 11) extrapolou significativamente a faixa observada na literatura. No entanto, é importante destacar que o cultivo utilizado neste trabalho foi realizado com fertilizantes agrícolas, que não possuem grau de pureza analítica, contendo uma parcela significativa de compostos insolúveis. A

Tabela 12 descreve a quantidade em massa dos compostos insolúveis presente nos fertilizantes utilizados para a formulação do meio de cultura.

**Tabela 12.** Teor de insolúveis dos fertilizantes

Fertilizante	Umidade a 65°C	Insolúveis
	% (m m <sup>-1</sup> )	
Ureia	0,89	0,00
Superfosfato Simples	7,80	23,47
Monofosfato de amônio (MAP)	5,06	9,15
Cloreto de Potássio	0,53	2,52
Sulfato de Ferro Monohidratado	6,88	7,37
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	20,43	0,00

Assim, foi possível concluir que o alto teor de cinzas da biomassa utilizada foi devido aos compostos insolúveis presentes no meio de cultivo a base de fertilizantes agrícolas. Não haviam compostos solúveis em quantidade significativa, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre as cinzas da biomassa com e sem o processo de lavagem.

### 5.1.2. Teor de lipídeos

A Tabela 13 expressa teores de lipídeos de microalgas de diversas espécies e métodos de rompimento.

**Tabela 13.** Teor de lipídeos da linhagem *Scenedesmus obliquus* BR003 e comparação com valores reportados da literatura

Método de rompimento	Microalga	Teor de lipídeos (% m/m)	Referência
Ácido	<i>Scenedesmus obliquus</i> BR003	15,892 ± 0,413	<b>Este trabalho</b>
Enzimático	<i>Chlorella</i> sp.	14,0	Lu et al. (2016)
	<i>Scenedesmus</i> sp.	12,6	Zhang et al. (2018)
Microondas	<i>Spirulina</i> sp.	5,81	Pohndorf et al. (2016)
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	19,03	(Cheng et al. (2013)
Autoclave	<i>Spirulina</i> sp.	5,65	Pohndorf et al. (2016)
Moinho	<i>Spirulina</i> sp.	5,69	Pohndorf et al. (2016)
Ultrassom	<i>Spirulina</i> sp.	7,0	Martínez et al. (2017)
Líquido iônico	<i>Chlorella</i> sp.	19,86	Shankar et al. (2017)

Os valores encontrados para a biomassa utilizada neste projeto encontram-se dentro do intervalo de teores encontrados por outros autores.

### **5.1.3. Teor de proteínas**

O teor de proteínas foi determinado por espectrofotometria, como descrito pela seção 4.3.2. A biomassa foi rompida e as proteínas solubilizadas e identificadas pela absorvância a 585 nm após as reações de Bradford. O teor de proteínas da biomassa foi de  $(58,655 \pm 0,512)$  %. O teor de proteínas encontrados para a biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR 003 é similar ao teor encontrado por Mathimani et al. (2019) também para a biomassa de *Scenedesmus obliquus*, que foi de 50-56%.

### **5.1.4. Teor de carboidratos**

O teor de carboidratos foi determinado por espectrofotometria, como descrito pela seção 4.3.3. Os carboidratos complexos foram hidrolisados aos monossacarídeos e identificados pela absorvância a 490 nm após a reação fenol-ácido sulfúrico. O teor de carboidratos da biomassa foi de  $(26,184 \pm 0,325)$  %.

A quantidade de carboidratos presentes na célula é totalmente dependente das condições de cultivo. Shankar et al. (2017) determinaram que o teor de carboidratos total para a microalga *Scenedesmus obliquus* foi de 10-17% da biomassa seca, o mesmo encontrado por Mathimani et al. (2019). O valor encontrado no presente trabalho foi maior do que os apresentados na literatura. Esse fato pode ser atribuído a alguma condição de estresse da microalga, que estimulou o acúmulo de carboidrato.

## **5.2. Otimização de extração de biocompostos de biomassa úmida**

### **5.2.1. Carboidratos**

#### **5.2.1.1. Hidrólise do amido**

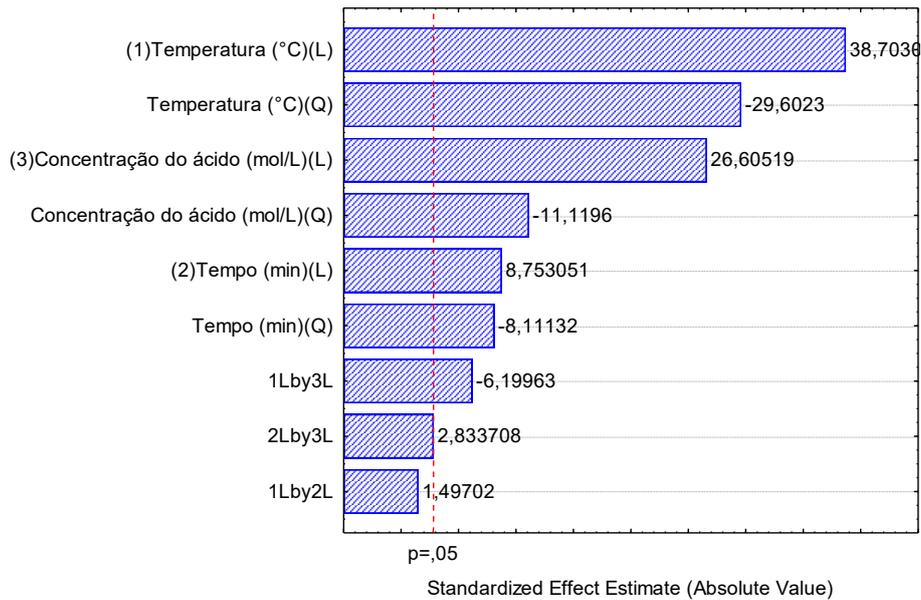
A otimização das condições de hidrólise da biomassa da microalga *Scenedesmus* sp. BR003, foi realizada por meio da otimização da hidrólise do amido e da biomassa. O amido é o principal carboidrato de reserva e a otimização da hidrólise do mesmo se fez necessária como estudo preliminar para a delimitação dos níveis das variáveis na hidrólise da biomassa.

Os experimentos correspondentes ao Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a hidrólise do amido foram executados e as respostas podem ser observadas na Tabela 14.

**Tabela 14.** DCCR a 3 variáveis para hidrólise do amido

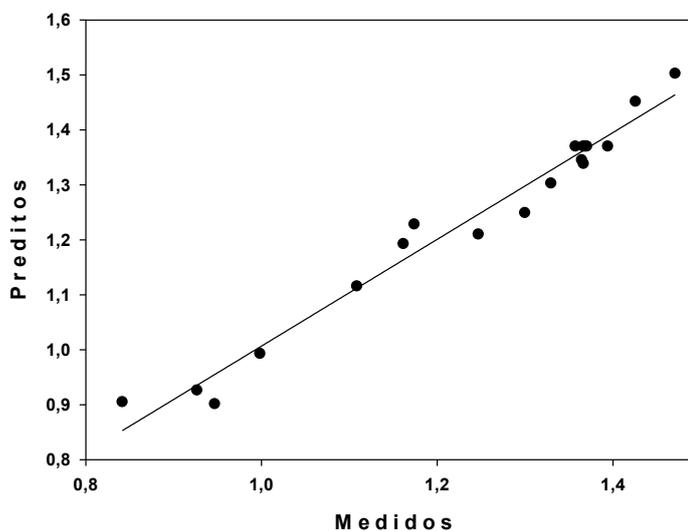
Ensaio	Parâmetro decodificado			Concentração Carboidratos (mg L <sup>-1</sup> )
	Temperatura (°C)	Tempo (s)	[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (mol L <sup>-1</sup> )	
1	40	30	1	169,5
2	40	30	3	195,1
3	40	90	1	182,1
4	40	90	3	209,4
5	70	30	1	273,0
6	70	30	3	270,8
7	70	90	1	257,4
8	70	90	3	259,9
9	29,8	60	2	156,7
10	80,2	60	2	262,3
11	55	9,5	2	207,2
12	55	110	2	258,8
13	55	60	0,30	204,2
14	55	60	3,68	261,4
15	55	60	2	249,5
16	55	60	2	255,5
17	55	60	2	271,4
18	55	60	2	247,7
19	55	60	2	263,5

Os efeitos de cada variável foram calculados e estão apresentados na Figura 6. A análise de significância dos efeitos foi realizada a partir das diferenças estatísticas dos efeitos e dos respectivos erros padrões por meio do teste t a um nível de significância de 5%. Os efeitos das 3 variáveis analisadas (temperatura, concentração do ácido e tempo) foram significativas a 95% de confiança. A temperatura é a variável que mais afeta a hidrólise do amido, seguido da concentração do ácido e por último o tempo de hidrólise. O efeito da interação entre temperatura e tempo também foi significativo, enquanto que as outras interações de segunda ordem não foram significativas.



**Figura 6.** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a hidrólise do amido.

O modelo foi avaliado pela falta de ajuste, por meio da Análise de Variância (ANOVA), análise de identidade e a análise de distribuição dos resíduos. A análise de identidade foi realizada por meio da regressão linear do gráfico gerado pelos valores medidos e preditos do modelo, como apresentado na Figura 7 e na Tabela 15.



**Figura 7.** Identidade do modelo: análise de regressão entre a absorvância medida e a predita (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste.

**Tabela 15.** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo

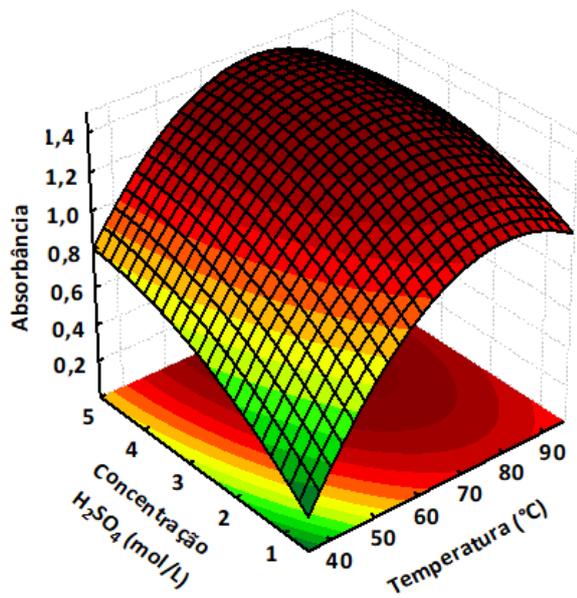
Variável	Valor	
<b>Coeficientes da regressão</b> ( $y = aX + b$ )	<b>a</b>	<b>b</b>
	0,97169	0,03504
<b>Coeficiente de correlação (<math>R^2</math>)</b>	0,9717	

O modelo ajustado apresentou boa correlação entre os valores previstos pelos modelos e os experimentais, sendo o  $R^2$  igual a 0,9717. A ANOVA foi significativa, a falta de ajuste não-significativa e a distribuição dos resíduos aleatória. Diante destes resultados, o modelo foi considerado consistente para a explicação da relação entre a resposta e as variáveis. Os coeficientes do modelo estão expressos na Tabela 16. Os dados completos se encontram no Apêndice C.

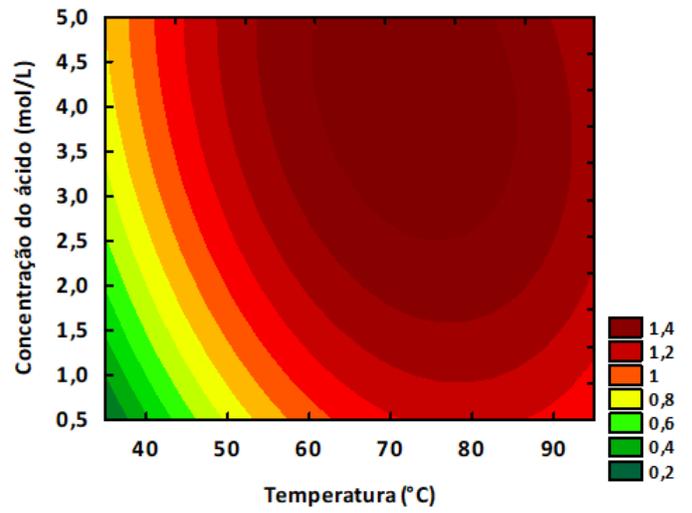
**Tabela 16.** Coeficientes do modelo do teor de carboidratos em função da temperatura (T), concentração do ácido (C) e tempo (t)

Variável	Coeficientes	Erro padrão
<b>Média</b>	1,366256	0,006138
<b>T (L)</b>	0,143815	0,003716
<b>T (Q)</b>	-0,110004	0,003716
<b>C (L)</b>	0,032525	0,003716
<b>C (Q)</b>	-0,030142	0,003716
<b>t (L)</b>	0,098831	0,003715
<b>t (Q)</b>	-0,041360	0,003720
<b>TC</b>	0,007266	0,004854
<b>Tt</b>	-0,030082	0,004852
<b>Ct</b>	0,013750	0,004852

As superfícies de resposta foram geradas e estão apresentadas no Apêndice C. As Figura 8, Figura 9 e Figura 10 apresentam as superfícies de resposta e os gráficos de contorno no tempo de 120 minutos, na concentração de ácido de  $4,0 \text{ mol L}^{-1}$  e na temperatura de  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Nas três figuras, a absorbância foi expressa em função das outras duas variáveis, excetuando a que foi fixada. A hidrólise converte o amido em glicose, que reage com fenol gerando produtos que absorvem luz no comprimento de onda de  $490 \text{ nm}$ , de acordo com o protocolo. Assim, a absorbância do hidrolisado está diretamente ligada à quantidade de amido que sofreu hidrólise e esta foi adotada como a resposta nas análises de otimização.

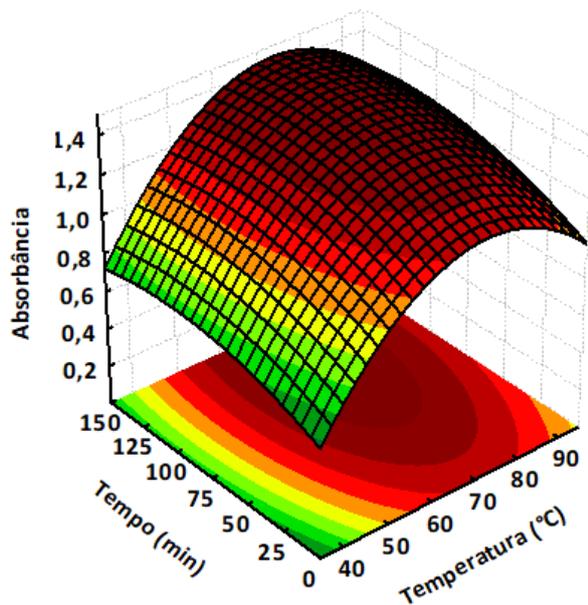


(a)

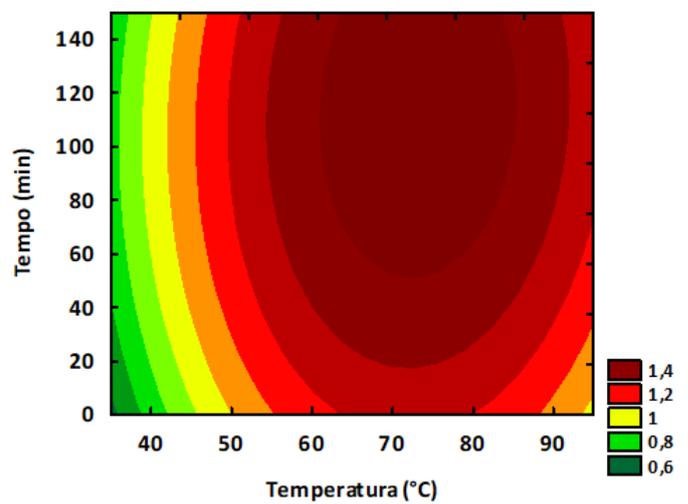


(b)

**Figura 8.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise do amido no tempo de 120 minutos, com absorbância em função da temperatura (°C) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mol L<sup>-1</sup>).

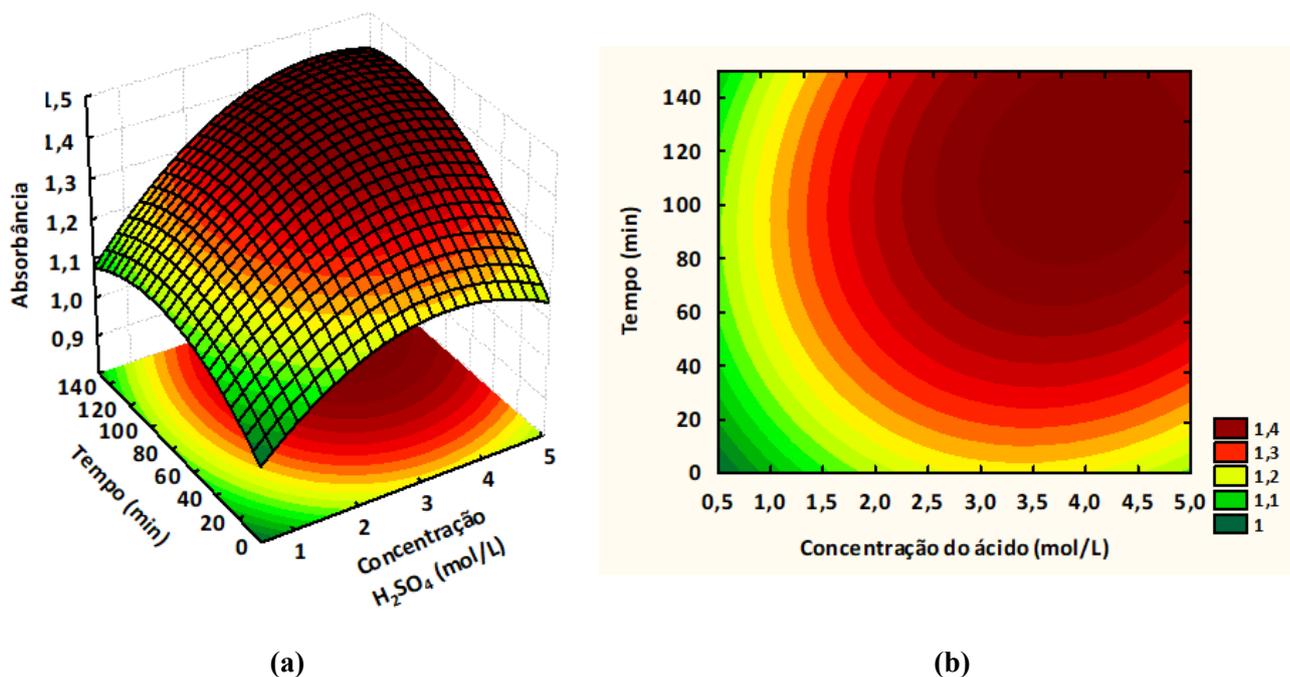


(a)



(b)

**Figura 9.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) da hidrólise do amido na concentração de 4,0 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com absorbância em função do tempo (min) e da temperatura (°C).



**Figura 10.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise do amido na temperatura 80°C, com absorbância em função do tempo (min) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mol L<sup>-1</sup>).

O intervalo de temperaturas em que foram obtidos os maiores teores de carboidratos foi de 70 a 80°C, entre 80 e 120 minutos, e para concentração do ácido sulfúrico acima de 3,0 mol L<sup>-1</sup>. Pela análise gráfica das Figura 8, Figura 9 e Figura 10 foi estabelecido que as condições de hidrólise da biomassa seriam as mesmas da hidrólise do amido, visto que os intervalos que contém o ponto ótimo foram adequadamente delimitados nesse estudo.

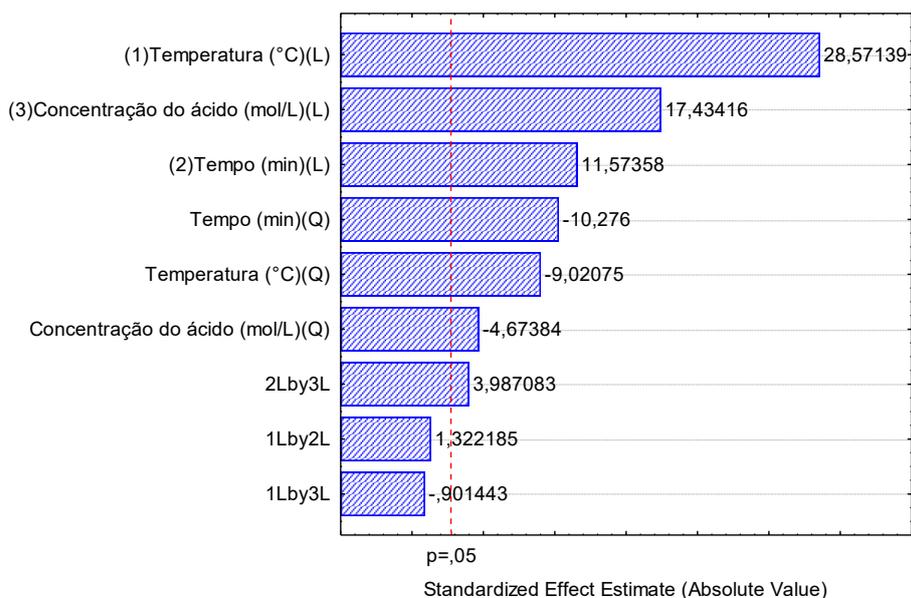
### 5.2.1.2. Hidrólise da biomassa

Os experimentos correspondentes ao Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a hidrólise da biomassa foram executados e as respostas podem ser observadas na Tabela 17.

Os efeitos de cada variável foram calculados e estão apresentados na Figura 11. A análise de significância dos efeitos foi realizada a partir das diferenças estatísticas dos efeitos e dos respectivos erros padrões por meio do teste t a um nível de significância de 5%. Os efeitos das 3 variáveis analisadas (temperatura, concentração do ácido e tempo) foram significativas a 95% de confiança. A temperatura é a variável que mais afeta a hidrólise da biomassa, seguido da concentração do ácido e por último o tempo de hidrólise. O efeito da interação entre concentração do ácido e tempo foi significativo, enquanto que as outras interações de segunda ordem não foram significativas.

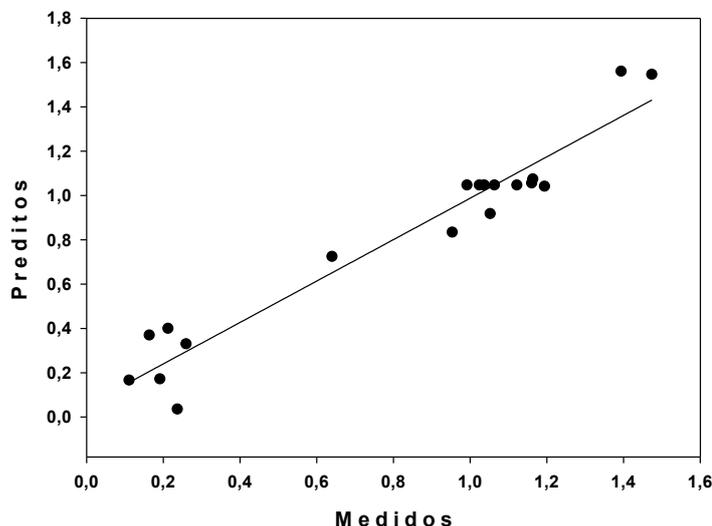
**Tabela 17.** DCCR a 3 variáveis para hidrólise da biomassa

Ensaio	Parâmetro decodificado			Concentração Carboidratos (% m/m)
	Temperatura (°C)	Tempo (s)	[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (mol L <sup>-1</sup> )	
1	40	30	1	6,2
2	40	30	3	4,4
3	40	90	1	2,0
4	40	90	3	12,4
5	70	30	1	19,1
6	70	30	3	24,2
7	70	90	1	24,0
8	70	90	3	24,4
9	29,8	60	2	2,9
10	80,2	60	2	23,5
11	55	9,5	2	3,6
12	55	110	2	20,9
13	55	60	0,30	3,6
14	55	60	3,68	26,2
15	55	60	2	20,4
16	55	60	2	19,4
17	55	60	2	21,4
18	55	60	2	18,6
19	55	60	2	19,7



**Figura 11.** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a hidrólise da biomassa.

O modelo foi avaliado pela falta de ajuste, por meio da Análise de Variância (ANOVA), análise de identidade e a análise de distribuição dos resíduos. A análise de identidade foi realizada por meio da regressão linear do gráfico gerado pelos valores medidos e preditos do modelo, como apresentado na Figura 12 e na Tabela 18.



**Figura 12.** Identidade do modelo: análise de regressão entre a absorvância medida e a predita (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste.

**Tabela 18.** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo

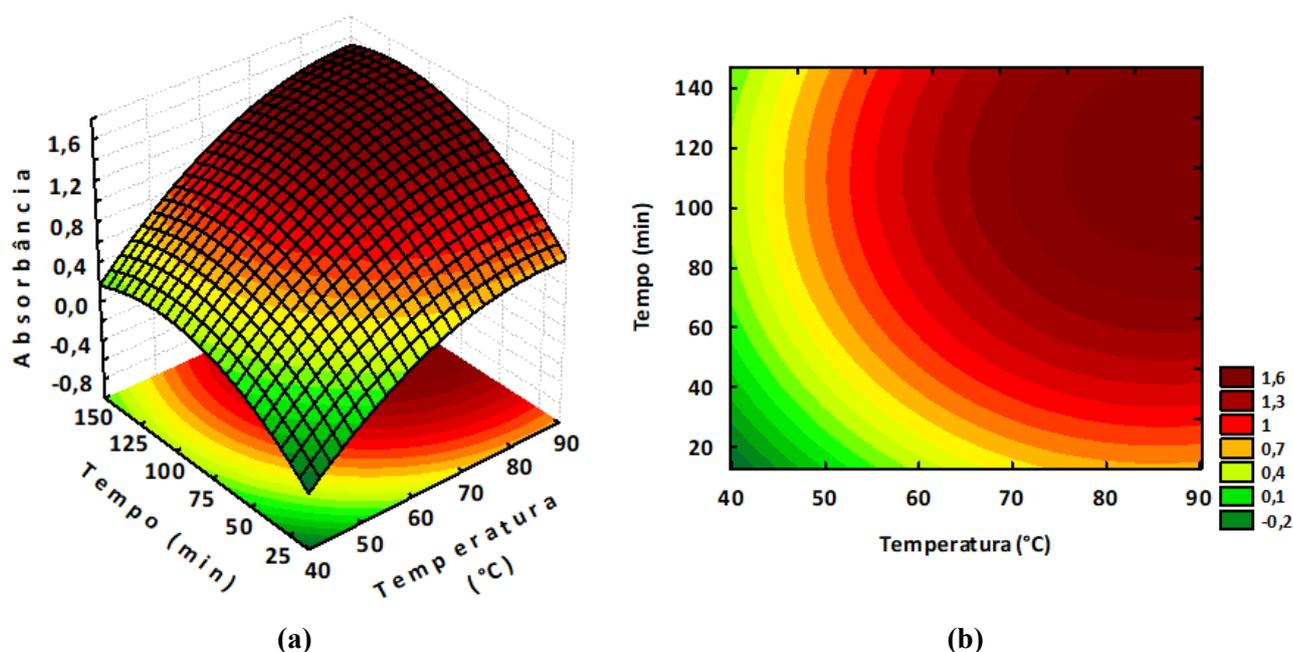
Variável	Valor	
<b>Coeficientes da regressão</b> ( $y = aX + b$ )	<b>a</b>	<b>b</b>
	0,9350	0,0529
<b>Coeficiente de correlação (<math>R^2</math>)</b>	0,9350	

O modelo ajustado apresentou boa correlação entre os valores previstos pelos modelos e os experimentais, sendo o  $R^2$  igual a 0,9350. A ANOVA foi significativa, a falta de ajuste não-significativa e a distribuição dos resíduos aleatória. Diante destes resultados, o modelo foi considerado consistente para a explicação da relação entre a resposta e as variáveis. Os coeficientes do modelo estão expressos na Tabela 19. Os dados completos se encontram no Apêndice C.

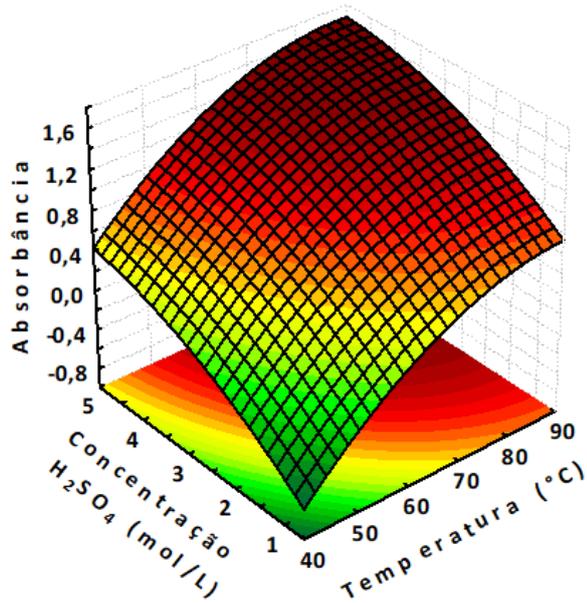
**Tabela 19.** Coeficientes do modelo do teor de carboidratos em função da temperatura (T), concentração do ácido (C) e tempo (t)

Variável	Coeficientes	Erro padrão
Média	1,036773	0,021837
T (L)	0,377805	0,013223
T (Q)	-0,119363	0,013232
C (L)	0,153006	0,013220
C (Q)	-0,135855	0,013221
t (L)	0,230412	0,013216
t (Q)	-0,061848	0,013233
TC	0,022833	0,017269
Tt	-0,015562	0,017263
Ct	0,068830	0,017263

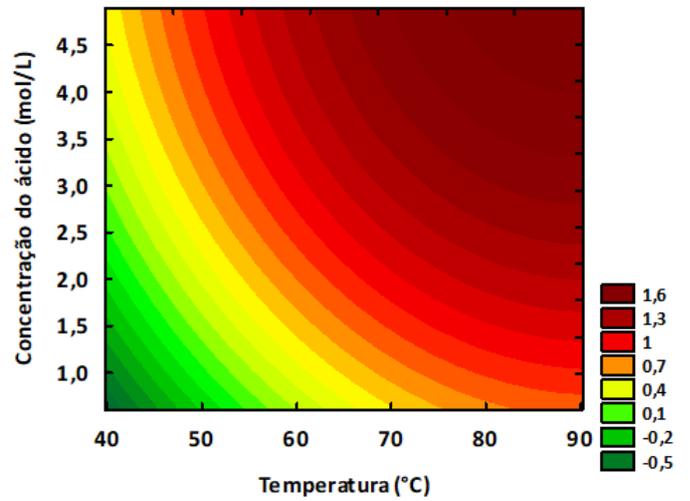
As superfícies de resposta foram geradas e estão apresentadas no Apêndice C. As Figura 13, Figura 14 e Figura 15 expressam as superfícies de resposta e os gráficos de contorno na concentração de ácido de  $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ , no tempo de 120 minutos e na temperatura de  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Nas três figuras, a absorbância foi expressa em função das outras duas variáveis, excetuando a que foi fixada. A hidrólise converte o amido em glicose, que reage com fenol gerando produtos que absorvem luz no comprimento de onda de  $490 \text{ nm}$ , de acordo com o protocolo. Assim, a absorbância do hidrolisado está diretamente ligada à quantidade de amido que sofreu hidrólise e esta foi adotada como a resposta nas análises de otimização.



**Figura 13.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise da biomassa na concentração de  $4,0 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , com absorbância em função do tempo (min) e da temperatura ( $^\circ\text{C}$ ).

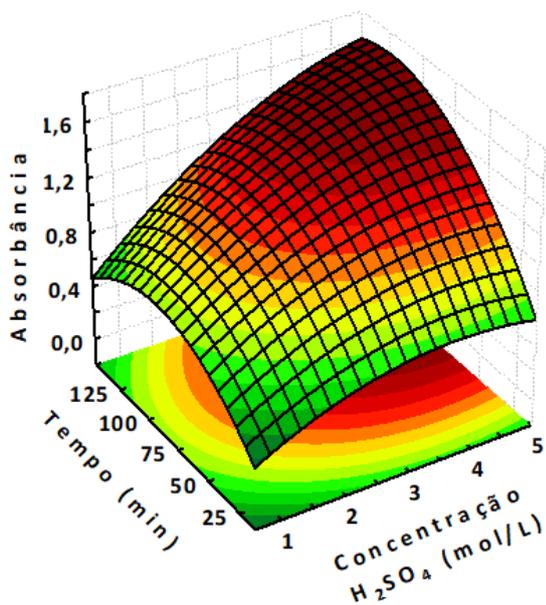


(a)

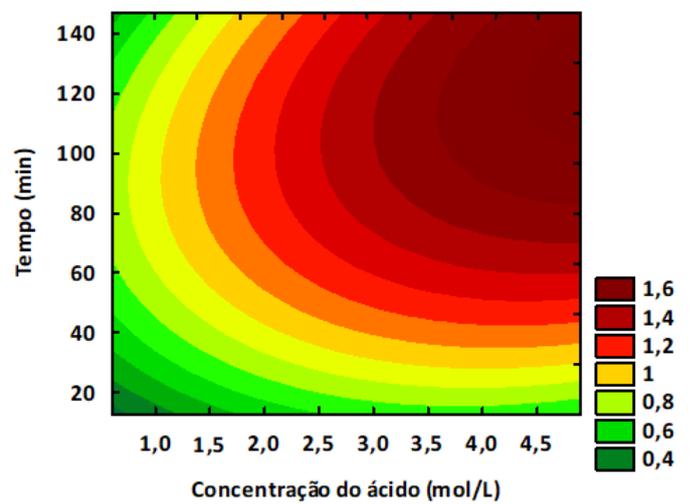


(b)

**Figura 14.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise da biomassa no tempo de 120 minutos, com absorbância em função da temperatura (°C) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mol L<sup>-1</sup>).



(a)



(b)

**Figura 15.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da hidrólise da biomassa na temperatura 80°C, com absorbância em função do tempo (min) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mol L<sup>-1</sup>).

A hidrólise da biomassa, devido à sua complexa composição exigiu condições mais drásticas de rompimento, quando comparado à hidrólise do amido. A região da temperatura em que foram obtidos os maiores teores de carboidratos foi de 80 a 90°C, entre 100 e 120 minutos e concentração do ácido sulfúrico acima de 4,0 mol L<sup>-1</sup>. Assim, pela análise das Figura 13, Figura 14 e Figura 15 e da Tabela 17, estabeleceu-se como condição ótima para a hidrólise da biomassa a temperatura de 90 °C, tempo de 120 min e concentração de ácido de 4,0 mol L<sup>-1</sup>.

Castro et al., (2015) otimizaram as condições de hidrólise de algas de águas residuárias para a produção de açúcares e posterior fermentação. As variáveis analisadas foram a temperatura, a concentração de ácido sulfúrico e tempo de hidrólise. A concentração de ácido sulfúrico variou de 0 a 1,5 mol L<sup>-1</sup>, em intervalo de tempo de 40 a 120 min e temperaturas de 23 a 90 °C. O planejamento experimental realizado foi o fatorial completo. As condições ótimas de hidrólise encontradas foram de concentração de ácido de 1,0 mol L<sup>-1</sup> durante 120 minutos em temperatura na faixa de 80 e 90°C. Os autores consideraram, também, os custos do processo para a definição do ponto ótimo, e concluíram que o ganho de rendimento em temperaturas superiores não justifica o custo energético envolvido.

Rizza et al., (2017) otimizaram as condições de cultivo, de hidrólise e de fermentação da microalga *Desmodesmus* sp. Utilizando as mesmas variáveis de otimização deste estudo, os autores definiram a região ótima para temperatura entre 90 e 120 °C, concentração de ácido entre 2,5 e 3,5 mol L<sup>-1</sup> e tempo de 60 minutos de hidrólise.

Teh et al., (2017) usaram o tratamento de ácido sulfúrico diluído, com aquecimento assistido por micro-ondas para a otimização das condições de hidrólise, onde as variáveis concentração de ácido sulfúrico e temperaturas de reação foram estudadas. O tempo de hidrólise foi fixado em 10 minutos. As temperaturas avaliadas foram de 150 a 170 °C e as concentrações do ácido 0,1 e 0,2 mol L<sup>-1</sup>. As condições otimizadas para a hidrólise foram temperatura de 160 °C e concentração de ácido sulfúrico menor que outras estudos (0,1 mol L<sup>-1</sup>).

Os resultados encontrados neste estudo são coerentes com os encontrados na literatura, para as mesmas condições experimentais. As diferenças são justificadas principalmente porque as microalgas, mesmo que sejam da mesma espécie, variam a sua composição de acordo com as condições de cultivo.

### 5.2.2. Lipídeos

Para consolidar a extração de lipídeos por via úmida foram realizadas otimizações de extração em 3 sistemas de agitação diferentes, sendo eles o tamboramento, a mesa de agitação orbital e o vórtex.

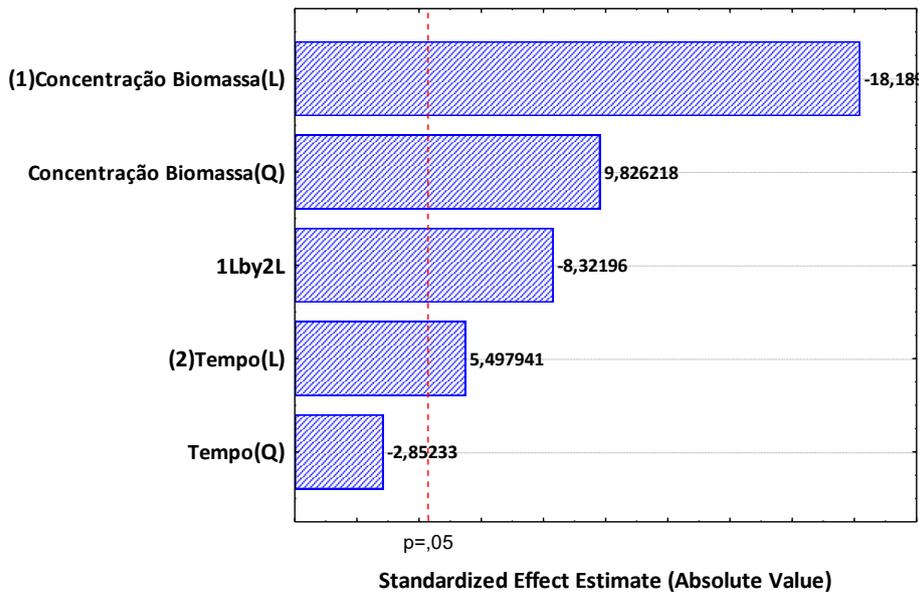
#### 5.2.2.1. Sistema de agitação por tamboramento

Os experimentos correspondentes ao Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a extração de lipídeos no sistema de tamboramento foram executados e as respostas podem ser observadas na Tabela 20.

**Tabela 20.** Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de tamboramento

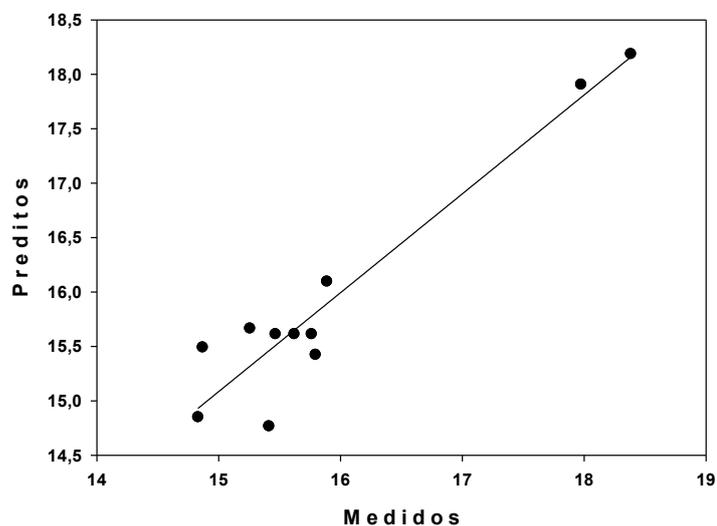
Ensaio	Decodificado		Teor óleo (% m/m)
	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	
1	7,0	20,0	15,888
2	9,0	20,0	15,794
3	7,0	50,0	17,973
4	9,0	50,0	15,412
5	6,6	35,0	18,382
6	9,4	35,0	14,867
7	8,0	13,8	14,830
8	8,0	56,2	15,255
9	8,0	35,0	15,761
10	8,0	35,0	15,465
11	8,0	35,0	15,619

Os efeitos de cada variável foram calculados e estão apresentados na Figura 16. A análise de significância dos efeitos foi realizada a partir das diferenças estatísticas dos efeitos e dos respectivos erros padrões por meio do teste t a um nível de significância de 5%. Os efeitos lineares das 2 variáveis analisadas (teor de biomassa e tempo), o efeito quadrático da concentração de biomassa e o efeito de interação foram significativos a 95% de confiança. A concentração da biomassa é o efeito mais significativo na extração de lipídeos.



**Figura 16.** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de tamboramento.

O modelo foi avaliado pela falta de ajuste, por meio da Análise de Variância (ANOVA), análise de identidade e a análise de distribuição dos resíduos. A análise de identidade foi realizada por meio da regressão linear do gráfico gerado pelos valores medidos e preditos do modelo, como apresentado na Figura 17 e na Tabela 21.



**Figura 17.** Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos.

**Tabela 21.** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo

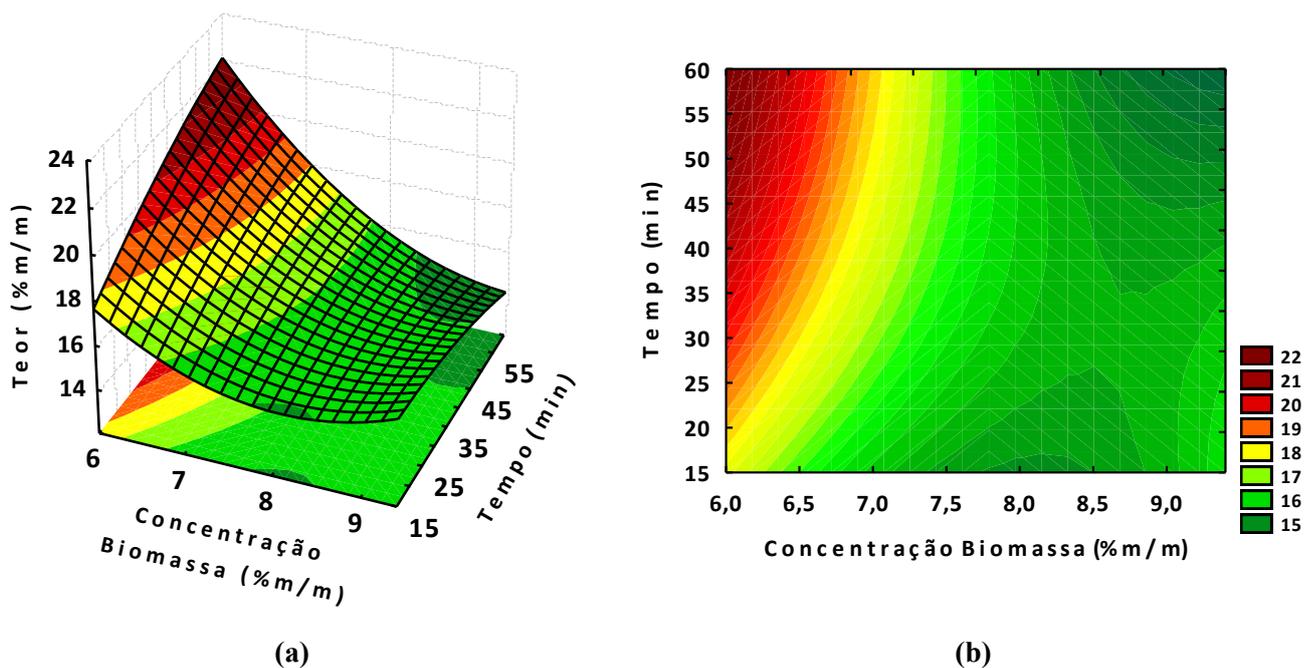
<b>Equação</b> $y = ax + b$	<b>Coeficientes</b>	<b>valor-P</b> <b>(teste t)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>valor-P</b> <b>(ANOVA)</b>	<b>Distribuição</b> <b>dos resíduos</b>
<b>Curva</b>	<b>a</b> 0,9088 ± 0,0960	<0,0001	0,9088	<0,0001	Aleatória
<b>padrão</b>	<b>b</b> 1,4537 ± 1,5329	0,3677			

O modelo ajustado apresentou boa correlação entre os valores previstos pelos modelos e os experimentais, sendo o R<sup>2</sup> igual a 0,9088. A ANOVA foi significativa, a falta de ajuste não-significativa e a distribuição dos resíduos aleatória. Diante destes resultados, o modelo foi considerado consistente para a explicação da relação entre a resposta e as variáveis. Os coeficientes do modelo estão expressos na Tabela 22. Os dados completos se encontram no Apêndice D.

**Tabela 22.** Coeficientes do modelo do teor de lipídeos em função da concentração de biomassa (C) e tempo (t) para o sistema de agitação por tamboramento

	<b>Coeficientes</b>	<b>Erro Padrão</b>
<b>Média</b>	15,61499	0,085573
<b>C (L)</b>	-0,95316	0,052403
<b>C (Q)</b>	0,61288	0,062372
<b>t (L)</b>	0,28811	0,052403
<b>t (Q)</b>	-0,17790	0,062372
<b>Ct</b>	-0,61673	0,074109

O efeito da concentração de biomassa se torna mais significativo com o aumento do tempo (Figura 18). Verifica-se, ainda, que o efeito do tempo se torna mais significativo com a diminuição da concentração de biomassa. A extração neste sistema apresentou maior rendimento em lipídeos para concentrações de biomassa menores, possivelmente devido a transferência de massa entre as fases ser limitada pela quantidade de biomassa presente no sistema ou o tipo de agitação não é o mais adequado para este sistema bifásico. Para este sistema, o nível das variáveis que permite o maior rendimento de lipídeos, dentre os intervalos avaliados, foi de 60 minutos e teor de biomassa de 6%.



**Figura 18.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) da extração de lipídeos no sistema de tamboramento em função do tempo (min) e concentração de biomassa (% m/m).

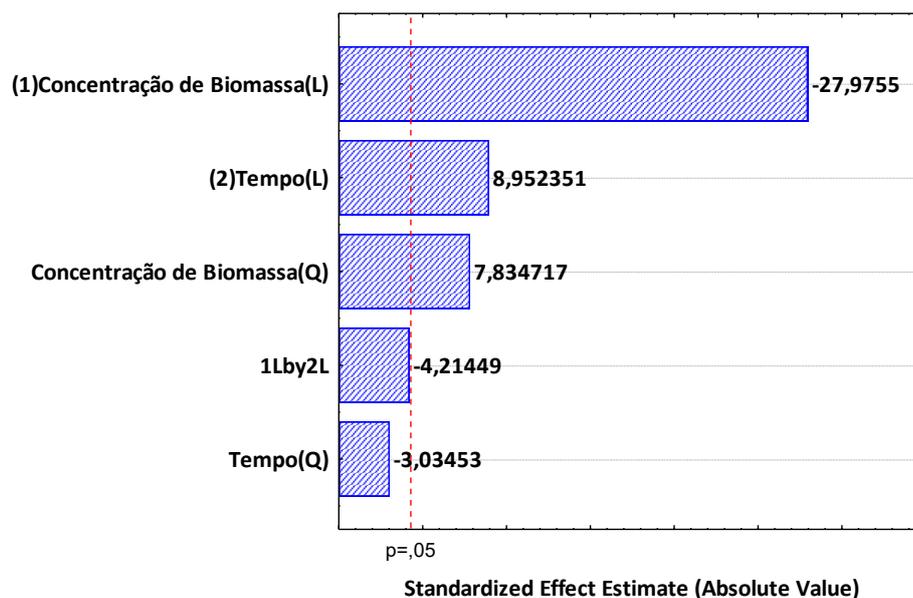
#### 5.2.2.2. Sistema de mesa de agitação orbital

Os experimentos correspondentes ao Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a extração de lipídeos no sistema de agitação orbital foram executados e as respostas podem ser observadas na Tabela 23.

**Tabela 23.** Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de mesa de agitação orbital

Ensaio	Decodificado		Teor óleo (% m/m)
	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	
1	7,0	20,0	17,284
2	9,0	20,0	14,786
3	7,0	50,0	19,807
4	9,0	50,0	15,814
5	6,6	35,0	19,997
6	9,4	35,0	14,668
7	8,0	13,8	15,380
8	8,0	56,2	16,042
9	8,0	35,0	16,189
10	8,0	35,0	16,544
11	8,0	35,0	15,360

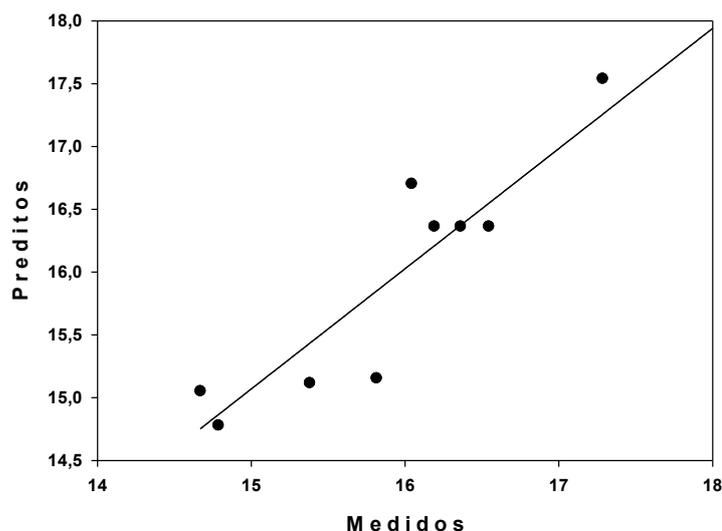
Os efeitos de cada variável foram calculados e estão apresentados na Figura 19. A análise de significância dos efeitos foi realizada a partir das diferenças estatísticas dos efeitos e dos respectivos erros padrões por meio do teste t a um nível de significância de 5%. Os efeitos lineares das 2 variáveis analisadas (concentração da biomassa e tempo) e o efeito quadrático da concentração de biomassa foram significativos a 95% de confiança. Nenhum efeito de interação foi significativo. A concentração da biomassa é o efeito mais significativo na extração de lipídeos.



**Figura 19.** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de mesa agitadora.

O modelo foi avaliado pela falta de ajuste, por meio da Análise de Variância (ANOVA), análise de identidade e a análise de distribuição dos resíduos. A análise de identidade foi realizada por meio da regressão linear do gráfico gerado pelos valores medidos e preditos do modelo, como apresentado na Figura 20 e na Tabela 24.

O modelo ajustado apresentou boa correlação entre os valores previstos pelos modelos e os experimentais, sendo o  $R^2$  igual a 0,957. A ANOVA foi significativa, a falta de ajuste não-significativa e a distribuição dos resíduos aleatória. Diante destes resultados, o modelo foi considerado consistente para a explicação da relação entre a resposta e as variáveis. Os coeficientes do modelo estão expressos na Tabela 25. Os dados completos se encontram no Apêndice D.



**Figura 20.** Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos.

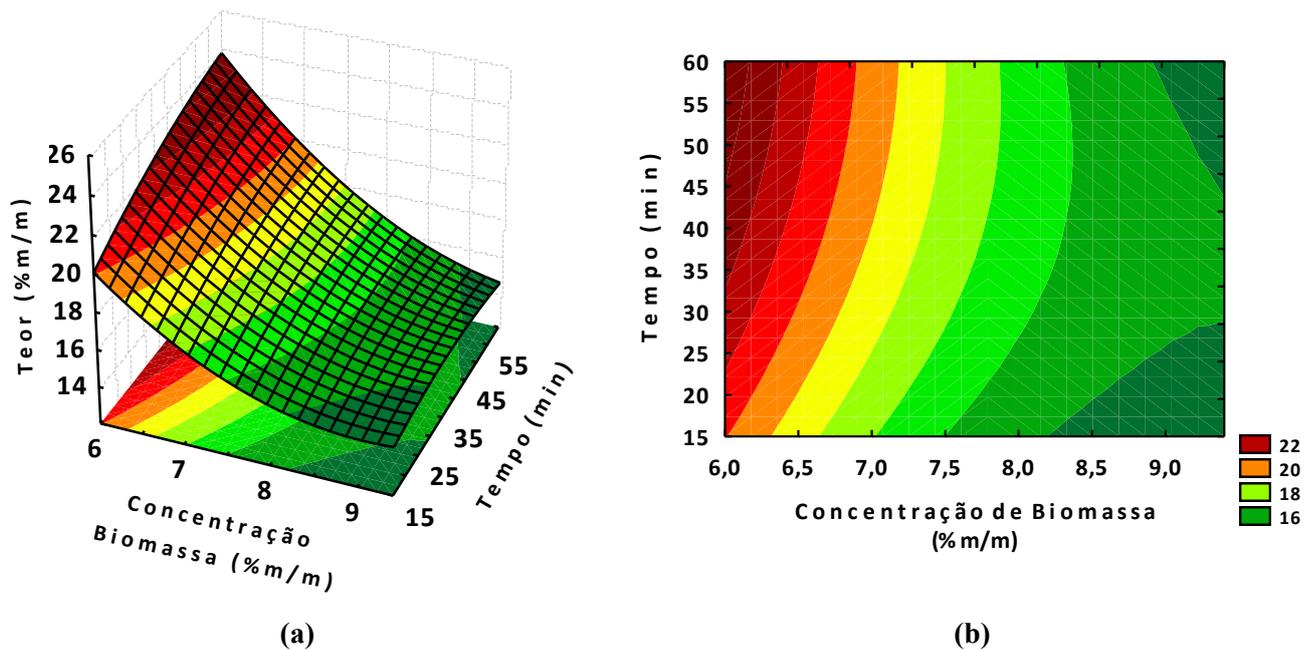
**Tabela 24.** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo

Equação $y = ax + b$	Coeficientes	valor-P (teste t)	R <sup>2</sup>	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos resíduos
Curva	a 0,9570 ± 0,0676	<0,0001	0,957	<0,0001	Aleatória
padrão	b 0,7155 ± 1,1305	0,5426			

**Tabela 25.** Coeficientes do modelo do teor de lipídeos em função da concentração de biomassa (C) e tempo (t) para o sistema de mesa de agitação orbital

	Coeficientes	Erro padrão
<b>Média</b>	16,36411	0,102346
<b>C (L)</b>	-1,75333	0,062674
<b>C (Q)</b>	0,58444	0,074597
<b>t (L)</b>	0,56108	0,062674
<b>t (Q)</b>	-0,22637	0,074597
<b>Ct</b>	-0,37355	0,088634

O efeito da concentração de biomassa se torna mais significativo com o aumento do tempo de extração (Figura 21). O efeito do tempo se torna mais significativo com a diminuição da concentração de biomassa, como também verificado no sistema de extração por tamboramento. Para o sistema de agitação orbital, o nível das variáveis que permite o maior rendimento de lipídeos, nos intervalos avaliados, foi para um teor de biomassa de 6% com 60 minutos de extração.



**Figura 21.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno da extração de lipídeos no sistema de mesa de agitação orbital em função do tempo (min) e concentração de biomassa (% m/m).

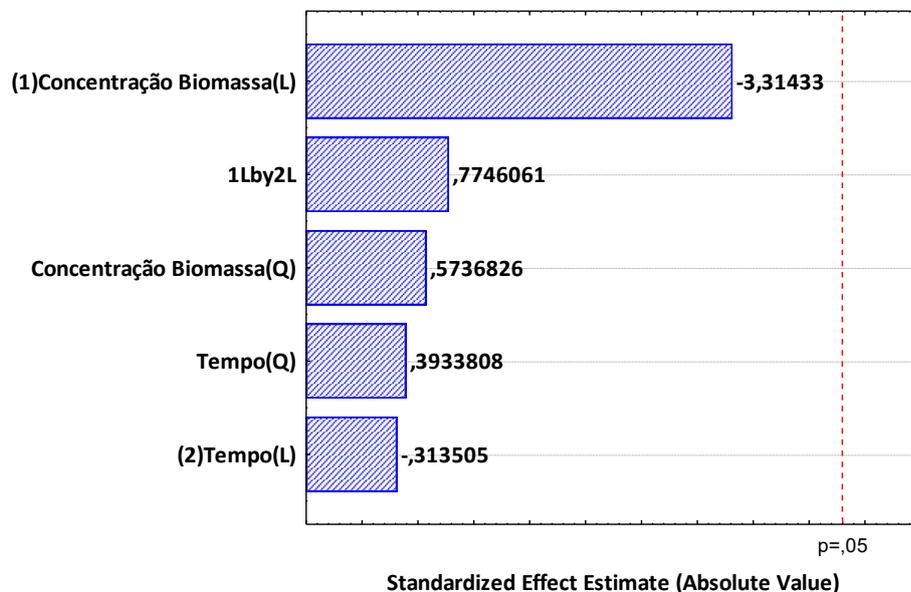
### 5.2.2.3. Sistema de agitação por vórtex

Os experimentos correspondentes ao Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a extração de lipídeos com agitação intensa, em agitador tipo vórtex (TS200, ARSEC, Brasil) foram executados e as respostas podem ser observadas na Tabela 26.

**Tabela 26.** Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de vórtex

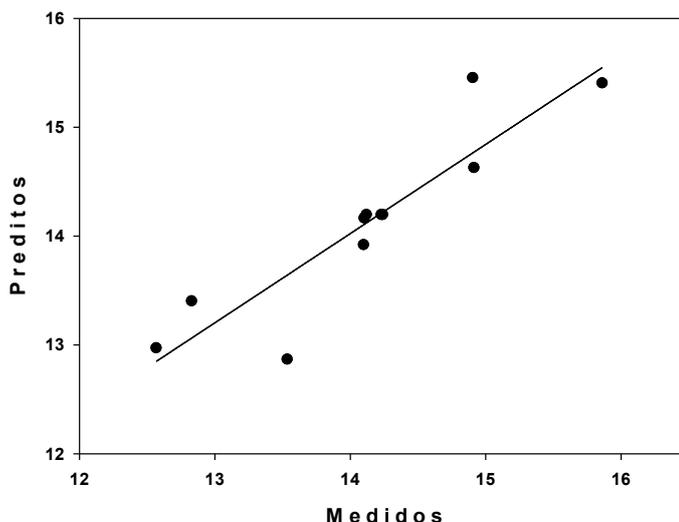
Ensaio	Decodificado		Teor óleo (% m/m)
	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (s)	
1	7	25	15,86
2	9	25	12,57
3	7	55	14,91
4	9	55	12,83
5	6,58	40	14,90
6	9,41	40	13,53
7	8	18,78	14,10
8	8	61,21	14,10
9	8	40	14,23
10	8	40	14,24
11	8	40	14,12

Os efeitos de cada variável foram calculados e estão apresentados na Figura 22. A análise de significância dos efeitos foi realizada a partir das diferenças estatísticas dos efeitos e dos respectivos erros padrões por meio do teste t a um nível de significância de 5%. Os efeitos da concentração da biomassa e do tempo não foram significativos, dentro dos intervalos de nível avaliados



**Figura 22.** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de vórtex.

O modelo foi avaliado pela falta de ajuste, por meio da Análise de Variância (ANOVA), análise de identidade e a análise de distribuição dos resíduos. A análise de identidade foi realizada por meio da regressão linear do gráfico gerado pelos valores medidos e preditos do modelo, como apresentado na Figura 23 e na Tabela 27.



**Figura 23.** Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos.

**Tabela 27.** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo

<b>Equação</b> <b><math>y = ax + b</math></b>	<b>Coeficientes</b>	<b>valor-P</b> <b>(teste t)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>valor-P</b> <b>(ANOVA)</b>	<b>Distribuição</b> <b>dos resíduos</b>
<b>Curva</b>	<b>a</b> 0,8196 ± 0,1282	<0,0001	0,8196	<0,0001	Aleatória
<b>padrão</b>	<b>b</b> 2,5491 ± 1,8145	0,1936			

O modelo ajustado não apresentou boa correlação entre os valores previstos pelos modelos e os experimentais, sendo o R<sup>2</sup> igual a 0,8196. A ANOVA foi não significativa, além de apresentar falta de ajuste. Desta forma, o modelo foi considerado inconsistente para a explicação da relação entre a resposta e as variáveis. Além disso, os teores extraídos foram menores do que os dos outros sistemas avaliados, sendo assim o sistema de agitação por vórtex não foi considerado adequado para a extração de lipídeos. Os dados completos se encontram no Apêndice D.

### 5.2.3. Pigmentos

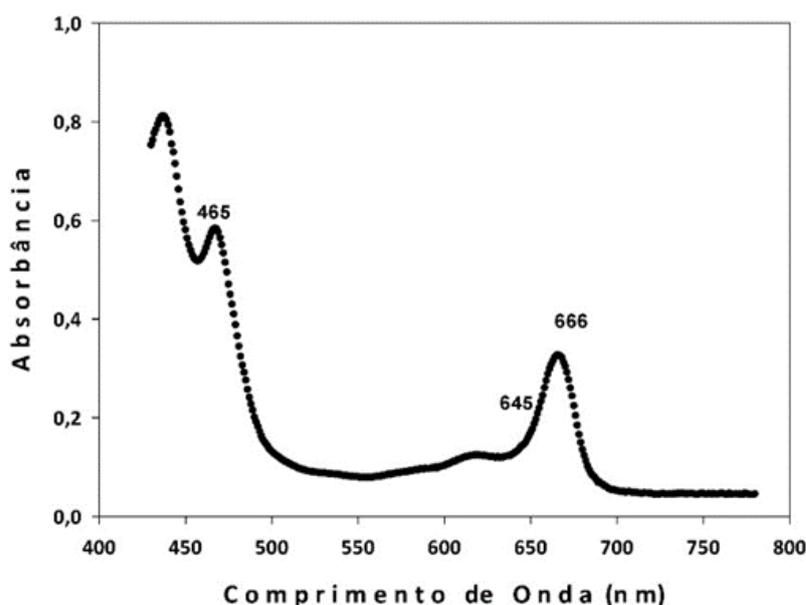
A extração de pigmentos das microalgas é realizada por meio de solventes orgânicos anidros, geralmente etanol ou acetona. A extração de biocompostos a partir de biomassa úmida é objetivo deste trabalho, visto que a secagem da biomassa ainda é considerada economicamente inviável em um contexto atual de biorrefinaria de microalgas. Assim sendo, foi realizado o desenvolvimento de uma metodologia de extração dos pigmentos em biomassa úmida.

A partir de certa quantidade de suspensão da biomassa foi adicionada outra quantidade de etanol, resultando em soluções alcoólicas em diversas frações. A extração dos pigmentos em soluções compostas por água e etanol em diferentes frações foi executada e os resultados podem ser observados na Tabela 28.

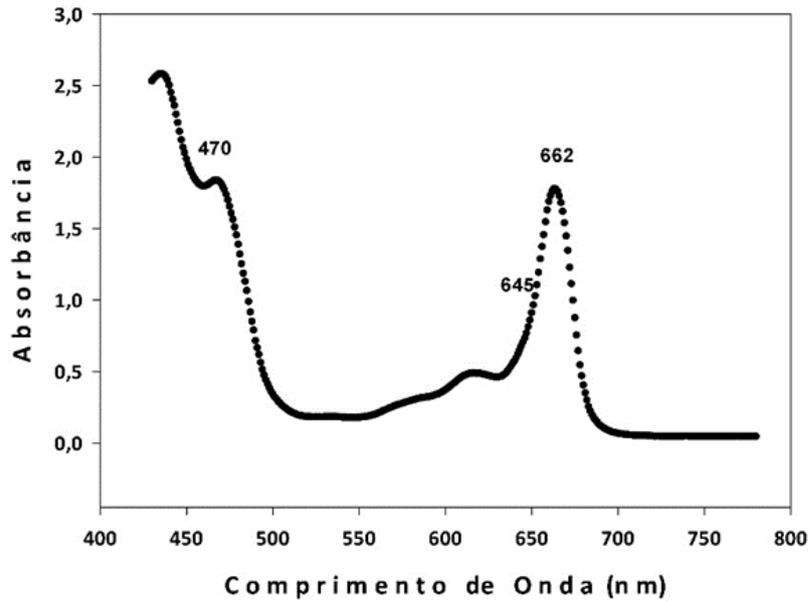
**Tabela 28.** Teor, em mg g<sup>-1</sup>, de pigmentos fotossintéticos a partir de soluções alcoólicas em diferentes frações

Fração de Etanol	Carotenóides	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total
<b>0</b>	0,0087 ± 0,0004	0,0044 ± 0,0003	0,0072 ± 0,0005	0,0116 ± 0,0008
<b>0,2</b>	0,0330 ± 0,0025	0,0543 ± 0,0059	0,0293 ± 0,0026	0,0837 ± 0,0085
<b>0,3</b>	0,0783 ± 0,0045	0,1545 ± 0,0095	0,0772 ± 0,0046	0,2316 ± 0,0140
<b>0,4</b>	0,0558 ± 0,0028	0,1623 ± 0,0072	0,0639 ± 0,0031	0,2263 ± 0,0103
<b>0,5</b>	0,2107 ± 0,0085	0,3015 ± 0,0054	0,0941 ± 0,0022	0,3956 ± 0,0076
<b>0,6</b>	0,8382 ± 0,0179	0,9030 ± 0,0275	0,3680 ± 0,0115	1,2710 ± 0,0389
<b>0,7</b>	2,2862 ± 0,0105	3,8817 ± 0,0328	1,4508 ± 0,0100	5,3325 ± 0,0422
<b>0,8</b>	3,0195 ± 0,0614	7,0106 ± 0,1081	2,0829 ± 0,0209	9,0935 ± 0,3979
<b>0,9</b>	3,1369 ± 0,1027	7,3696 ± 0,2267	2,3040 ± 0,0500	9,6736 ± 0,8750
<b>1,0</b>	3,1698 ± 0,0112	7,0936 ± 0,0377	2,3906 ± 0,0312	9,4842 ± 0,5551

Os picos de absorbância máxima dos pigmentos foram afetados tanto em intensidade quanto em sua posição no espectro em função da quantidade de etanol utilizado. Foram geradas as curvas de absorção espectral para todas as soluções alcoólicas descritas na Tabela 28 para a verificação dos picos. Da composição de 0 a 50% de etanol o pico dos carotenóides migrou de 470 para 465 nm e o da clorofila de 662 para 666 nm (Figura 24). Da composição de 60 a 100% os picos foram coerentes com a literatura (HYNSTOVA et al., 2018), sendo o espectro obtido apresentado na Figura 25. Todos os gráficos referentes as concentrações de etanol utilizadas são apresentados no Apêndice C.

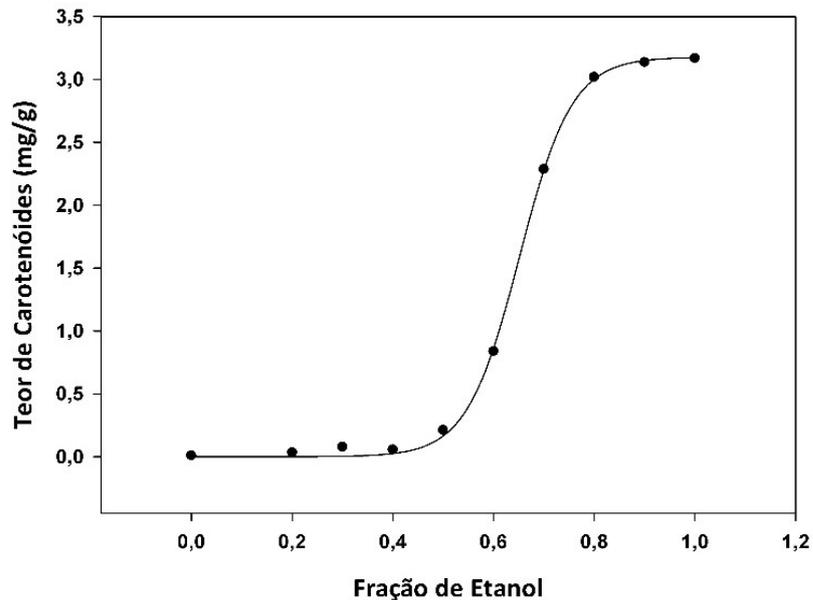


**Figura 24.** Espectro de absorção do extrato de pigmentos em solução alcoólica 50 % etanol.

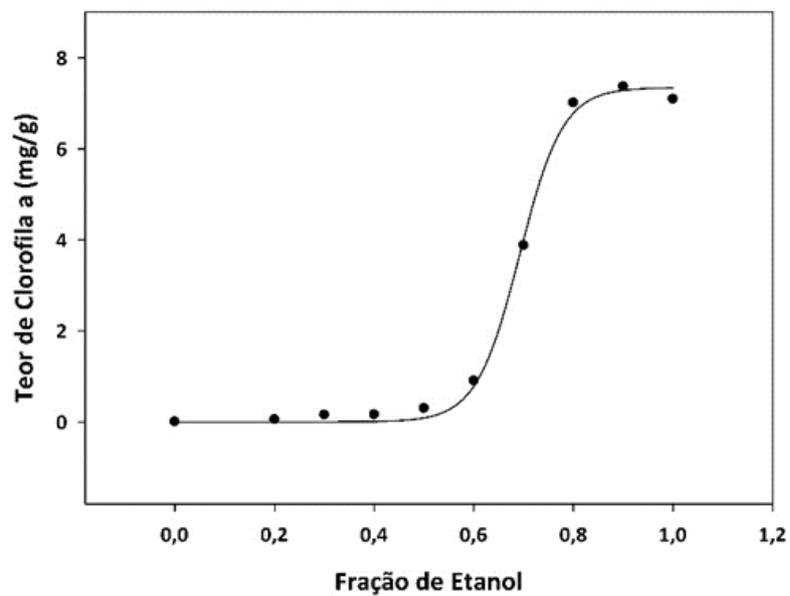


**Figura 25.** Espectro de absorção do extrato de pigmentos em solução alcoólica 90 % etanol.

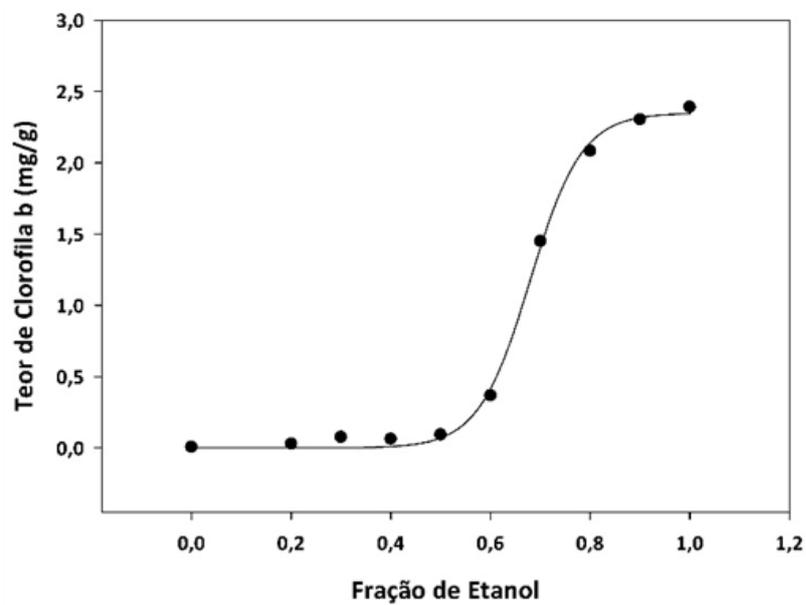
A partir dos dados da Tabela 28 foram construídos gráficos representados pelas Figura 26, Figura 27, Figura 28 e Figura 29 que expressaram, respectivamente o teor de carotenóides, clorofila a, clorofila b e clorofila total em função da fração de etanol.



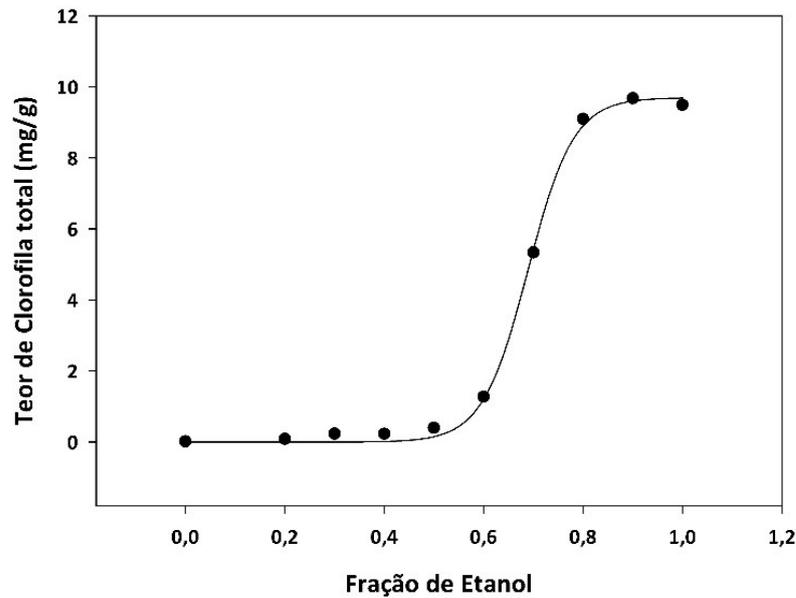
**Figura 26.** Variação dos teores de carotenóides extraídos em função da fração em volume de etanol.



**Figura 27.** Variação dos teores de clorofila a extraídos em função da fração em volume de etanol.



**Figura 28.** Variação dos teores de clorofila b extraídos em função da fração em volume de etanol.



**Figura 29.** Variação dos teores de clorofila total extraídos em função da fração em volume de etanol.

Das Figura 26, Figura 27, Figura 28 e Figura 29 pode-se verificar que, tanto para os carotenóides quanto para as clorofilas, o teor de pigmentos extraídos em função da fração de etanol apresentou comportamento sigmoidal. Considerando o aumento gradual da fração de etanol, têm-se que teor de pigmentos presente nos extratos é praticamente nulo até a fração em volume de 50% de etanol em água. A partir de 60%, o teor aumenta exponencialmente até a fração de 80%, onde o teor fica estacionário até a fração de 100%.

Os modelos sigmoidais foram gerados por meio de regressões não-lineares. Para a validação do modelo foram realizados testes t a 5% para a significância dos coeficientes, bem como a ANOVA e a análise de distribuição dos resíduos. Estes dados da análise de regressão estão expressos na Tabela 29.

**Tabela 29.** Análise da regressão do teor de pigmentos em função da fração de etanol

Pigmento	Equação	Coeficientes			valor-P (teste t)	R <sup>2</sup>	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos Resíduos
Carotenóides	$y = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{b}}}$	a	3,1776	± 0,0271	<0,0001	0,9994	<0,0001	Aleatória
		b	0,0522	± 0,0021	<0,0001		<0,0001	
		x <sub>0</sub>	0,6515	± 0,0026	<0,0001		<0,0001	
Clorofila a	$y = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{b}}}$	a	7,3440	± 0,1323	<0,0001	0,9975	<0,0001	Aleatória
		b	0,0433	± 0,0044	<0,0001		<0,0001	
		x <sub>0</sub>	0,6921	± 0,0046	<0,0001		<0,0001	
Clorofila b	$y = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{b}}}$	a	2,3492	± 0,0393	<0,0001	0,9979	<0,0001	Aleatória
		b	0,0517	± 0,0041	<0,0001		<0,0001	
		x <sub>0</sub>	0,6794	± 0,0047	<0,0001		<0,0001	
Clorofila total	$y = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{b}}}$	a	9,6954	± 0,1362	<0,0001	0,9985	<0,0001	Aleatória
		b	0,0458	± 0,0034	<0,0001		<0,0001	
		x <sub>0</sub>	0,6889	± 0,0037	<0,0001		<0,0001	

Pelos resultados de extração de pigmentos, pode-se afirmar que a partir de uma suspensão aquosa de biomassa a 10 % (m/v) de concentração, o uso de uma solução de 80 % em volume de etanol permite a extração de 96 % dos pigmentos (carotenóides e clorofilas), em relação a quantidade extraída com o etanol anidro e biomassa seca. Este resultado permite concluir ainda que a biorrefinaria de microalgas para extração de pigmentos por via úmida possui viabilidade técnica.

### 5.3. Validação como indicador de rompimento celular

A validação de cada indicador de rompimento celular foi realizada por meio da execução dos protocolos descritos nas 5 amostras de biomassas que possuíam níveis de rompimento distintos. A relação entre o nível de rompimento e cada teor avaliado indicou quais foram os potenciais indicadores de rompimento celular mecânico.

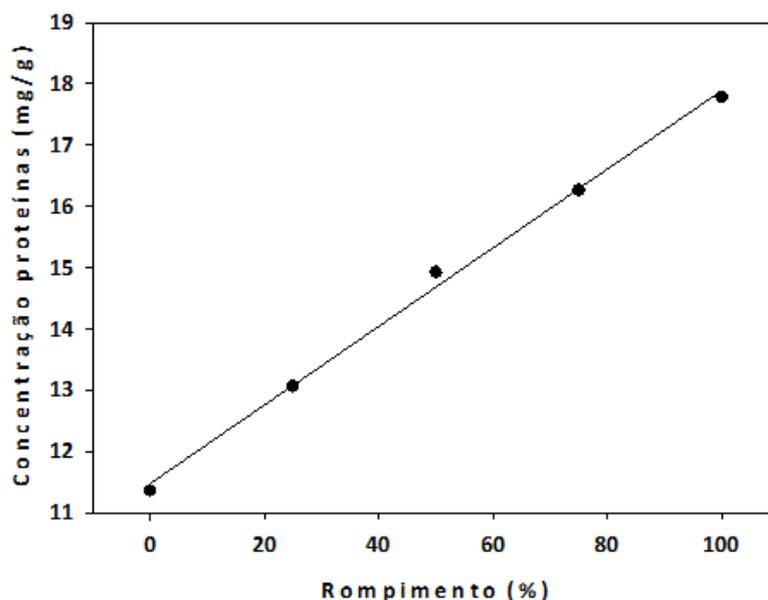
#### 5.3.1. Teor de proteínas solúveis

O espectro de absorção de luz dos produtos da reação de Bradford foi gerado para a verificação do(s) pico(s) de absorbância. O comprimento de onda de 595 nm, presente no protocolo descrito por Bradford, encontrou-se na região de máxima absorvidade da luz e foi escolhido para determinação do teor de proteínas da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003.

Os teores de proteínas das amostras com níveis de rompimento distintos são apresentados na Tabela 30. A Figura 30 apresenta um gráfico de dispersão e ajuste dos dados do teor de proteínas solúveis em função do nível de rompimento celular.

**Tabela 30.** Absorbância, concentração e teor do extrato de proteínas solúveis a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular

Rompimento	Teor (mg/g)
0%	11,361 ± 0,561
25%	13,671 ± 0,541
50%	14,927 ± 0,356
75%	16,269 ± 0,095
100%	17,788 ± 0,137



**Figura 30.** Dispersão dos dados de concentração de proteínas em função do nível de rompimento.

Os ajustes dos dados da curva padrão e da validação do teor de proteínas como indicador de rompimento foram realizados por meio de regressões lineares. A análise das regressões foi realizada por meio de um teste t (95%) de significância dos coeficientes do modelo, pela análise de variância da regressão (ANOVA) e pela distribuição dos resíduos. A Tabela 31 apresenta os dados da análise do modelo.

**Tabela 31.** Análise das regressões lineares da curva padrão de BSA e do teor de proteínas em função do nível de rompimento

Equação $y = ax + b$		Coeficientes		valor-P (teste t)	R <sup>2</sup>	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos resíduos
<b>Curva padrão</b>	<b>a</b>	0,0015	± 7,1E-5	<0,0001	0,9914	<0,0001	Aleatória
	<b>b</b>	0,3153	± 0,0172	<0,0001			
<b>Validação Indicador</b>	<b>a</b>	0,0642	± 0,0021	<0,0001	0,9968	<0,0001	Aleatória
	<b>b</b>	11,4703	± 0,1293	<0,0001			

Os coeficientes do modelo da curva padrão e da relação entre rompimento celular e teor de proteínas solúveis foram significativos a um nível de confiança de 95%. Além disso, o coeficiente de correlação foi alto (acima de 0,99) e a distribuição dos resíduos foi aleatória. A ANOVA também foi realizada e foi significativa a 95% de confiança.

Diante destes resultados, a curva gerada foi utilizada para a avaliação dos teores de proteínas na biomassa e a concentração de proteínas presente na fase aquosa (sobrenadante) da suspensão de biomassa pode ser utilizada como indicador de rompimento celular mecânico, visto a relação linear significativa entre o nível de rompimento e a concentração de proteínas no meio extracelular.

O espectro de absorção de luz dos produtos reacionais de Bradford, as tabelas com os dados completos da curva padrão e das análises, os gráficos de dispersão de dados e distribuição dos resíduos, além dos dados de testes de significância dos coeficientes da regressão e da ANOVA da regressão se encontram no Apêndice B.

### 5.3.2. Teor de carboidratos solúveis

O espectro de absorção de luz dos produtos reacionais do protocolo foi gerado para a verificação dos picos de absorbância. O comprimento de onda de 490 nm resultou na maior absorção da luz e foi escolhido para determinação do teor de carboidratos da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003.

O ajuste dos dados da curva padrão de glicose foi realizado por meio de regressões lineares. A análise das regressões foi realizada por meio de um teste t (95%) de significância dos coeficientes do modelo, pela análise de variância da regressão (ANOVA) e pela distribuição dos resíduos. A Tabela 32 apresenta os dados da análise dos modelos.

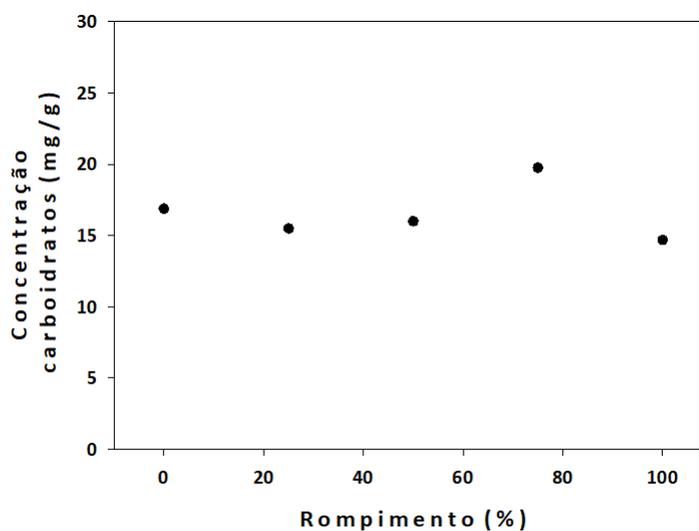
**Tabela 32.** Coeficientes da regressão linear da curva padrão de glicose

Equação $y = ax + b$	Coeficientes	valor-P (teste t)	R <sup>2</sup>	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos resíduos
Curva padrão	a 0,0058 ± 8,92E-5 b 0,0241 ± 0,0174	<0,0001 <0,0001	0,9979	<0,0001	Aleatória

Os teores de carboidratos das amostras com níveis de rompimento distintos estão descritos na Tabela 33. A Figura 31 apresenta um gráfico de dispersão dos dados do teor de carboidratos em função do nível de rompimento celular.

**Tabela 33.** Absorbância, concentração e teor do extrato de carboidratos solúveis a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular

Rompimento	Absorbância 490 nm	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Teor (mg g <sup>-1</sup> )
0%	0,456 ± 0,004	295,441 ± 2,508	16,860 ± 0,153
25%	0,419 ± 0,005	270,393 ± 3,720	15,481 ± 0,221
50%	0,438 ± 0,018	283,266 ± 12,003	15,989 ± 0,650
75%	0,526 ± 0,024	343,604 ± 16,217	19,741 ± 0,941
100%	0,399 ± 0,012	256,738 ± 8,374	14,681 ± 0,449



**Figura 31.** Dispersão dos dados de concentração de carboidratos em função do nível de rompimento.

A análise da Figura 31 permite afirmar que o teor de carboidratos solúveis é independente do nível de rompimento celular, isto é, esse conteúdo celular não é adequado para ser utilizado como indicador de rompimento celular. O teor de carboidratos foi estatisticamente idêntico para os pontos de 0, 25, 50 e 100 % de rompimento, sendo diferente apenas no ponto de 75%. Assim, sugere-se que os carboidratos intracelulares solúveis são completamente permeáveis na membrana celular, visto que a extração dos mesmos é independente do rompimento. O ponto de 75 % de rompimento possuiu um teor superior, mas esta diferença pode ser atribuída ao erro experimental.

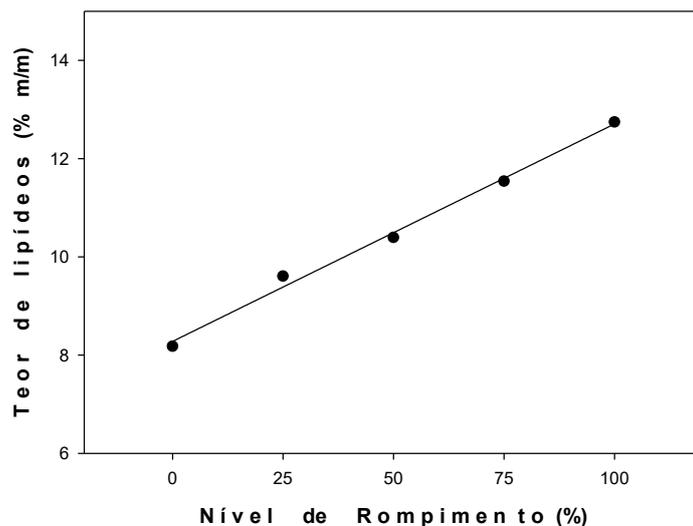
O espectro de absorção de luz dos produtos reacionais, as tabelas com os dados completos da curva padrão e das análises, os gráficos de dispersão de dados e distribuição dos resíduos, além dos dados de testes de significância dos coeficientes da regressão e da ANOVA da regressão se encontram no Apêndice C.

### 5.3.3. Teor de lipídeos

Os teores de lipídeos das amostras com níveis de rompimento distintos estão expressos na Tabela 34. A Figura 32 expressa um gráfico de dispersão dos dados do teor de lipídeos em função do nível de rompimento celular.

**Tabela 34.** Teor de lipídeos a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular

<b>Rompimento</b>	<b>Teor de Lipídeos (%m/m)</b>
<b>0%</b>	8,18 ± 0,19
<b>25%</b>	9,61 ± 0,20
<b>50%</b>	10,39 ± 0,21
<b>75%</b>	11,54 ± 0,30
<b>100%</b>	12,74 ± 0,34



**Figura 32.** Dispersão dos dados do teor de lipídeos em função do nível de rompimento.

O ajuste dos dados do teor de lipídeos em função do nível de rompimento foi realizado por meio de regressões lineares. A análise das regressões foi realizada por meio de um teste t (95%) de significância dos coeficientes do modelo, pela análise de variância da regressão (ANOVA) e pela distribuição dos resíduos. A Tabela 35 apresenta os dados da análise dos modelos.

**Tabela 35.** Análise da regressão linear do teor de lipídeos em função do nível de rompimento

Equação $y = ax + b$	Coefficientes	valor-P (teste t)	R <sup>2</sup>	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos resíduos
Curva	a 0,0443 ± 0,0020	<0,0001	0,9941	<0,0001	Aleatória
padrão	b 8,2790 ± 0,1209	0,0002			

A Figura 32 mostra que a relação entre o teor de lipídeos e o nível de rompimento é linear. Este fato é confirmado na Tabela 35, tendo em vista que os coeficientes do modelo do linear foram significativos a um nível de confiança de 95%, o coeficiente de correlação acima de 0,99, a ANOVA foi significativa e a distribuição dos resíduos foi aleatória.

Assim, é possível concluir que o teor de lipídeos da suspensão de biomassa pode ser utilizado como indicador de rompimento celular mecânico. Níveis crescentes de rompimento celular permitem a extração de lipídeos com maior efetividade e, por conseguinte, obtêm-se teores mais altos desse conteúdo celular.

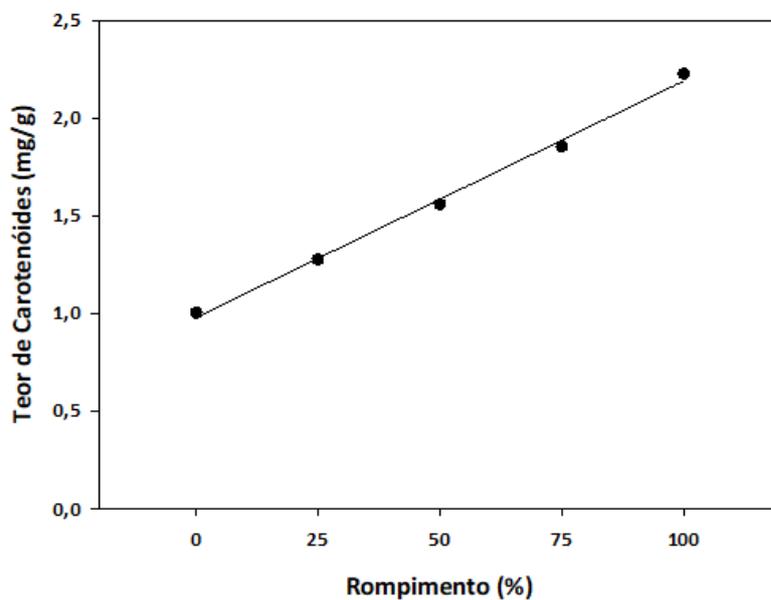
As tabelas com os dados completos da curva padrão e das análises, os gráficos de dispersão de dados e distribuição dos resíduos, além dos dados de testes de significância dos coeficientes da regressão e da ANOVA da regressão se encontram no Apêndice D.

### 5.3.4. Teor de pigmentos

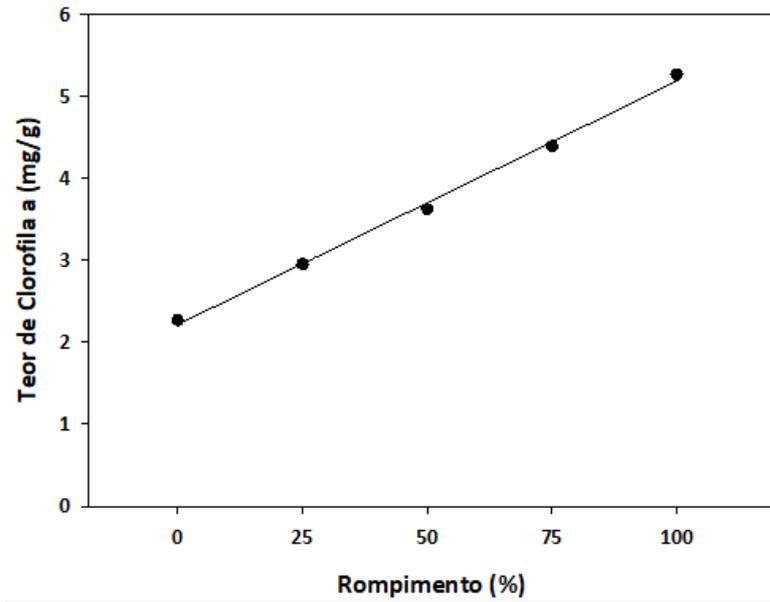
Os teores de carotenóides, clorofila a, clorofila b e clorofila total das amostras com níveis de rompimento distintos estão expressos na Tabela 36. As Figura 33, Figura 34, Figura 35 e Figura 36 expressam os gráficos de dispersão e ajuste dos dados do teor de carotenóides, clorofila a, clorofila b e clorofila total em função do nível de rompimento celular, respectivamente.

**Tabela 36.** Concentração de pigmentos fotossintéticos a partir da biomassa em distintos níveis de rompimento celular

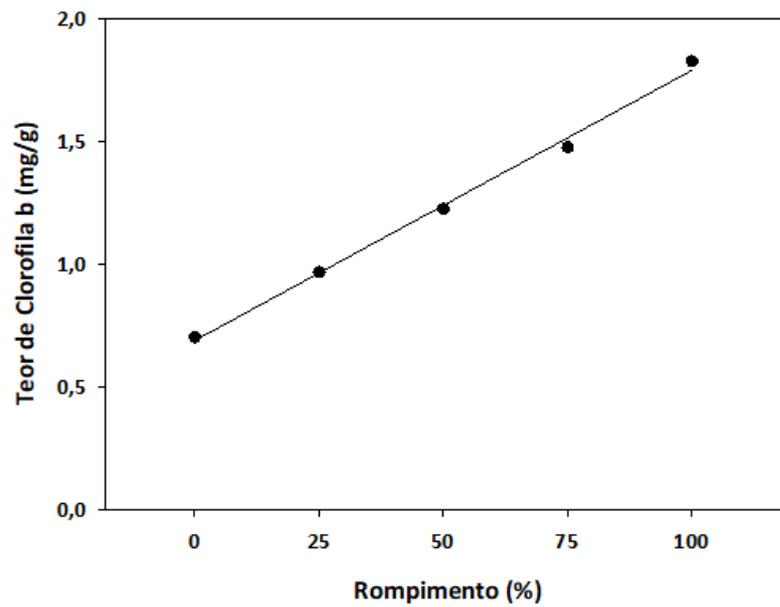
Rompimento	Carotenóides (mg g <sup>-1</sup> )	Clorofila a (mg g <sup>-1</sup> )	Clorofila b (mg g <sup>-1</sup> )	Clorofila Total (mg g <sup>-1</sup> )
0%	1,003 ± 0,013	2,271 ± 0,030	0,702 ± 0,014	2,973 ± 0,043
25%	1,277 ± 0,059	2,955 ± 0,166	0,967 ± 0,049	3,922 ± 0,211
50%	1,559 ± 0,021	3,623 ± 0,047	1,224 ± 0,015	4,847 ± 0,063
75%	1,855 ± 0,015	4,392 ± 0,000	1,475 ± 0,019	5,867 ± 0,019
100%	2,227 ± 0,051	5,264 ± 0,115	1,825 ± 0,049	7,090 ± 0,164



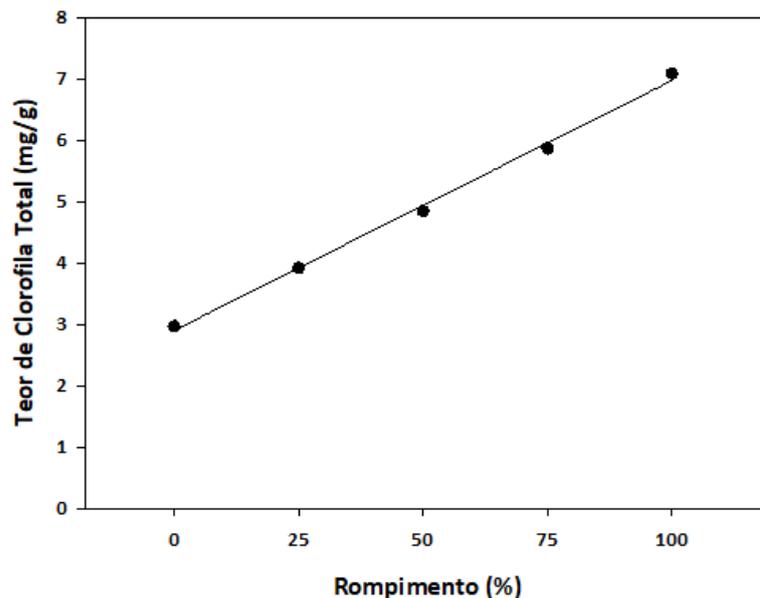
**Figura 33.** Dispersão dos dados do teor de carotenóides em função do nível de rompimento.



**Figura 34.** Dispersão dos dados do teor de clorofila a em função do nível de rompimento.



**Figura 35.** Dispersão dos dados do teor de clorofila b em função do nível de rompimento.



**Figura 36.** Dispersão dos dados do teor de clorofila total em função do nível de rompimento.

Os ajustes dos dados da curva padrão e da validação do teor de pigmentos como indicador de rompimento foram realizados por meio de regressões lineares. A análise das regressões foi realizada por meio de um teste t (95%) de significância dos coeficientes do modelo, pela análise de variância da regressão (ANOVA) e pela distribuição dos resíduos. A Tabela 37 apresenta os dados da análise do modelo.

**Tabela 37.** Análise da regressão linear da validação dos teores de pigmentos como indicadores de rompimento celular

Equação $y = ax + b$	Coeficientes		valor-P (teste t)	$R^2$	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos resíduos
<b>Carotenóides</b>	<b>a</b>	0,0121 ± 0,0004	<0,0001	0,9960	<0,0001	Aleatória
	<b>b</b>	0,9792 ± 0,0272	<0,0001			
<b>Clorofila a</b>	<b>a</b>	0,0297 ± 0,0010	<0,0001	0,9967	<0,0001	Aleatória
	<b>b</b>	2,2164 ± 0,0599	<0,0001			
<b>Clorofila b</b>	<b>a</b>	0,0110 ± 0,0004	<0,0001	0,9957	<0,0001	Aleatória
	<b>b</b>	0,6878 ± 0,0255	<0,0001			
<b>Clorofila total</b>	<b>a</b>	0,0407 ± 0,0014	<0,0001	0,9967	<0,0001	Aleatória
	<b>b</b>	2,9042 ± 0,0833	<0,0001			

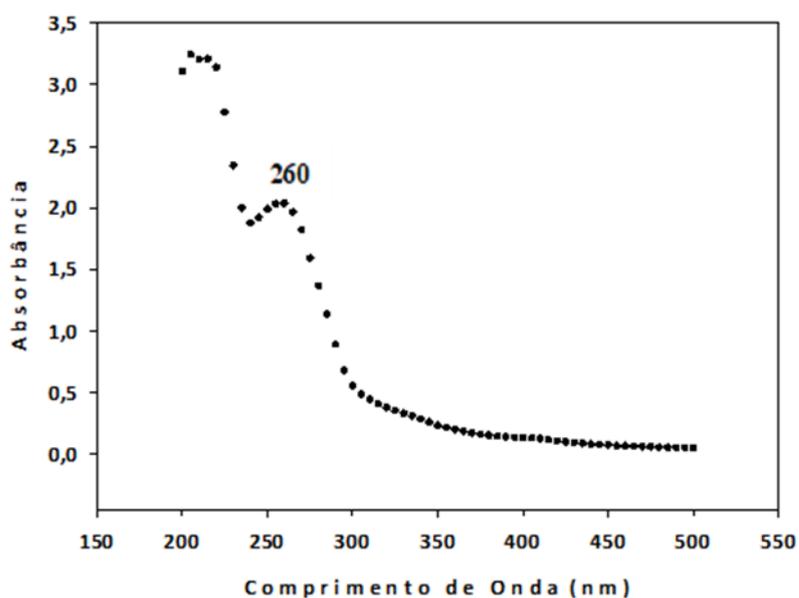
Os resultados da relação dos teores de pigmentos em função do nível de rompimento celular indicam que os teores de carotenóides, clorofila a, clorofila b e clorofila total são indicadores de rompimento celular. Esta conclusão foi ratificada pela significância dos coeficientes da relação entre rompimento celular e os teores de cada pigmento a um nível de

confiança de 95%. Além disso, o coeficiente de correlação de cada modelo foi acima de 0,99 e a distribuição dos resíduos foi aleatória. A ANOVA também foi realizada para cada modelo, sendo significativa a 95% de confiança.

As tabelas com os dados completos das análises realizadas, incluindo os gráficos de dispersão de dados e distribuição dos resíduos, além dos dados de testes de significância dos coeficientes da regressão e da ANOVA da regressão se encontram no Apêndice E.

### 5.3.5. Teor de compostos nitrogenados

Compostos nitrogenados geralmente absorvem na região do espectro de luz correspondente ao ultravioleta. Os ácidos nucléicos tem pico de absorção em 260 nm e algumas proteínas em 280 nm (LOPEZ et al., 2017). Os espectros de absorção de luz na região do ultravioleta (200 a 400 nm) para sobrenadante das suspensões de microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 com 0 e 100% de rompimento foram gerados para a verificação do(s) pico(s) de absorbância. Avaliou-se também a influência da concentração de tampão fosfato (pH=6,8) na extração de tais compostos. O comprimento de onda de 260 nm, encontrou-se na região de máxima absorvidade da luz, para todos os experimentos realizados e foi escolhido para a análise do teor de compostos nitrogenados solúveis da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. A Figura 37 expressa o espectro de absorção na região do ultravioleta para o extrato de compostos nitrogenados a partir da extração com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A Tabela 38 expressa a absorbância no comprimento de onda de 260 nm para os dois níveis de rompimento e 3 solventes diferentes.



**Figura 37.** Espectros de absorção na região do ultravioleta do extrato sobrenadante de suspensões de microalgas rompidas e concentração de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH=6,8).

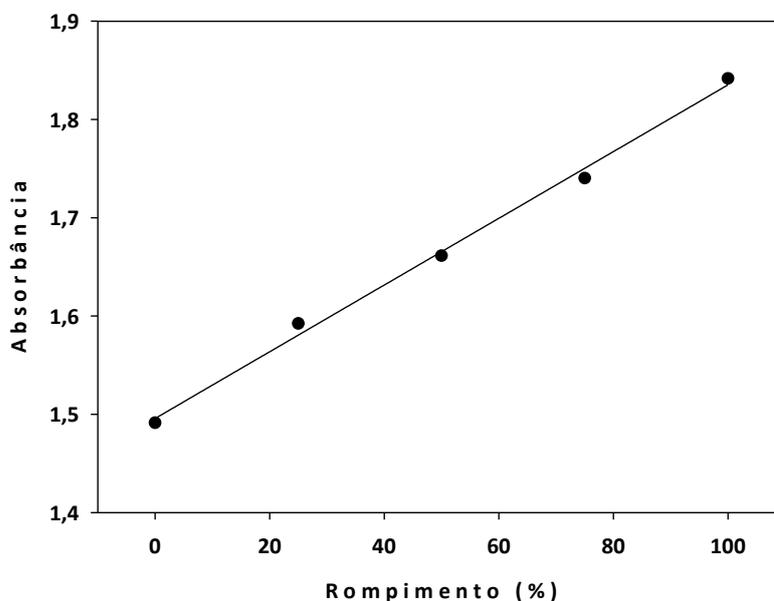
**Tabela 38.** Absorbância no 260 nm em diferentes solventes níveis de rompimento celular

Solvente	0% rompimento	100% rompimento
Água deionizada	0,897 ± 0,0110	1,246 ± 0,0334
Tampão Fosfato 0,1 M	1,793 ± 0,0358	2,276 ± 0,0628
Tampão Fosfato 0,05 M	1,533 ± 0,0586	1,946 ± 0,0282

As absorbâncias dos compostos nitrogenados solúveis das amostras com níveis de rompimento distintos estão expressas na Tabela 39. A Figura 38 expressa um gráfico de dispersão dos dados das absorbâncias dos compostos nitrogenados solúveis em função do nível de rompimento celular.

**Tabela 39.** Absorbâncias dos compostos nitrogenados solúveis a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular

Rompimento	Absorbância (260 nm)
0%	1,491 ± 0,00823
25%	1,592 ± 0,00281
50%	1,661 ± 0,01750
75%	1,740 ± 0,01449
100%	1,842 ± 0,00258



**Figura 38.** Dispersão dos dados de absorbância dos compostos nitrogenados em função do nível de rompimento.

A análise das regressões para os dados de compostos nitrogenados foi realizada por meio de um teste t (95%) de significância dos coeficientes do modelo, pela análise de variância da regressão (ANOVA) e pela distribuição dos resíduos. A Tabela 40 apresenta os dados da análise do modelo.

**Tabela 40.** Coeficientes da regressão linear da absorbância em 260 nm em função do nível de rompimento

Equação $y = ax + b$	Coeficientes	valor-P (teste t)	R <sup>2</sup>	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos resíduos
<b>Curva</b>	<b>a</b> 0,0034 ± 0,0001	0,0001	0,9955	<0,0001	Aleatória
<b>padrão</b>	<b>b</b> 1,4957 ± 0,0080	<0,0001			

A absorbância dos compostos nitrogenados que absorvem no comprimento de onda de 260 nm aumentou linearmente com o aumento do nível de rompimento linear. Isto significa que este índice é apropriado para ser utilizado como indicador de rompimento celular. De fato, a análise de regressão linear (Tabela 40) corrobora esta afirmação pelos coeficientes da reta significativos a 95% de confiança, alto coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>), uma análise de variância significativa e uma distribuição aleatória dos resíduos do modelo.

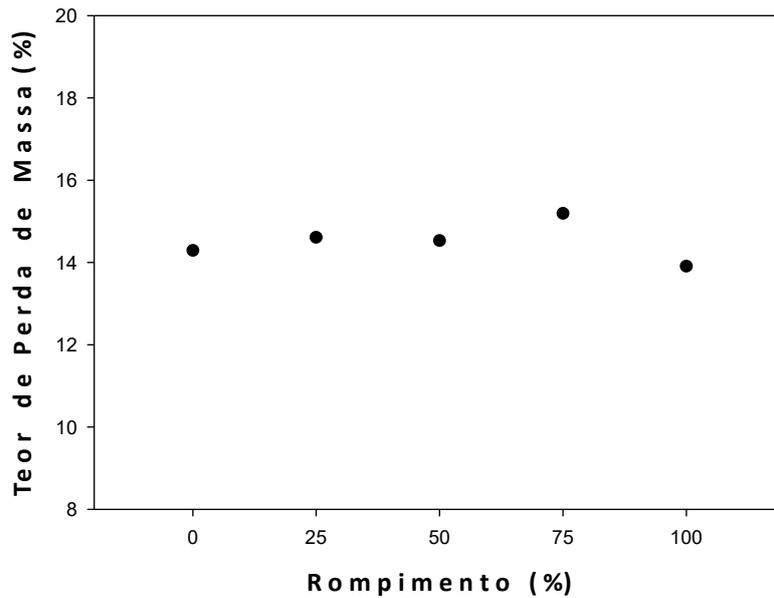
O espectro de absorção de luz dos extratos, as tabelas com os dados completos das análises, os gráficos de dispersão de dados e distribuição dos resíduos, além dos dados de testes de significância dos coeficientes da regressão e da ANOVA da regressão se encontram no Apêndice F.

### 5.3.6. Teor de perda de massa

Os teores de perda de massa das amostras com níveis de rompimento distintos estão expressos na Tabela 41. A Figura 39 expressa um gráfico de dispersão dos dados do teor de perda de massa em função do nível de rompimento celular.

**Tabela 41.** Teores de perda de massa de biomassas com distintos níveis de rompimento

ID	Teor de perda de massa (%)	
<b>0%</b>	14,2876	± 1,2620
<b>25%</b>	14,6074	± 1,5386
<b>50%</b>	14,5293	± 2,4851
<b>75%</b>	15,1882	± 1,1055
<b>100%</b>	13,9064	± 1,2949



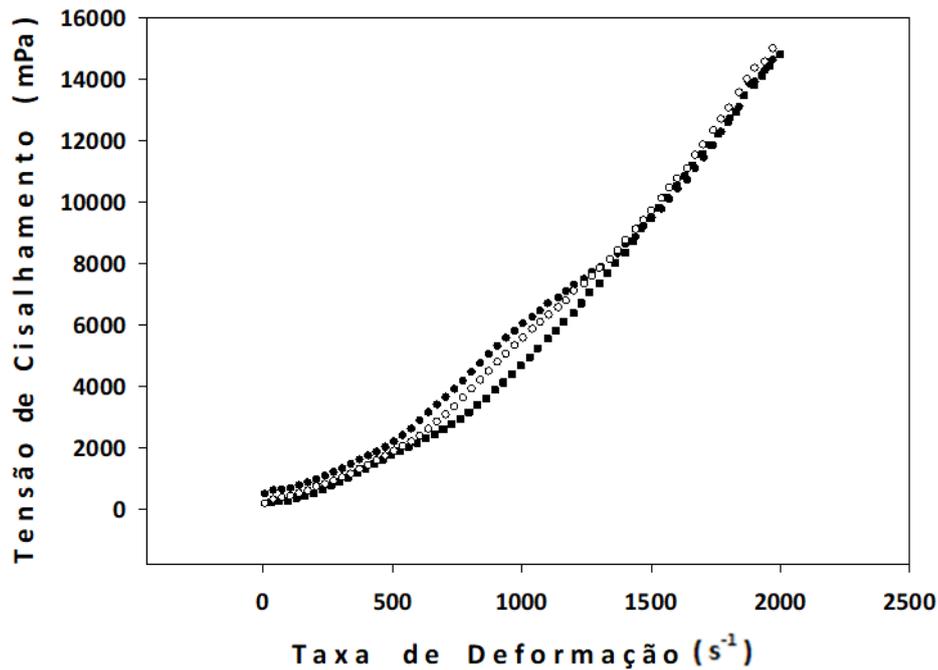
**Figura 39.** Dispersão dos dados de teor de perda de massa em função do nível de rompimento.

Os teores de perda de massa em níveis distintos de rompimento não apresentam diferença estatística a 95% de confiança, como mostrado na Figura 39. Isto significa que este índice não deve ser utilizado como indicador de rompimento celular. Os compostos solúveis que migraram para a fase aquosa possuíam alta permeabilidade pela membrana celular.

As tabelas com os dados completos das análises, incluindo as repetições realizadas se encontram no Apêndice G.

### 5.3.7. Propriedades reológicas

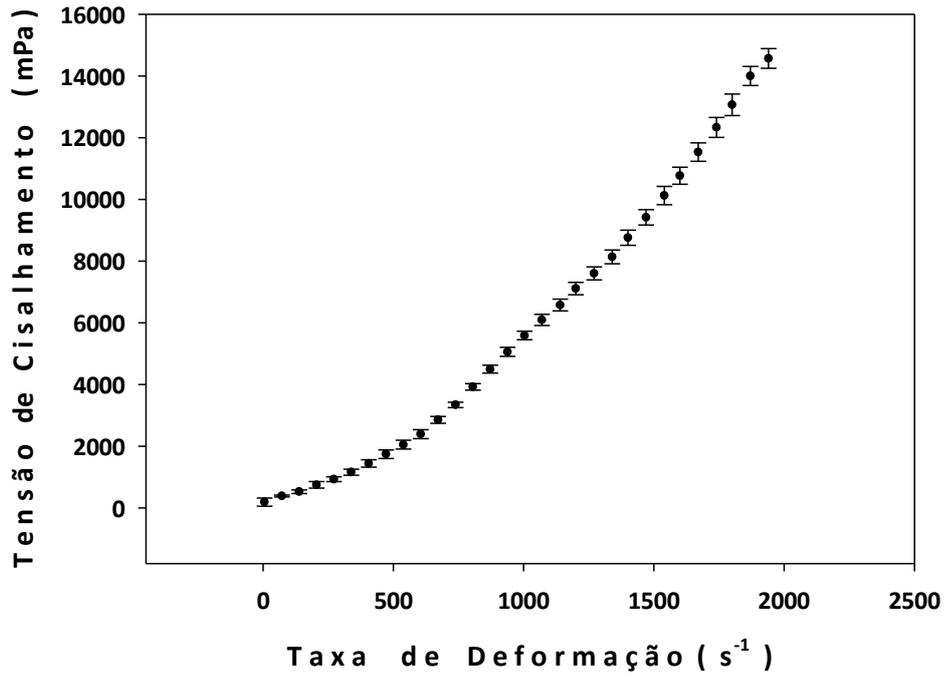
A Figura 40 apresenta o reograma das 3 rampas avaliadas, sendo elas a primeira subida de 0 a  $2000\text{ s}^{-1}$ , descida de  $2000$  a  $0\text{ s}^{-1}$  e subsequente subida de 0 a  $2000\text{ s}^{-1}$ , para a suspensão de microalgas sem rompimento celular.



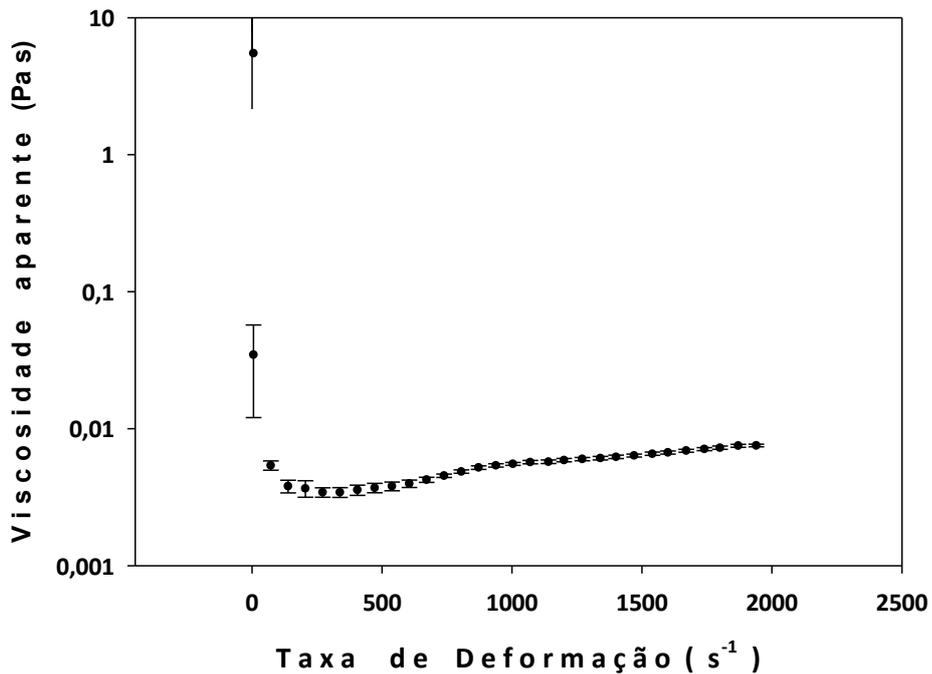
**Figura 40.** Reograma de dados médios com representação das 3 rampas analisadas, subida 1 (●), descida 1 (■) e subida 2 (○) da biomassa de microalgas sem rompimento.

As microalgas são microscópicas, com tamanho da ordem de poucos micrômetros. A linhagem em estudo, *Scenedesmus obliquus*, possui tamanho de 10  $\mu\text{m}$ . Mesmo após a classificação granulométrica, a biomassa se apresenta como pequenos flocos, isto é, agregados de células. Assim, a suspensão de microalgas sem rompimento é heterogênea, visto que o tamanho dos flocos é variável. A Figura 40 evidencia uma histerese entre as 3 curvas, mostrando que modificações irreversíveis ocorreram no material analisado. O cisalhamento aplicado desintegrou os pequenos flocos, homogeneizando a suspensão de microalgas. Esta mudança foi macroscópica e visual.

Para a análise reológica, o que inclui a modelagem das curvas e a definição do comportamento das suspensões foi considerada a segunda subida, visto que o material analisado já se encontrava homogeneizado. A Figura 41 expressa o intervalo de confiança das medidas de cada ponto experimental e a Figura 42 expressa a viscosidade aparente em função da tensão de cisalhamento.



**Figura 41.** Reograma de dados médios das suspensões de microalgas sem rompimento, subida 2, com representação do intervalo de confiança a 95% para cada ponto experimental.



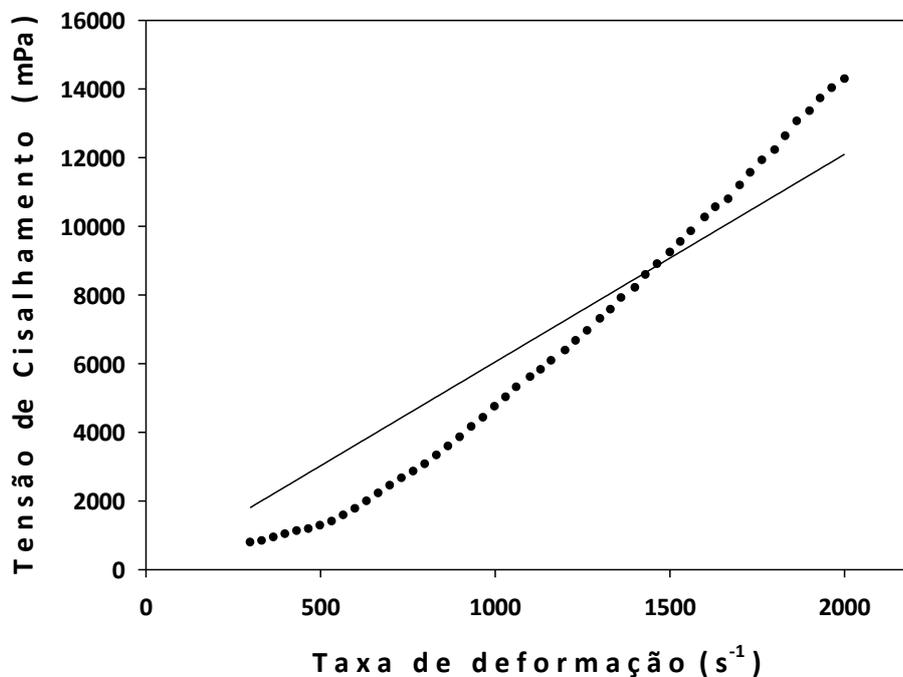
**Figura 42.** Reograma de dados médios das suspensões de microalgas sem rompimento, subida 2, com representação da viscosidade aparente em função da taxa de deformação.

Os intervalos de confiança são pequenos e ratificam que a análise possuiu boa repetibilidade (Figura 41 e Figura 42). O comportamento anômalo (0 a 300 s<sup>-1</sup>) pode ser explicado por uma possível deposição de biomassa no fundo do cilindro no tempo de preparo do reômetro para a análise. Esta possível deposição de biomassa produz uma camada inferior de alta concentração de sólidos e conseqüente maior concentração e viscosidade da suspensão.

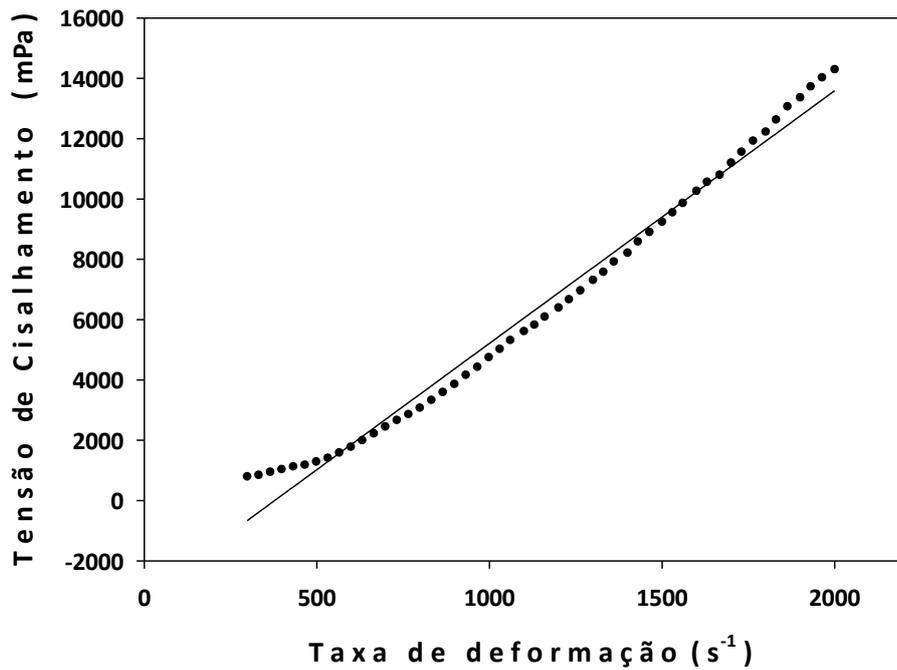
Ao iniciar o movimento com taxas de deformações crescentes o fluido se torna mais homogêneo, e a viscosidade é bruscamente reduzida e depois se comporta de forma regular no intervalo de 300 a 2000 s<sup>-1</sup>. Assim, para a modelagem dos reogramas, foi considerado o intervalo de taxa de deformação entre 300 e 2000 s<sup>-1</sup>. A Tabela 42 apresenta os dados das análises de regressão dos 4 modelos reológicos, sendo eles o Newtoniano, Bingham, Ostwald-de-Waele e Herschel-Bulkley. Tais modelos estão descritos graficamente nas Figura 43, Figura 44, Figura 45 e Figura 46, respectivamente.

**Tabela 42.** Análise de regressão dos modelos reológicos

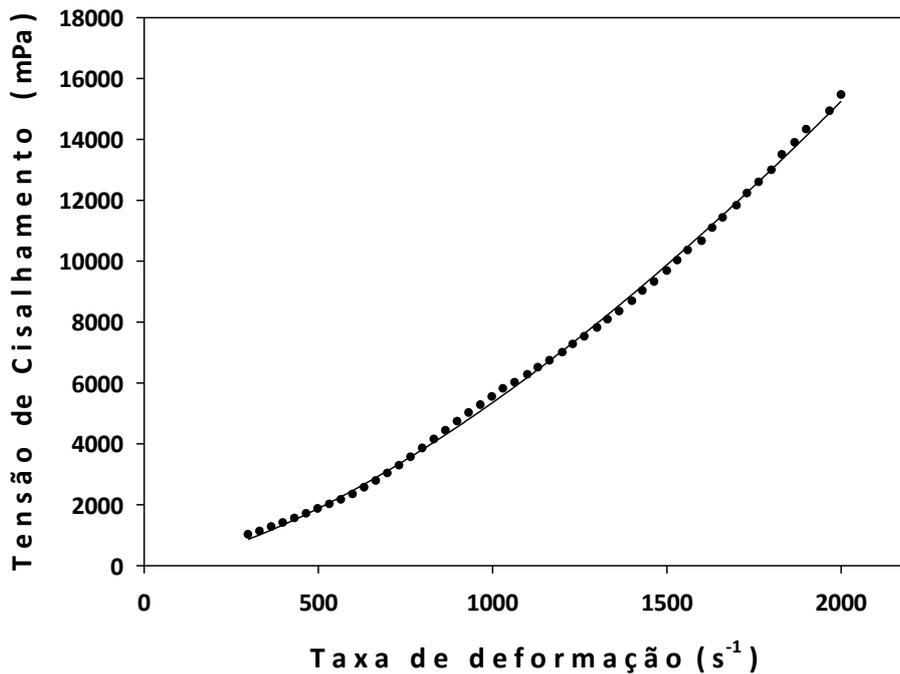
Modelo	Equação	Coefficientes	valor-P (teste t)	R <sup>2</sup>	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos Resíduos
Newtoniano	$\tau = \mu\dot{\gamma}$	$\mu$ 6,5234 ± 0,0585	<0,0001	0,9236	-	Tendenciosa
Bingham (linear)	$\tau = \tau_0 + \mu\dot{\gamma}$	$\tau_0$ -2684,17 ± 76,4820	<0,0001	0,9870	<0,0001	Aleatória
		$\mu$ 8,5042 ± 0,0614	<0,0001			
Ostwald de Waele (potência)	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	$K$ 0,1578 ± 0,0048	<0,0001	0,9990	<0,0001	Aleatória
		$n$ 1,5102 ± 0,0041	<0,0001			
		$\tau_0$ 186,1425 ± 37,6652	<0,0001			
Herschel-Bulkley (potência)	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$	$K$ 0,1112 ± 0,0087	<0,0001	0,9991	<0,0001	Aleatória
		$n$ 1,5551 ± 0,0101	<0,0001			



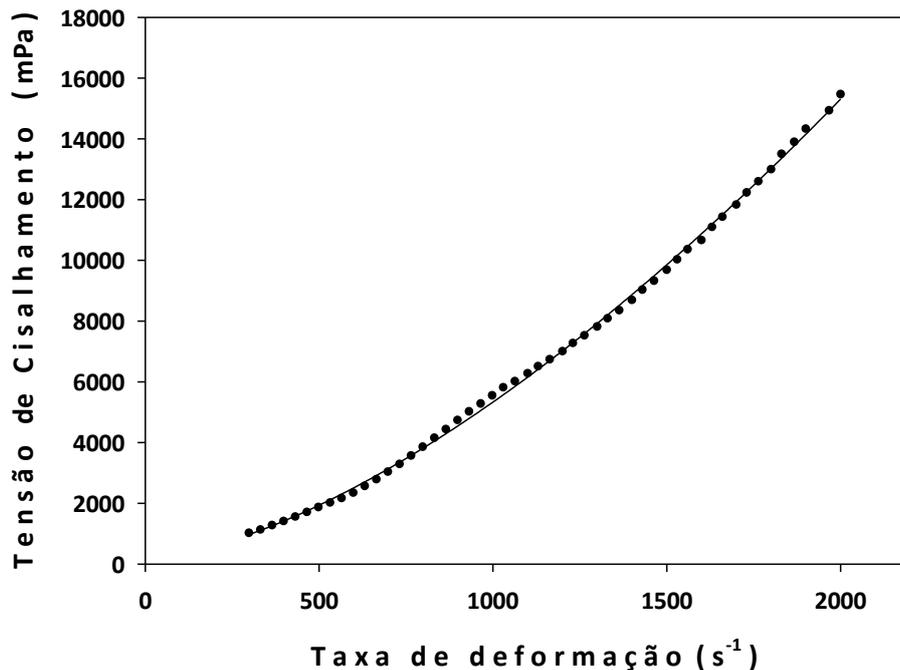
**Figura 43.** Ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo Newtoniano.



**Figura 44.** Ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Bingham.



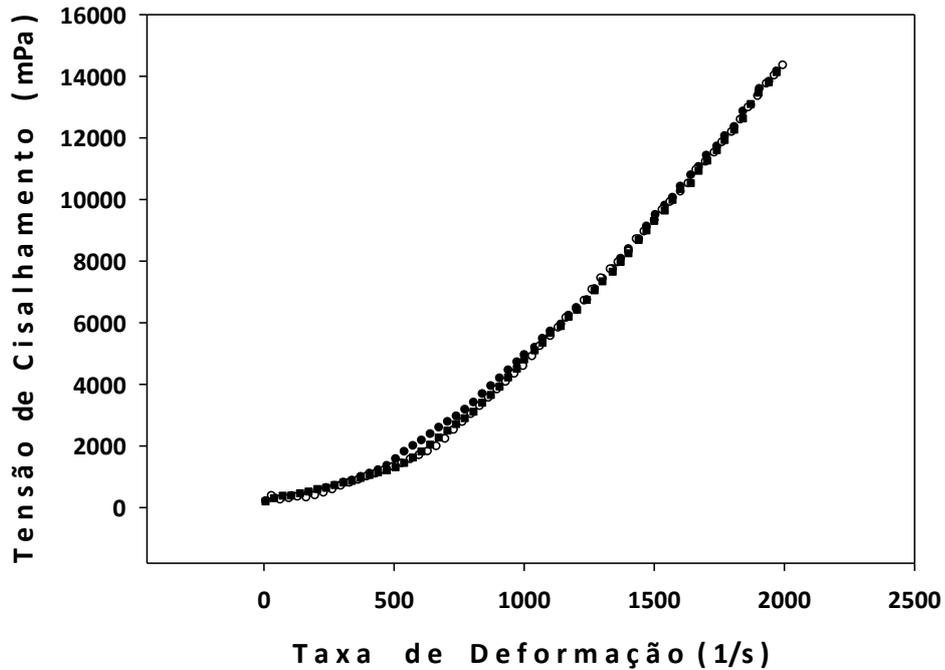
**Figura 45.** Ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Ostwald de Waele.



**Figura 46.** Ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Herschel-Bulkley.

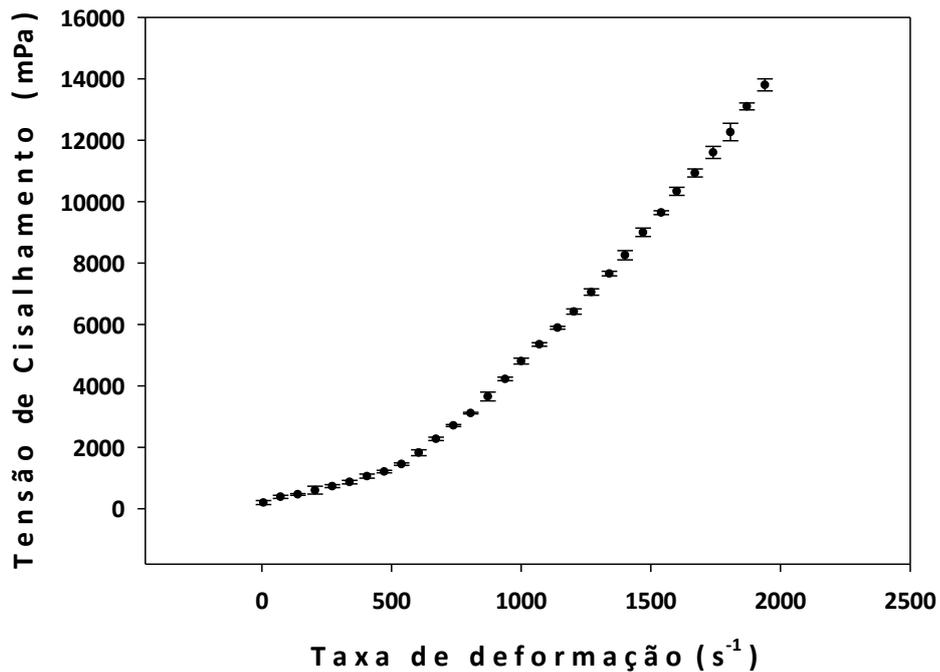
A Tabela 42, juntamente com as Figura 43, Figura 44, Figura 45 e Figura 46 expressam o comportamento reológico das suspensões de microalgas sem rompimento nas condições da análise. Os modelos Newtoniano e de Bingham não explicam a variação da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação. O ajuste dos mesmos não apresenta significância estatística. As suspensões analisadas são fluidos não-newtonianos dilatantes, isto é, são fluidos em que a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de deformação. Este fato também pode ser observado nas Figura 41 e Figura 42, sendo que esta última evidencia a variação da viscosidade aparente com a taxa de deformação. Os modelos que representam os fluidos dilatantes são o Ostwald-deWaele e o Herschel-Bulkley, ambos com  $n > 1$ . Para estes dois modelos, a análise de regressão foi significativa, como foi exposto na Tabela 42. A diferença entre eles é que o Herschel-Bulkley considera que o fluido necessita de uma tensão inicial para o escoamento. Em se tratando de uma suspensão aquosa, com baixa concentração de fluidos e baixa viscosidade aparente, a existência desta tensão inicial não possui sentido físico. Além disso, para o modelo de Herschel-Bulkley, a tensão inicial,  $\tau_0$ , foi negativa, o que também não possui sentido físico. Assim, o modelo de Ostwald-de-Waele foi o escolhido para representar o comportamento reológico das suspensões da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003, sem rompimento.

A análise reológica das suspensões de microalgas com a biomassa rompida foi executada da mesma forma da biomassa sem rompimento. A Figura 47 expressa o reograma das 3 rampas avaliadas, sendo elas a primeira subida de 0 a 2000 s<sup>-1</sup>, descida de 2000 a 0 s<sup>-1</sup> e subsequente subida de 0 a 2000s<sup>-1</sup> para a suspensão de microalgas rompidas.

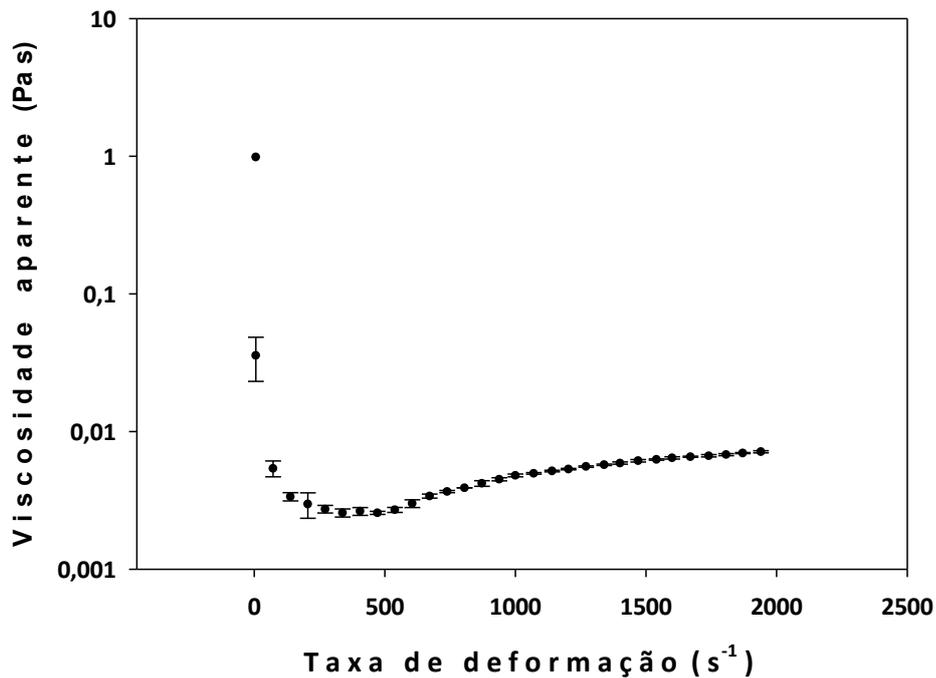


**Figura 47.** Reograma de dados médios com representação das 3 rampas analisadas, subida 1 (●), descida 1 (■) e subida 2 (○) da biomassa de microalgas rompidas.

A histerese que aparece no reograma da biomassa sem rompimento (Figura 40) não ocorre no reograma da biomassa rompida (Figura 47). Isto porque o processo de rompimento celular utilizado desintegrou os flocos e as próprias células, deixando o material mais homogêneo e uniforme.



**Figura 48.** Reograma de dados médios das suspensões de microalgas rompidas, subida 2, com representação do intervalo de confiança a 95% para cada ponto experimental.



**Figura 49.** Reograma de dados médios das suspensões de microalgas rompidas, subida 2, com representação da viscosidade aparente em função da taxa de deformação.

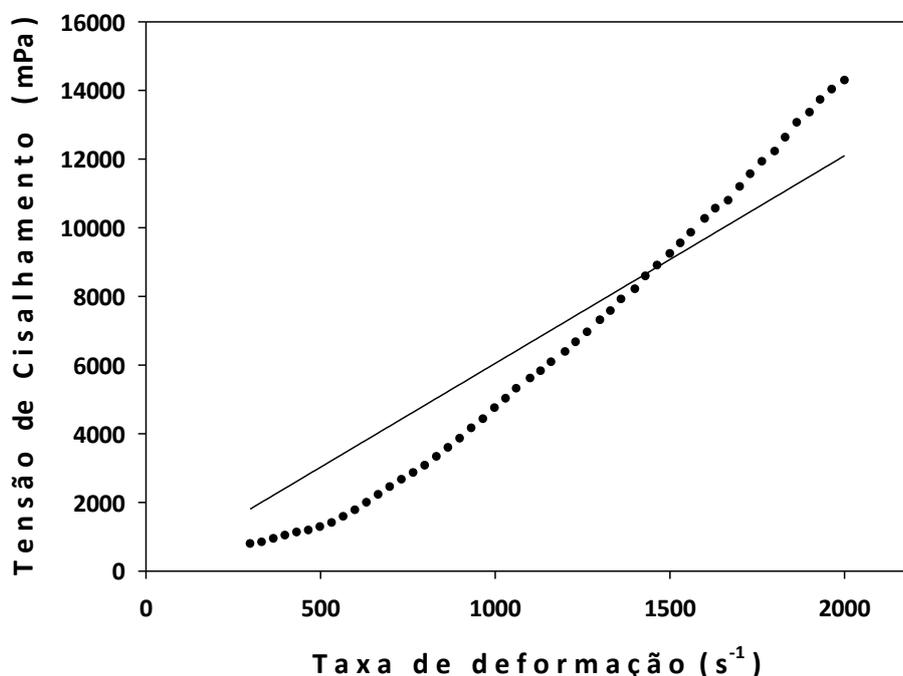
A Figura 48 expressa a média das 3 análises realizadas. Foi calculado e representado graficamente o intervalo de confiança a 95% para cada ponto experimental. Os intervalos de confiança são pequenos e ratificam que a análise possuiu boa repetibilidade.

O comportamento anômalo da viscosidade aparente (Figura 49) no intervalo de 0 a 300 s<sup>-1</sup> também ocorreu da mesma forma que para a biomassa sem rompimento. Este intervalo também foi desconsiderado das análises pelos mesmos motivos apresentados.

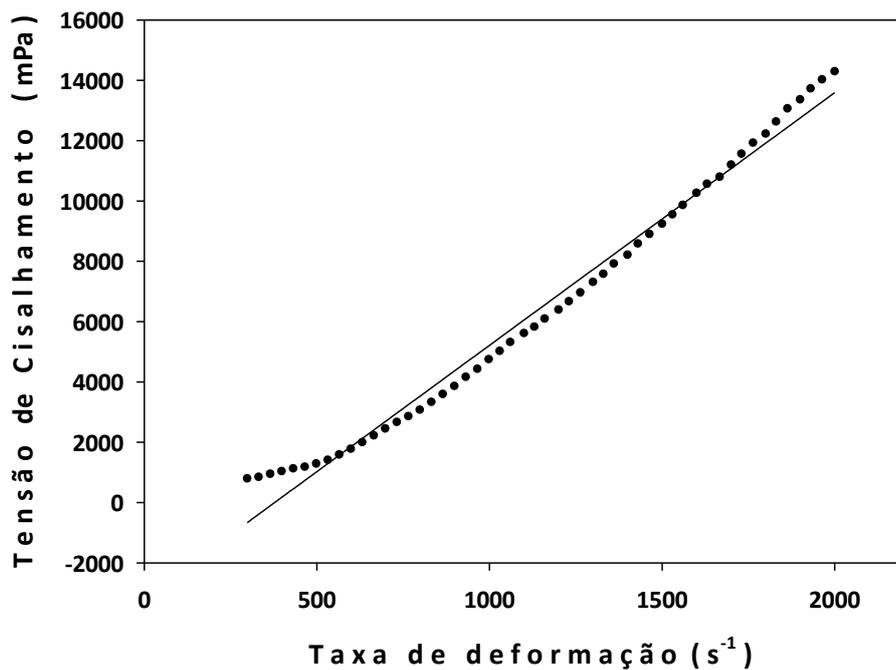
A Tabela 43 expressa os dados das análises de regressão dos 4 modelos reológicos, sendo eles o Newtoniano, Bingham, Ostwald-de-Waele e Herschel-Bulkley. Tais modelos estão descritos graficamente nas Figura 50, Figura 51, Figura 52, Figura 53, respectivamente.

**Tabela 43.** Análise de regressão dos modelos reológicos

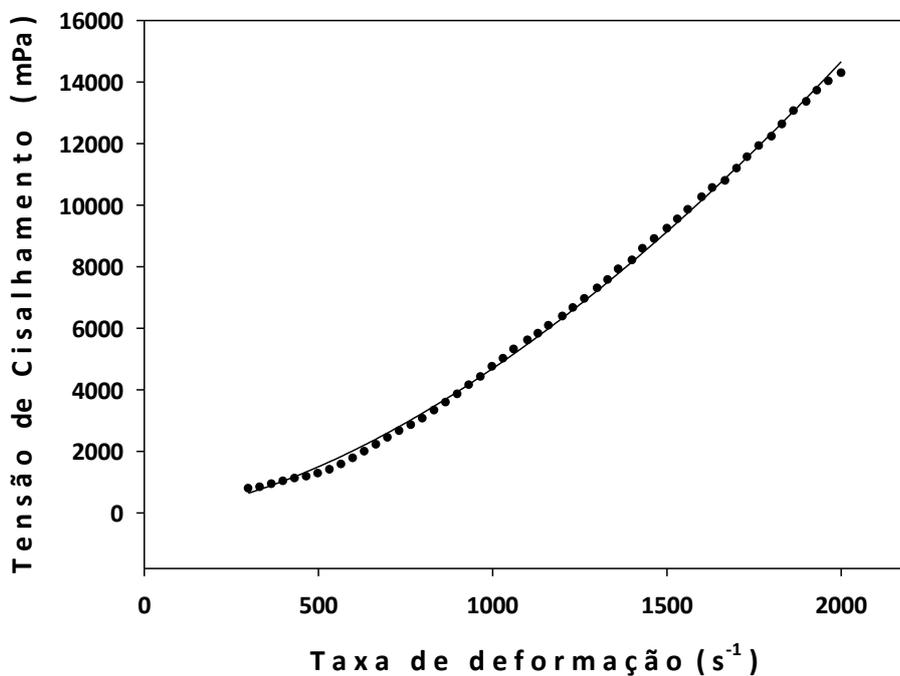
Modelo	Equação	Coefficientes	valor-P (teste t)	R <sup>2</sup>	valor-P (ANOVA)	Distribuição dos Resíduos
Newtoniano	$\tau = \mu\dot{\gamma}$	$\mu$ 6,0497 ± 0,0672	<0,0001	0,8960	-	Tendenciosa
Bingham (linear)	$\tau = \tau_0 + \mu\dot{\gamma}$	$\tau_0$ -3164,22 ± 77,8430	<0,0001	0,9861	<0,0001	Aleatória
		$\mu$ 8,3780 ± 0,0623	<0,0001			
Ostwald de Waele (potência)	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	$K$ 0,0551 ± 0,0018	<0,0001	0,9991	<0,0001	Aleatória
		$n$ 1,6435 ± 0,0045	<0,0001			
Herschel-Bulkley (potência)	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$	$\tau_0$ -297,817 ± 31,9179	<0,0001	0,9993	<0,0001	Aleatória
		$K$ 0,1005 ± 0,0068	<0,0001			
		$n$ 1,5663 ± 0,0088	<0,0001		<0,0001	



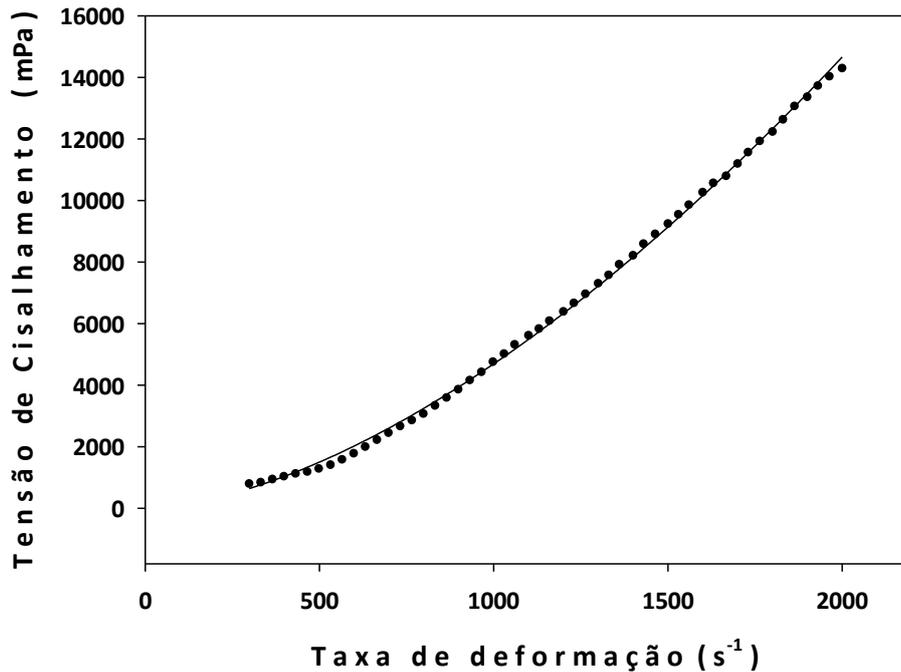
**Figura 50.** Regressão linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas rompidas, modelo Newtoniano.



**Figura 51.** Regressão linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas rompidas, modelo de Bingham.



**Figura 52.** Regressão não-linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas rompidas, modelo de Ostwald de Waele.



**Figura 53.** Regressão não-linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas rompidas, modelo de Herschel-Bulkley.

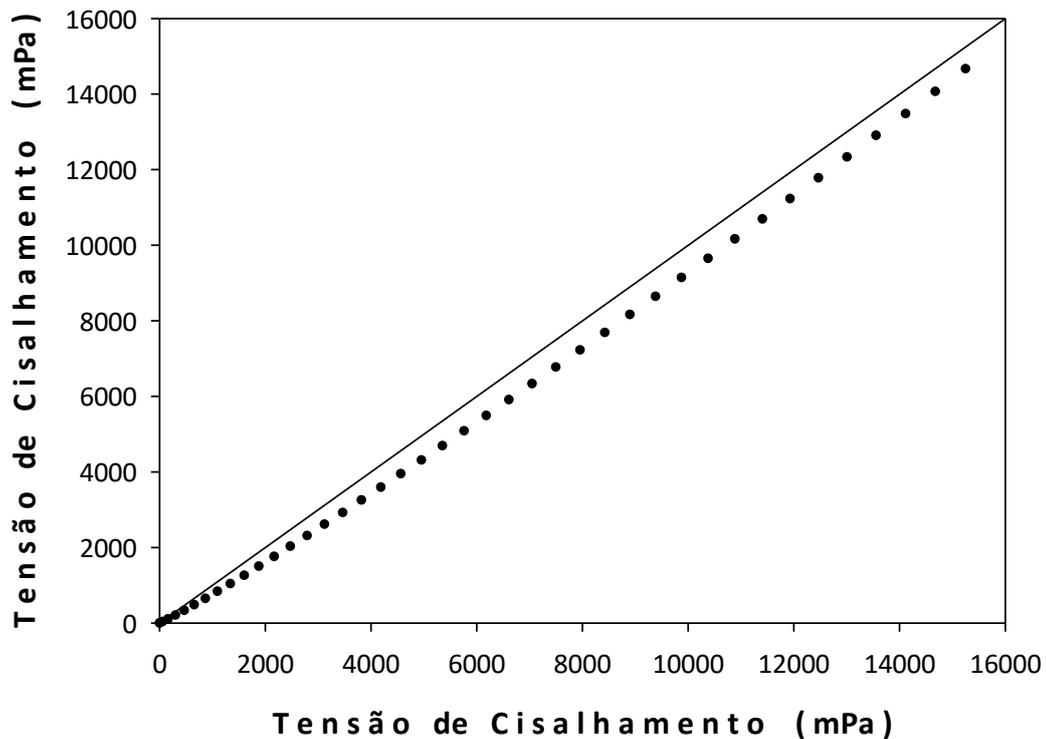
A Tabela 43, juntamente com as expressam o comportamento reológico das suspensões de microalgas rompidas nas condições da análise. O modelo de Ostwald-de-Waele foi o escolhido para representar o comportamento reológico das suspensões da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 rompidas, pelos mesmos motivos apresentados para as suspensões de biomassa sem rompimento.

A análise dos modelos de Ostwald-de-Waele para as biomassas sem rompimento e rompida são apresentadas na Tabela 44. Pela análise da mesma, é possível inferir que os dois modelos são diferentes, isto é, os coeficientes são estatisticamente distintos, considerando o intervalo de confiança de cada coeficiente.

**Tabela 44.** Modelos reológicos para biomassas sem rompimento e rompidas

Modelo	Equação	Coeficientes		
Ostwald de Waele sem rompimento	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	<i>K</i>	0,1578	± 0,0048
		<i>n</i>	1,5102	± 0,0041
Ostwald de Waele rompida	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	<i>K</i>	0,0551	± 0,0018
		<i>n</i>	1,6435	± 0,0045

Para avaliar se os dois modelos dissemelhantes representavam o mesmo fenômeno físico foi realizada uma análise de identidade. Esta análise consistiu de comparar, graficamente, se as tensões produzidas pela mesma taxa de deformação, pelos dois modelos, eram iguais ou diferentes. Construiu-se a linha de identidade das tensões e comparou-se com as geradas pelos modelos. Esta análise está representada na Figura 54.



**Figura 54.** Análise de identidade dos modelos reológicos das microalgas sem rompimento (eixo x) e microalgas rompidas (eixo y), modelo Ostwald-de-Waele.

A curva gerada pelas tensões de cisalhamento dos dois modelos não é coincidente com a curva identidade. Isto corrobora que os modelos são distintos, ou seja, as biomassas sem rompimento e rompidas possuem propriedades reológicas diferentes. Para determinar se as características reológicas de suspensões de microalgas pudessem ser utilizadas como indicador de rompimento celular mecânico é necessário realizar ensaios com as biomassas em níveis de rompimento intermediários (25, 50 e 75%, por exemplo). Tais ensaios não foram realizados neste trabalho.

Esse comportamento dilatante das suspensões de *Scenedesmus obliquus* não foi observado em suspensões de microalgas de outras espécies. Yap, Martin, Scales, (2016) estudaram o comportamento reológico de suspensões de 25% m/m da microalga *Nannochloropsis* sp. Tais suspensões apresentaram comportamento pseudoplástico. O cisalhamento mecânico foi capaz de reduzir o valor da viscosidade aparente em até 5 ordens de grandeza.

Wileman, Ozkan, Berberoglu (2012) estudaram o efeito da concentração da biomassa no comportamento reológico das microalgas *Nannochloris* sp., *Chlorella vulgaris*, e *Phaeodactylum tricornutum*. Para concentrações abaixo de 2% (m/m) todas as suspensões de comportaram como fluidos newtonianos. Para concentrações acima de 6%, as microalgas *Nannochloris* sp. e *Chlorella vulgaris* se comportaram como fluidos pseudoplásticos, enquanto a *Phaeodactylum tricornutum* se comportou como fluido newtoniano em toda a extensão da análise. A faixa de taxa de deformação avaliada foi de 5 a 280 s<sup>-1</sup>.

Schneider e Gerber, (2014) caracterizaram a reologia de suspensões da microalga *Nannochloropsis salina* e a influência do teor de sólidos, além da temperatura. O comportamento de fluido pseudoplástico foi observado e a viscosidade aparente aumentou com o teor de sólidos e diminuiu com a temperatura, como esperado. A faixa de taxa de deformação das análises foi de 0 a 600 s<sup>-1</sup>.

Bernaerts et al. (2017) caracterizaram a reologia de sete suspensões de espécies distintas de microalgas para fins alimentícios. O efeito do processamento mecânico e térmico foi avaliado no trabalho. As microalgas estavam estocadas em freezer a -80 °C, sendo as espécies *Nannochloropsis* sp., *Odontella aurita*, *Arthrospira platensis*, *Schizochytrium* sp., *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Porphyridium cruentum*. O tratamento mecânico consistiu da homogeneização industrial a 100 MPa em passe único. O tratamento térmico foi uma pasteurização a pH 4. Todas as espécies de microalgas apresentaram comportamento pseudoplástico, exceto a *Nannochloropsis* sp. que se comportou como fluido newtoniano, o que é consistente com os outros trabalhos da literatura. A reologia de todas as microalgas foi afetada pelo tratamento mecânico e térmico. Este fato corrobora os resultados deste trabalho.

Diante dos resultados experimentais obtidos nesta pesquisa e os trabalhos reportados na literatura é possível concluir que a morfologia das microalgas afeta diretamente a reologia das suspensões produzidas. O rompimento celular modifica as propriedades reológicas, que possuem potencial de utilização destas como indicador de rompimento celular, apesar de serem mais complexas de serem realizadas quando comparadas aos indicadores bioquímicos reportados nas seções anteriores.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho atenderam os objetivos propostos. Concluiu-se que é possível estabelecer indicadores quantitativos de rompimento celular a partir da biomassa úmida da microalga *Scenedesmus obliquus*, BR003.

A extração de carboidratos solúveis depende da hidrólise dos polissacarídeos estruturais e de reserva. Assim, as condições ótimas para a hidrólise da biomassa foram 90°C por 120 minutos em concentração de ácido de 4,0 mol L<sup>-1</sup>.

A extração bifásica de lipídeos a partir da biomassa úmida obteve o maior rendimento quando a mesma ocorreu no sistema de mesa de agitação orbital por 60 minutos no teor máximo de 6% (m/m) de biomassa por batelada.

Foi desenvolvida uma metodologia de extração de pigmentos (carotenóides, clorofila a e clorofila b) a partir da biomassa úmida. Os resultados mostraram que, a partir de uma biomassa de 10% (m/m) de teor é possível extrair até 96% dos pigmentos, por meio da adição de etanol em fração volumétrica resultante de 80% (v/v), isto é, a suspensão resultante sendo composta de 80% de etanol e 20% de água.

Verificou-se que o teor de perda de massa e teor de carboidratos solúveis não são bons indicadores de rompimento celular mecânico, tendo em vista que não houve relação significativa entre o nível de rompimento celular e os respectivos teores.

Os teores de carotenóides, clorofila a, clorofila b, clorofila total, proteínas solúveis, lipídeos e compostos nitrogenados podem ser utilizados como indicadores quantitativos de rompimento celular, visto que apresentaram relação linear significativa entre os teores e os níveis de rompimento celular testados.

As propriedades reológicas das suspensões de biomassa a 10% (m/v) possuem potencial de utilização como indicador de rompimento celular, uma vez que a reologia foi afetada pelo tratamento de rompimento mecânico. Porém, são necessários experimentos adicionais em outros níveis de rompimento para determinar se os parâmetros dos modelos reológicos possuem relação linear com o nível de rompimento.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANGLES, Emilie et al. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp. : Disruption , physiological effects and solvent screening. **ALGAL**, [s. l.], v. 21, p. 27–34, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.005>>
- ANSARI, Faiz Ahmad et al. Evaluation of various cell drying and disruption techniques for sustainable metabolite extractions from microalgae grown in wastewater: A multivariate approach. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 182, p. 634–643, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.098>>
- BERNAERTS, Tom M. M. et al. Microalgal biomass as a ( multi ) functional ingredient in food products : Rheological properties of microalgal suspensions as a ff ected by mechanical and thermal processing. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, n. December 2016, p. 452–463, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.014>>
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.
- CASTRO, Yessica A. et al. Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation. **Applied Energy**, [s. l.], v. 140, p. 14–19, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.045>>
- CHENG, Jun et al. Bioresource Technology Using wet microalgae for direct biodiesel production via microwave irradiation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 131, p. 531–535, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.045>>
- DAMERGI, Eya et al. Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, n. September 2016, p. 488–495, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.003>>
- DAO, Guo Hua et al. Enhanced growth and fatty acid accumulation of microalgae *Scenedesmus* sp. LX1 by two types of auxin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 247, n. September 2017, p. 561–567, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.079>>
- DONG, T. et al. Impact of biochemical composition on susceptibility of algal biomass to acid-catalyzed pretreatment for sugar and lipid recovery. **Algal Research**, [s. l.], v. 18, p. 69–77, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.004>>
- DUBOIS, Michel. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- FARIED, M. et al. Biodiesel production from microalgae : Processes , technologies and recent advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 79, n. February, p. 893–913, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>>
- FEDERATION, International Dairy. **and processed cheese products:determination of fat content (gravimetric method) (reference method)**. Brussels.
- GONG, Yangyang et al. Microalgae *Scenedesmus* sp . as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon ( *Salmo salar* L . ). **Aquaculture**, [s. l.], v. 501, n. September 2018, p. 455–464, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.049>>

- GUL, Osman et al. Effect of high pressure homogenization (HPH) on microstructure and rheological properties of hazelnut milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 41, n. May 2016, p. 411–420, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.05.002>>
- GÜNERKEN, Emre et al. Flow cytometry to estimate the cell disruption yield and biomass release of *Chlorella sp.* during bead milling. [s. l.], v. 25, n. November 2016, p. 25–31, 2017.
- GUPTA, Soumyajit Sen; SHASTRI, Yogendra; BHARTIYA, Sharad. Model-based optimisation of biodiesel production from microalgae. **Computers and Chemical Engineering**, [s. l.], v. 89, p. 222–249, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.compchemeng.2016.01.014>>
- HYNSTOVA, Veronika et al. Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 148, p. 108–118, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.018>>
- LANZ, Bruno; DIETZ, Simon; SWANSON, Tim. The Expansion of Modern Agriculture and Global Biodiversity Decline: An Integrated Assessment. **Ecological Economics**, [s. l.], v. 144, p. 260–277, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.07.018>>
- LECINA, Martí et al. Bioresource Technology Structural changes of *Arthrospira sp.* after low energy sonication treatment for microalgae harvesting : Elucidating key parameters to detect the rupture of gas vesicles. [s. l.], v. 223, p. 98–104, 2017.
- LEE, Andrew K.; LEWIS, David M.; ASHMAN, Peter J. Bioresource Technology Force and energy requirement for microalgal cell disruption : An atomic force microscope evaluation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 128, p. 199–206, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.032>>
- LEE, Ilgyu; HAN, Jong-in. Bioresource Technology Simultaneous treatment ( cell disruption and lipid extraction ) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, [s. l.], v. 186, p. 246–251, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.045>>
- LEE, Soo Youn et al. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 244, p. 1317–1328, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>>
- LOPEZ, Blanca R. et al. Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 135, p. 96–104, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.005>>
- LORENTE, E. et al. Bioresource Technology Microalgae fractionation using steam explosion , dynamic and tangential cross-flow membrane filtration. [s. l.], v. 237, p. 3–10, 2017.
- LU, Weidong et al. Bioresource Technology A new approach of microalgal biomass pretreatment using deep eutectic solvents for enhanced lipid recovery for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 218, p. 123–128, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.120>>

MARTÍNEZ, Natalia et al. Obtaining biodiesel from microalgae oil using ultrasound-assisted in-situ alkaline transesterification. [s. l.], v. 202, p. 512–519, 2017.

MASUKO, Tatsuya et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 339, n. 1, p. 69–72, 2005.

MATHIMANI, Thangavel et al. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: Process evaluation and knowledge gaps. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 208, p. 1053–1064, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.096>>

MIRANDA, M. T. et al. Physical-energy characterization of microalgae *Scenedesmus* and experimental pellets. **Fuel**, [s. l.], v. 226, n. April, p. 121–126, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.03.097>>

MONTALESCOT, V. et al. Bioresource Technology Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, [s. l.], v. 196, p. 339–346, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075>>

ORGANIZATION, United Nation. **World Population Prospects**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/wpp2017\\_keyfindings.pdf](https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/wpp2017_keyfindings.pdf)>

PARNIAKOV, Oleksii et al. Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *Nannochloropsis*. **ALGAL**, [s. l.], v. 8, p. 128–134, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.014>>

PHONG, Win Nee et al. Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae — Recent developments and future perspectives. **Algal Research**, [s. l.], v. 31, n. May 2016, p. 506–516, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.005>>

POHNDORF, Ricardo S. et al. Biomass and Bioenergy Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp. : Influence of drying, cell disruption and extraction methods. [s. l.], v. 93, p. 25–32, 2016.

POSTMA, P. R. et al. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 184, p. 297–304, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>>

POSTMA, P. R. et al. Bioresource Technology Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 224, p. 670–679, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.071>>

QURAIISHI, Khurram et al. Chemosphere Ionic liquids toxicity on fresh water microalgae, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris* & *Botryococcus braunii*; selection criterion for use in a two-phase partitioning bioreactor (TPBR). [s. l.], v. 184, p. 642–651, 2017.

RASLAVIČIUS, Laurencas; STRIŪGAS, Nerijus; FELNERIS, Mantas. New insights into algae factories of the future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 81, n. August 2017, p. 643–654, 2018.

RIVERA, E. Clavijo et al. Bioresource Technology Mechanical cell disruption of *Parachlorella kessleri* microalgae : Impact on lipid fraction composition. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 256, n. December 2017, p. 77–85, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.148>>

RIZZA, Lara Sanchez et al. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, [s. l.], v. 22, p. 140–147, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.021>>

SAITO, S. et al. **Key world energy statistics**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed17&AN=71899969>  
<<http://resolver.ebscohost.com/openurl?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:10.1016%2Fj.gie.2015.03.199&issn=0016-5107&isbn=&volume=81&issue=5+SUPPL.+1&spage=AB211&date=2015>>.

SCHNEIDER, Nico; GERBER, Mandy. Bioresource Technology Correlation between viscosity , temperature and total solid content of algal biomass. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, [s. l.], v. 170, p. 293–302, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.107>>

SCHÜLER, Lisa M. et al. Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, n. December 2016, p. 263–273, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.025>>

SHANKAR, Mukund et al. Protic ionic liquid-assisted cell disruption and lipid extraction from fresh water *Chlorella* and *Chlorococcum* microalgae. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, n. January, p. 228–236, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.009>>

SHUBA, Eyasu Shumbulo; KIFLE, Demeke. Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 81, n. August 2017, p. 743–755, 2018.

SIERRA, Laura Soto; DIXON, Chelsea K.; WILKEN, Lisa R. Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, n. July 2016, p. 149–159, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.004>>

SMETANA, Sergiy et al. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 245, n. August, p. 162–170, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.113>>

SPIDEN, Erin M. et al. Critical analysis of quantitative indicators of cell disruption applied to *Saccharomyces cerevisiae* processed with an industrial high pressure homogenizer. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 70, p. 120–126, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.10.008>>

TEH, Yong Yi et al. Dilute sulfuric acid hydrolysis of red macroalgae *Eucheuma denticulatum* with microwave-assisted heating for biochar production and sugar recovery. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 246, n. May, p. 20–27, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.101>>

TOMÁS-ALMENAR, C. et al. Scenedesmus almeriensis from an integrated system waste-nutrient , as sustainable protein source for feed to rainbow trout ( Oncorhynchus mykiss ). **Aquaculture**, [s. l.], v. 497, n. August, p. 422–430, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.011>>

VENKATA SUBHASH, G. et al. Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 244, p. 1304–1316, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.024>>

WANG, Songmei et al. A novel process on lipid extraction from microalgae for biodiesel production. **Energy**, [s. l.], v. 115, p. 963–968, 2016. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2016.09.078>>

WANG, Yue et al. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 222, p. 485–497, 2016. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.106>>

WILEMAN, Angel; OZKAN, Altan; BERBEROGLU, Halil. Bioresource Technology Rheological properties of algae slurries for minimizing harvesting energy requirements in biofuel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 104, p. 432–439, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.027>>

XIE, Youping et al. Disruption of thermo-tolerant Desmodesmus sp . F51 in high pressure homogenization as a prelude to carotenoids extraction. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 109, p. 243–251, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.003>>

YAP, Benjamin H. J. et al. Bioresource Technology Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 184, p. 280–285, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.049>>

YAP, Benjamin H. J.; MARTIN, Gregory J. O.; SCALES, Peter J. Rheological manipulation of flocculated algal slurries to achieve high solids processing. **ALGAL**, [s. l.], v. 14, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.007>>

ZHANG, Yi et al. Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae Scenedesmus sp . **Renewable Energy**, [s. l.], v. 125, p. 1049–1057, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.078>>

ZINKONÉ, Téné Rosine et al. Bioresource Technology Bead milling disruption kinetics of microalgae : Process modeling , optimization and application to biomolecules recovery from Chlorella sorokiniana. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 267, n. July, p. 458–465, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.080>>

## 8. APÊNDICE

O objetivo da elaboração dos apêndices foi trazer a análise completa de todos os dados da pesquisa para a dissertação, sem colocar no texto uma quantidade significativa de informações auxiliares que não contribuem diretamente para o entendimento dos resultados. Cada apêndice foi organizado por tipo de análise, na ordem em que os experimentos foram realizados. Os apêndices são:

- APÊNDICE A – Memorial de dados de umidade e cinzas;
- APÊNDICE B – Memorial de dados de proteínas solúveis;
- APÊNDICE C – Memorial de dados de carboidratos;
- APÊNDICE D – Memorial de dados de lipídeos;
- APÊNDICE E – Memorial de dados de pigmentos;
- APÊNDICE F – Memorial de dados de aminoácidos solúveis;
- APÊNDICE G – Memorial de dados de teor de compostos nitrogenados;
- APÊNDICE H – Memorial de dados de teor de perda de massa;
- APÊNDICE I – Memorial de dados de propriedades reológicas.

## APÊNDICE A Memorial de dados de umidade e cinzas

### A.1 Biomassa peneirada sem lavagem

**Tabela A.1** Teor de massa seca da biomassa peneirada sem lavagem.

ID	Cadinho seco (g)	Cadinho + biomassa (g)	Biomassa (g)	Cadinho + biomassa seca (g)	biomassa seca (g)	Teor de massa seca (%)	Teor de massa seca médio (%)
1	33,13131	33,32439	0,19308	33,30592	0,17461	90,43	
2	37,95941	38,15171	0,1923	38,13528	0,17587	91,46	
3	34,0106	34,17284	0,16224	34,15961	0,14901	91,85	90,9669 ± 0,5622
4	33,32829	33,52735	0,19906	33,5086	0,18031	90,58	
5	36,02835	36,13951	0,11116	36,12897	0,10062	90,52	

**Tabela A.2** Teor de umidade da biomassa peneirada sem lavagem.

ID	Cadinho seco (g)	Cadinho + biomassa (g)	Biomassa (g)	Cadinho + biomassa seca (g)	biomassa seca (g)	Teor de umidade (%)	Teor de umidade médio (%)
1	33,13131	33,32439	0,19308	33,30592	0,17461	9,57	
2	37,95941	38,15171	0,1923	38,13528	0,17587	8,54	
3	34,0106	34,17284	0,16224	34,15961	0,14901	8,15	9,0331 ± 0,5622
4	33,32829	33,52735	0,19906	33,5086	0,18031	9,42	
5	36,02835	36,13951	0,11116	36,12897	0,10062	9,48	

**Tabela A.3** Teor de cinzas da biomassa peneirada sem lavagem.

ID	Biomassa (g)	Cadinho seco	Cadinho + Cinzas	Cinzas	Teor de cinzas	Teor de Cinzas médio (%)
1	0,19308	33,13131	33,20077	0,06946	35,97	
2	0,1923	37,95941	38,02881	0,06940	36,09	
3	0,16224	34,0106	34,06934	0,05874	36,21	36,2196 ± 0,3818
4	0,19906	33,32829	33,39968	0,07139	35,86	
5	0,11116	36,02835	36,06944	0,04109	36,96	

**Tabela A.4** Teor de massa seca livre de cinzas da biomassa peneirada sem lavagem.

Biomassa	biomassa seca	Cinzas	Teor de massa seca livre de cinzas (%)	Teor de massa seca livre de cinzas médio (%)
0,19308	0,17461	0,06946	54,46	
0,1923	0,17587	0,06940	55,37	
0,16224	0,14901	0,05874	55,64	54,7473 ± 0,7187
0,19906	0,18031	0,07139	54,72	
0,11116	0,10062	0,04109	53,55	

## A.2 Biomassa peneirada e lavada

**Tabela A.5** Teor de massa seca da biomassa peneirada e lavada.

ID	Cadinho seco (g)	Cadinho + biomassa (g)	Biomassa (g)	Cadinho + biomassa seca (g)	biomassa seca (g)	Teor de massa seca (%)	Teor de massa seca médio (%)
1	35,89105	36,00451	0,11346	35,99621	0,10516	92,68	
2	34,71683	34,83778	0,12095	34,82789	0,11106	91,82	
3	33,482252	33,592782	0,11053	33,5822	0,099948	90,43	91,9542 ± 0,8272
4	34,033373	34,182173	0,1488	34,17037	0,136997	92,07	
5	34,10321	34,21509	0,11188	34,207	0,10379	92,77	

**Tabela A.6** Teor de umidade da biomassa peneirada e lavada.

ID	Cadinho seco (g)	Cadinho + biomassa (g)	Biomassa (g)	Cadinho + biomassa seca (g)	biomassa seca (g)	Teor de umidade (%)	Teor de umidade médio (%)
1	35,89105	36,00451	0,11346	35,99621	0,10516	7,32	
2	34,71683	34,83778	0,12095	34,82789	0,11106	8,18	
3	33,482252	33,592782	0,11053	33,5822	0,099948	9,57	8,0458 ± 0,8272
4	34,033373	34,182173	0,1488	34,17037	0,136997	7,93	
5	34,10321	34,21509	0,11188	34,207	0,10379	7,23	

**Tabela A.7** Teor de cinzas da biomassa e peneirada lavada.

ID	Cadinho seco	Cadinho + Cinzas	Cinzas	Teor de cinzas	Teor de cinzas médio (%)
1	35,89105	35,93222	0,04117	36,29	
2	34,71683	34,76018	0,04335	35,84	
3	33,48225	33,52247	0,04022	36,39	36,1210 ± 0,2123
4	34,03337	34,08678	0,05341	35,89	
5	34,10321	34,14371	0,04050	36,20	

**Tabela A.8** Teor de massa seca livre de cinzas da biomassa peneirada lavada.

Biomassa	biomassa seca	Cinzas	Teor de massa seca livre de cinzas (%)	Teor de massa seca livre de cinzas médio (%)
0,11346	0,10516	0,04117	56,40	
0,12095	0,11106	0,04335	55,98	
0,11053	0,099948	0,04022	54,04	55,8332 ± 0,9002
0,1488	0,136997	0,05341	56,18	
0,11188	0,10379	0,04050	56,57	

## APÊNDICE B Memorial de dados de proteínas solúveis

### B.1 Validação como indicador de rompimento celular

#### B.1.1 Curva padrão de BSA (albumina de soro bovino)

**Tabela B.1** Solução padrão de BSA.

Medida	Valor
Massa BSA (g)	0,08
Volume de solução (mL)	50
Solução estoque (mg/L)	1600

**Tabela B.2** Curva padrão de BSA (albumina de soro caseiro).

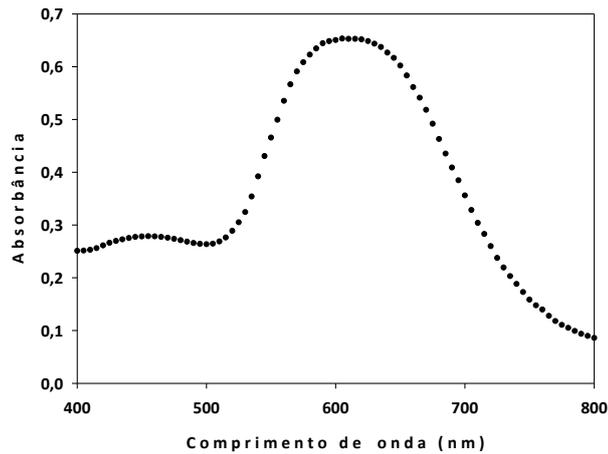
ID	Solução Estoque (uL)	Água (uL)	Concentração BSA (mg/L)	Absorbância
0	0	1000	0,0	0,293 ± 0,00510
1	50	950	80,0	0,455 ± 0,00204
2	100	900	160,0	0,554 ± 0,00389
3	150	850	240,0	0,716 ± 0,00361
4	200	800	320,0	0,796 ± 0,01304
5	250	750	400,0	0,912 ± 0,01718
6	300	700	480,0	0,965 ± 0,00510

**Tabela B.3** Coeficientes da regressão linear da curva padrão de BSA.

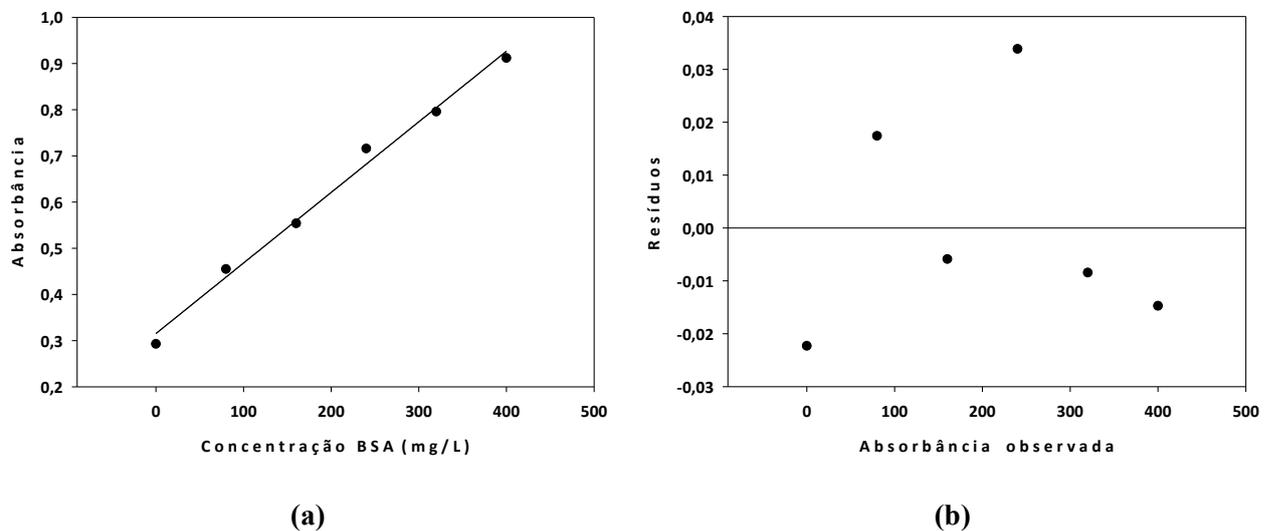
Equação	Coeficientes		t(4)	valor-P	R <sup>2</sup>
$y = ax + b$	a	0,0015 ± 7,1E-5	21,4807	<0,0001	0,9914
	b	0,3153 ± 0,0172	18,2924	<0,0001	

**Tabela B.4** Análise de Variância (ANOVA) da curva padrão de BSA.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P
Regressão	SQR 0,2617	1,0	MQR 0,2617	461,42	<0,0001
Resíduos	SQRes 0,0023	R-2	MQRRes 0,0006		
TOTAL	SQT 0,2640	R-1	MQT 0,0528		



**Figura B.1** Espectro de absorção do extrato de proteínas após reações de Bradford.



**Figura B.2** Curva padrão de BSA: Dispersão dos dados e regressão linear (a) e distribuição dos resíduos do modelo (b).

### B.1.2 Análise espectrofotométrica

**Tabela B.5** Absorbância do extrato de proteínas solúveis a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.

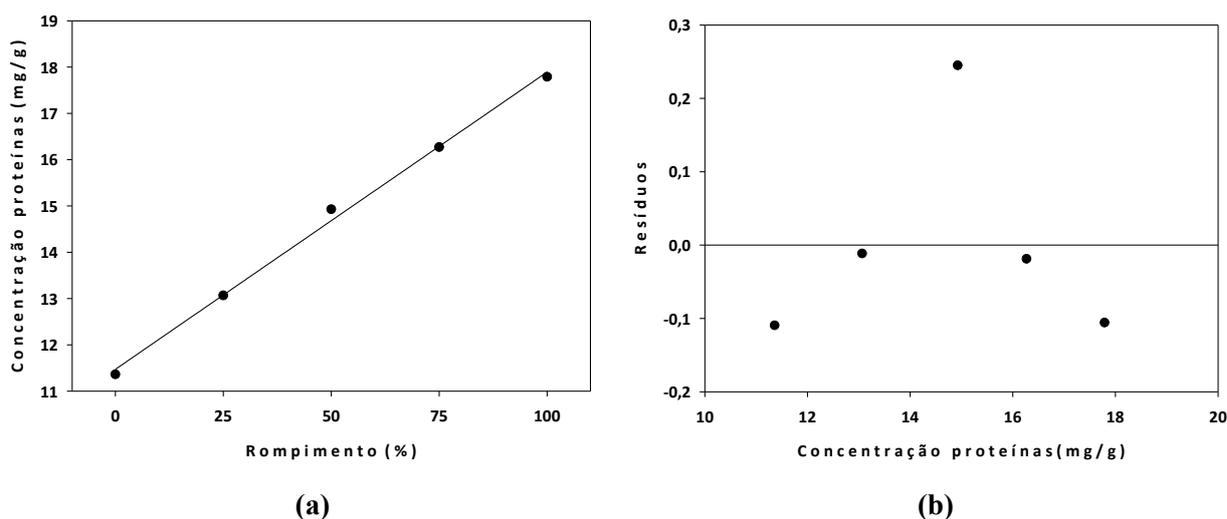
Rompimento	Absorbância 595 nm	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/g)
0%	0,753 ± 0,0563	298,080 ± 30,766	11,361 ± 1,192
25%	0,836 ± 0,0195	356,961 ± 13,756	13,671 ± 0,541
50%	0,890 ± 0,0204	395,252 ± 11,771	14,927 ± 0,356
75%	0,933 ± 0,0051	425,195 ± 2,952	16,269 ± 0,095
100%	0,989 ± 0,0038	464,731 ± 2,217	17,788 ± 0,137

**Tabela B.6** Coeficientes da regressão linear do teor de proteínas em função do nível de rompimento.

Equação		Coeficientes		t(4)	valor-P	R <sup>2</sup>
$y = ax + b$	a	0,0642	± 0,0021	30,4143	<0,0001	0,9968
	b	11,4703	± 0,1293	88,6905	<0,0001	

**Tabela B.7** Análise de Variância (ANOVA) da regressão linear do teor de proteínas em função do nível de rompimento.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P
Regressão	SQR 25,787	1,0	25,787	925,03	<0,0001
Resíduos	SQRes 0,0836	R-2 3	MQR 0,0279		
TOTAL	SQT 25,870	R-1 4	MQT 6,4676		



**Figura B.3** Análise de regressão entre os teores de proteínas e os níveis de rompimento: Dispersão dos dados e regressão linear (a) e distribuição dos resíduos do modelo (b).

## APÊNDICE C Memorial de dados de carboidratos

### C.1 Otimização da hidrólise do amido

#### C.1.1 Curva padrão de glicose

**Tabela C.1** Curva padrão de glicose.

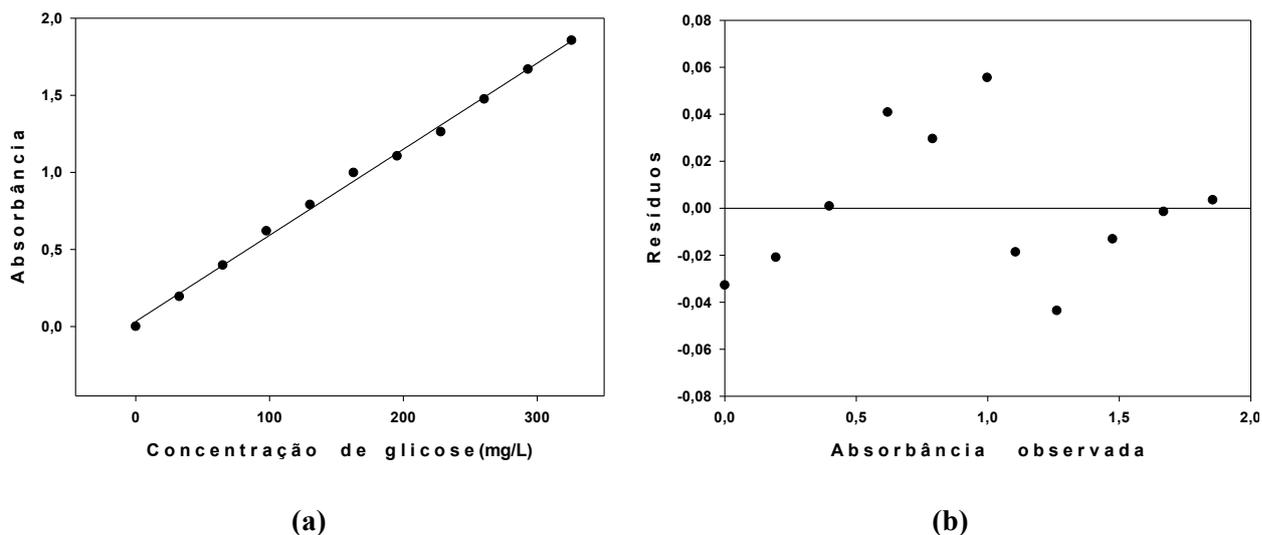
ID	Vol. Sol. Estoque (uL)	Vol. Água (uL)	Concentração glicose (mg/L)	Absorbância
0	0	1000	0,0	0,0004
1	50	950	32,6	0,1943
2	100	900	65,1	0,3976
3	150	850	97,7	0,6196
4	200	800	130,3	0,7904
5	250	750	162,8	0,9979
6	300	700	195,4	1,1057
7	350	650	228,0	1,2628
8	400	600	260,5	1,4748
9	450	550	293,1	1,6685
10	500	500	325,7	1,8555

**Tabela C.2** Coeficientes da regressão linear da curva padrão.

Variável	Valor	
<b>Coeficientes da regressão</b> ( $y = aX + b$ )	<b>a</b>	<b>b</b>
	0,0055847	0,0331568
<b>Coeficiente de correlação (<math>R^2</math>)</b>	0,9973817	

**Tabela C.3** Análise de Variância (ANOVA) da curva padrão de glicose.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade			Média Quadrática	F	valor-P
<b>Regressão</b>	<b>SQR</b>	3,64	<b>1,0</b>	1,0	<b>MQR</b>	3,6383	<b>MQF</b>
<b>Resíduos</b>	<b>SQRes</b>	0,01	<b>R-2</b>	11,0	<b>MQRes</b>	0,0009	<b>MQR</b>
<b>TOTAL</b>	<b>SQT</b>	3,65	<b>R-2</b>				



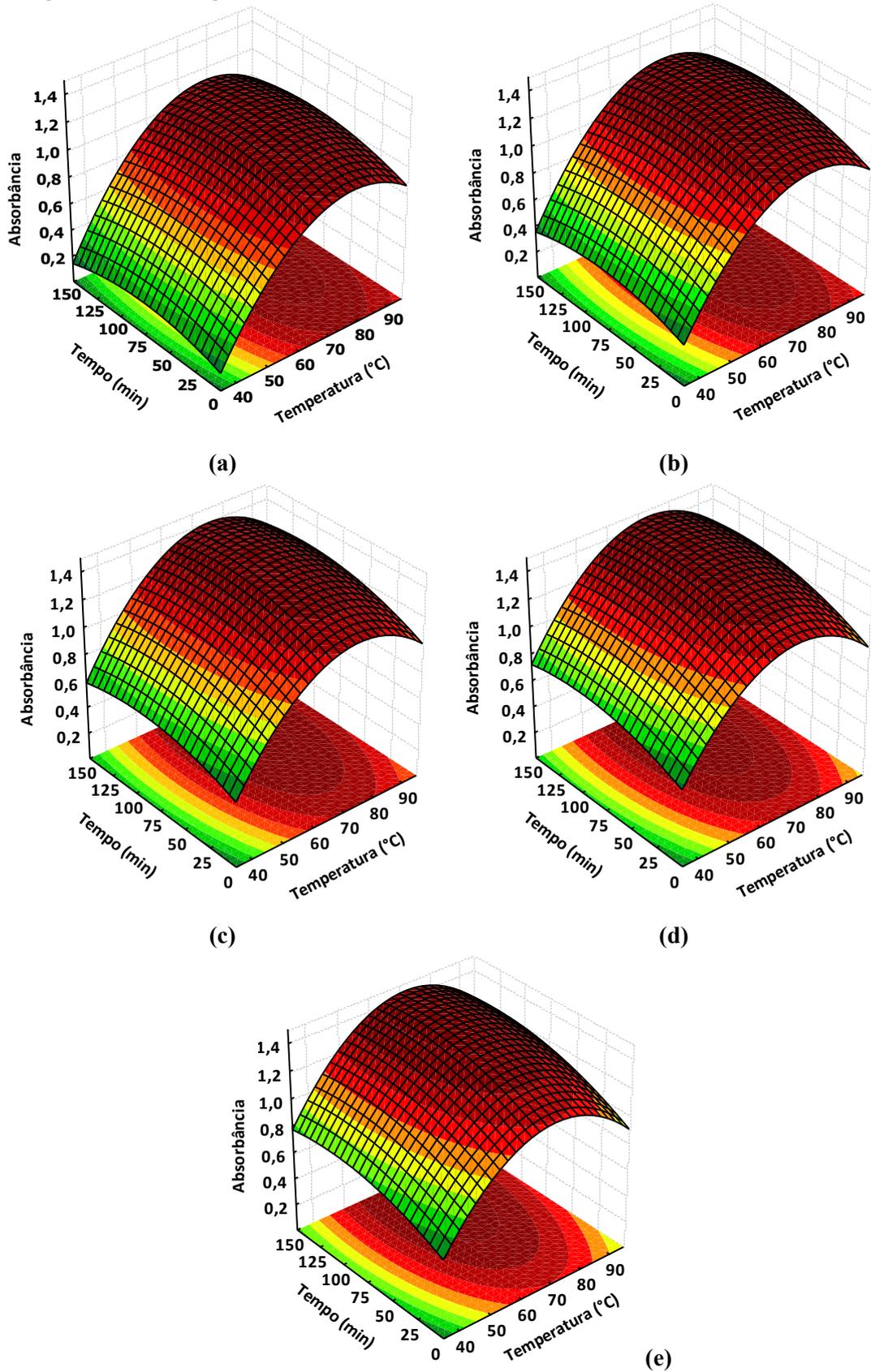
**Figura C.1** Curva padrão de glicose: Dispersão dos dados e regressão linear (a) e distribuição dos resíduos do modelo (b).

### C.1.2 Planejamento Composto Central

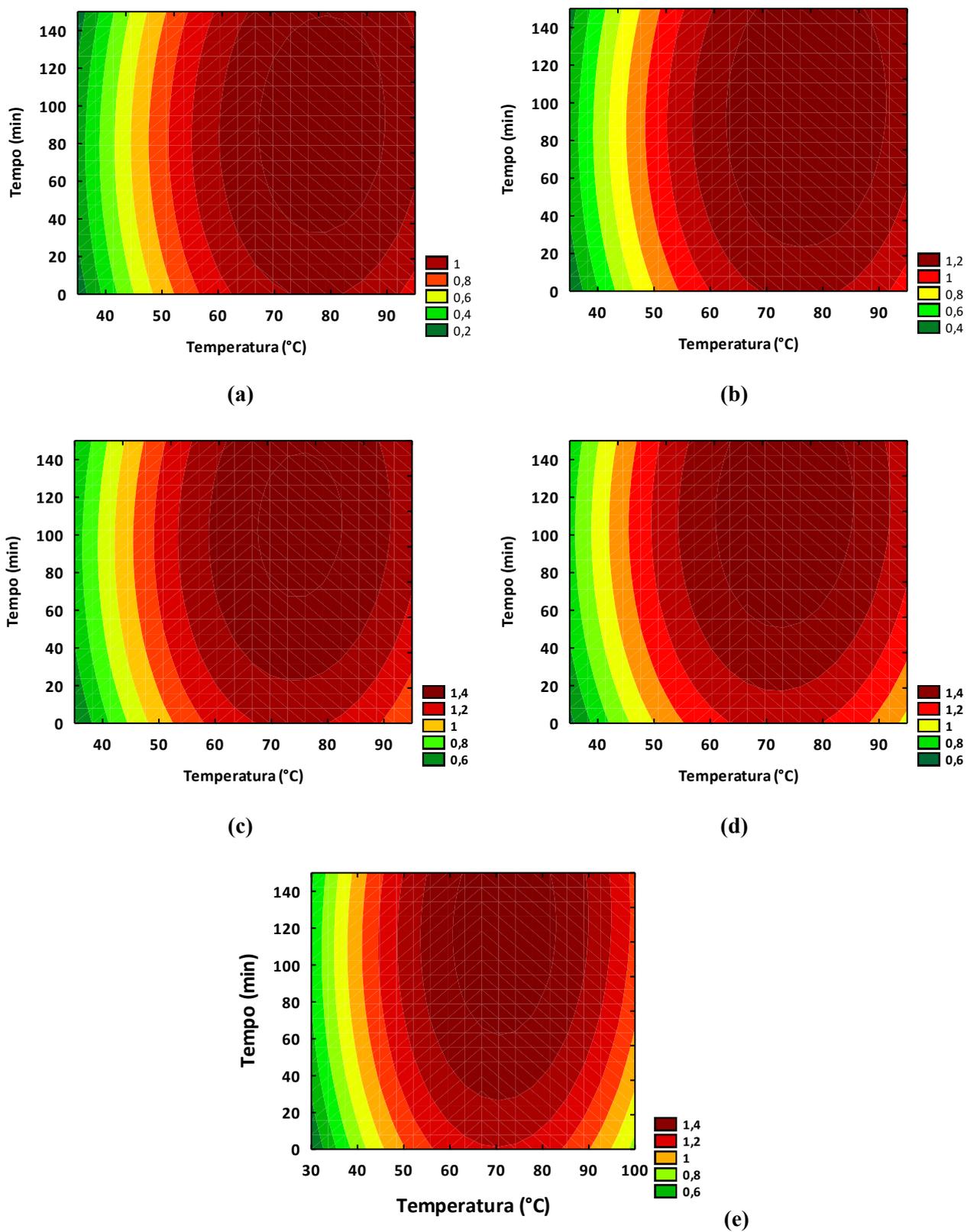
**Tabela C.4** DCCR a 3 variáveis para hidrólise do amido.

Ensaio	Codificado			Decodificado			Resposta	
	Temp. (°C)	Tempo (s)	Conc. Ácido (mol/L)	Temp. (°C)	Tempo (s)	Conc. Ácido (mol L <sup>-1</sup> )	Absorbância	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	40	30	1	0,980	169,5
2	-1	-1	1	40	30	3	1,083	195,1
3	-1	1	-1	40	90	1	0,927	182,1
4	-1	1	1	40	90	3	1,105	209,4
5	1	-1	-1	70	30	1	1,459	273,0
6	1	-1	1	70	30	3	1,415	270,8
7	1	1	-1	70	90	1	1,364	257,4
8	1	1	1	70	90	3	1,342	259,9
9	-1,682	0	0	29,8	60	2	0,810	156,7
10	1,682	0	0	80,2	60	2	1,359	262,3
11	0	-1,682	0	55	9,5	2	1,123	207,2
12	0	1,682	0	55	110	2	1,357	258,8
13	0	0	-1,682	55	60	0,30	1,114	204,2
14	0	0	1,682	55	60	3,68	1,426	261,4
15	0	0	0	55	60	2	1,359	249,5
16	0	0	0	55	60	2	1,330	255,5
17	0	0	0	55	60	2	1,482	271,4
18	0	0	0	55	60	2	1,312	247,7
19	0	0	0	55	60	2	1,397	263,5

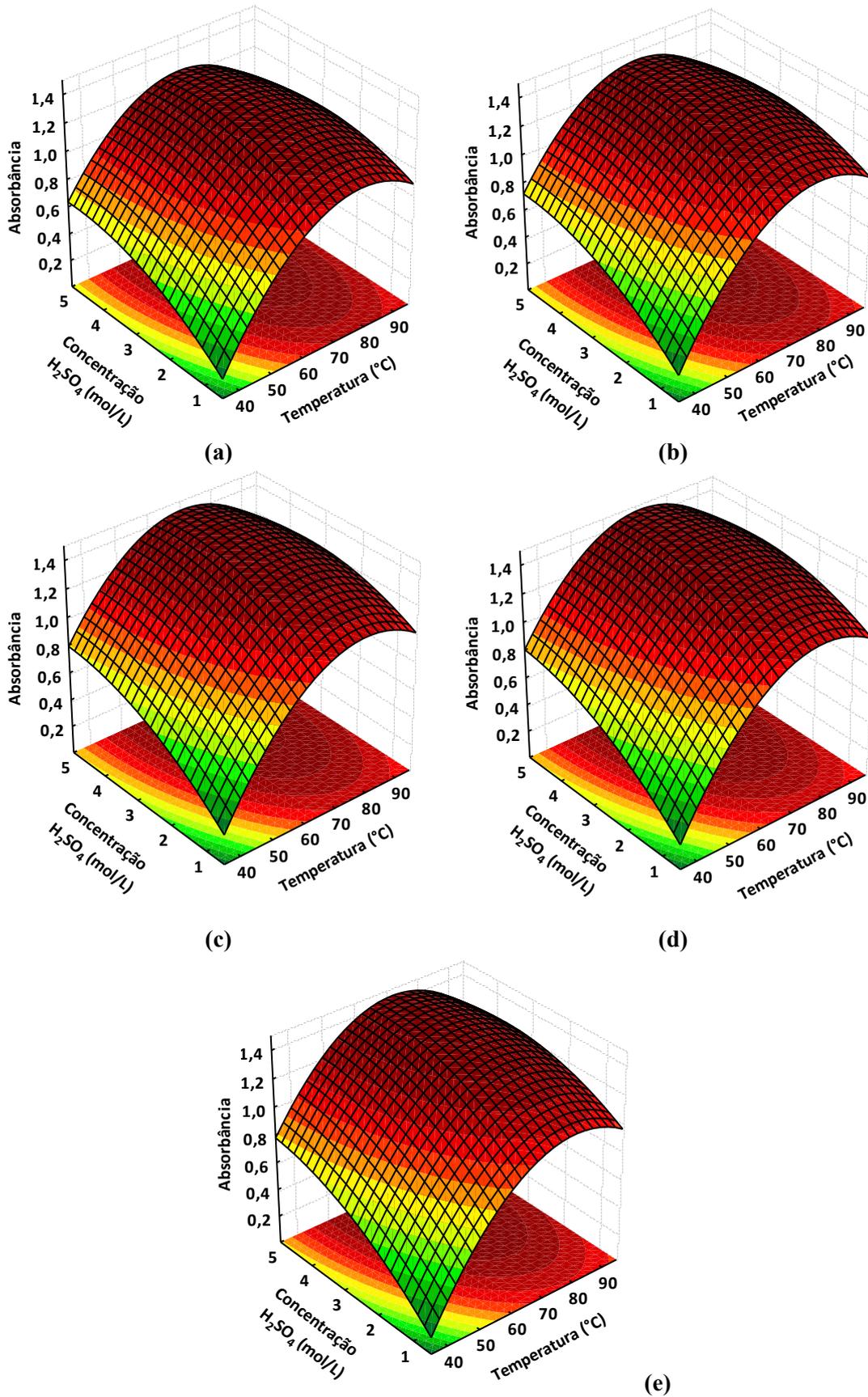
### C.1.3 Superfícies de resposta



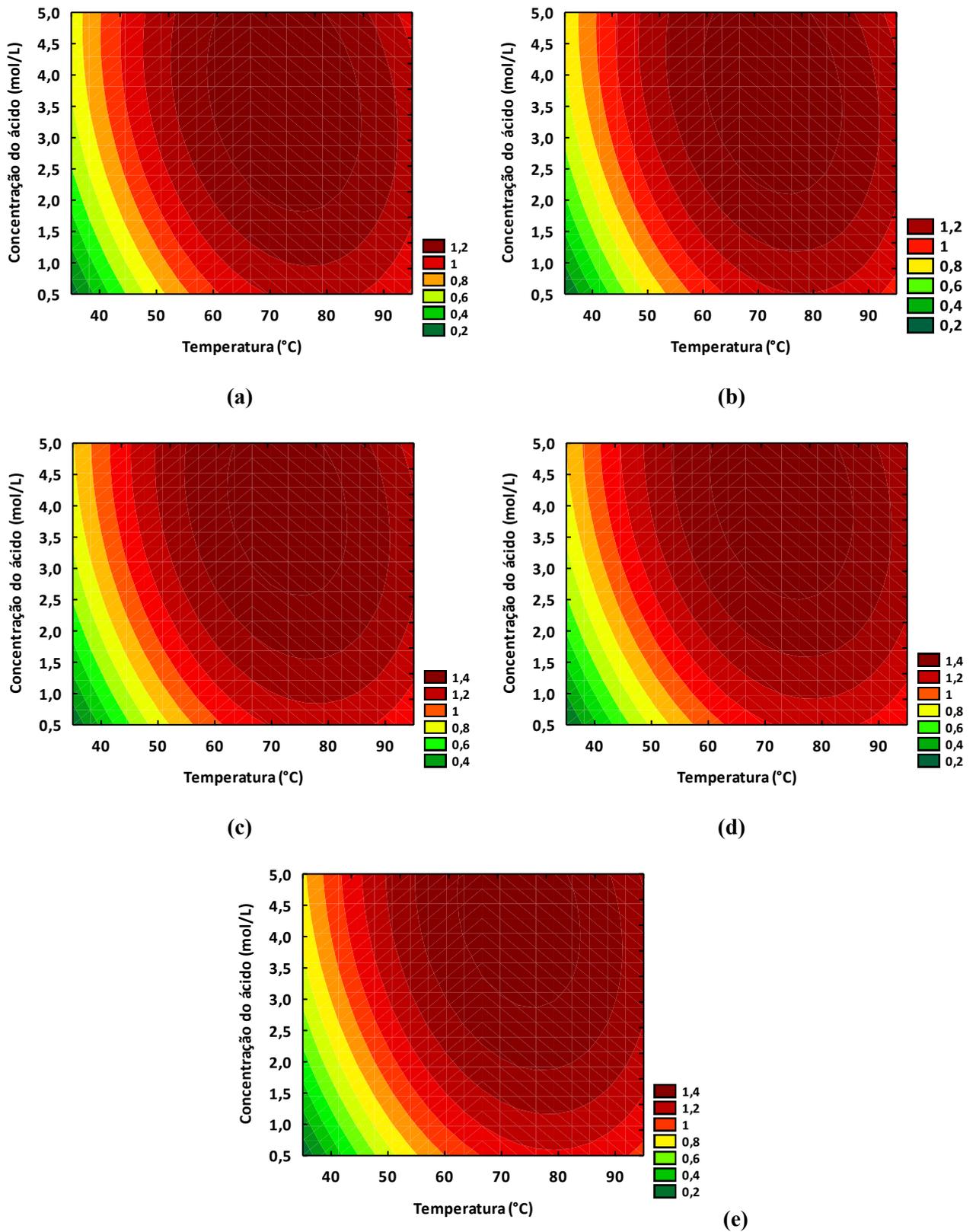
**Figura C.2** Superfícies de resposta da hidrólise do amido nas concentrações de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,6 mol/L (a), 1,5 mol/L (b), 2,8 mol/L (c), 4,0 mol/L (d) e 4,9 mol/L (e), com variação de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo (min).



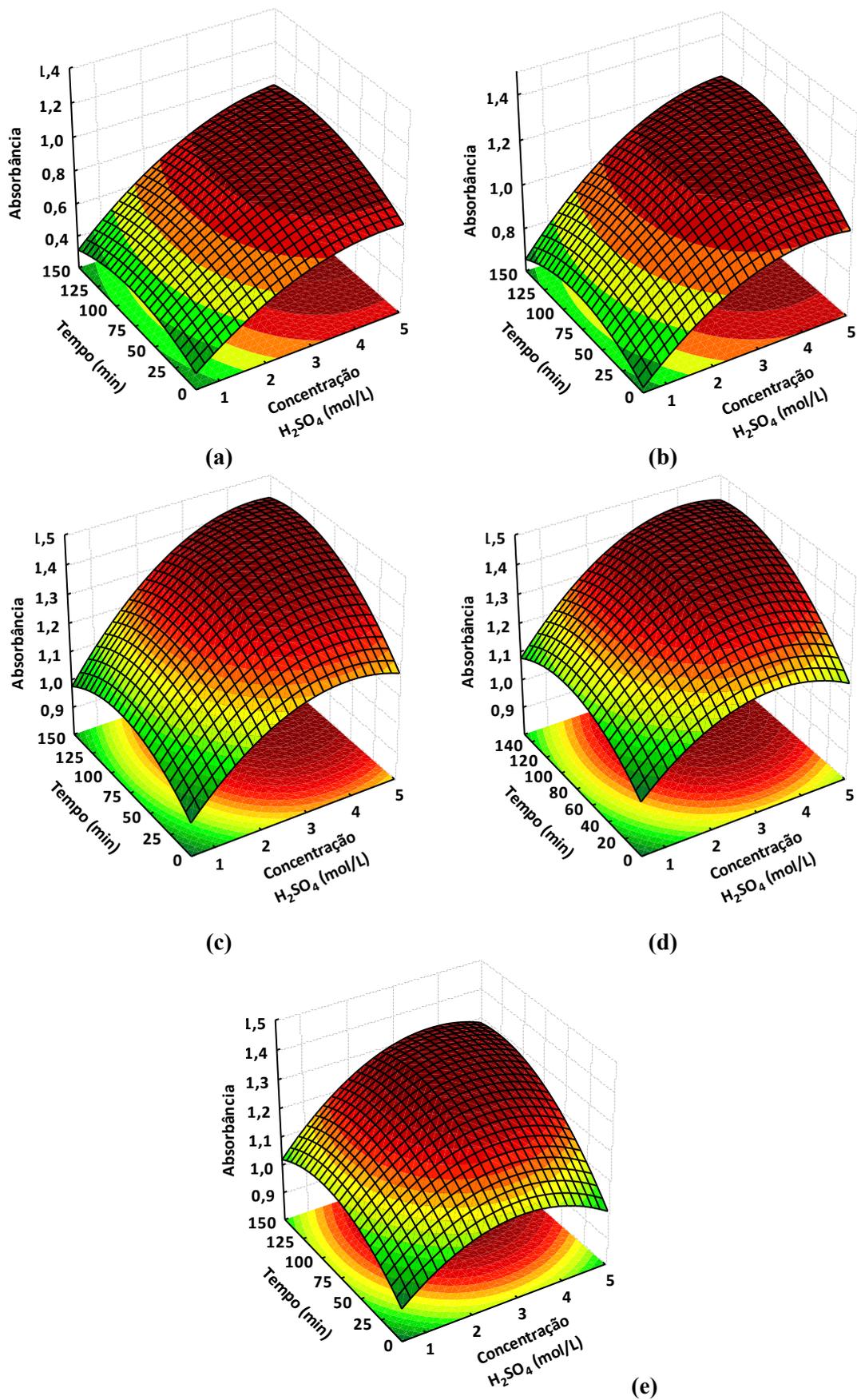
**Figura C.3** Gráficos de contorno da hidrólise do amido nas concentrações de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,6 mol/L (a), 1,5 mol/L (b), 2,8 mol/L (c), 4,0 mol/L (d) e 4,9 mol/L (e), com variação de temperatura (°C) e tempo (min) em função da absorbância.



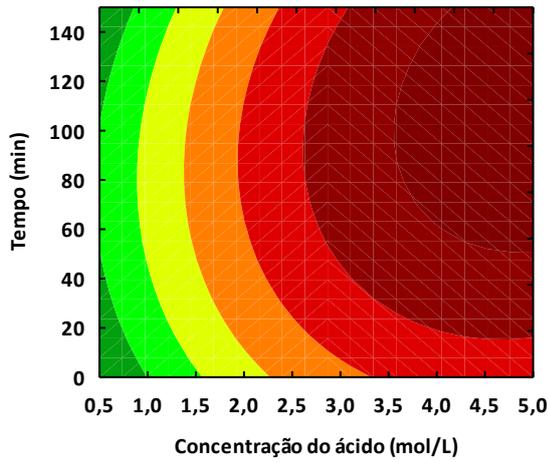
**Figura C.4** Superfícies de resposta da hidrólise do amido nos tempos 12,7 min (a), 40 min (b), 80 min (c), 120 min (d) e 147 min (e), com variação de temperatura ( $^{\circ}C$ ) e concentração de  $H_2SO_4$  (mol/L) em função da absorbância.



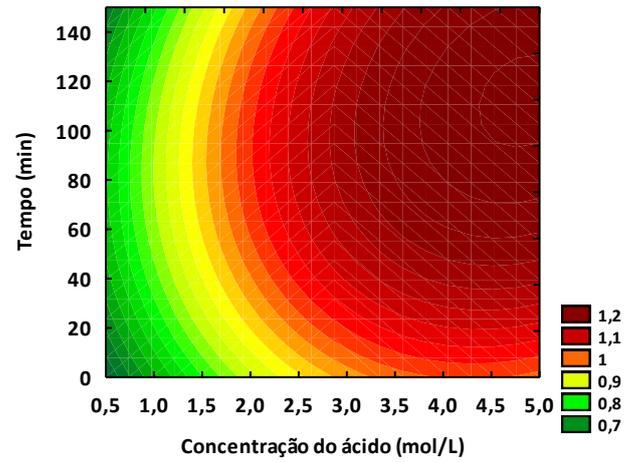
**Figura C.5** Gráficos de contorno da hidrólise do amido nos tempos 12,7 min (a), 40 min (b), 80 min (c), 120 min (d) e 147 min (e), com variação de temperatura (°C) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mol/L) em função da absorbância.



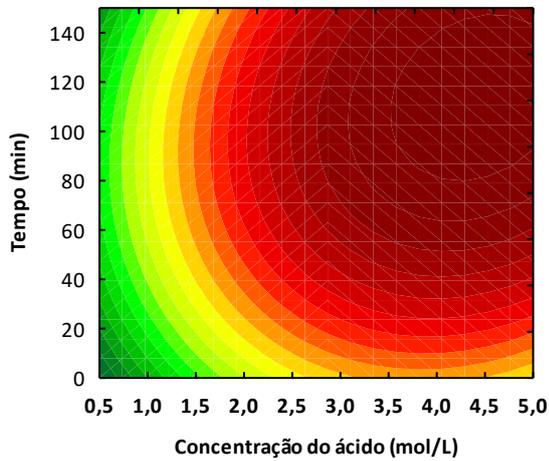
**Figura C.6** Superfícies de resposta da hidrólise do amido nas temperaturas 39,8°C (a), 50°C (b), 65°C (c), 80°C (d) e 90,2°C (e), com variação de tempo (min) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mol/L) em função da absorbância.



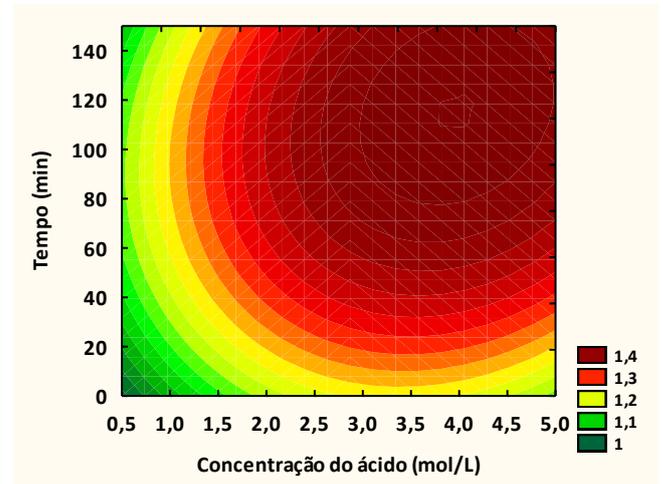
(a)



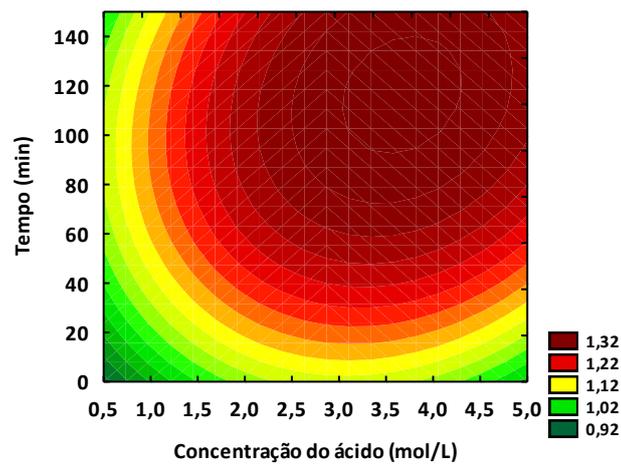
(b)



(c)



(d)



(e)

**Figura C.7** Gráficos de contorno da hidrólise do amido nas temperaturas 39,8°C (a), 50°C (b), 65°C (c), 80°C (d) e 90,2°C (e), com variação de tempo (min) e concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (mol/L) em função da absorbância.

## C.1.4 Análise estatística

### C.1.4.1 Efeitos e coeficiente do modelo

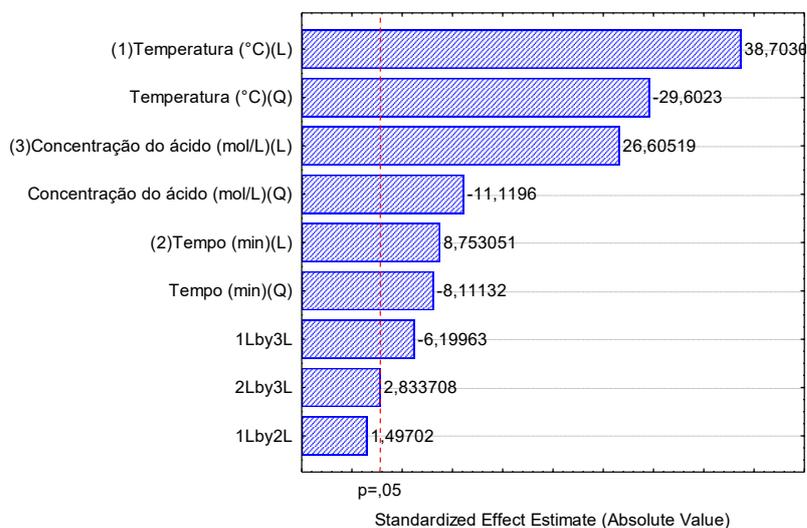


Figura C.8 Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a hidrólise do amido.

Tabela C.5 Efeitos das variáveis e coeficientes do modelo.

	Efeitos	Erro Padrão	t(4)	p	Coefficientes	Erro Padrão
<b>b0</b>	1,366256	0,006138	222,5953	<b>0,000000</b>	1,366256	0,006138
<b>b1</b>	0,287631	0,007432	38,7030	<b>0,000003</b>	0,143815	0,003716
<b>b11</b>	-0,220009	0,007432	-29,6023	<b>0,000008</b>	-0,110004	0,003716
<b>b2</b>	0,065050	0,007432	8,7531	<b>0,000939</b>	0,032525	0,003716
<b>b22</b>	-0,060285	0,007432	-8,1113	<b>0,001256</b>	-0,030142	0,003716
<b>b3</b>	0,197661	0,007429	26,6052	<b>0,000012</b>	0,098831	0,003715
<b>b33</b>	-0,082720	0,007439	-11,1196	<b>0,000372</b>	-0,041360	0,003720
<b>b12</b>	0,014533	0,009708	1,4970	0,208734	0,007266	0,004854
<b>b13</b>	-0,060165	0,009705	-6,1996	<b>0,003443</b>	-0,030082	0,004852
<b>b23</b>	0,027500	0,009705	2,8337	<b>0,047167</b>	0,013750	0,004852

### C.1.4.2 Ajuste do modelo

Tabela C.6 Análise de variância do ajuste do modelo.

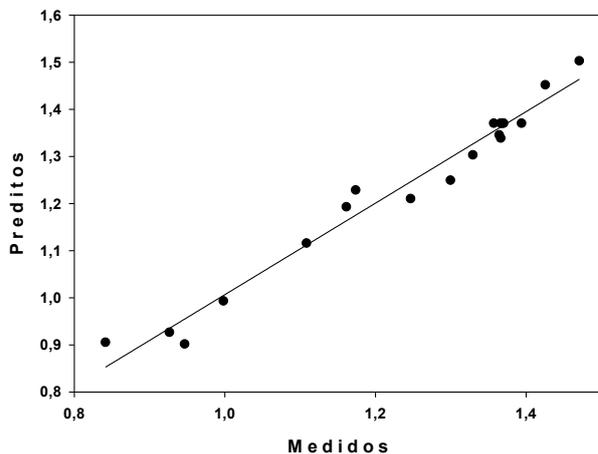
Fonte de Variação	ANOVA DA REGRESSÃO				
	SQ	nGL	MQ	F	p
<b>Regressão</b>	0,6283	5	0,1257	33,0	<b>7,8E-04</b>
<b>Resíduos</b>	0,0191	5	0,0038		
<b>Falta de Ajuste</b>	0,0183	3	0,0061	16,2	5,9E-02
<b>Erro Puro</b>	0,0008	2	0,0004		
<b>Total</b>	0,6466	10	0,0647		

**Tabela C.7** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo.

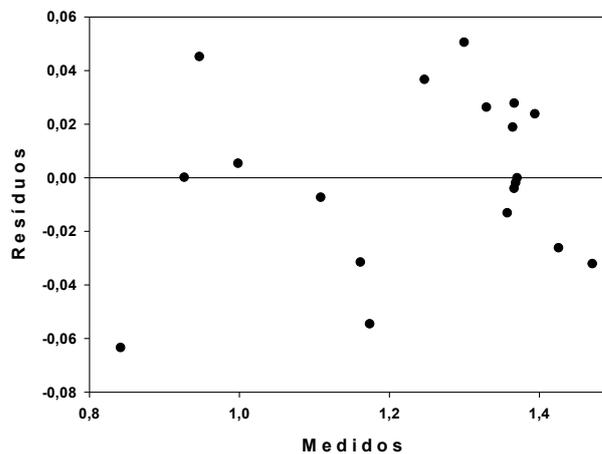
Variável	Valor	
<b>Coeficientes da regressão</b> ( $y = aX + b$ )	<b>a</b>	<b>b</b>
	0,97169	0,03504
<b>Coeficiente de correlação (<math>R^2</math>)</b>	0,9717	

**Tabela C.8** Análise de Variância (ANOVA) da curva de identidade do modelo.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P
<b>Regressão</b>	<b>SQR</b> 4,06	<b>1,00</b> 1,0	<b>MQR</b> 4,0624	5247,83	4,44E-16
<b>Resíduos</b>	<b>SQRes</b> 0,01	<b>R-2</b> 11,0	<b>MQRes</b> 0,0008		
<b>TOTAL</b>	<b>SQT</b> 4,07	<b>R-2</b>			



(a)



(b)

**Figura C.9** Identidade do modelo: análise de regressão entre a absorvância medida e a predita (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste.

## C.2 Otimização da hidrólise da biomassa

### C.2.1 Curva padrão de glicose

Tabela C.5 Curva padrão de glicose.

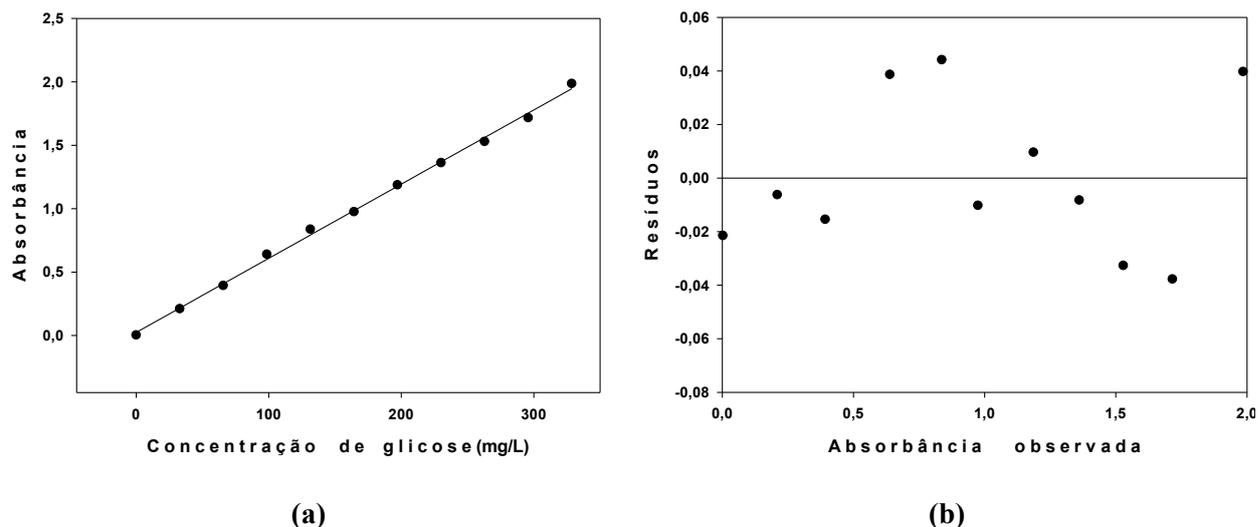
ID	Vol. Sol. Estoque (uL)	Vol. Água (uL)	Concentração glicose (mg/L)	Absorbância
0	0	1000	0,000	0,003
1	50	950	32,870	0,210
2	100	900	65,739	0,393
3	150	850	98,609	0,639
4	200	800	131,478	0,837
5	250	750	164,348	0,975
6	300	700	197,217	1,187
7	350	650	230,087	1,361
8	400	600	262,957	1,529
9	450	550	295,826	1,716
10	500	500	328,696	1,986

Tabela C.6 Coeficientes da regressão linear da curva padrão.

Variável	Valor	
<b>Coeficientes da regressão</b> ( $y = aX + b$ )	<b>a</b>	<b>b</b>
	0,0058465	0,0241011
<b>Coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>)</b>	0,9979	

Tabela C.7 Análise de Variância (ANOVA) da curva padrão.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P
<b>Regressão</b>	SQR 4,1	1,0	MQR 4,1	MQR	
<b>Resíduos</b>	SQRes 0,0	R-2 8,0	MQRRes 0,0	MQR 3816,6	5,24E-12
<b>TOTAL</b>	SQT 4,1	R-2			



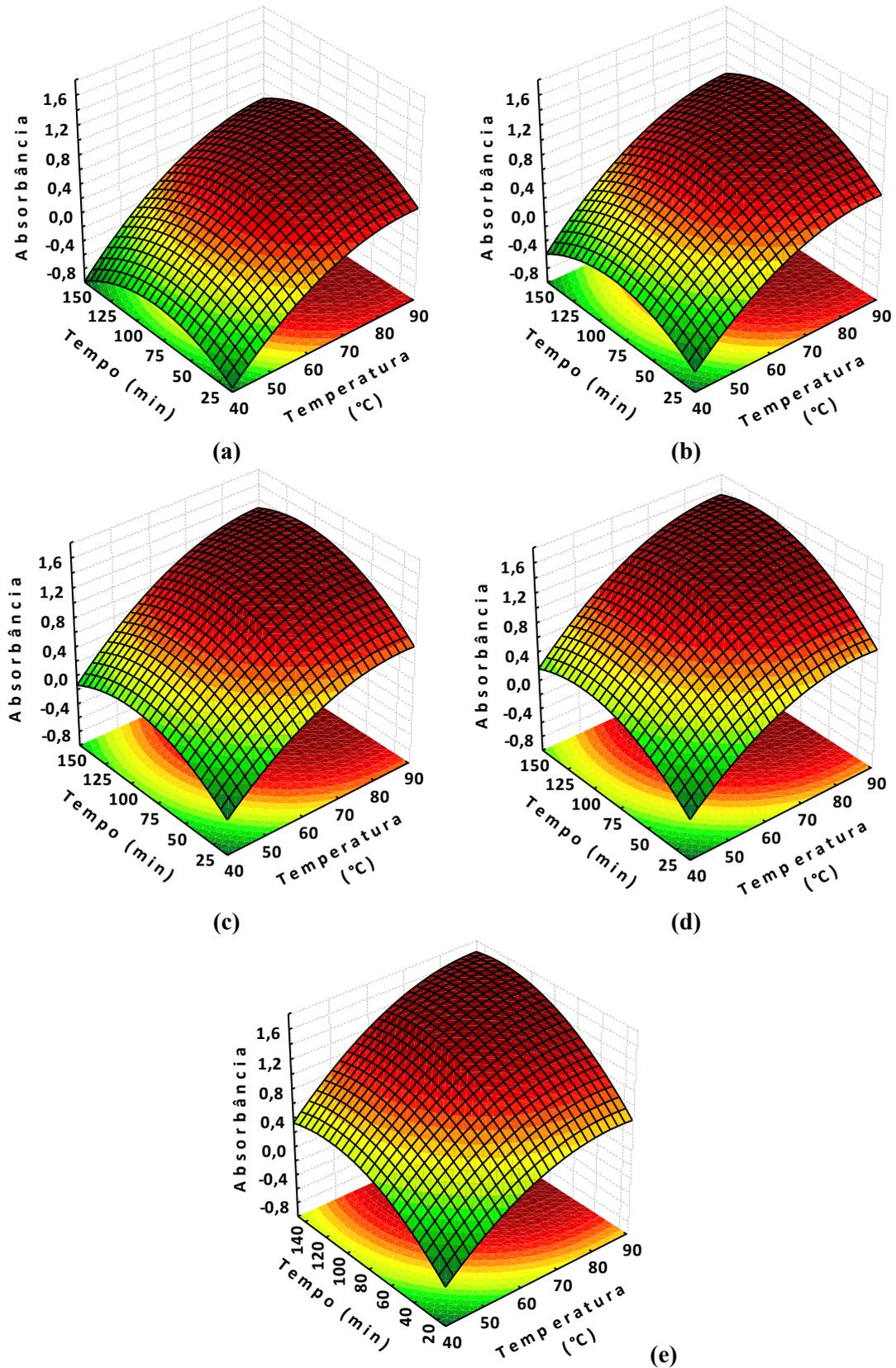
**Figura C.10** Curva padrão de glicose: Dispersão dos dados e regressão linear (a) e distribuição dos resíduos do modelo (b).

## C.2.2 Planejamento Composto Central

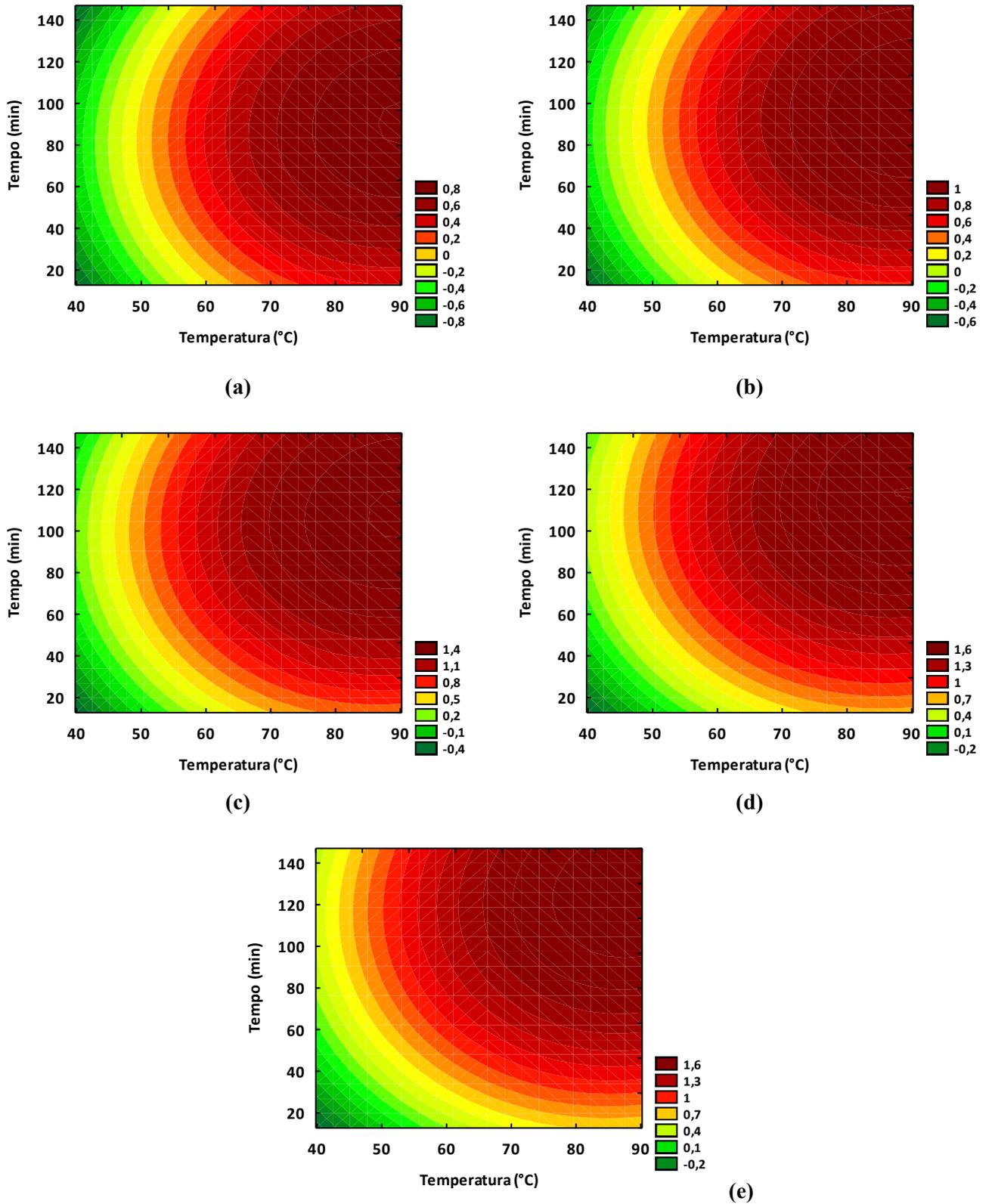
**Tabela C.8** DCCR a 3 variáveis para hidrólise da biomassa

Ensaio	Codificado			Decodificado			Resposta		
	Temp. (°C)	Tempo (s)	Conc. Ácido (mol/L)	Temp. (°C)	Tempo (s)	Conc. Ácido (mol/L)	ABS	Conc. (mg/L)	Conc. (% m/m)
1	-1	-1	-1	40	30	1	0,322	114,4	6,2
2	-1	-1	1	40	30	3	0,234	82,5	4,4
3	-1	1	-1	40	90	1	0,112	37,7	2,0
4	-1	1	1	40	90	3	0,640	230,5	12,4
5	1	-1	-1	70	30	1	1,001	362,0	19,1
6	1	-1	1	70	30	3	1,249	452,3	24,2
7	1	1	-1	70	90	1	1,255	454,6	24,0
8	1	1	1	70	90	3	1,257	455,4	24,4
9	-1,682	0	0	29,8	60	2	0,153	52,7	2,9
10	1,682	0	0	80,2	60	2	1,237	448,1	23,5
11	0	-1,682	0	55	9,5	2	0,197	68,7	3,6
12	0	1,682	0	55	110	2	1,099	397,5	20,9
13	0	0	-1,682	55	60	0,30	0,196	68,7	3,6
14	0	0	1,682	55	60	3,68	1,371	496,9	26,2
15	0	0	0	55	60	2	1,064	384,8	20,4
16	0	0	0	55	60	2	1,024	370,5	19,4
17	0	0	0	55	60	2	1,122	406,2	21,4
18	0	0	0	55	60	2	0,992	358,8	18,6
19	0	0	0	55	60	2	1,037	375,1	19,7

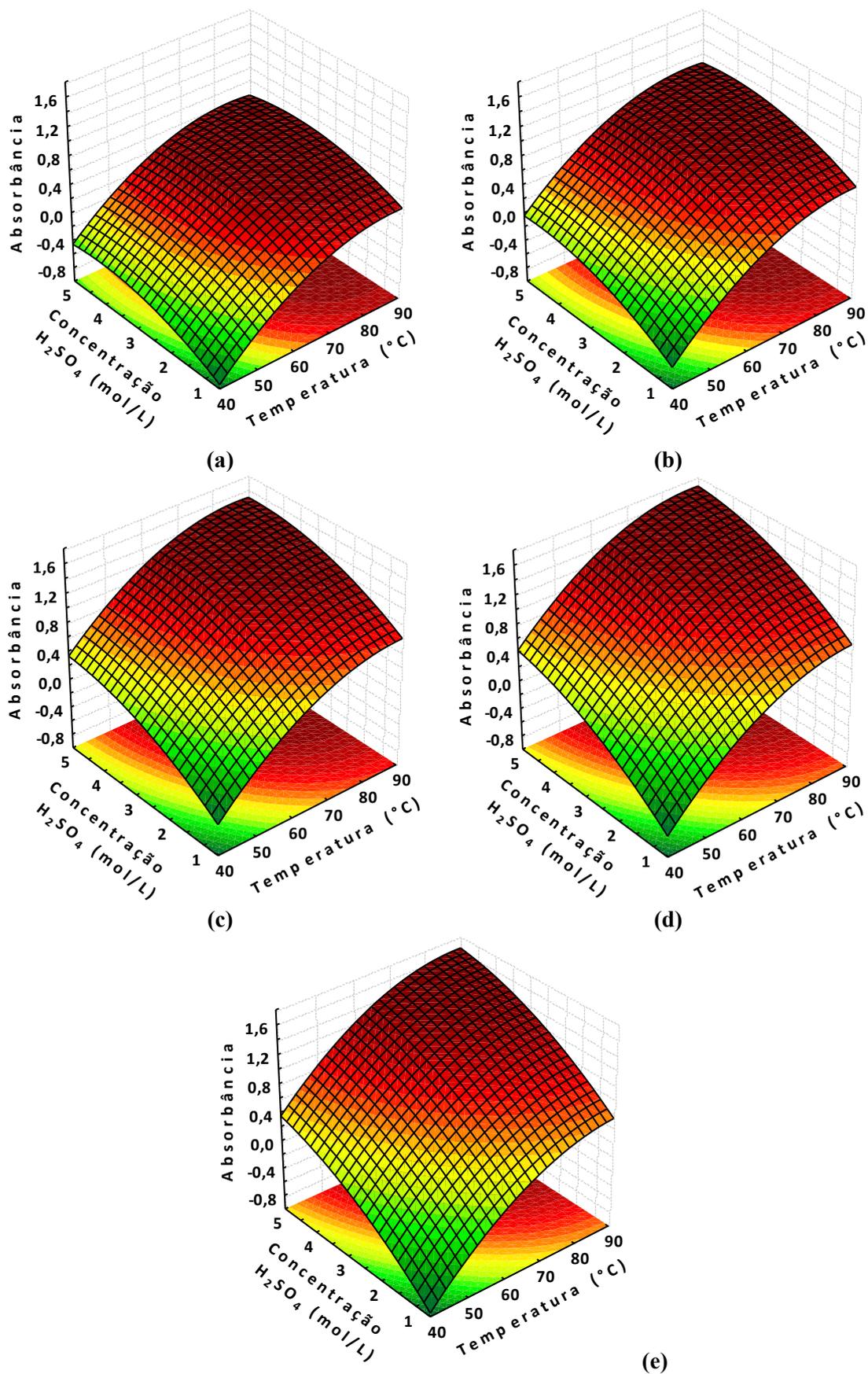
### C.2.3 Superfícies de resposta



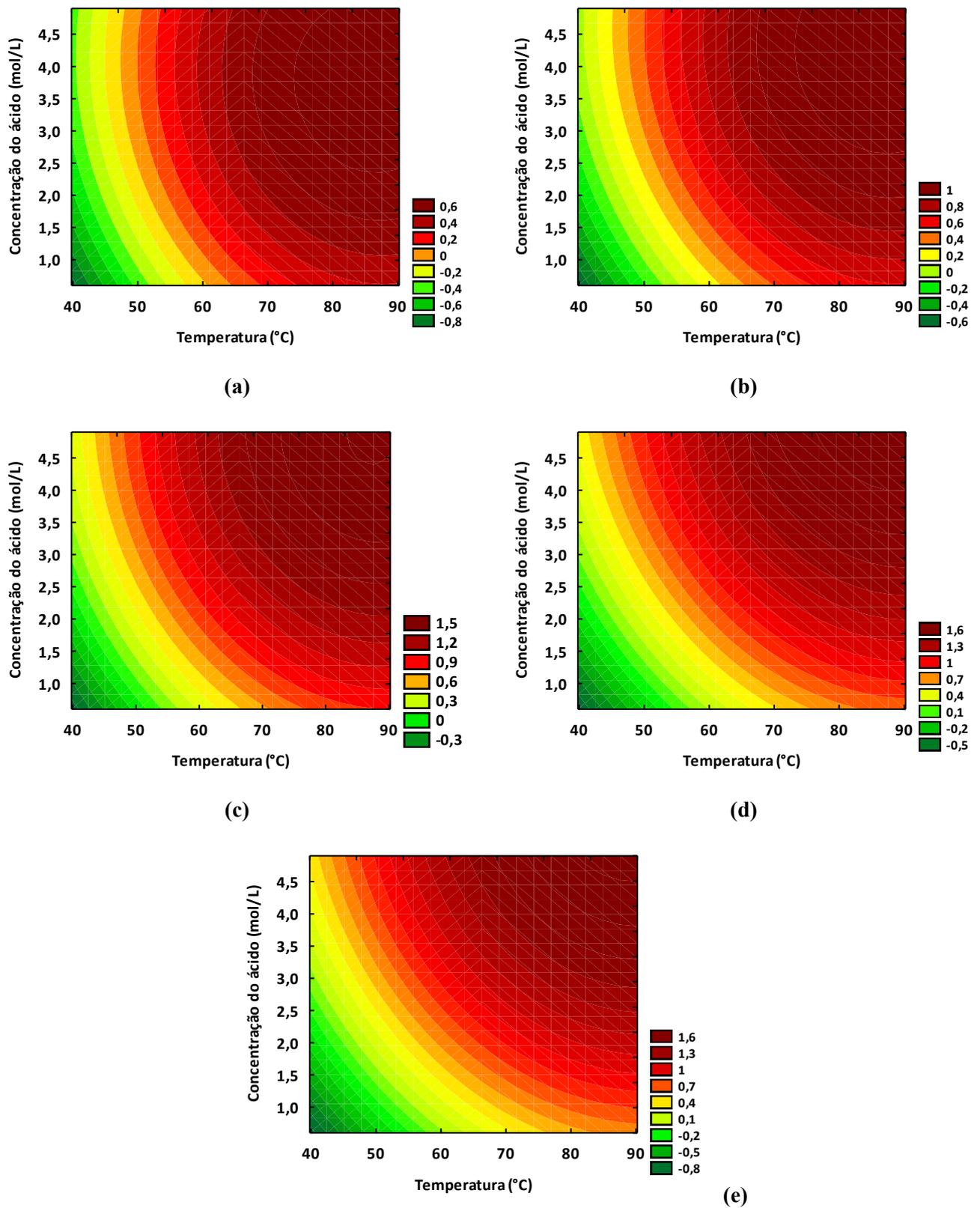
**Figura C.11** Superfícies de resposta da hidrólise da biomassa nas concentrações de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $0,6 \text{ mol/L}$  (a),  $1,5 \text{ mol/L}$  (b),  $2,8 \text{ mol/L}$  (c),  $4,0 \text{ mol/L}$  (d) e  $4,9 \text{ mol/L}$  (e), com variação de temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) e tempo (min).



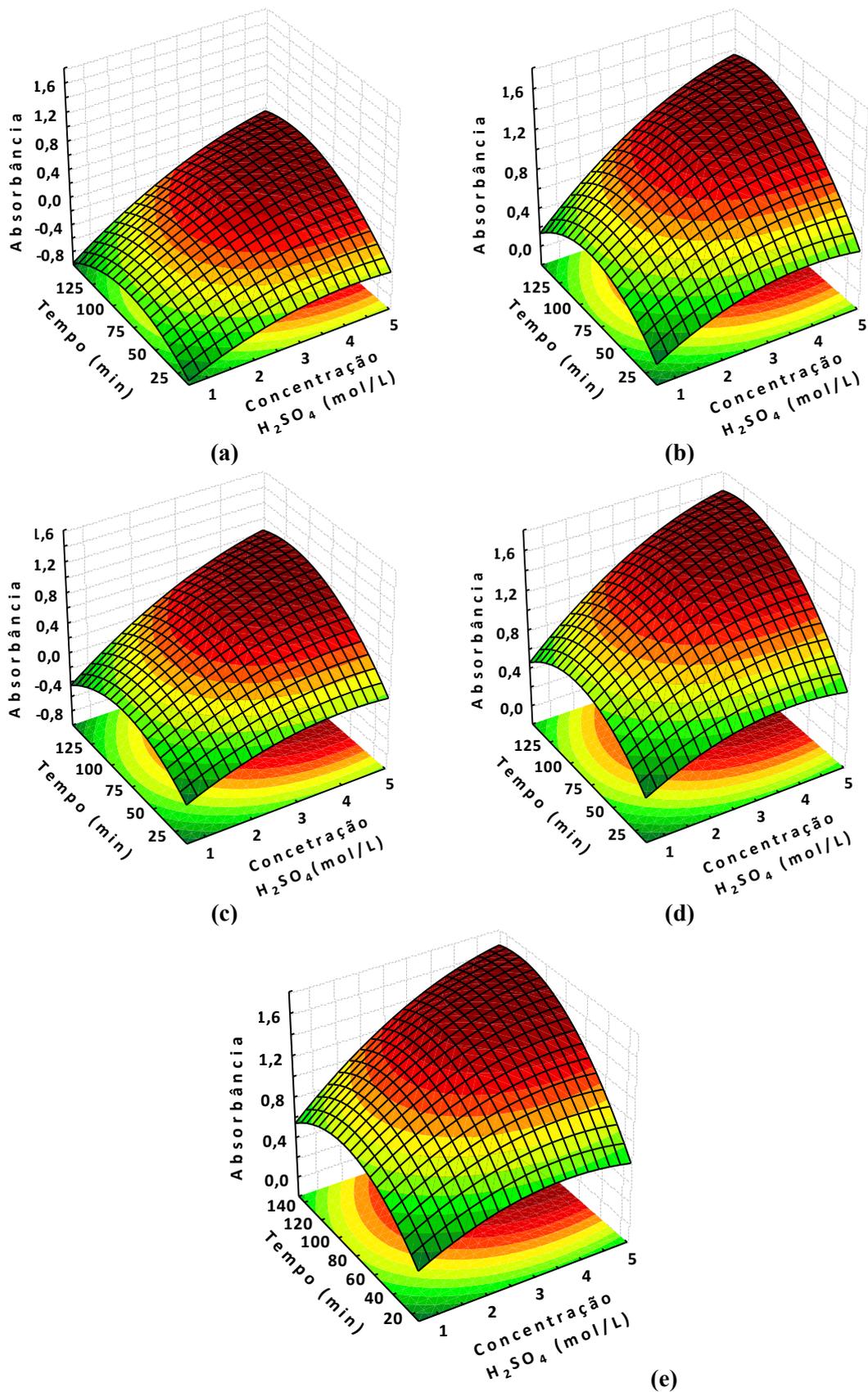
**Figura C.12** Gráficos de contorno da hidrólise da biomassa nas concentrações de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $0,6 \text{ mol/L}$  (a),  $1,5 \text{ mol/L}$  (b),  $2,8 \text{ mol/L}$  (c),  $4,0 \text{ mol/L}$  (d) e  $4,9 \text{ mol/L}$  (e), com variação de temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) e tempo (min) em função da absorbância.



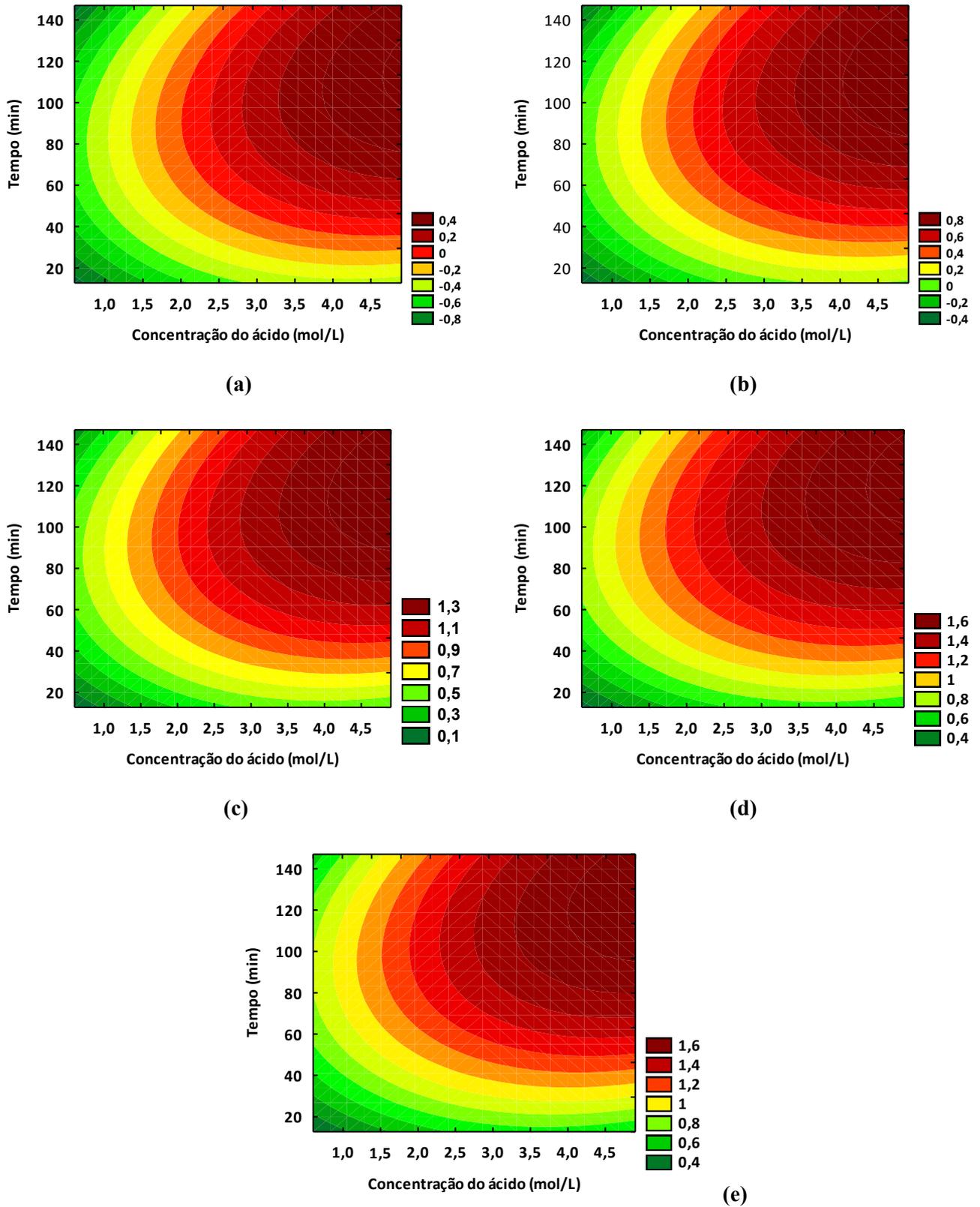
**Figura C.13** Superfícies de resposta da hidrólise da biomassa nos tempos 12,7 min (a), 40 min (b), 80 min (c), 120 min (d) e 147 min (e), com variação de temperatura ( $^{\circ}C$ ) e concentração de  $H_2SO_4$  (mol/L) em função da absorbância.



**Figura C.14** Gráficos de contorno da hidrólise da biomassa nos tempos 12,7 min (a), 40 min (b), 80 min (c), 120 min (d) e 147 min (e), com variação de temperatura (°C) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mol/L) em função da absorbância.



**Figura C.15** Superfícies de resposta da hidrólise da biomassa nas temperaturas 39,8°C (a), 50°C (b), 65°C (c), 80°C (d) e 90,2°C (e), com variação de tempo (min) e concentração de  $H_2SO_4$  (mol/L) em função da absorbância.



**Figura C.16** Gráficos de contorno da hidrólise da biomassa nas temperaturas 39,8°C (a), 50°C (b), 65°C (c), 80°C (d) e 90,2°C (e), com variação de tempo (min) e concentração de  $H_2SO_4$  (mol/L) em função da absorbância.

## C.2.4 Análise estatística

### C.2.4.1 Efeitos e coeficiente do modelo

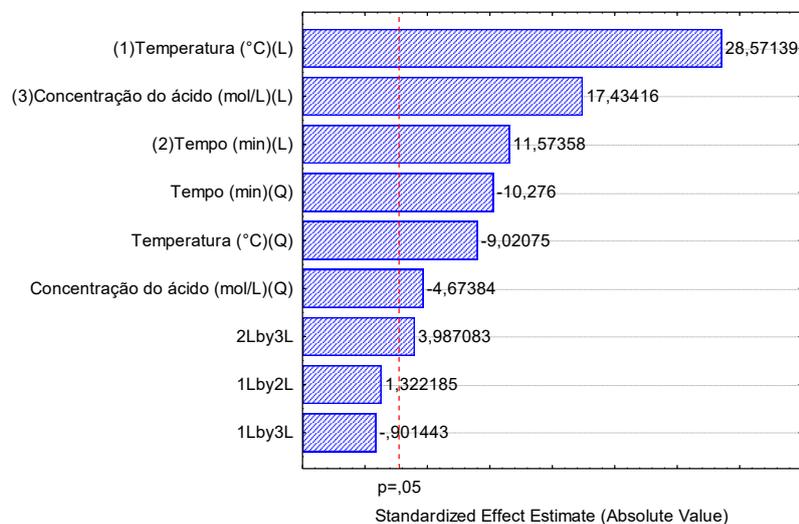


Figura C.17 Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para a hidrólise da biomassa.

Tabela C.9 Efeitos das variáveis e coeficientes do modelo.

Efeitos	Coeficientes	Erro Padrão	t(4)	p	Erro Padrão
<b>b0</b>	1,036773	0,021837	47,4782	<b>0,000001</b>	0,021837
<b>b1</b>	0,755609	0,026446	28,5714	<b>0,000009</b>	0,013223
<b>b11</b>	-0,238727	0,026464	-9,0207	<b>0,000836</b>	0,013232
<b>b2</b>	0,306012	0,026441	11,5736	<b>0,000318</b>	0,013220
<b>b22</b>	-0,271710	0,026441	-10,2760	<b>0,000506</b>	0,013221
<b>b3</b>	0,460824	0,026432	17,4342	<b>0,000064</b>	0,013216
<b>b33</b>	-0,123697	0,026466	-4,6738	<b>0,009491</b>	0,013233
<b>b12</b>	0,045666	0,034538	1,3222	0,256644	0,017269
<b>b13</b>	-0,031124	0,034527	-0,9014	<b>0,418324</b>	0,017263
<b>b23</b>	0,137661	0,034527	3,9871	<b>0,016305</b>	0,017263

### C.1.2.4.2 - Ajuste do modelo

Tabela C.10 Análise de variância do ajuste do modelo.

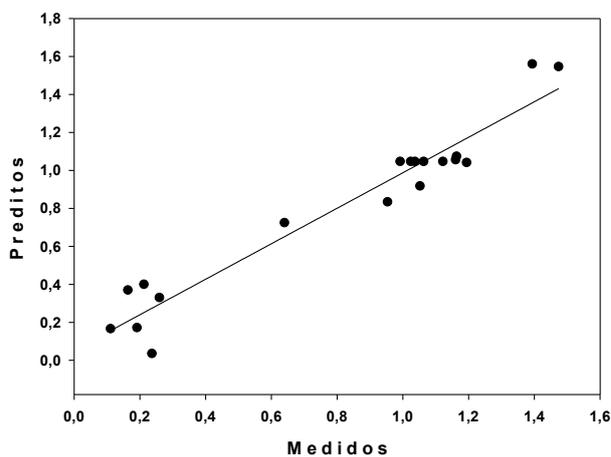
Fonte de Variação	SQ	nGL	MQ	F	p
<b>Regressão</b>	3,60	9	0,400	13,9	<b>2,9E-04</b>
<b>Resíduos</b>	0,26	9	0,029		
<b>Falta de Ajuste</b>	0,25	5	0,050	21,0	<b>5,7E-03</b>
<b>Erro Puro</b>	0,0095	4	0,002		
<b>Total</b>	3,85	18	0,214		

**Tabela C.11** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo.

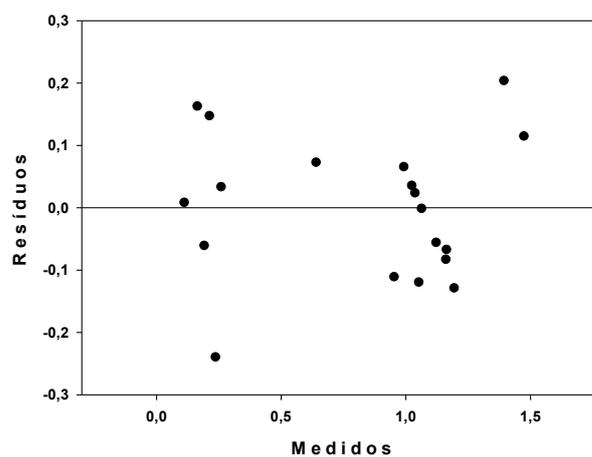
Variável	Valor	
<b>Coeficientes da regressão</b> ( $y = aX + b$ )	<b>a</b>	<b>b</b>
	0,9350	0,0529
<b>Coeficiente de correlação (<math>R^2</math>)</b>	0,9350	

**Tabela C.12** Análise de Variância (ANOVA) da curva de identidade do modelo.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P
<b>Regressão</b>	<b>SQR</b> 3,4	<b>1,0</b> 1,0	<b>MQR</b> 3,369	<b>MQF</b>	
<b>Resíduos</b>	<b>SQRes</b> 0,2	<b>R-2</b> 8,0	<b>MQRes</b> 0,029	<b>MQR</b> 115,0	5,02E-06
<b>TOTAL</b>	<b>SQT</b> 3,6	<b>R-2</b>			



(a)



(b)

**Figura C.18** Identidade do modelo: análise de regressão entre a absorvância medida e a predita (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste.

### C.3 Validação como indicador de rompimento celular

#### C.3.1 Curva padrão de glicose

Tabela C.13 Solução estoque de glicose.

Medida	Valor
Massa glicose (g)	0,0324
Volume de solução (mL)	50
Concentração (mg/L)	648

Tabela C.14 Curva padrão de glicose.

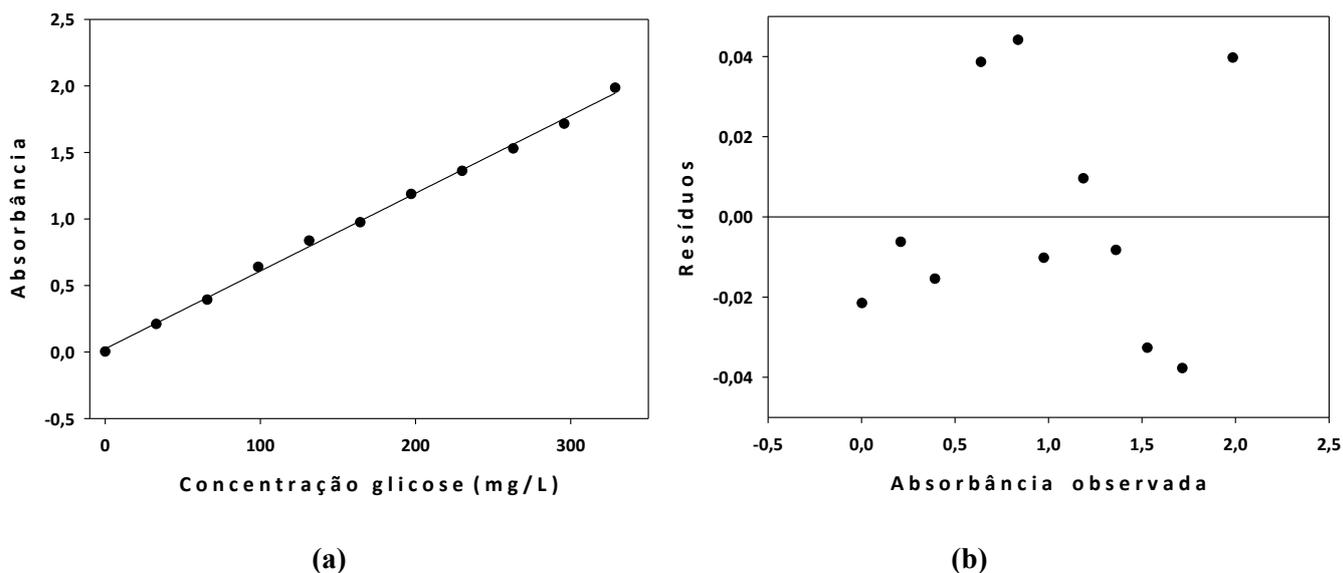
ID	Solução Estoque (uL)	Água (uL)	Concentração glicose (mg/L)	Absorbância
0	0	1000	0,0	0,003 ± 0,0039
1	50	950	32,9	0,210 ± 0,0058
2	100	900	65,7	0,393 ± 0,0202
3	150	850	98,6	0,639 ± 0,0105
4	200	800	131,5	0,837 ± 0,0120
5	250	750	164,3	0,975 ± 0,0199
6	300	700	197,2	1,187 ± 0,1033
7	350	650	230,1	1,361 ± 0,0517
8	400	600	263,0	1,529 ± 0,0378
9	450	550	295,8	1,716 ± 0,0720
10	500	500	328,7	1,986 ± 0,0651

Tabela C.15 Coeficientes da regressão linear da curva padrão de glicose.

Equação	Coefficientes	t	valor-P	R <sup>2</sup>
$y = ax + b$	a	0,0058 ± 8,92E-5	65,5261	<0,0001
	b	0,0241 ± 0,0174	1,3891	0,1982

Tabela C.16 Análise de Variância (ANOVA) da curva padrão de glicose.

Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRes	MQT		
4,062	0,0085	4,0709	1	9	10	4,0624	0,0009	0,4071	4293,68	<0,0001



**Figura C.19** Curva padrão de glicose: Dispersão dos dados e regressão linear (a) e distribuição dos resíduos do modelo (b).

### C.3.2 Análise espectrofotométrica

**Tabela C.17** Absorbância do extrato de proteínas solúveis a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.

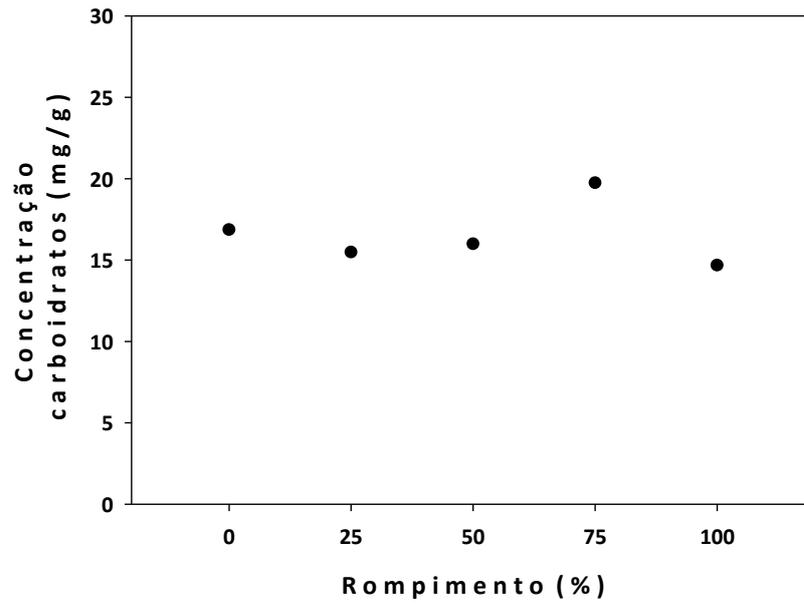
Rompimento	Absorbância 490 nm	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/g)
0%	0,456 ± 0,004	295,441 ± 2,508	16,860 ± 0,153
25%	0,419 ± 0,005	270,393 ± 3,720	15,481 ± 0,221
50%	0,438 ± 0,018	283,266 ± 12,003	15,989 ± 0,650
75%	0,526 ± 0,024	343,604 ± 16,217	19,741 ± 0,941
100%	0,399 ± 0,012	256,738 ± 8,374	14,681 ± 0,449

**Tabela C.18** Coeficientes da regressão linear do teor de proteínas em função do nível de rompimento.

Equação	Coeficientes		t(4)	valor-P	R <sup>2</sup>
$y = ax + b$	a	0,0642 ± 0,0021	30,4143	<0,0001	0,9968
	b	11,4703 ± 0,1293	88,6905	<0,0001	

**Tabela C.19** Análise de Variância (ANOVA) da regressão linear do teor de proteínas em função do nível de rompimento.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P
Regressão	SQR 25,787	1,0	MQR 25,787	925,03	<0,0001
Resíduos	SQRes 0,0836	R-2 3	MQRes 0,0279		
TOTAL	SQT 25,870	R-1 4	MQT 6,4676		



**Figura C.20** Dispersão dos dados de concentração de carboidratos em função do nível de rompimento.

## APÊNDICE D Memorial de dados de Lipídeos

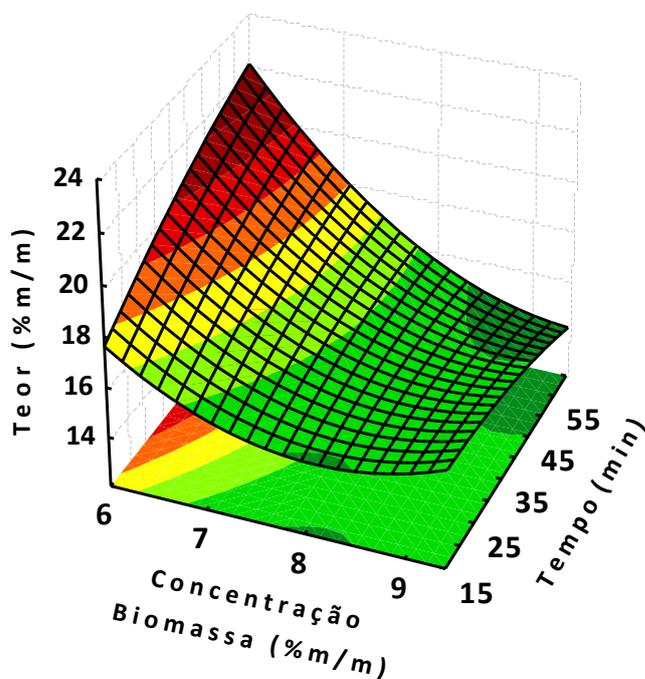
### D.1 Otimização da extração de lipídeos no sistema de tamboramento

#### D.1.1 Planejamento Composto Central

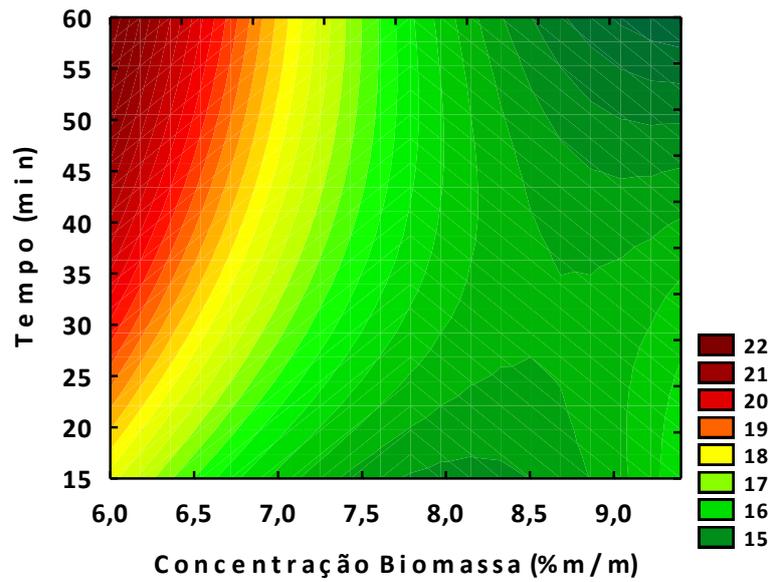
**Tabela D.1** Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de tamboramento.

Ensaio	Codificado		Decodificado		Teor óleo (% m/m)
	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	
1	-1	-1	7,0	20,0	15,888
2	1	-1	9,0	20,0	15,794
3	-1	1	7,0	50,0	17,973
4	1	1	9,0	50,0	15,412
5	-1,414	0	6,6	35,0	18,382
6	1,414	0	9,4	35,0	14,867
7	0	-1,414	8,0	13,8	14,830
8	0	1,414	8,0	56,2	15,255
9	0	0	8,0	35,0	15,761
10	0	0	8,0	35,0	15,465
11	0	0	8,0	35,0	15,619

#### D.1.2 Superfície de resposta



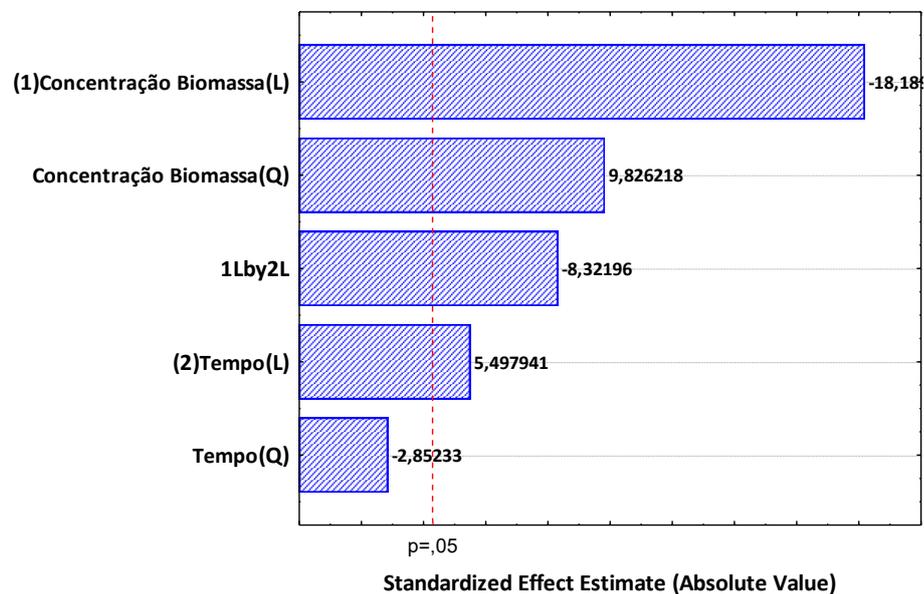
**Figura D.1** Superfícies de resposta da extração de lipídeos com variação da concentração de biomassa (% m/m) e tempo (min) em função do teor de lipídeos (%m/m).



**Figura D.2** Gráficos de contorno da extração de lipídeos com variação da concentração de biomassa (% m/m) e tempo (min) em função do teor de lipídeos (%m/m).

### D.1.3 Análise estatística

#### D.1.3.1 Efeitos e coeficiente do modelo



**Figura D.3** Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de tamboramento.

**Tabela D.2** Efeitos das variáveis e coeficientes do modelo

	Efeitos	Erro Padrão	t(4)	p	Coeficientes	Erro Padrão
<b>b0</b>	15,61499	0,085573	182,4753	<b>0,000030</b>	15,61499	0,085573
<b>b1</b>	-1,90632	0,104805	-18,1892	<b>0,003009</b>	-0,95316	0,052403
<b>b11</b>	1,22575	0,124743	9,8262	<b>0,010199</b>	0,61288	0,062372
<b>b2</b>	0,57621	0,104805	5,4979	<b>0,031526</b>	0,28811	0,052403
<b>b22</b>	-0,35581	0,124743	-2,8523	0,104077	-0,17790	0,062372
<b>b12</b>	-1,23346	0,148217	-8,3220	<b>0,014134</b>	-0,61673	0,074109

**Tabela D.3** Análise de variância (ANOVA) do ajuste do modelo

Fonte de Variação	SQ	nGL	MQ	F	Valor-P
<b>Regressão</b>	12,37	5	2,5	10,0	<b>1,2E-02</b>
<b>Resíduos</b>	1,24	5	0,2		
<b>Falta de Ajuste</b>	1,20	3	0,4	18,2	5,3E-02
<b>Erro Puro</b>	0,04	2	0,0		
<b>Total</b>	13,61	10	1,4		

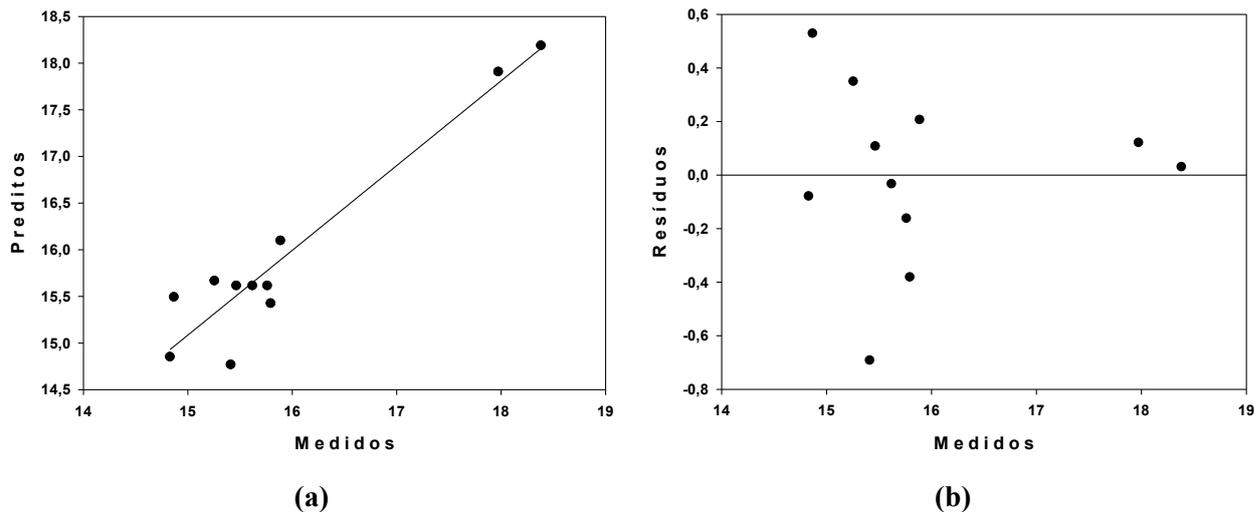
### D.1.3.2 - Ajuste do modelo

**Tabela D.4** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo.

Equação	Coeficientes	t	valor-P	R <sup>2</sup>
<b>y = ax + b</b>	<b>a</b> 0,9088 ± 0,0960	9,4674	<0,0001	0,9088
	<b>b</b> 1,4537 ± 1,5329	0,9483	0,3677	

**Tabela D.5** Análise de Variância (ANOVA) da curva de identidade do modelo.

Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRes	MQT		
11,24	1,1285	12,367	1	9	10	11,239	0,125	1,237	89,6324	<0,0001



**Figura D.4** Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste (b).

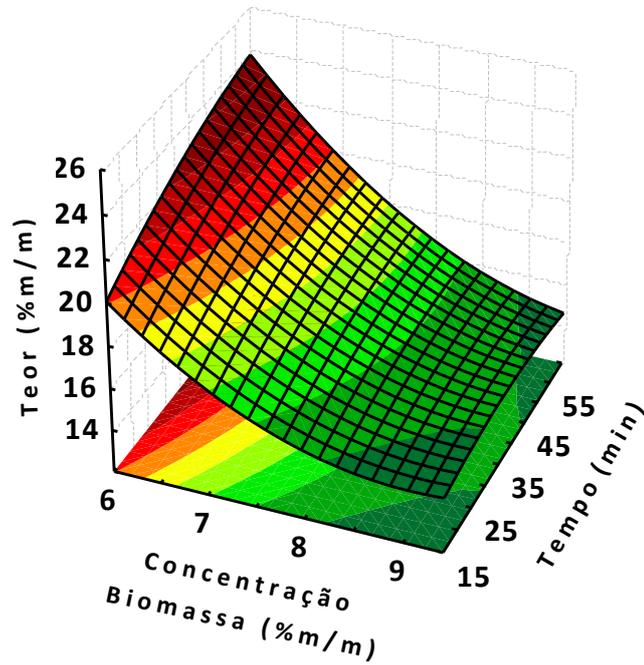
## D.2 Extração no sistema de mesa de agitação orbital

### D.2.1 Planejamento Composto Central

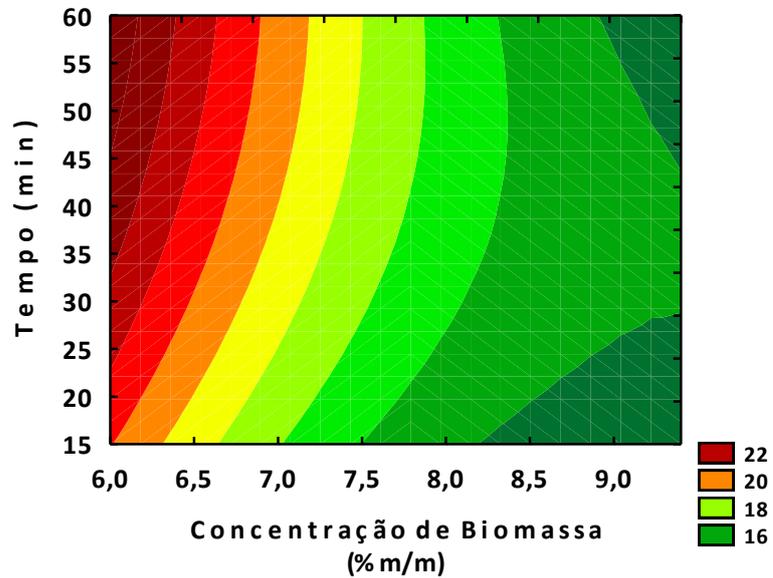
**Tabela D.6** Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de mesa de agitação orbital.

Ensaio	Codificado		Decodificado		Teor óleo (% m/m)
	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (min)	
1	-1	-1	7,0	20,0	17,284
2	1	-1	9,0	20,0	14,786
3	-1	1	7,0	50,0	19,807
4	1	1	9,0	50,0	15,814
5	-1,414	0	6,6	35,0	19,997
6	1,414	0	9,4	35,0	14,668
7	0	-1,414	8,0	13,8	15,380
8	0	1,414	8,0	56,2	16,042
9	0	0	8,0	35,0	16,189
10	0	0	8,0	35,0	16,544
11	0	0	8,0	35,0	15,360

### D.2.2 Superfície de resposta



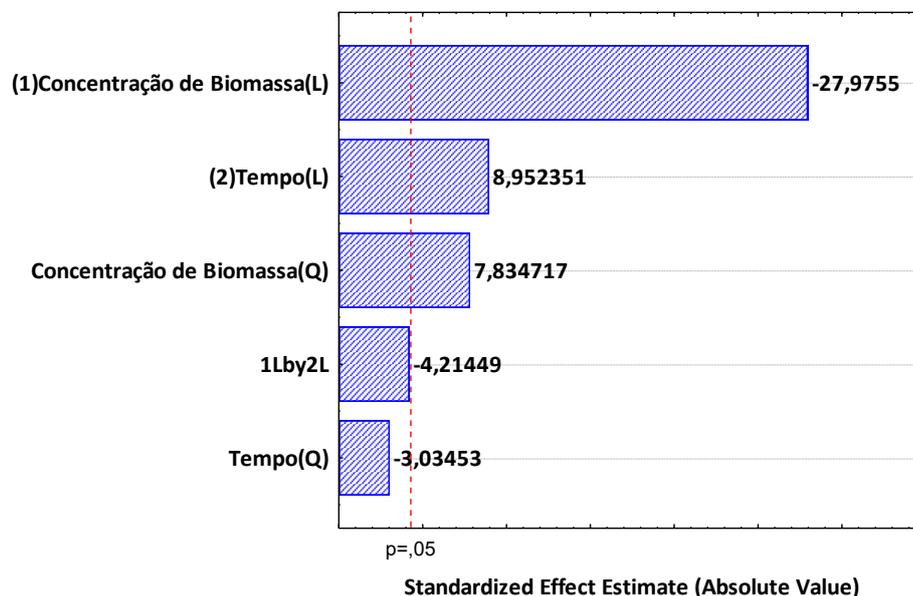
**Figura D.5** Superfícies de resposta da extração de lipídeos com variação da concentração de biomassa (% m/m) e tempo (min) em função do teor de lipídeos (%m/m)..



**Figura D.6** Gráficos de contorno da extração de lipídeos com variação da concentração de biomassa (% m/m) e tempo (min) em função do teor de lipídeos (%m/m).

## D.2.3 Análise estatística

### D.2.3.1 Efeitos e coeficiente do modelo



**Figura D.7** Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de mesa agitadora.

**Tabela D.7** Efeitos das variáveis e coeficientes do modelo

	Efeitos	Erro Padrão	t(4)	p	Coefficientes	Erro Padrão
<b>b0</b>	16,36411	0,102346	159,8902	<b>0,000039</b>	16,36411	0,102346
<b>b1</b>	-3,50667	0,125348	-27,9755	<b>0,001275</b>	-1,75333	0,062674
<b>b11</b>	1,16889	0,149194	7,8347	<b>0,015904</b>	0,58444	0,074597
<b>b2</b>	1,12216	0,125348	8,9524	<b>0,012249</b>	0,56108	0,062674
<b>b22</b>	-0,45273	0,149194	-3,0345	0,093600	-0,22637	0,074597
<b>b12</b>	-0,74710	0,177268	-4,2145	0,051952	-0,37355	0,088634

**Tabela D.8** Análise de variância (ANOVA) do ajuste do modelo

Fonte de Variação	SQ	nGL	MQ	F	valor-P
<b>Regressão</b>	30,58	5	6,1	22,2	<b>2,0E-03</b>
<b>Resíduos</b>	1,38	5	0,3		
<b>Falta de Ajuste</b>	1,31	3	0,4	13,9	6,8E-02
<b>Erro Puro</b>	0,06	2	0,0		
<b>Total</b>	31,95	10	3,2		

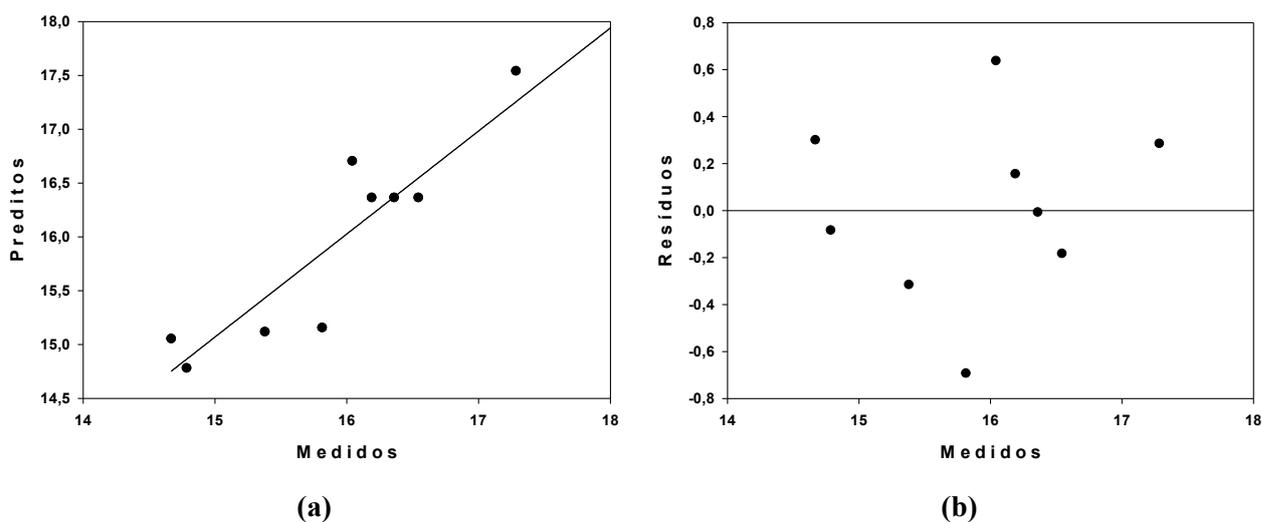
### D.2.3.2 Ajuste do modelo

**Tabela D.9** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo.

Equação		Coeficientes	t(4)	valor-P	R <sup>2</sup>
$y = ax + b$	<b>a</b>	0,9570 ± 0,0676	14,1466	<0,0001	0,957
	<b>b</b>	0,7155 ± 1,1305	0,6329	0,5426	

**Tabela D.10** Análise de Variância (ANOVA) da curva de identidade do modelo.

Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRes	MQT		
29,26	1,3160	30,580	1	9	10	29,26	0,1462	3,058	200,127	<0,0001



**Figura D.8** Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste (b).

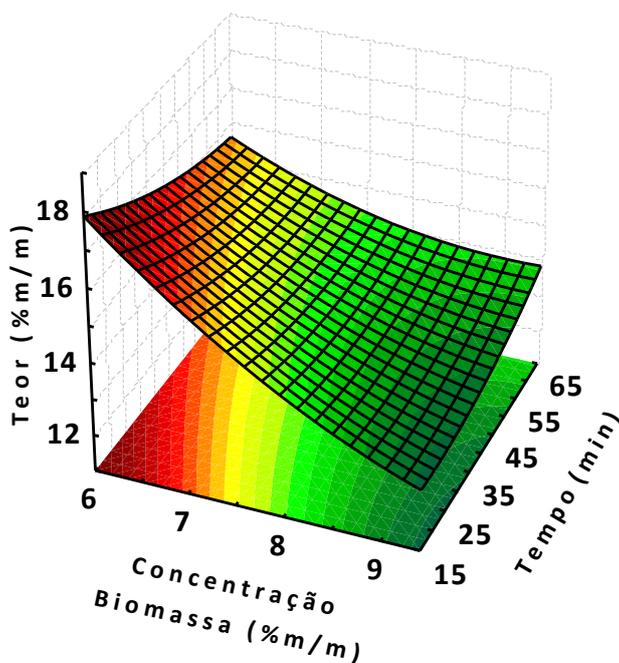
### D.3 Extração no sistema de vórtex

#### D.3.1 Planejamento Composto Central

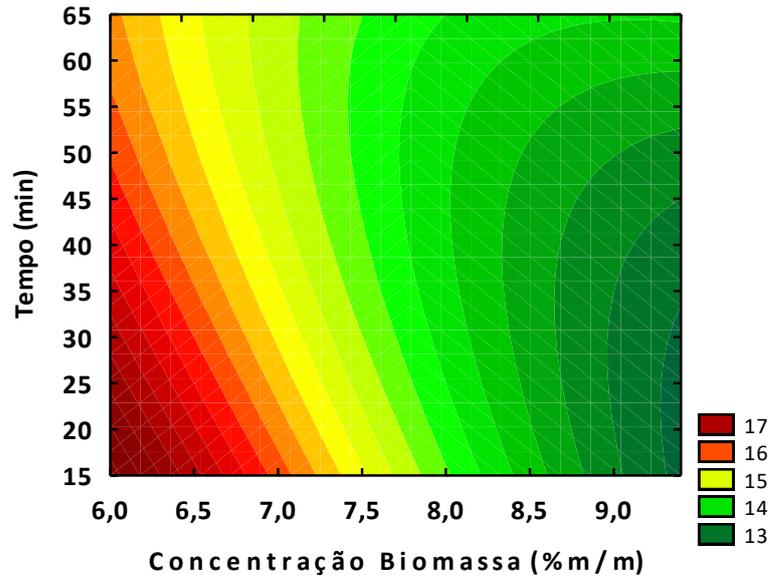
**Tabela D.11** Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a 2 variáveis para extração de lipídeos no sistema de mesa agitadora.

Ensaio	Codificado		Decodificado		Teor óleo (% m/m)
	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (s)	[Biomassa] (% m/m)	Tempo (s)	
1	-1	-1	7	25	15,86
2	1	-1	9	25	12,57
3	-1	1	7	55	14,91
4	1	1	9	55	12,83
5	-1,414	0	6,58	40	14,90
6	1,414	0	9,41	40	13,53
7	0	-1,414	8	18,78	14,10
8	0	1,414	8	61,21	14,10
9	0	0	8	40	14,23
10	0	0	8	40	14,24
11	0	0	8	40	14,12

#### D.3.2 Superfície de resposta



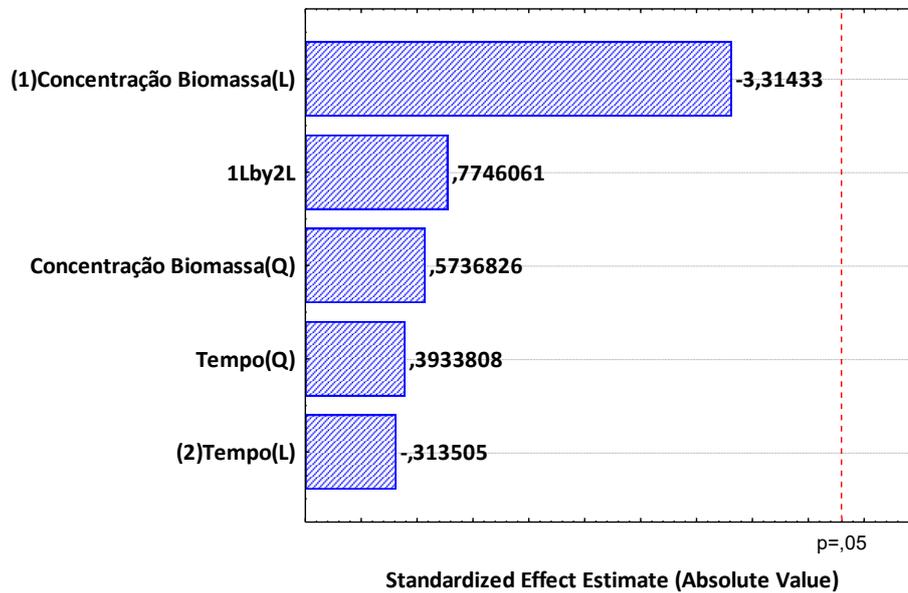
**Figura D.9** Superfícies de resposta da extração de lipídeos com variação da concentração de biomassa (% m/m) e tempo (min) em função do teor de lipídeos (%m/m)..



**Figura D.10** Gráficos de contorno da extração de lipídeos com variação da concentração de biomassa (% m/m) e tempo (min) em função do teor de lipídeos (%m/m).

### D.3.3 Análise estatística

#### D.3.3.1 Efeitos e coeficiente do modelo



**Figura D.11** Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a extração de lipídeos no sistema de mesa agitadora.

**Tabela D.12** Efeitos das variáveis e coeficientes do modelo

	Efeitos	Erro Padrão	t(4)	p	Coeficientes	Erro Padrão
<b>b0</b>	13,78418	0,450610	30,59004	<b>0,001067</b>	13,78418	0,450610
<b>b1</b>	-1,82912	0,551882	-3,31433	0,080232	-0,91456	0,275941
<b>b11</b>	0,37684	0,656871	0,57368	0,624096	0,18842	0,328436
<b>b2</b>	-0,17302	0,551882	-0,31351	0,783572	-0,08651	0,275941
<b>b22</b>	0,25840	0,656871	0,39338	0,732012	0,12920	0,328436
<b>b12</b>	0,60456	0,780479	0,77461	0,519611	0,30228	0,390240

**Tabela D.13** Análise de variância do ajuste do modelo

Fonte de Variação	SQ	nGL	MQ	F	valor-P
<b>Regressão</b>	7,15	5	1,4	4,5	6,1E-02
<b>Resíduos</b>	1,57	5	0,3		
<b>Falta de Ajuste</b>	1,57	3	0,5	118,2	<b>8,4E-03</b>
<b>Erro Puro</b>	0,01	2	0,0		
<b>Total</b>	8,72	10	0,9		

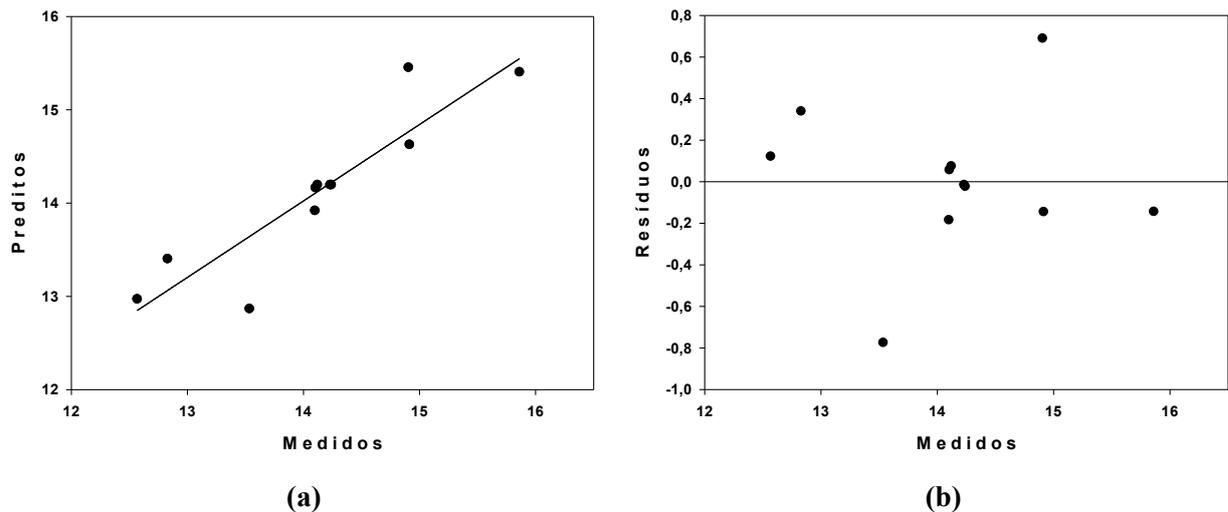
### D.3.3.2 - Ajuste do modelo

**Tabela D.14** Coeficientes da regressão linear da análise de identidade do modelo.

Equação	Coeficientes	t	valor-P	R <sup>2</sup>
<b>y = ax + b</b>	<b>a</b> 0,8196 ± 0,1282	6,3937	0,0001	0,8196
	<b>b</b> 2,5491 ± 1,8145	1,4049	0,1936	

**Tabela D.15** Análise de Variância (ANOVA) da curva de identidade do modelo.

Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRes	MQT		
5,860	1,2902	7,1504	1	9	10	5,860	0,1434	0,7150	40,8791	0,0001



**Figura D.12** Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos (a) e a distribuição dos resíduos do ajuste (b).

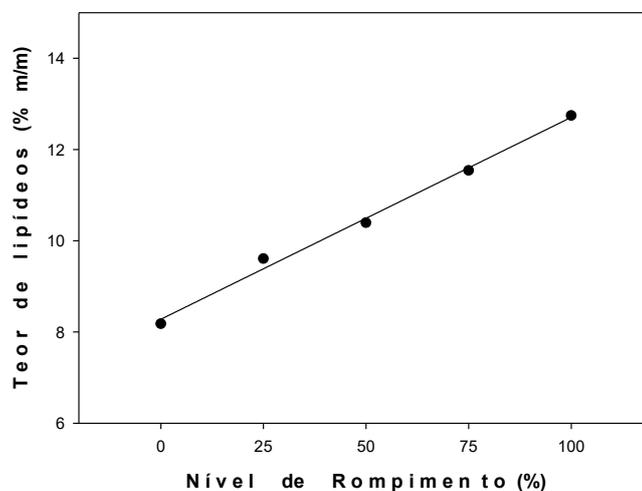
#### D.4 Validação como indicador de rompimento celular

##### D.4.1 Análise gravimétrica

**Tabela D.16** Teor mássico de lipídeos a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.

Rompimento	Teor de Lipídeos (%m/m)
0%	8,18 ± 0,19
25%	9,61 ± 0,20
50%	10,39 ± 0,21
75%	11,54 ± 0,30
100%	12,74 ± 0,34

##### D.4.2 Regressões lineares



**Figura D.13** Análise de regressão entre os teores de lipídeos e os níveis de rompimento.

### D.4.3 Análise de significância

**Tabela D.17** Análise de significância ( $\alpha = 5\%$ ) dos coeficientes da regressão linear da validação do teor de lipídeos como indicador de rompimento celular.

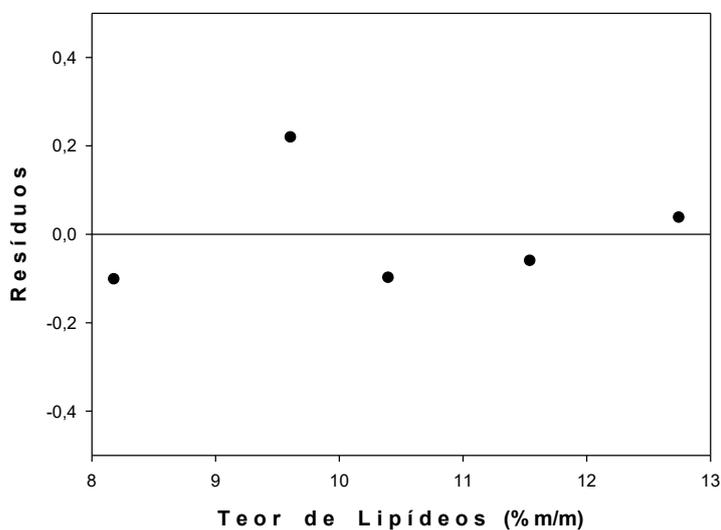
Equação		Coeficientes		t	valor-P	R <sup>2</sup>
$y = ax + b$	<b>a</b>	0,0443	± 0,0020	68,4831	<0,0001	0,9941
	<b>b</b>	8,2790	± 0,1209	22,4201	0,0002	

### D.4.4 Análise de Variância (ANOVA)

**Tabela D.18** Análise de variância dos coeficientes da validação do teor de lipídeos

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P
Regressão	SQR 12,244	1,0	12,244	502,66	0,0002
Resíduos	SQRes 0,0731	R-2	0,0244		
TOTAL	SQT 12,317	R-1	3,0792		

### D.4.5 Análise de distribuição dos resíduos



**Figura D.14** Distribuição dos resíduos da regressão linear do teor de lipídeos e os níveis de rompimento.

## APÊNDICE E Memorial de dados de pigmentos

### E.1 Extração de pigmentos de biomassa úmida

#### E.1.1 Unidades experimentais

**Tabela E.1** Unidades experimentais da extração de pigmentos a partir de soluções alcoólicas em diferentes frações.

Ensaio	Fração de Etanol	Etanol (mL)	Água (mL)	Biomassa (g)
1	0	0	1,5	0,15
2	0,2	0,3	1,2	0,12
3	0,3	0,45	1,05	0,105
4	0,4	0,6	0,9	0,09
5	0,5	0,75	0,75	0,075
6	0,6	0,9	0,6	0,06
7	0,7	1,05	0,45	0,045
8	0,8	1,2	0,3	0,03
9	0,9	1,35	0,15	0,015
10	1	1,5	0	0,02

#### E.1.2 Análise espectrofotométrica

**Tabela E.2** Absorbância do extrato de pigmentos fotossintéticos a partir de soluções alcoólicas em diferentes frações e comprimentos de onda distintos.

Fração de Etanol	470 nm	662 nm	645 nm
0	0,0666 ± 0,0033	0,0168 ± 0,0012	0,0161 ± 0,0010
0,2	0,3015 ± 0,0233	0,2211 ± 0,0239	0,1068 ± 0,0103
0,3	0,6306 ± 0,0364	0,5490 ± 0,0338	0,2545 ± 0,0154
0,4	0,3886 ± 0,0194	0,4905 ± 0,0220	0,2019 ± 0,0095
0,5	1,2030 ± 0,0474	0,7552 ± 0,0132	0,2800 ± 0,0055
0,6	1,9066 ± 0,0409	0,9116 ± 0,0280	0,3815 ± 0,0118
0,7	1,3193 ± 0,0048	1,0173 ± 0,0074	0,4086 ± 0,0026
0,8	1,1909 ± 0,0226	1,1792 ± 0,0212	0,4421 ± 0,0084
0,9	0,7265 ± 0,0301	0,7519 ± 0,0317	0,2725 ± 0,0119
1,0	1,8237 ± 0,0309	1,8089 ± 0,0175	0,6997 ± 0,0087

**Tabela E.3** Concentração, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de pigmentos fotossintéticos a partir de soluções alcoólicas em diferentes frações.

<b>Fração de Etanol</b>	<b>Carotenóides</b>	<b>Clorofila a</b>	<b>Clorofila b</b>	<b>Clorofila Total</b>
<b>0</b>	0,3063 $\pm$ 0,01517	0,1564 $\pm$ 0,0109	0,2530 $\pm$ 0,0156	0,4094 $\pm$ 0,0265
<b>0,2</b>	1,3755 $\pm$ 0,10552	2,2677 $\pm$ 0,2472	1,2238 $\pm$ 0,1078	3,4915 $\pm$ 0,3549
<b>0,3</b>	2,8666 $\pm$ 0,16553	5,6514 $\pm$ 0,3487	2,8231 $\pm$ 0,1680	8,4746 $\pm$ 0,5159
<b>0,4</b>	1,7521 $\pm$ 0,08779	5,1013 $\pm$ 0,2279	2,0092 $\pm$ 0,0988	7,1105 $\pm$ 0,3267
<b>0,5</b>	5,5323 $\pm$ 0,21986	7,9177 $\pm$ 0,1374	2,4712 $\pm$ 0,0564	10,3889 $\pm$ 0,1935
<b>0,6</b>	17,5770 $\pm$ 0,375	18,9369 $\pm$ 0,5803	7,7186 $\pm$ 0,2423	26,6555 $\pm$ 0,8222
<b>0,7</b>	36,2126 $\pm$ 0,13389	63,6027 $\pm$ 0,4682	23,7710 $\pm$ 0,1345	87,3737 $\pm$ 0,5916
<b>0,8</b>	32,5435 $\pm$ 0,47776	74,1139 $\pm$ 1,0298	23,7495 $\pm$ 0,3770	97,8633 $\pm$ 1,4055
<b>0,9</b>	16,5384 $\pm$ 0,52946	39,4771 $\pm$ 1,2865	11,6739 $\pm$ 0,4120	51,1510 $\pm$ 1,6983
<b>1,0</b>	16,5987 $\pm$ 0,21957	37,8102 $\pm$ 0,2771	13,0108 $\pm$ 0,1611	50,8210 $\pm$ 0,4314

**Tabela E.4** Teor, em  $\text{mg g}^{-1}$ , de pigmentos fotossintéticos a partir de soluções alcoólicas em diferentes frações.

<b>Fração de Etanol</b>	<b>Carotenóides</b>	<b>Clorofila a</b>	<b>Clorofila b</b>	<b>Clorofila Total</b>
<b>0</b>	0,0087 $\pm$ 0,0004	0,0044 $\pm$ 0,0003	0,0072 $\pm$ 0,0005	0,0116 $\pm$ 0,0008
<b>0,2</b>	0,0330 $\pm$ 0,0025	0,0543 $\pm$ 0,0059	0,0293 $\pm$ 0,0026	0,0837 $\pm$ 0,0085
<b>0,3</b>	0,0783 $\pm$ 0,0045	0,1545 $\pm$ 0,0095	0,0772 $\pm$ 0,0046	0,2316 $\pm$ 0,0140
<b>0,4</b>	0,0558 $\pm$ 0,0028	0,1623 $\pm$ 0,0072	0,0639 $\pm$ 0,0031	0,2263 $\pm$ 0,0103
<b>0,5</b>	0,2107 $\pm$ 0,0085	0,3015 $\pm$ 0,0054	0,0941 $\pm$ 0,0022	0,3956 $\pm$ 0,0076
<b>0,6</b>	0,8382 $\pm$ 0,0179	0,9030 $\pm$ 0,0275	0,3680 $\pm$ 0,0115	1,2710 $\pm$ 0,0389
<b>0,7</b>	2,2862 $\pm$ 0,0105	3,8817 $\pm$ 0,0328	1,4508 $\pm$ 0,0100	5,3325 $\pm$ 0,0422
<b>0,8</b>	3,0195 $\pm$ 0,0614	7,0106 $\pm$ 0,1081	2,0829 $\pm$ 0,0209	9,0935 $\pm$ 0,3979
<b>0,9</b>	3,1369 $\pm$ 0,1027	7,3696 $\pm$ 0,2267	2,3040 $\pm$ 0,0500	9,6736 $\pm$ 0,8750
<b>1,0</b>	3,1698 $\pm$ 0,0112	7,0936 $\pm$ 0,0377	2,3906 $\pm$ 0,0312	9,4842 $\pm$ 0,5551

### E.1.3 Curvas de absorção espectral

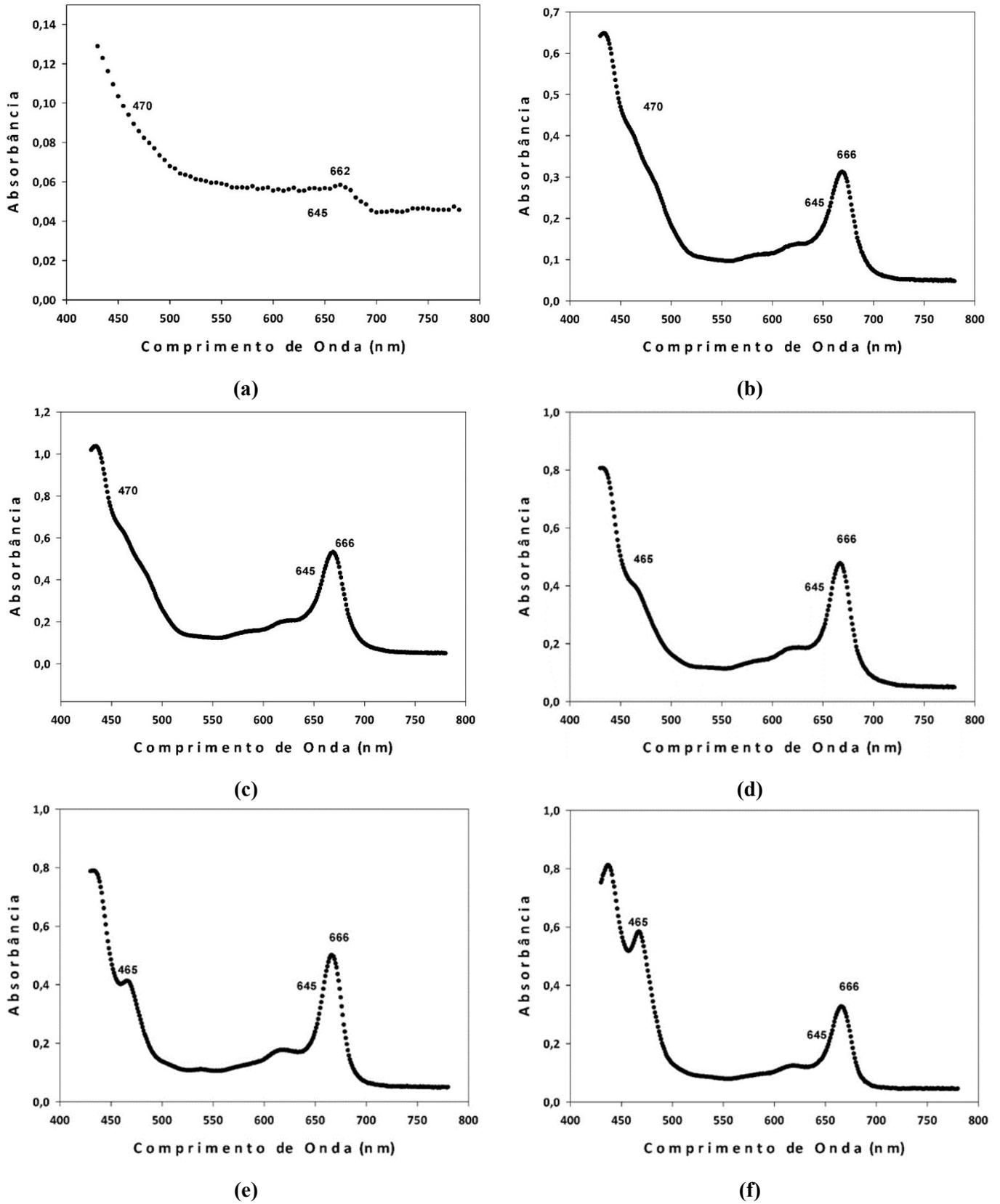
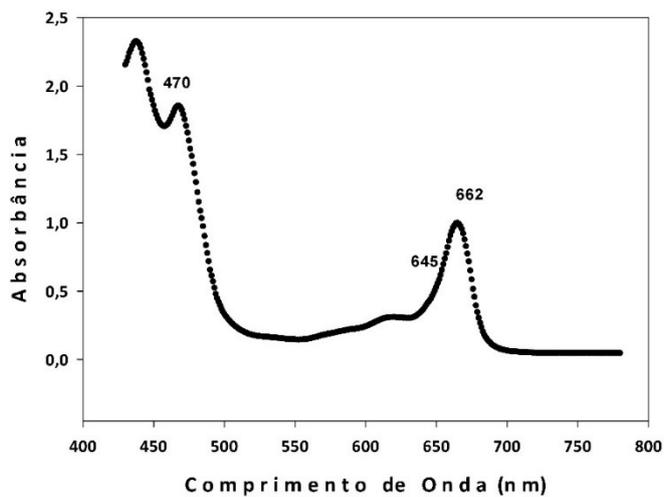
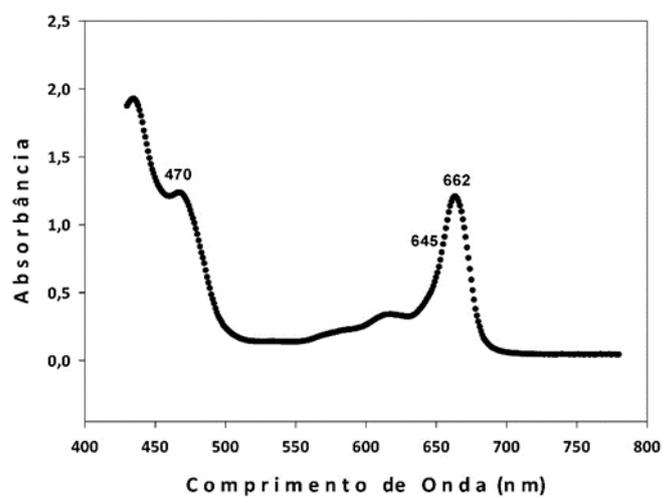


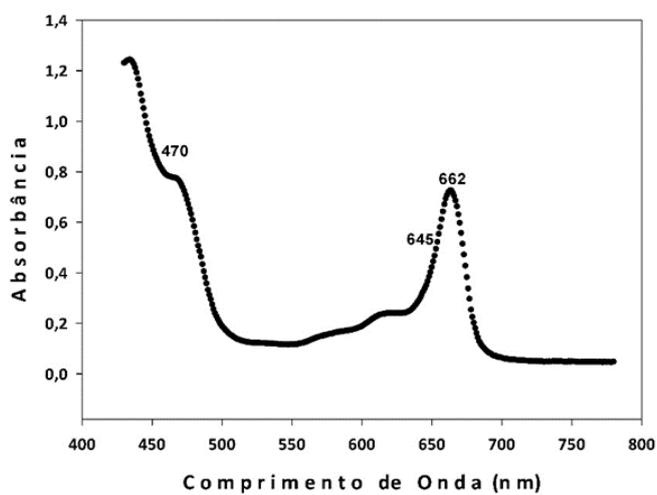
Figura E.1 Espectro de absorção do extrato de pigmentos em água (a) e em solução alcoólica 20 % etanol (b), 30 % etanol (c), 40 % etanol (d), 50 % etanol (e) e 60 % etanol (f).



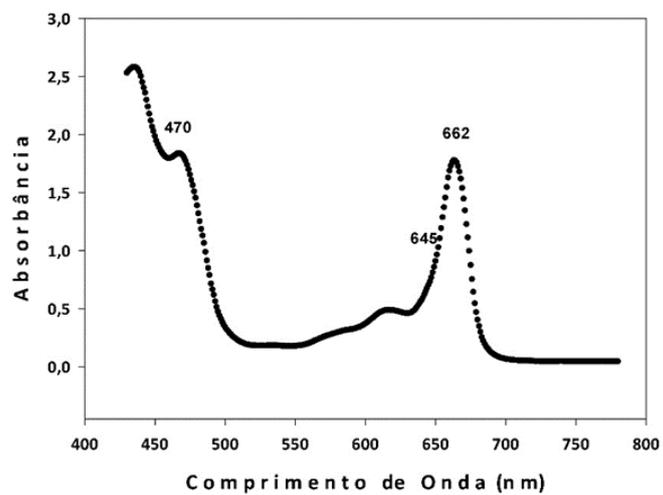
(g)



(h)



(i)



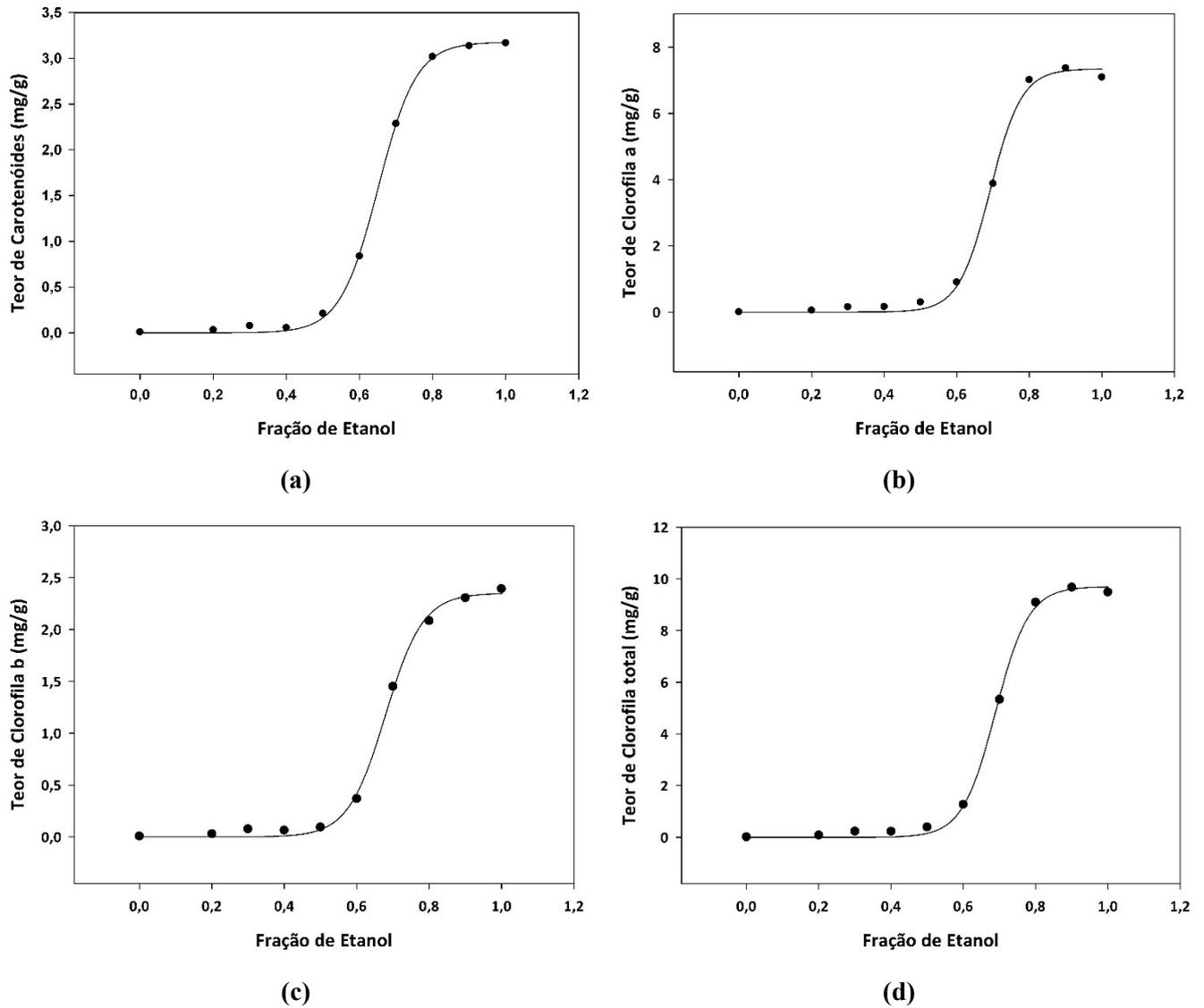
(j)

**Figura E.2** Espectro de absorção do extrato de pigmentos em solução alcoólica 70 % etanol (g), 80 % etanol (h), 90 % etanol (i) e 100 % etanol (j).

## E.1.4 Análise estatística

### E.1.4.1 Análise de regressão

#### E.1.4.1.1 Regressões não lineares sigmóides a 3 parâmetros



**Figura E.3** Regressão não-linear dos teores de carotenóides (a), clorofila a (b), clorofila b (c) e clorofila total (d) em função da fração de etanol.

### E.1.4.1.2 Análise de significância

**Tabela E.5** Análise de significância ( $\alpha = 5\%$ ) dos coeficientes das regressões do teor de pigmentos em função da fração de etanol.

Pigmento	Equação		Coeficientes			t	valor-P	R <sup>2</sup>
Carotenóides	$y = \frac{a}{1 + e^{\frac{-(x-x_0)}{b}}}$	a	3,1776	±	0,0271	117,1082	<0,0001	0,9994
		b	0,0522	±	0,0021	24,7381	<0,0001	
		x0	0,6515	±	0,0026	251,6221	<0,0001	
Clorofila a	$y = \frac{a}{1 + e^{\frac{-(x-x_0)}{b}}}$	a	7,3440	±	0,1323	55,5237	<0,0001	0,9975
		b	0,0433	±	0,0044	9,8022	<0,0001	
		x0	0,6921	±	0,0046	151,6144	<0,0001	
Clorofila b	$y = \frac{a}{1 + e^{\frac{-(x-x_0)}{b}}}$	a	2,3492	±	0,0393	59,7548	<0,0001	0,9979
		b	0,0517	±	0,0041	12,7065	<0,0001	
		x0	0,6794	±	0,0047	143,4620	<0,0001	
Clorofila total	$y = \frac{a}{1 + e^{\frac{-(x-x_0)}{b}}}$	a	9,6954	±	0,1362	71,2008	<0,0001	0,9985
		b	0,0458	±	0,0034	13,4355	<0,0001	
		x0	0,6889	±	0,0037	186,6415	<0,0001	

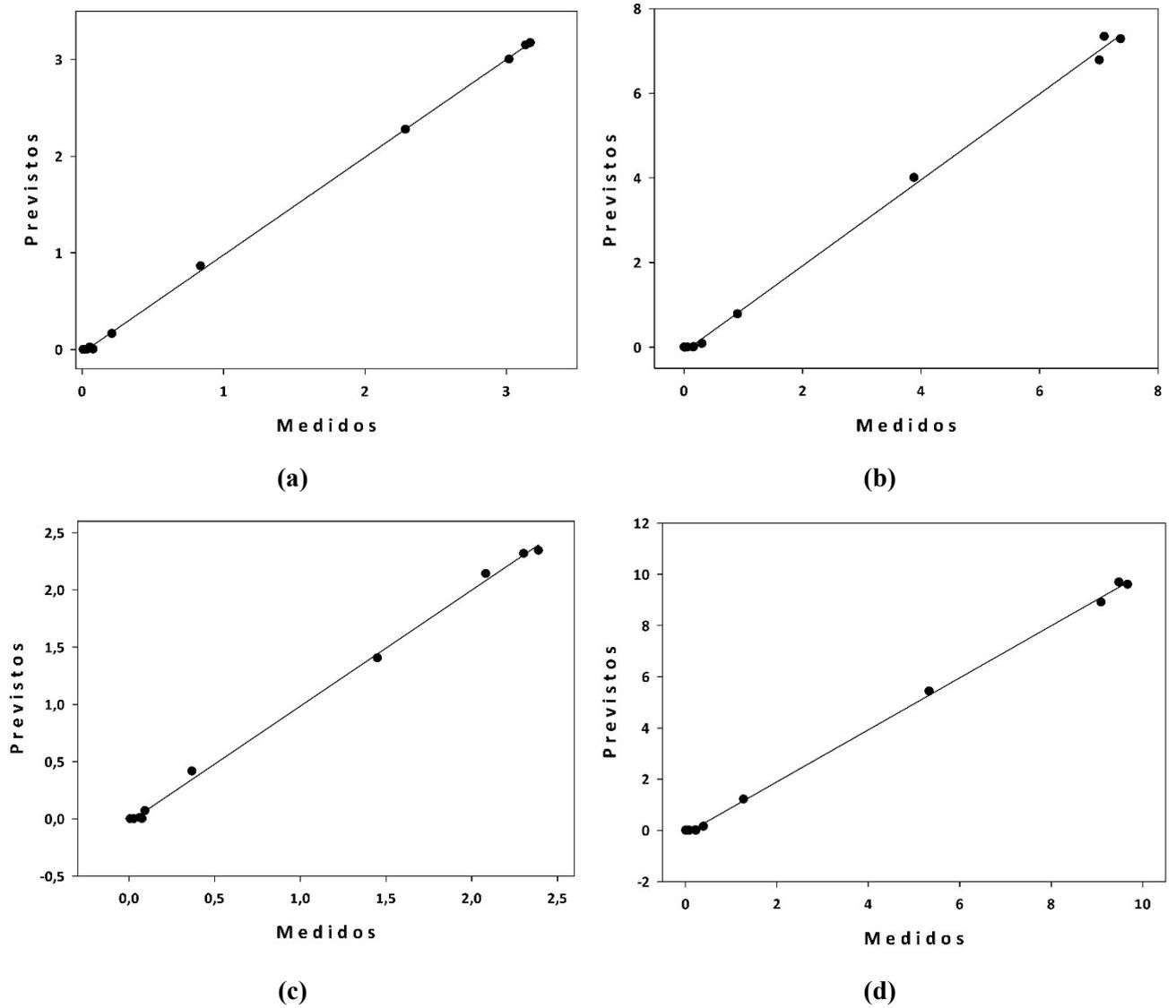
### E.1.4.1.3 Análise de Variância (ANOVA)

**Tabela E.6** Análise de Variância (ANOVA) dos modelos sigmoidais a 3 parâmetros.

Pigmentos	Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
	SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRes	MQT		
Carotenóides	18,499	0,0108	18,510	2	7	9	9,2498	0,0015	2,0567	5986,831	<0,0001
Clorofila a	97,006	0,2457	97,252	2	7	9	48,503	0,0351	10,805	1381,938	<0,0001
Clorofila b	9,7377	0,0201	9,7577	2	7	9	4,8688	0,0029	1,0842	1697,009	<0,0001
Clorofila Total	168,09	0,2545	168,34	2	7	9	84,047	0,0364	18,704	2311,728	<0,0001

## E.1.4.2 Análise de Identidade dos modelos

### E.1.4.2.1 Regressões lineares



**Figura E.4** Identidade do modelo: análise de regressão entre os teores medidos e preditos para os modelos de carotenóides (a), clorofila a (b), clorofila b (c) e clorofila total (d).

### E.1.4.2.2 Análise de significância

**Tabela E.7** Análise de significância ( $\alpha = 5\%$ ) dos coeficientes da regressão linear da avaliação de identidade dos modelos.

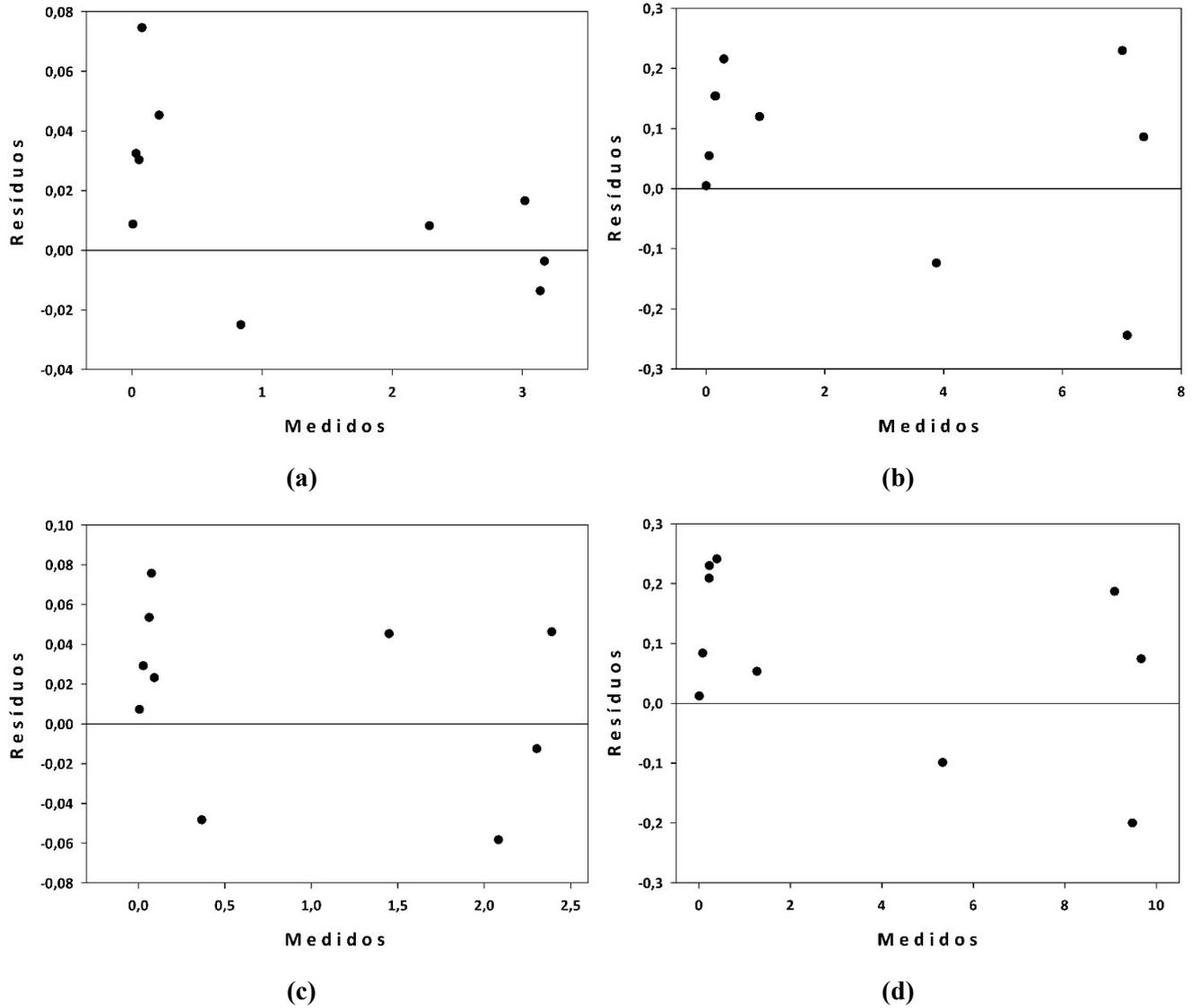
Pigmento	Equação		Coeficientes			t(4)	valor-P	R <sup>2</sup>
Carotenóides	$y = ax + b$	a	1,0114	±	0,0060	167,6045	<0,0001	0,9997
		b	-0,0320	±	0,0113	-2,8353	0,0220	
Clorofila a	$y = ax + b$	a	1,0154	±	0,0152	66,5979	<0,0001	0,9982
		b	-0,1061	±	0,0628	-1,6888	0,1297	
Clorofila b	$y = ax + b$	a	1,0125	±	0,0143	70,7865	<0,0001	0,9984
		b	-0,0272	±	0,0190	-1,4310	0,1903	
Clorofila total	$y = ax + b$	a	1,0153	±	0,0107	95,1935	<0,0001	0,9991
		b	-0,1334	±	0,0581	-2,2976	0,0507	

### E.1.4.2.3 Análise de Variância (ANOVA)

**Tabela E.8** Análise de variância dos coeficientes da regressão linear da avaliação de identidade dos modelos.

Pigmentos	Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
	SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRes	MQT		
Carotenóides	18,936	0,0054	18,941	1	8	9	18,936	0,0007	2,1046	28091,27	<0,0001
Clorofila a	100,26	0,1809	100,44	1	8	9	100,26	0,0226	11,160	4435,283	<0,0001
Clorofila b	10,003	0,0160	10,019	1	8	9	10,003	0,0020	1,1133	5010,727	<0,0001
Clorofila Total	173,52	0,1532	173,67	1	8	9	173,52	0,0191	19,297	9061,807	<0,0001

#### E.1.4.2.4 Análise de distribuição de resíduos



**Figura E.5** Identidade do modelo: análise de distribuição dos resíduos para os modelos de carotenóides (a), clorofila a (b), clorofila b (c) e clorofila total (d).

## E.2 Validação como indicador de rompimento celular

### E.2.1 Análise espectrofotométrica

**Tabela E.9** Absorbância do extrato de pigmentos fotossintéticos a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.

Rompimento	470 nm	645 nm	662 nm
0%	0,462 ± 0,008	0,168 ± 0,003	0,455 ± 0,008
25%	0,606 ± 0,023	0,231 ± 0,010	0,610 ± 0,029
50%	0,737 ± 0,006	0,286 ± 0,002	0,746 ± 0,006
75%	0,880 ± 0,005	0,344 ± 0,002	0,900 ± 0,003
100%	1,057 ± 0,029	0,423 ± 0,012	1,085 ± 0,028

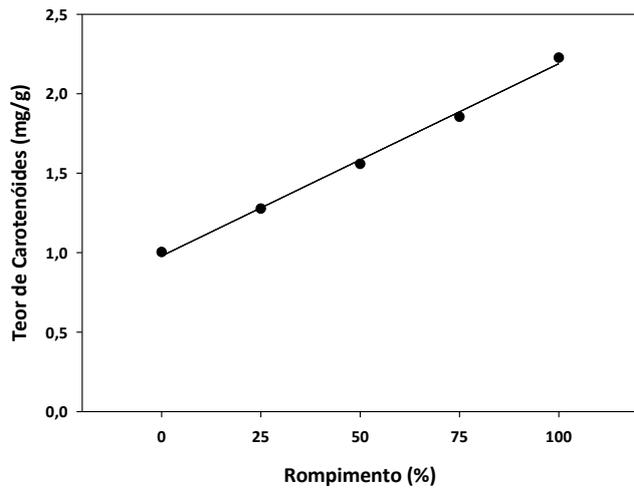
**Tabela E.10** Concentração, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de pigmentos fotossintéticos a partir de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.

Rompimento	Carotenóides	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total
0%	10,532 ± 0,173	7,370 ± 0,163	32,181 ± 0,975	24,486 ± 0,704
25%	13,788 ± 0,527	10,439 ± 0,442	42,269 ± 3,416	31,517 ± 2,704
50%	16,772 ± 0,148	13,175 ± 0,101	51,857 ± 0,734	38,725 ± 0,558
75%	20,015 ± 0,123	15,804 ± 0,144	62,508 ± 0,373	46,808 ± 0,244
100%	24,017 ± 0,655	19,800 ± 0,647	78,179 ± 3,728	57,962 ± 2,591

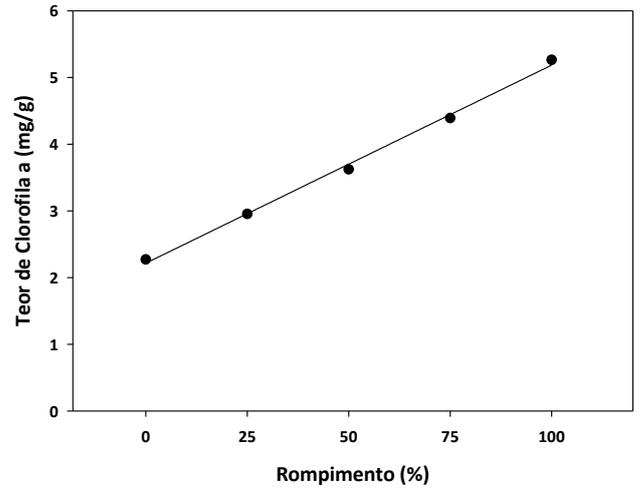
**Tabela E.11** Concentração, em mg/g, de pigmentos fotossintéticos a partir de de biomassa em distintos níveis de rompimento celular.

Rompimento	Carotenóides	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total
0%	1,003 ± 0,013	2,271 ± 0,030	0,702 ± 0,014	2,973 ± 0,043
25%	1,277 ± 0,059	2,955 ± 0,166	0,967 ± 0,049	3,922 ± 0,211
50%	1,559 ± 0,021	3,623 ± 0,047	1,224 ± 0,015	4,847 ± 0,063
75%	1,855 ± 0,015	4,392 ± 0,000	1,475 ± 0,019	5,867 ± 0,019
100%	2,227 ± 0,051	5,264 ± 0,115	1,825 ± 0,049	7,090 ± 0,164

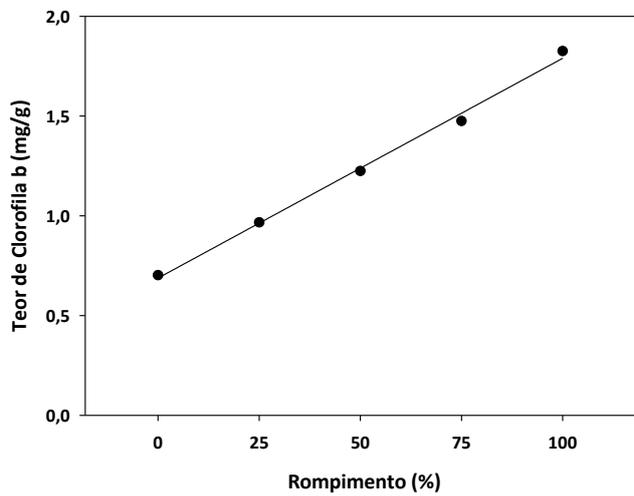
### E.2.1 Regressões lineares



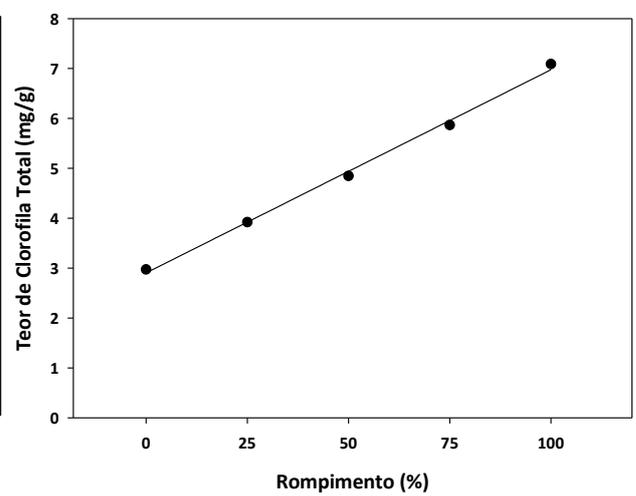
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura E.6** Análise de regressão entre os teores de pigmentos e os níveis de rompimento para os modelos de carotenóides (a), clorofila a (b), clorofila b (c) e clorofila total (d).

### E.2.2 Análise de significância

**Tabela E.9** Análise de significância ( $\alpha = 5\%$ ) dos coeficientes da regressão linear da validação dos teores de pigmentos como indicadores de rompimento celular.

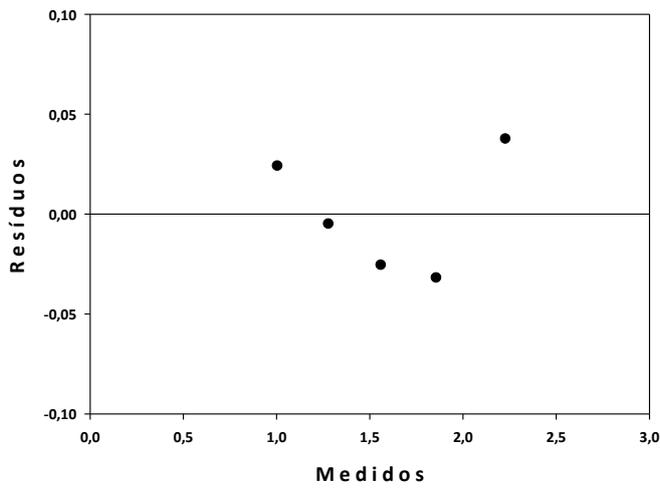
Pigmento	Equação		Coeficientes		t	valor-P	R <sup>2</sup>
Carotenóides	$y = ax + b$	a	0,0121	± 0,0004	27,2632	0,0001	0,9960
		b	0,9792	± 0,0272	36,0406	<0,0001	
Clorofila a	$y = ax + b$	a	0,0297	± 0,0010	30,3306	<0,0001	0,9967
		b	2,2164	± 0,0599	36,9706	<0,0001	
Clorofila b	$y = ax + b$	a	0,0110	± 0,0004	26,4322	0,0001	0,9957
		b	0,6878	± 0,0255	26,9450	0,0001	
Clorofila total	$y = ax + b$	a	0,0407	± 0,0014	29,9215	<0,0001	0,9967
		b	2,9042	± 0,0833	34,8563	<0,0001	

### E.2.3 Análise de Variância (ANOVA)

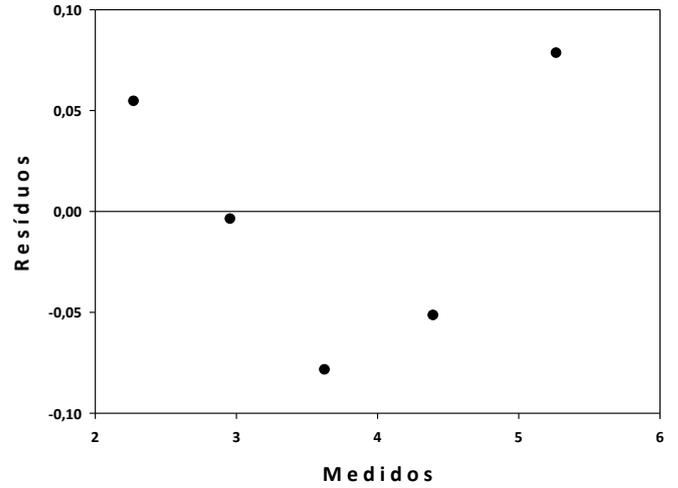
**Tabela E.10** Análise de variância dos coeficientes da validação dos teores de pigmentos como indicadores de rompimento celular.

Pigmentos	Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
	SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRes	MQT		
Carotenóides	0,9145	0,0037	0,9182	1	3	4	0,9145	0,0012	0,2295	743,2834	0,0001
Clorofila a	5,5104	0,0180	5,5284	1	3	4	5,5104	0,0060	1,3821	919,9432	<0,0001
Clorofila b	0,7587	0,0033	0,7620	1	3	4	0,7587	0,0011	0,1905	698,6621	0,0001
Clorofila Total	10,358	0,0347	10,393	1	3	4	10,358	0,0116	2,5983	895,2989	<0,0001

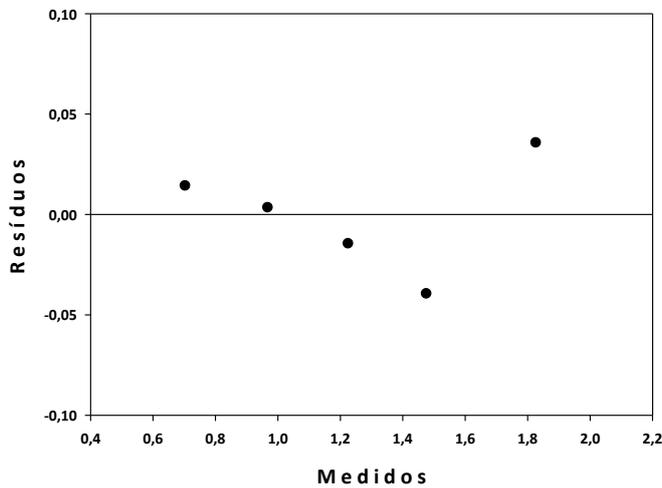
### E.2.4 Análise de distribuição dos resíduos



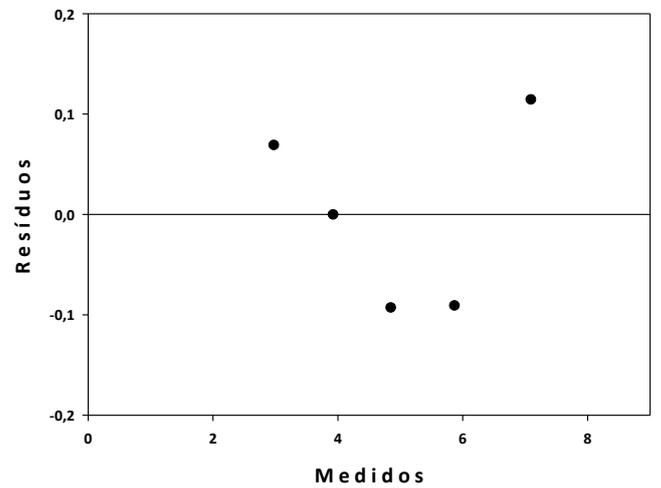
(a)



(b)



(c)

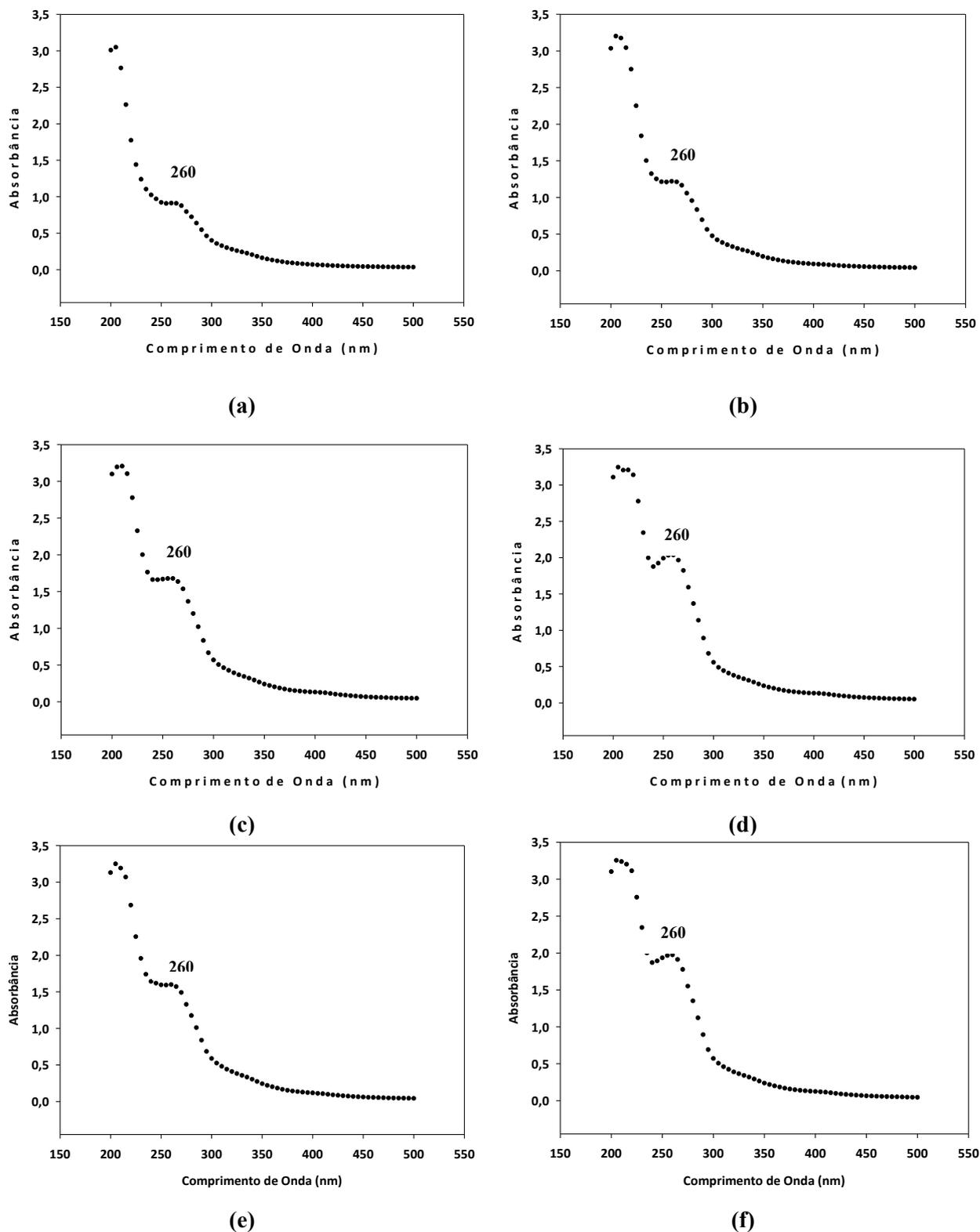


(d)

**Figura E.7** Distribuição dos resíduos da regressão linear dos teores de pigmentos e os níveis de rompimento para os modelos de carotenóides (a), clorofila a (b), clorofila b (c) e clorofila total (d).

## APÊNDICE F Memorial de dados de absorbância na região do ultravioleta

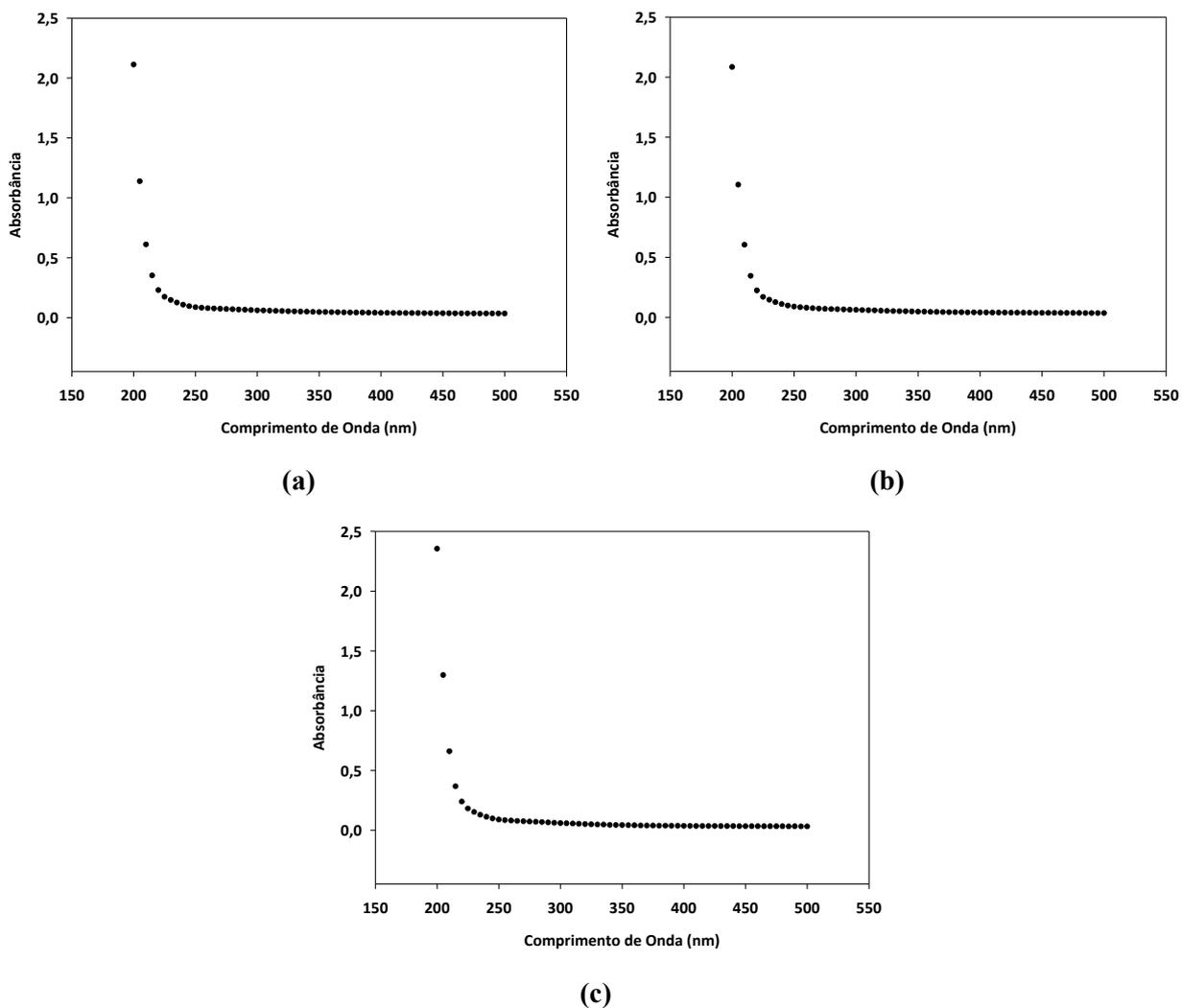
### F.1 Seleção de solventes para extração de compostos nitrogenados



**Figura F.1** Espectros de absorção de extrato sobrenadante de suspensões de microalgas em diferentes solventes e níveis de rompimento (%), sendo água deionizada 0% (a) e 100% (b), tampão fosfato 0,1 mol/L 0% (c) e 100% (d) e tampão fosfato 0,05 mol/L 0% (e) e 100% (f).

**Tabela F.1** Absorbância no 260 nm em diferentes solventes níveis de rompimento celular.

Solvente	0% rompimento	100% rompimento
Água deionizada	0,897 ± 0,0110	1,246 ± 0,0334
Tampão Fosfato 0,1 M	1,793 ± 0,0358	2,276 ± 0,0628
Tampão Fosfato 0,05 M	1,533 ± 0,0586	1,946 ± 0,0282



**Figura F.2** Espectro de absorção de água deionizada (a), tampão fosfato 0,1 mol/L (b) e 0,05 mol/L (c).

## F.2 Validação como indicador de rompimento celular

**Tabela F.2** Absorbância do extrato sobrenadante de suspensões de microalgas em diferentes níveis de rompimento (%).

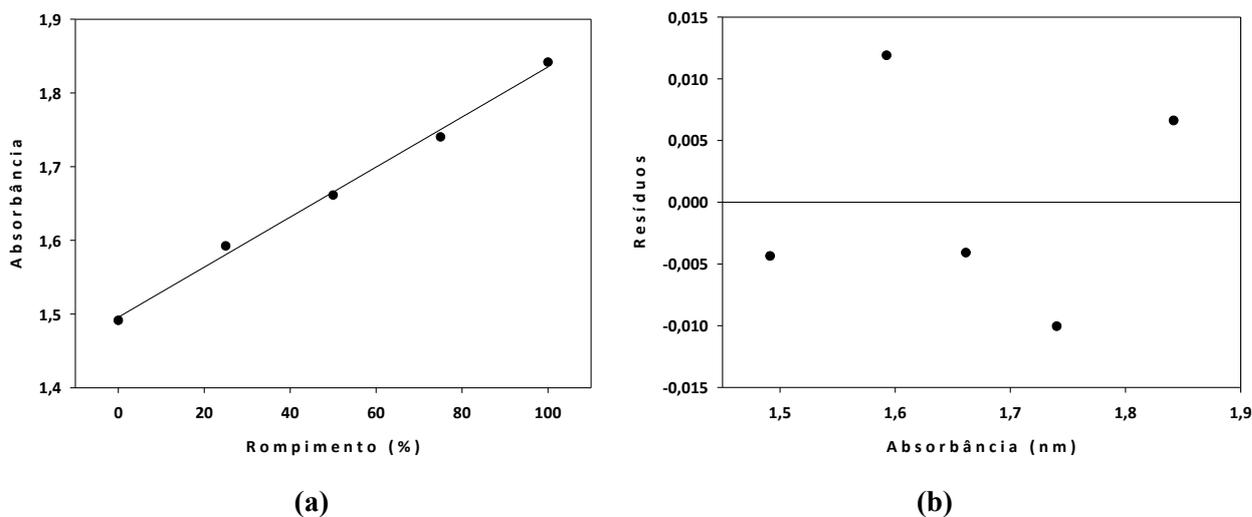
Rompimento	Absorbância (260 nm)
0%	1,491 ± 0,00823
25%	1,592 ± 0,00281
50%	1,661 ± 0,01750
75%	1,740 ± 0,01449
100%	1,842 ± 0,00258

**Tabela F.3** Coeficientes da regressão linear da absorbância em 260 nm em função do nível de rompimento.

Equação	Coeficientes		t	valor-P	R <sup>2</sup>
$y = ax + b$	a	0,0034 ± 0,0001	25,9050	0,0001	0,9955
	b	1,4957 ± 0,0080	186,3701	<0,0001	

**Tabela F.4** Análise de Variância (ANOVA) da regressão linear da absorbância em 260 nm em função do nível de rompimento.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	valor-P
Regressão	SQR 0,0720	1,0	MQR 0,0720	671,07	0,0001
Resíduos	SQRes 0,0003	R-2 3	MQRes 0,0001		
TOTAL	SQT 0,0724	R-1 4	MQT 0,0181		



**Figura F.3** Análise de regressão entre a absorbância a 260 nm e os níveis de rompimento: Dispersão dos dados e regressão linear (a) e distribuição dos resíduos do modelo (b).

## APÊNDICE G Memorial de dados de teor de perda de massa

### G.1 Validação como indicador de rompimento celular

**Tabela G.1** Dados da biomassa com 5 níveis de rompimento distintos antes da lavagem com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH=6,8.

ID	Biomassa úmida (g)			Biomassa Seca (g)	
	0%	100%	Total		
0%	01	0,5084	0,0000	0,5084	0,4321
	02	0,5053	0,0000	0,5053	0,4295
	03	0,5028	0,0000	0,5028	0,4274
25%	11	0,1262	0,3772	0,5034	0,4279
	12	0,1265	0,3779	0,5044	0,4287
	13	0,1265	0,3772	0,5037	0,4281
50%	21	0,252	0,2584	0,5104	0,4338
	22	0,2577	0,2521	0,5098	0,4333
	23	0,2549	0,2578	0,5127	0,4358
75%	31	0,3763	0,1252	0,5015	0,4263
	32	0,3765	0,1261	0,5026	0,4272
	33	0,3768	0,1254	0,5022	0,4269
100%	41	0,0000	0,5009	0,5009	0,4258
	42	0,0000	0,5055	0,5055	0,4297
	43	0,0000	0,5068	0,5068	0,4308

**Tabela G.2** Dados da biomassa com 5 níveis de rompimento distintos após a lavagem com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH=6,8.

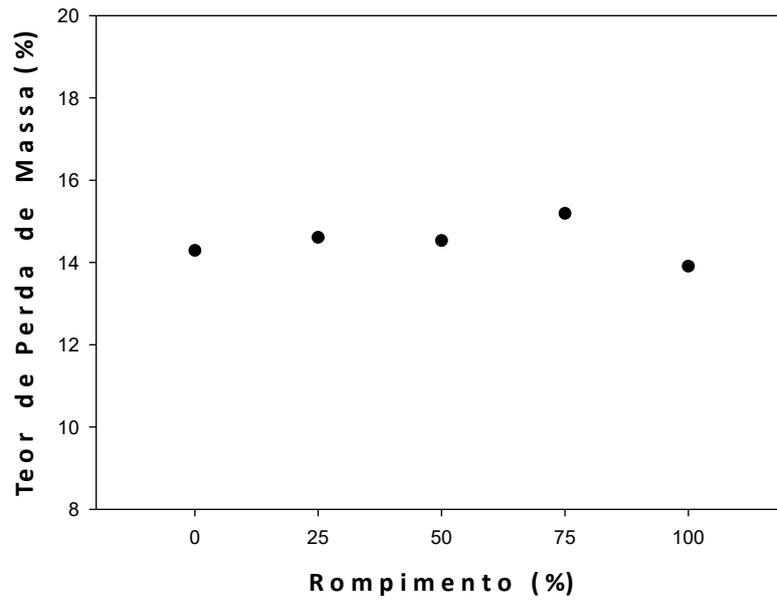
ID	Erlenmeyer (g)	Erlenmeyer + Biomassa (g)	Biomassa seca + tampão (g)	Tampão (g)	Biomassa seca (g)
0%	01	72,03310	72,70720	0,6741	0,3641
	02	62,13640	62,81770	0,6813	0,3713
	03	60,50500	61,18440	0,6794	0,3694
25%	11	89,21940	89,90100	0,6816	0,3716
	12	68,67530	69,35210	0,6768	0,3668
	13	62,43490	63,10360	0,6687	0,3587
50%	21	75,63460	76,32540	0,6908	0,3808
	22	64,55310	65,23490	0,6818	0,3718
	23	68,09220	68,76320	0,6710	0,3610
75%	31	78,13110	78,79770	0,6666	0,3566
	32	79,68930	80,36210	0,6728	0,3628
	33	67,49890	68,17540	0,6765	0,3665
100%	41	69,03010	69,71060	0,6805	0,3705
	42	63,25220	63,93450	0,6823	0,3723
	43	68,73880	69,41330	0,6745	0,3645

**Tabela G.3** Teor de perda de massa, dados das repetições.

	ID	Biomassa seca (g)		Teor de perda de massa (%)
		Antes lavagem	Após lavagem	
0%	01	0,4321	0,3641	15,7449
	02	0,4295	0,3713	13,5516
	03	0,4274	0,3694	13,5664
25%	11	0,4279	0,3716	13,1553
	12	0,4287	0,3668	14,4470
	13	0,4281	0,3587	16,2200
50%	21	0,4338	0,3808	12,2257
	22	0,4333	0,3718	14,1993
	23	0,4358	0,3610	17,1629
75%	31	0,4263	0,3566	16,3451
	32	0,4272	0,3628	15,0769
	33	0,4269	0,3665	14,1425
100%	41	0,4258	0,3705	12,9802
	42	0,4297	0,3723	13,3531
	43	0,4308	0,3645	15,3860

**Tabela G.3** Teor de perda de massa, dados médios.

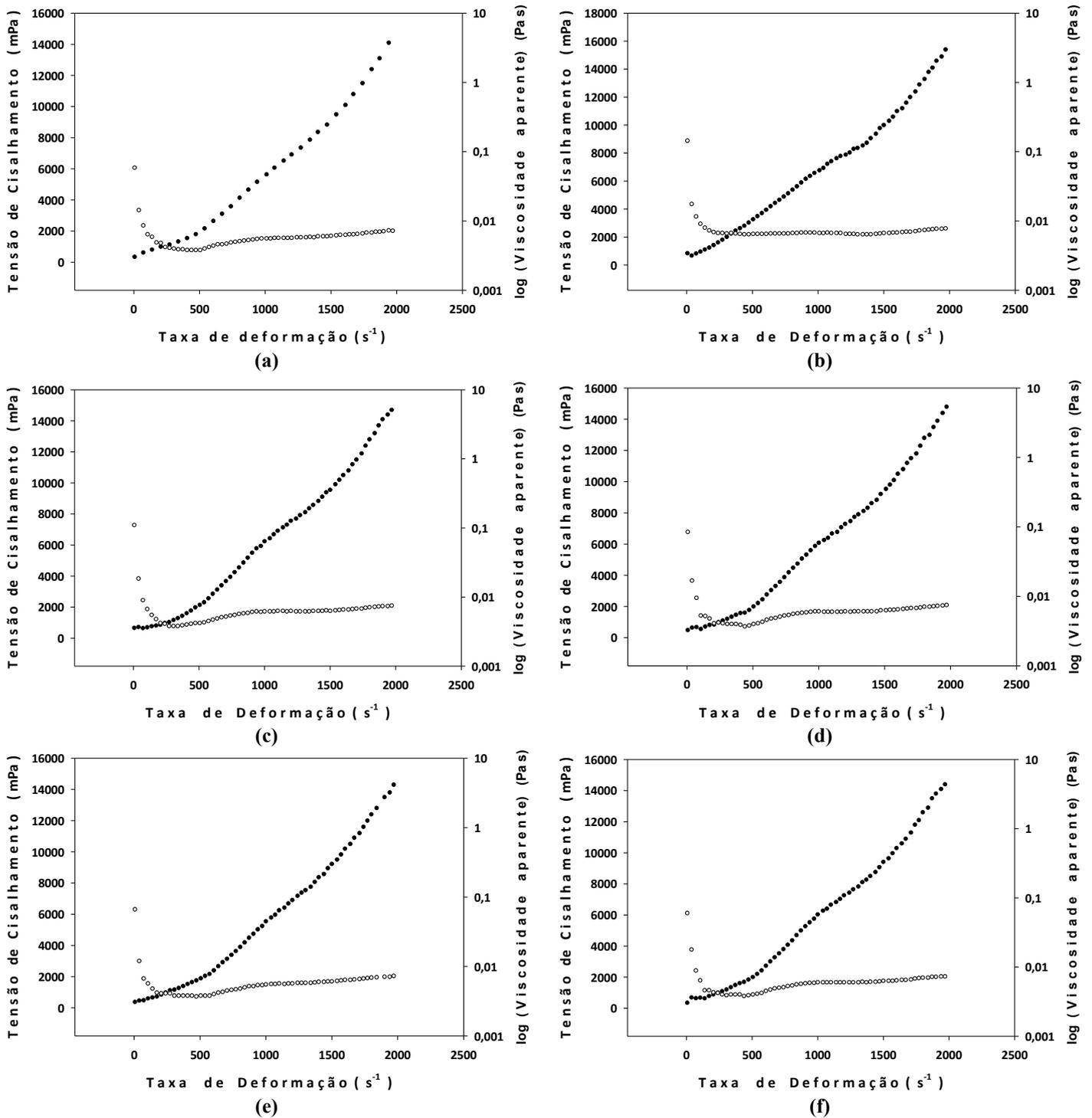
ID	Teor de perda de massa (%)		
0%	14,2876	±	1,2620
25%	14,6074	±	1,5386
50%	14,5293	±	2,4851
75%	15,1882	±	1,1055
100%	13,9064	±	1,2949



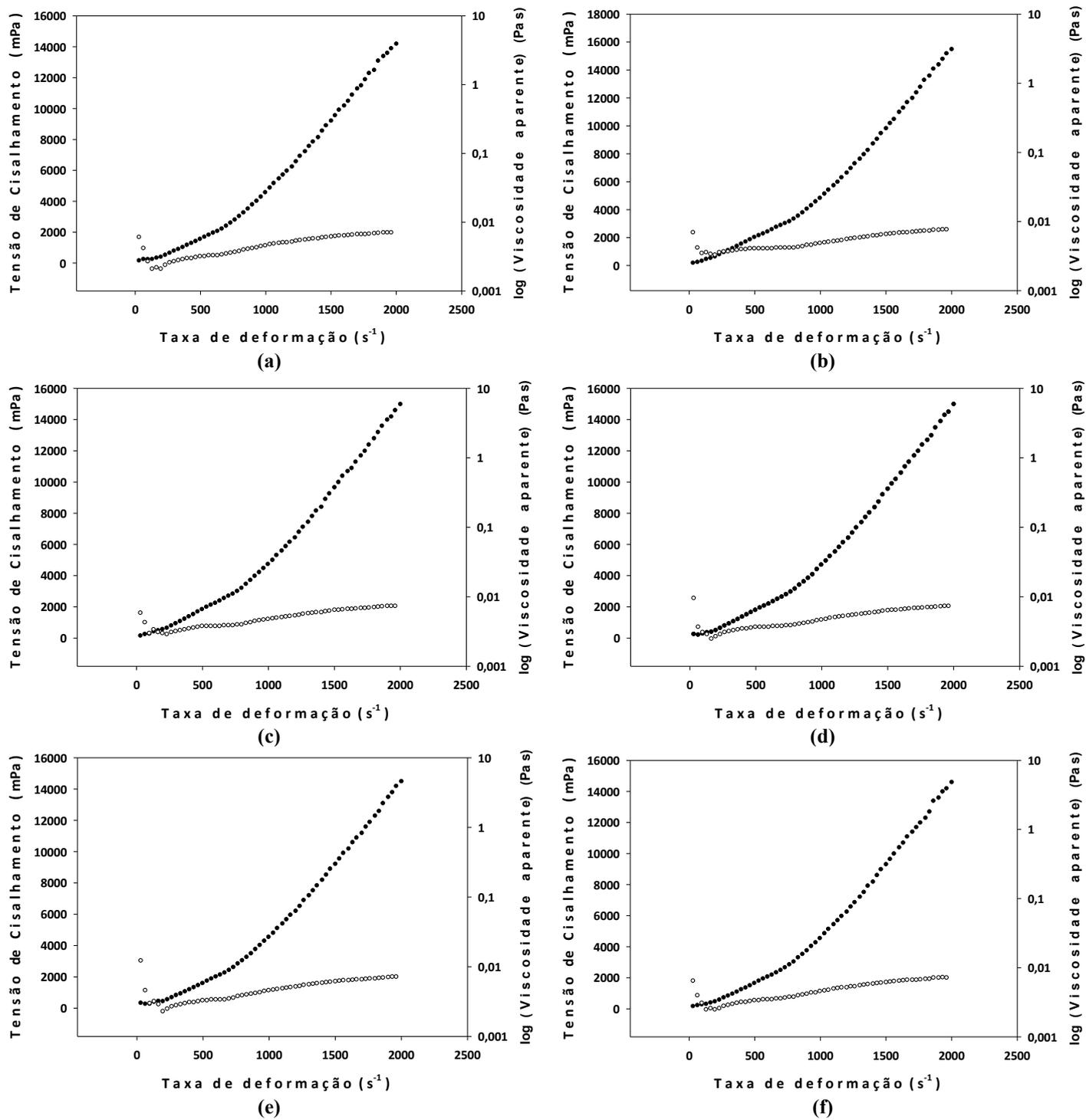
**Figura G.1** Dispersão dos dados de teor de perda de massa em função do rompimento.

## APENDICE H Memorial de dados de reologia

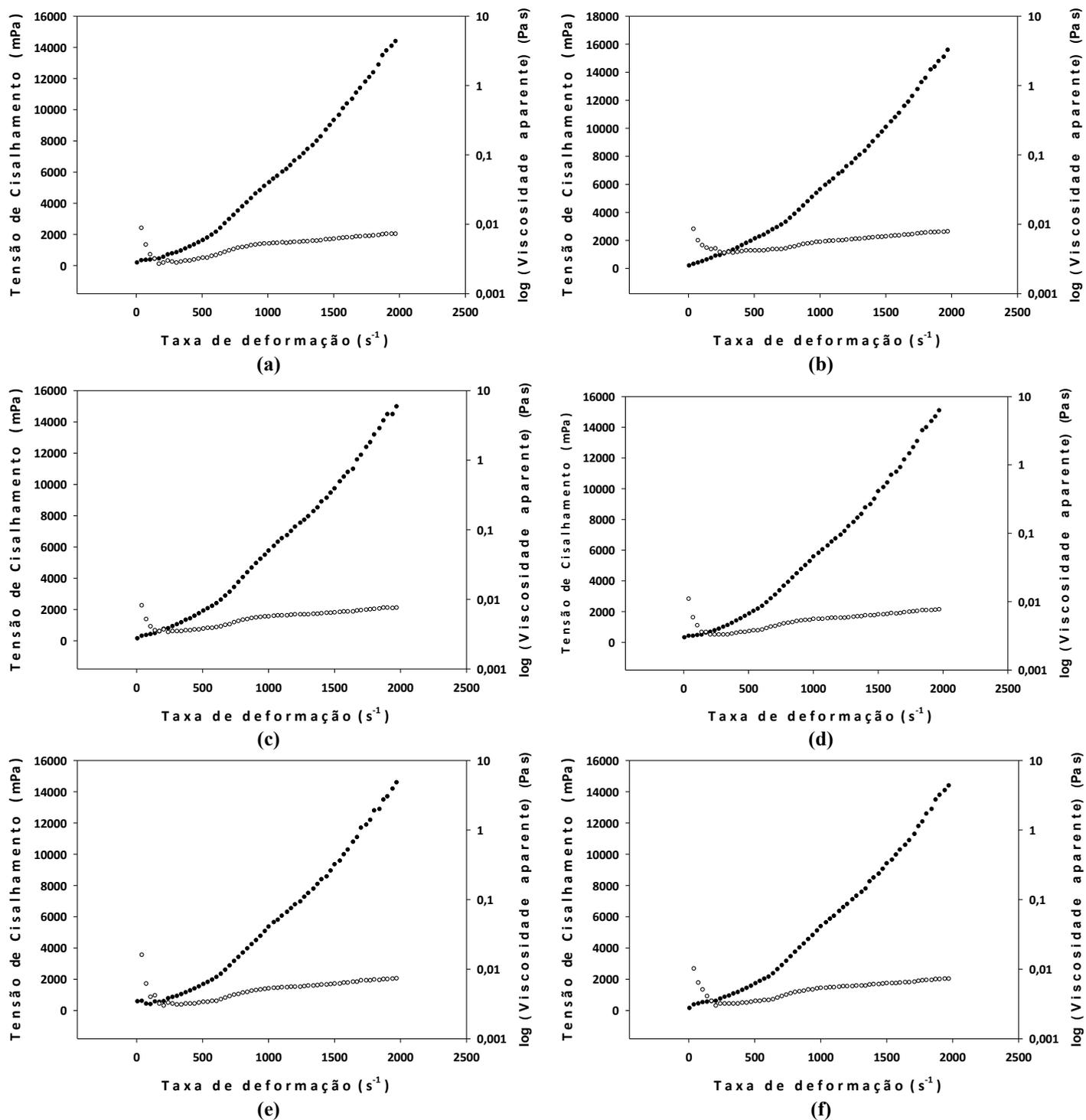
### H.1 Reologia de suspensão de microalgas sem rompimento



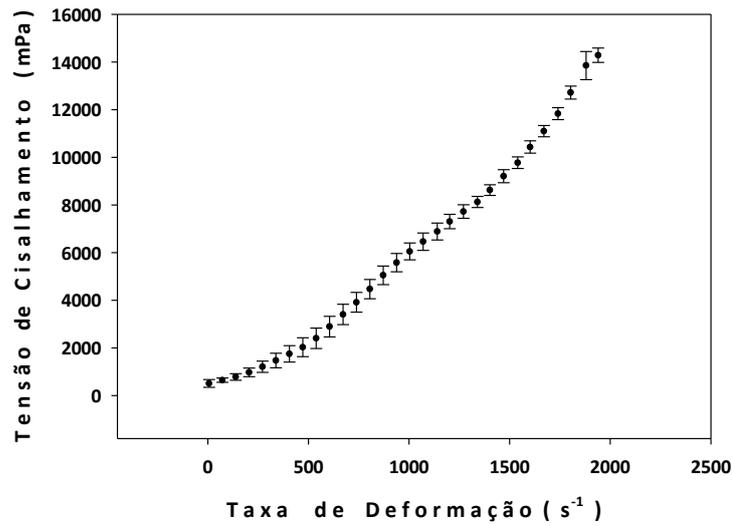
**Figura H.1** Reogramas de suspensões de microalgas sem rompimento (a), (b), (c), (d), (e) e (f). Tensão de cisalhamento (●) e viscosidade (○) em função da taxa de deformação (0 a 2000 s<sup>-1</sup>, subida 1).



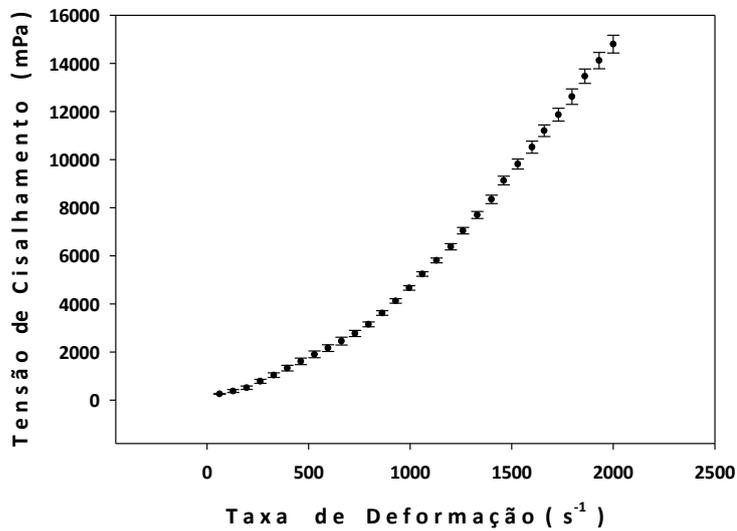
**Figura H.2** Reogramas de suspensões de microalgas sem rompimento (a), (b), (c), (d), (e) e (f). Tensão de cisalhamento (●) e viscosidade (○) em função da taxa de deformação (2000 a 0 s<sup>-1</sup>, descida 1).



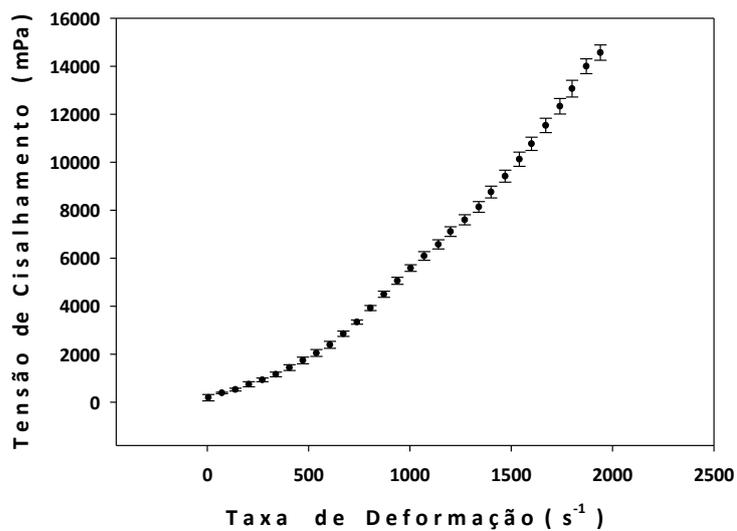
**Figura H.3** Reogramas de suspensões de microalgas sem rompimento (a), (b), (c), (d), (e) e (f). Tensão de cisalhamento (●) e viscosidade (○) em função da taxa de deformação (0 a 2000 s<sup>-1</sup>, subida 2).



(a)

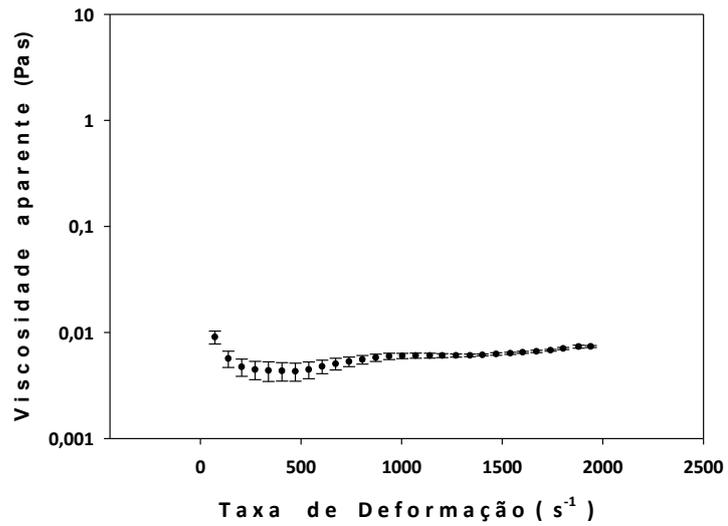


(b)

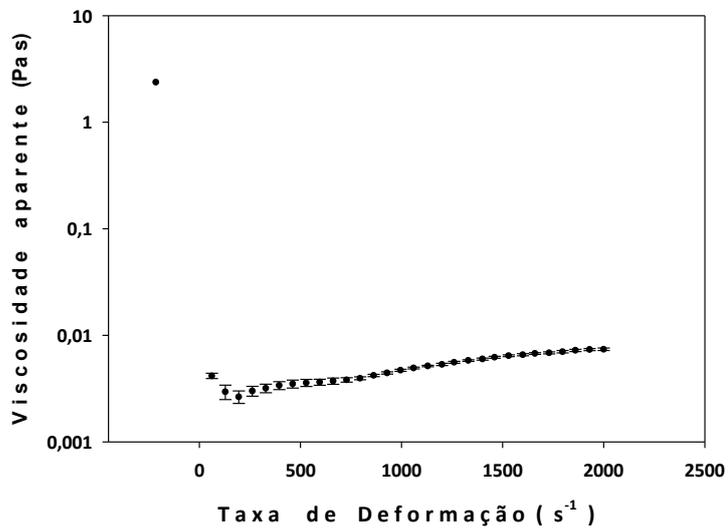


(c)

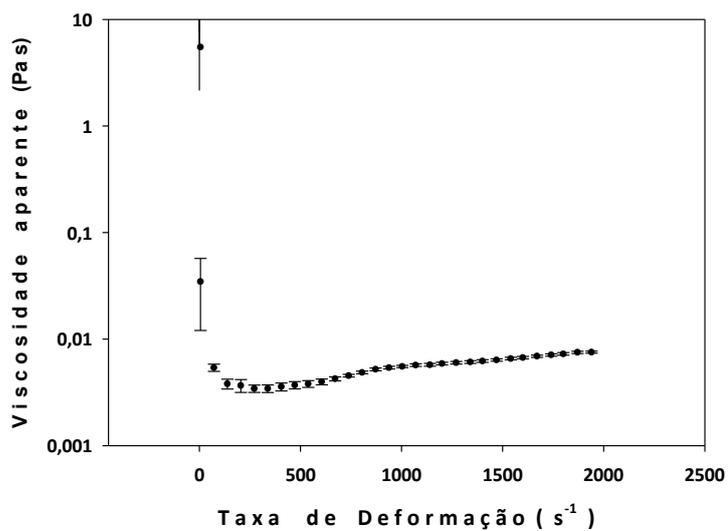
**Figura H.4** Reogramas de dados médios das suspensões de microalgas sem rompimento, sendo a rampa de subida 1 (a), descida 1 (b) e subida 2 (c) com representação do intervalo de confiança a 95% para cada ponto experimental.



(a)

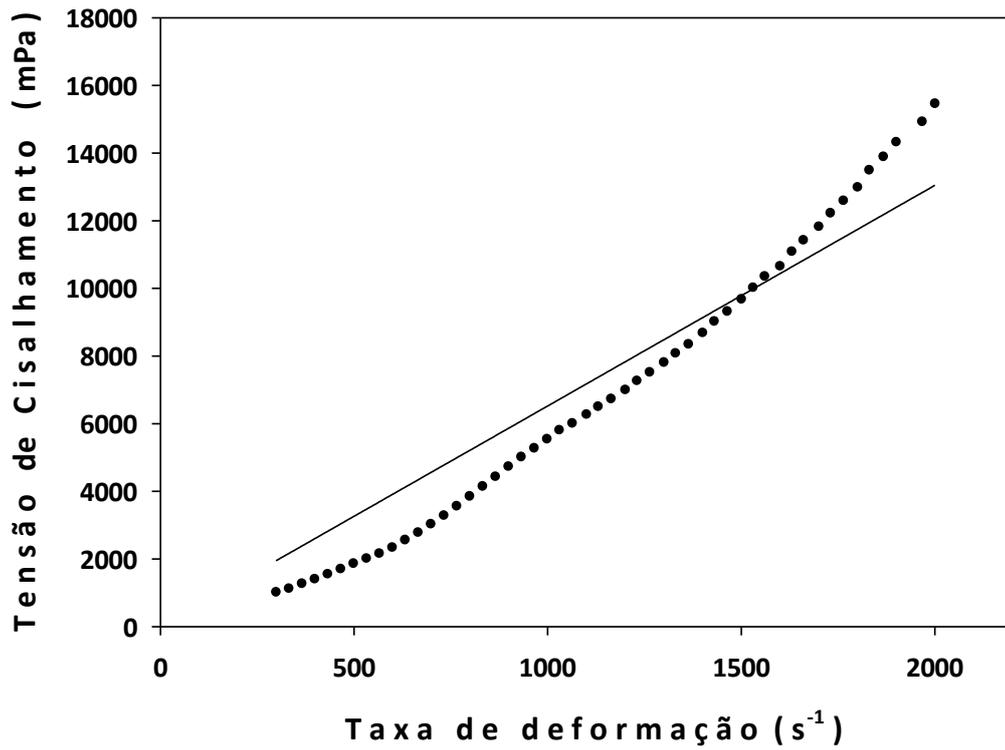


(b)

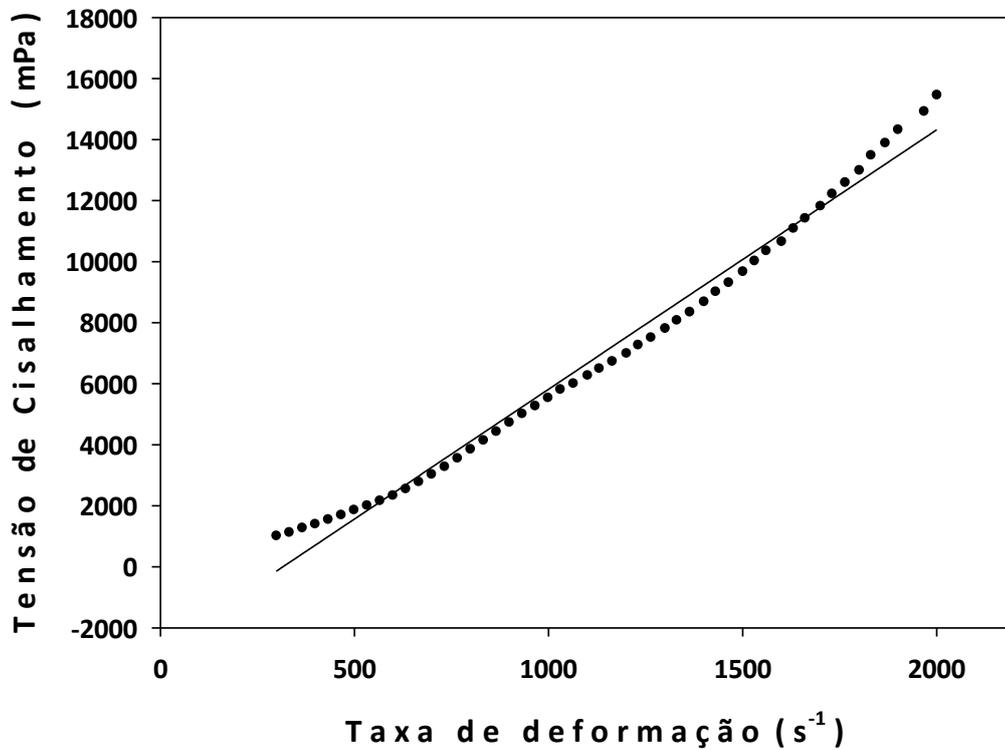


(c)

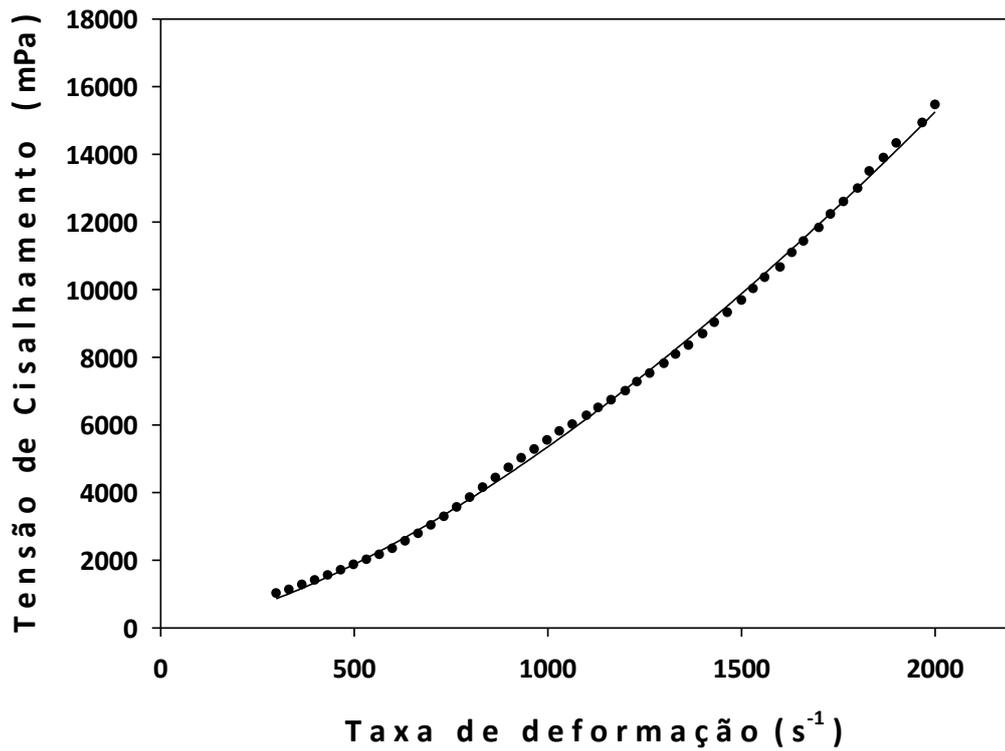
**Figura H.5** Reogramas de dados médios das suspensões de microalgas sem rompimento, sendo a rampa de subida 1 (a), descida 1 (b) e subida 2 (c) com representação da viscosidade aparente em função da taxa de deformação.



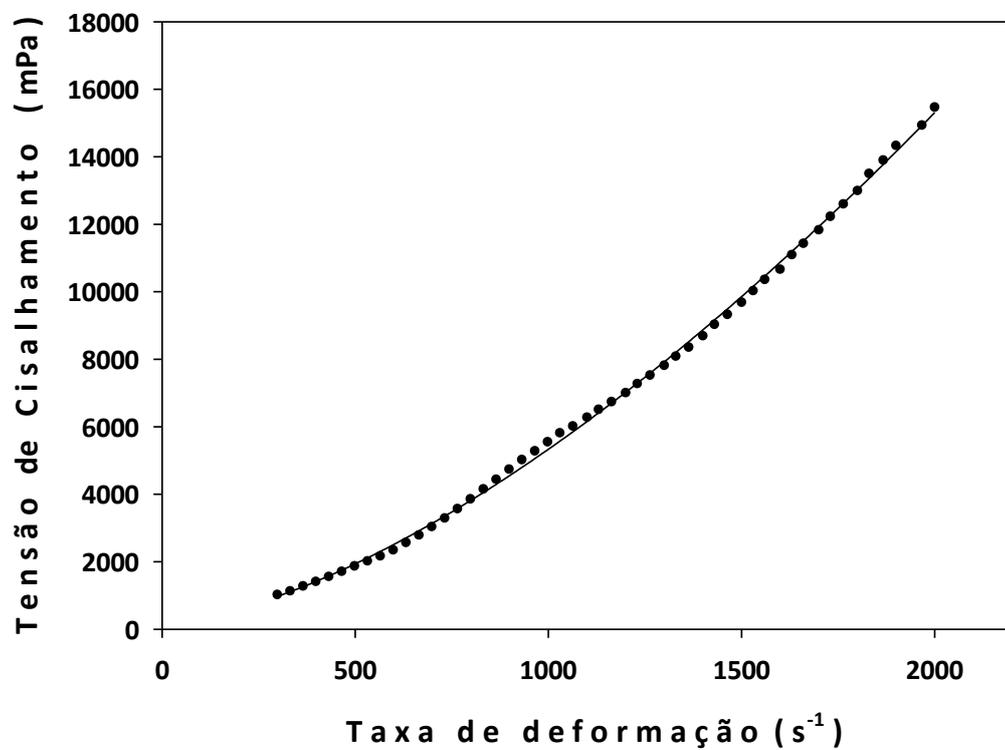
**Figura H.6** Regressão linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo Newtoniano, subida 2 (0 a 2000 s<sup>-1</sup>).



**Figura H.7** Regressão linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Bingham, subida 2 (0 a 2000 s<sup>-1</sup>).



**Figura H.8** Regressão não-linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Ostwald de Waele, subida 2 (0 a 2000  $s^{-1}$ ).



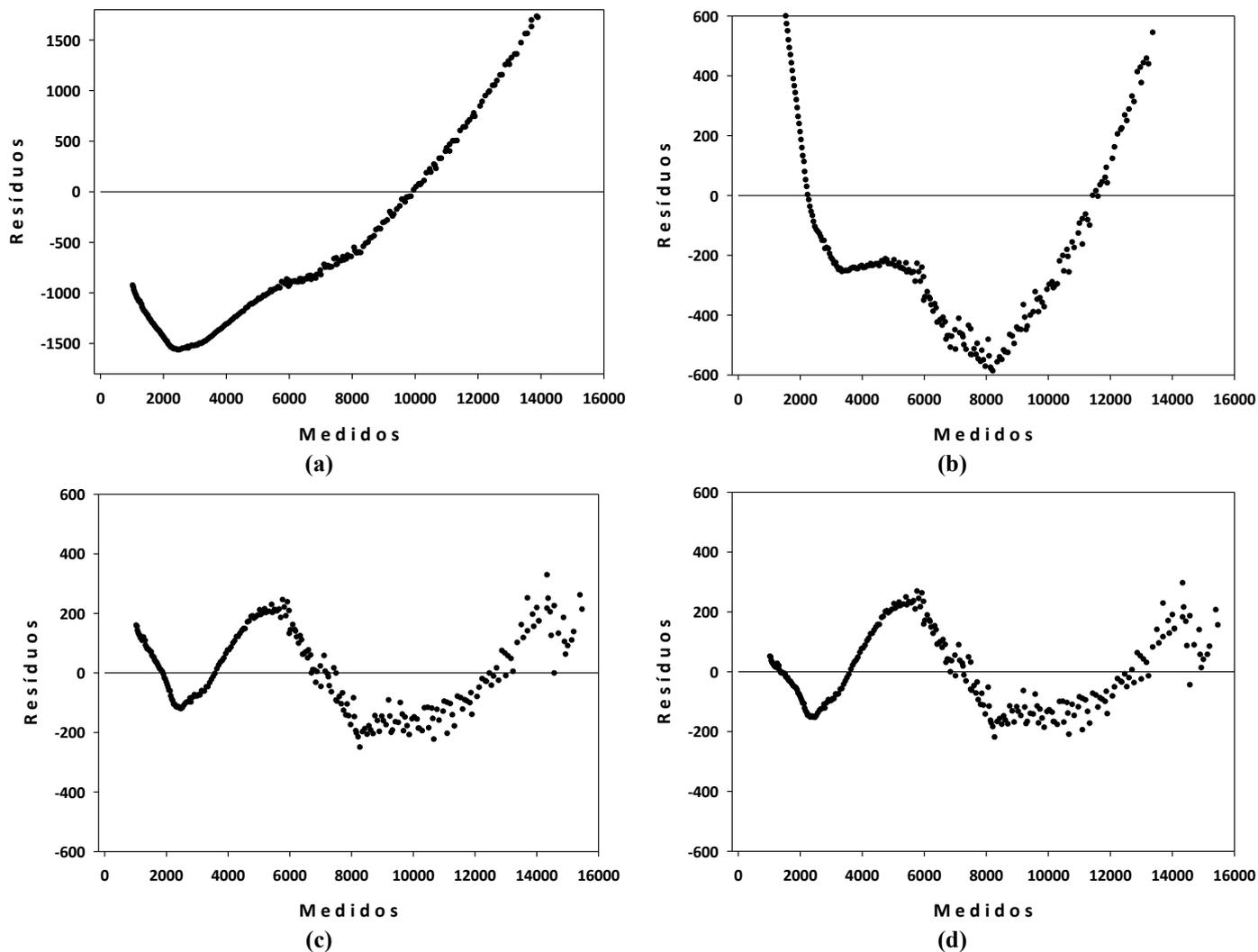
**Figura H.9** Regressão não-linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Herschel-Bulkley, subida 2 (0 a 2000  $s^{-1}$ ).

**Tabela H.1** Análise de significância ( $\alpha = 5\%$ ) dos coeficientes das regressões dos modelos reológicos.

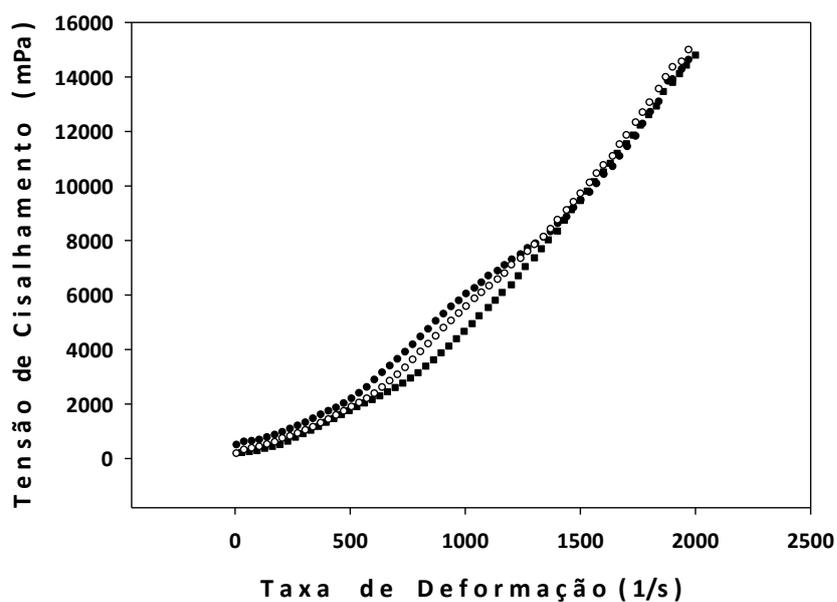
Modelo	Equação		Coeficientes			t	valor-P	R <sup>2</sup>
Newtoniano (linear)	$\tau = \mu\dot{\gamma}$	$\mu$	6,5234	±	0,0585	111,4930	<0,0001	0,9236
Bingham (linear)	$\tau = \tau_0 + \mu\dot{\gamma}$	$\tau_0$	-2684,17	±	76,4820	-35,0955	<0,0001	0,9870
		$\mu$	8,5042	±	0,0614	138,4794	<0,0001	
Ostwald de Waele (potência)	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	$K$	0,1578	±	0,0048	32,8783	<0,0001	0,9990
		$n$	1,5102	±	0,0041	365,1802	<0,0001	
		$\tau_0$	186,1425	±	37,6652	4,9420	<0,0001	
Herschel-Bulkley (potência)	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$	$K$	0,1112	±	0,0087	12,7764	<0,0001	0,9991
		$n$	1,5551	±	0,0101	153,3446	<0,0001	

**Tabela H.2** Análise de variância dos coeficientes da regressão não linear do modelo reológico.

Pigmentos	Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
	SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRes	MQT		
Newtoniano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bingham	4,44E9	5,86E6	4,5E9	1	253	254	4,44E9	2,31E5	1,77E7	1,91E4	<0,0001
Ostwald de Waele	4,49E9	4,49E6	4,5E9	1	253	254	4,49E9	1,77E4	1,77E7	2,53E5	<0,0001
Herschel-Bulkley	4,49E9	4,11E6	4,5E9	2	252	254	5,72E9	1,63E4	1,77E7	1,38E5	<0,0001

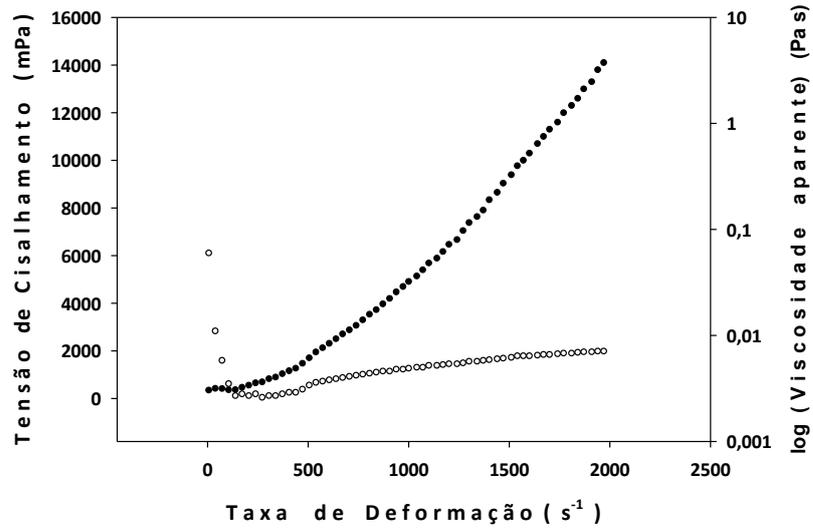


**Figura H.10** Distribuição dos resíduos dos modelos reológicos newtoniano (a), Bingham (b), Ostwald de Waele (c) e Herschel-Bulkley (d), para as microalgas sem rompimento, subida 2 (0 a 2000 s<sup>-1</sup>).

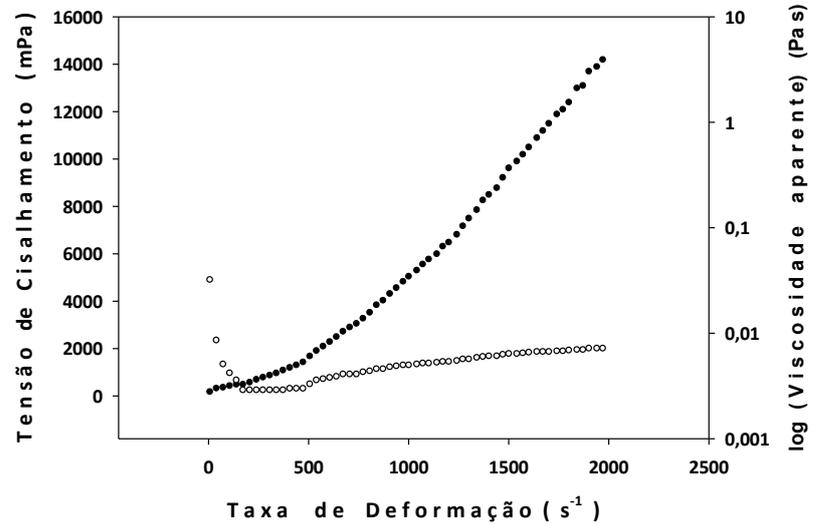


**Figura H.11** Reograma de dados médios com representação das 3 rampas analisadas, subida 1 (●), descida 1 (■) e subida 2 (○).

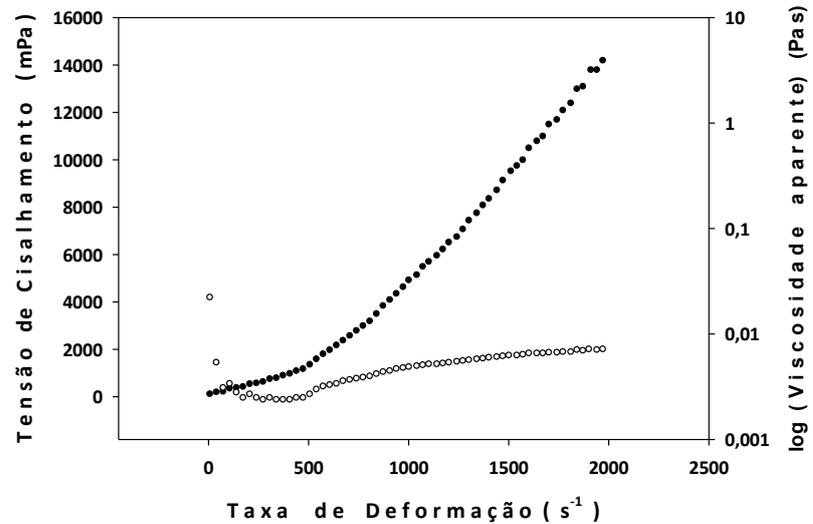
## H.2 Reologia de suspensão de microalgas rompidas



(a)

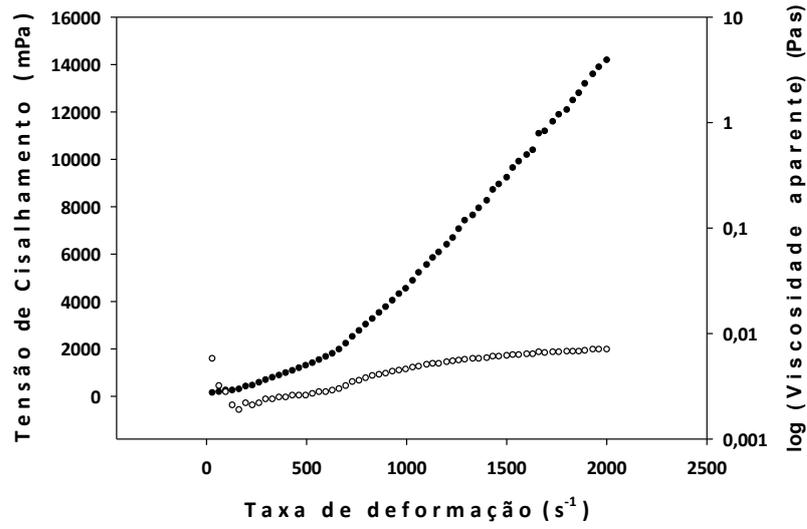


(b)

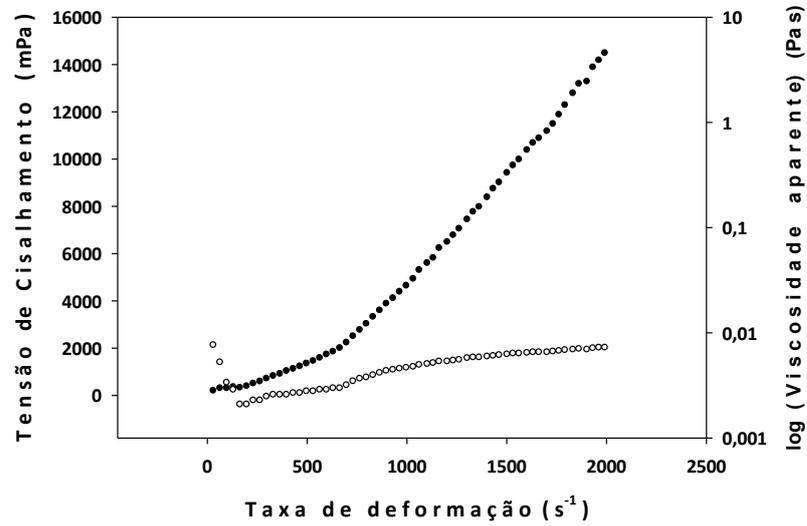


(c)

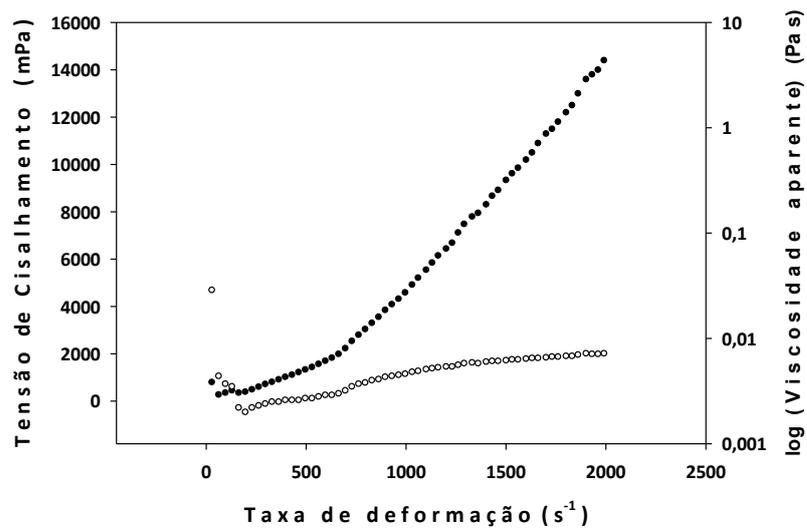
**Figura H.12** Reogramas de suspensões de microalgas rompidas (a), (b) e (c). Tensão de cisalhamento (●) e viscosidade (○) em função da taxa de deformação (0 a 2000  $s^{-1}$ , subida 1).



(a)

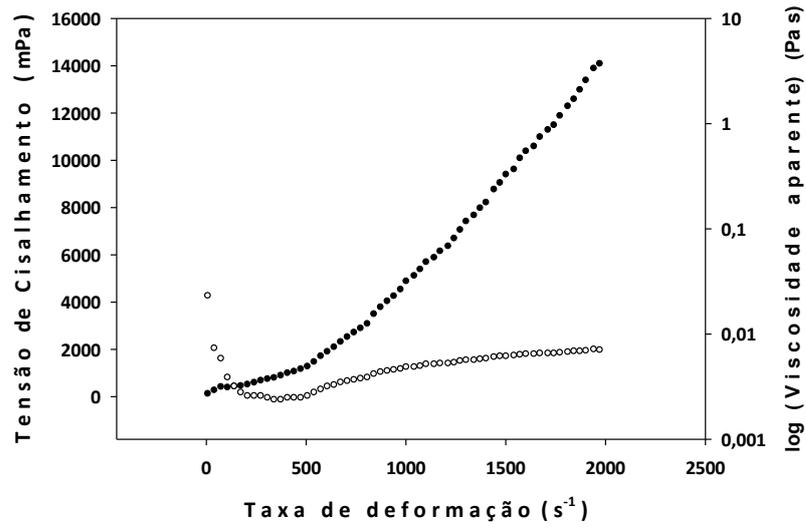


(b)

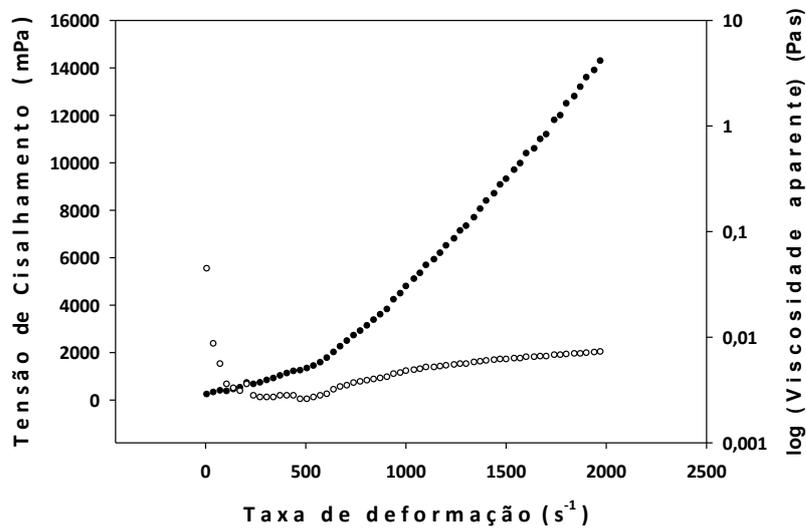


(c)

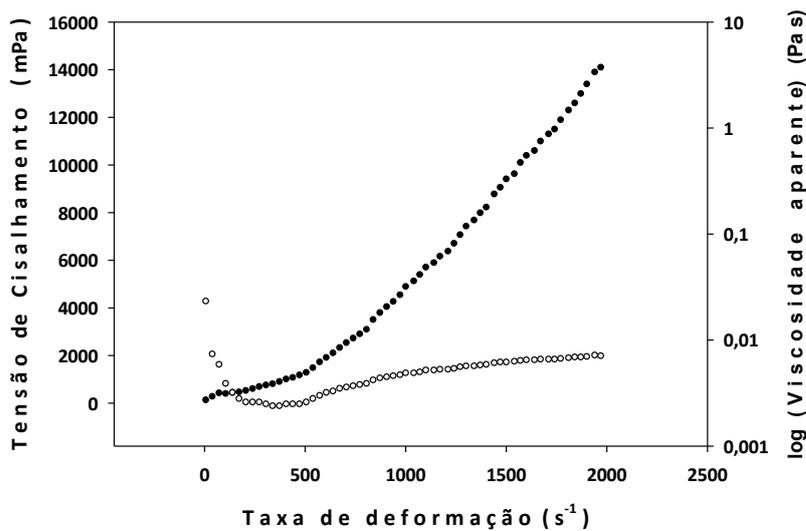
**Figura H.13** Reogramas de suspensões de microalgas rompidas (a), (b) e (c). Tensão de cisalhamento (●) e viscosidade (○) em função da taxa de deformação (2000 a 0  $s^{-1}$ , descida 1).



(a)

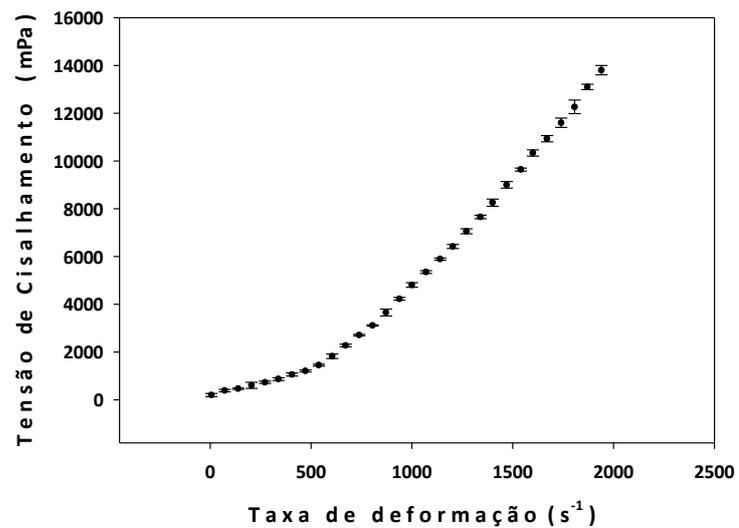
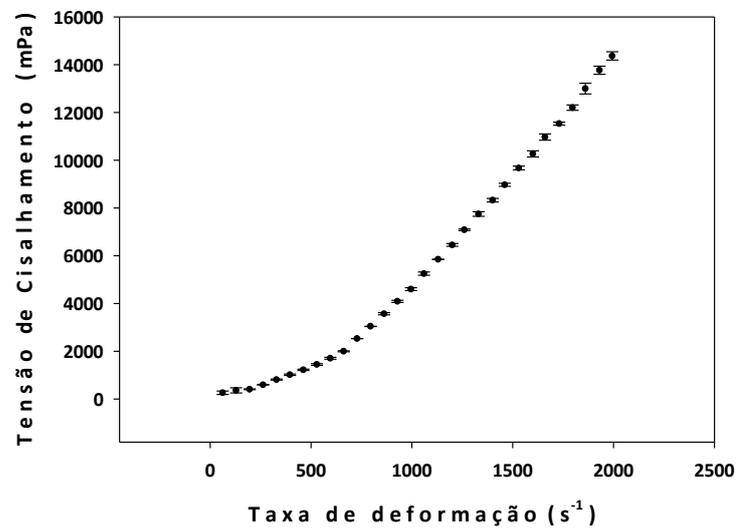
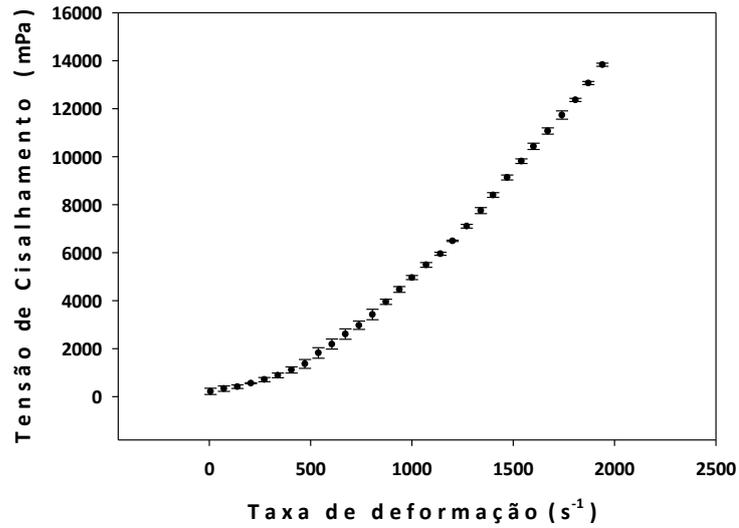


(b)

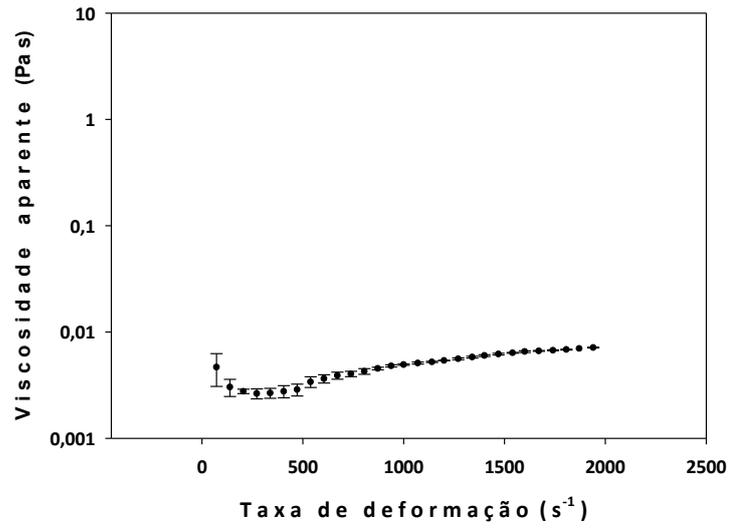


(c)

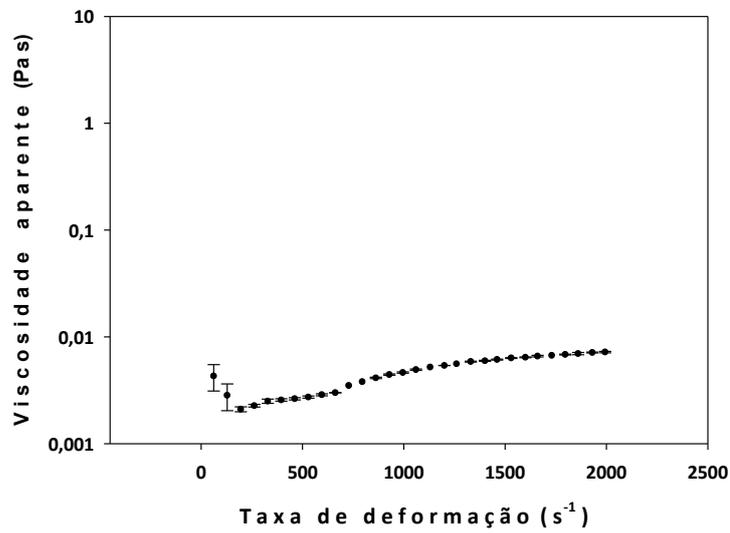
**Figura H.14** Reogramas de suspensões de microalgas rompidas (a), (b) e (c). Tensão de cisalhamento (●) e viscosidade (○) em função da taxa de deformação (0 a 2000  $s^{-1}$ , subida 2).



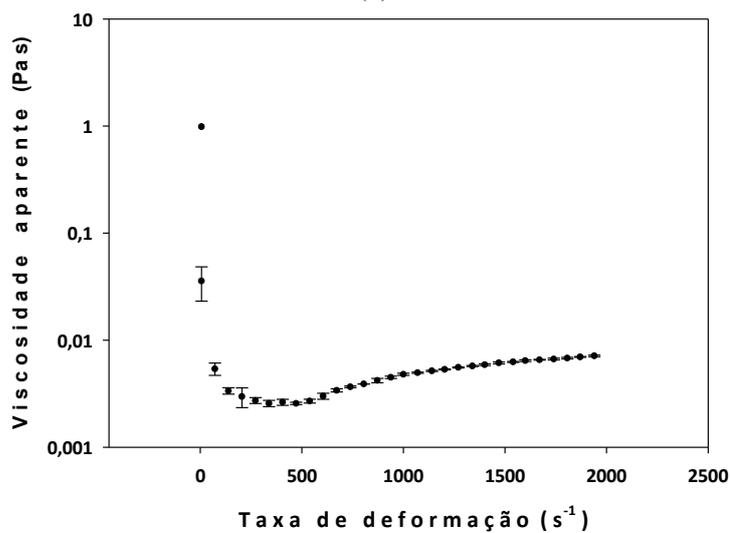
**Figura H.15** Reogramas de dados médios das suspensões de microalgas rompidas, sendo a rampa de subida 1 (a), descida 1 (b) e subida 2 (c) com representação do intervalo de confiança a 95% para cada ponto experimental.



(a)

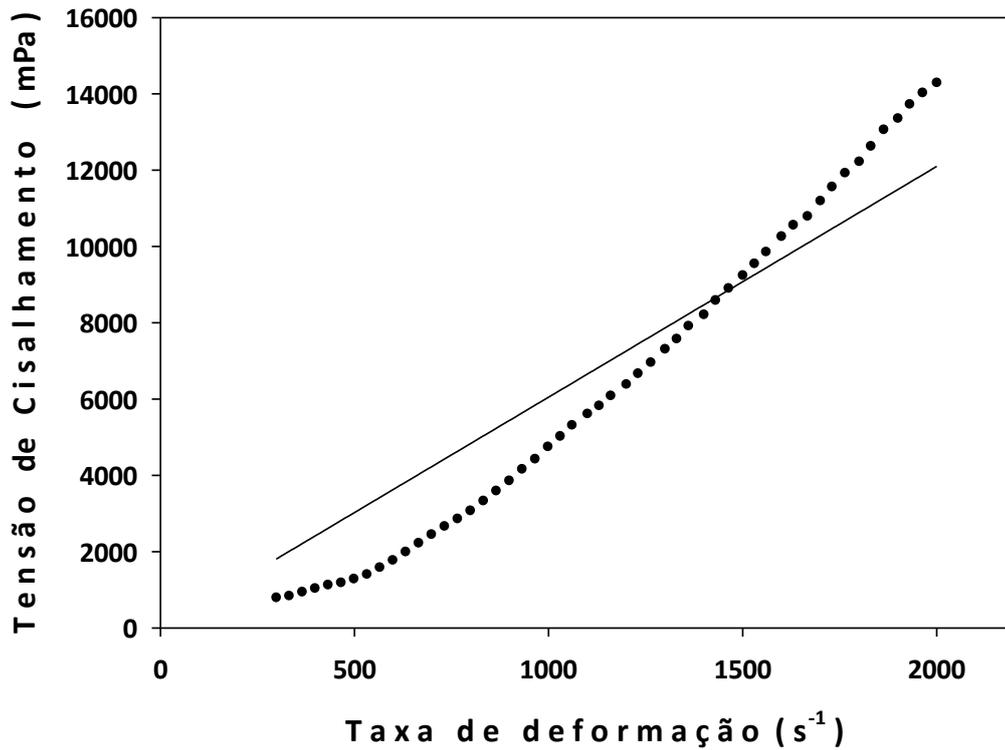


(b)

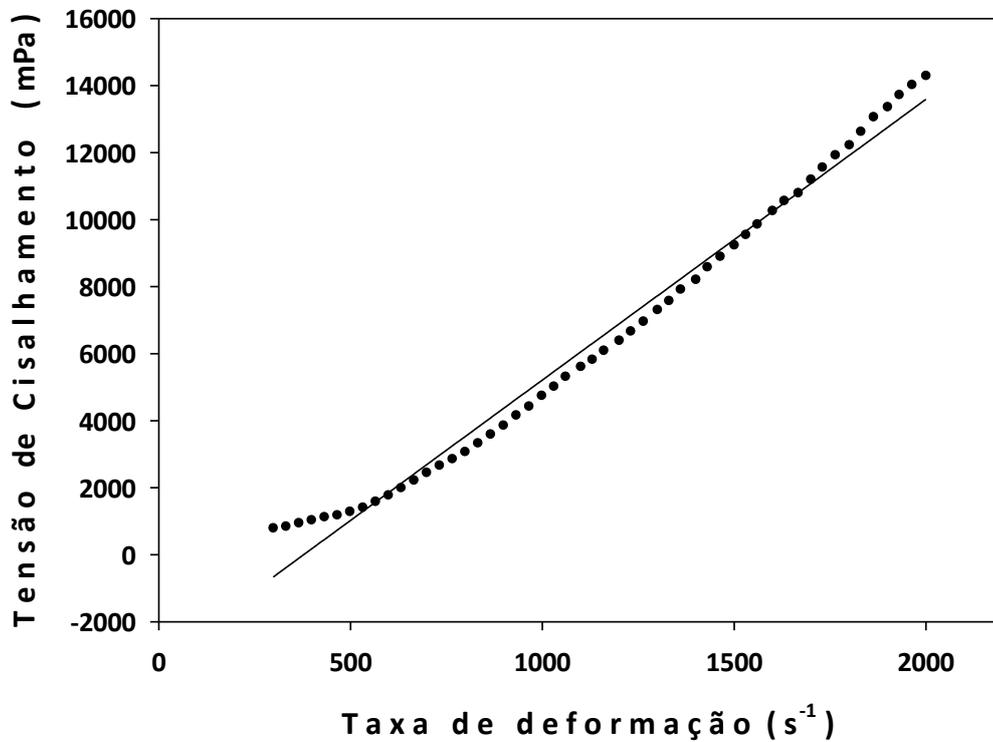


(c)

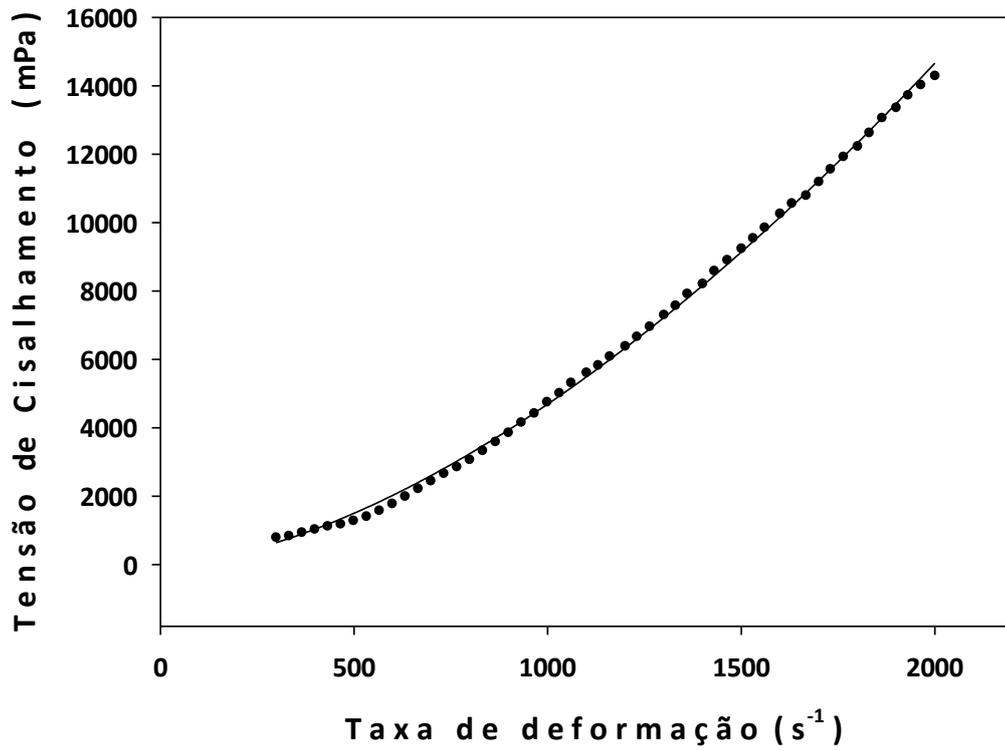
**Figura H.16** Reogramas de dados médios das suspensões de microalgas sem rompimento, sendo a rampa de subida 1 (a), descida 1 (b) e subida 2 (c) com representação da viscosidade aparente em função da taxa de deformação.



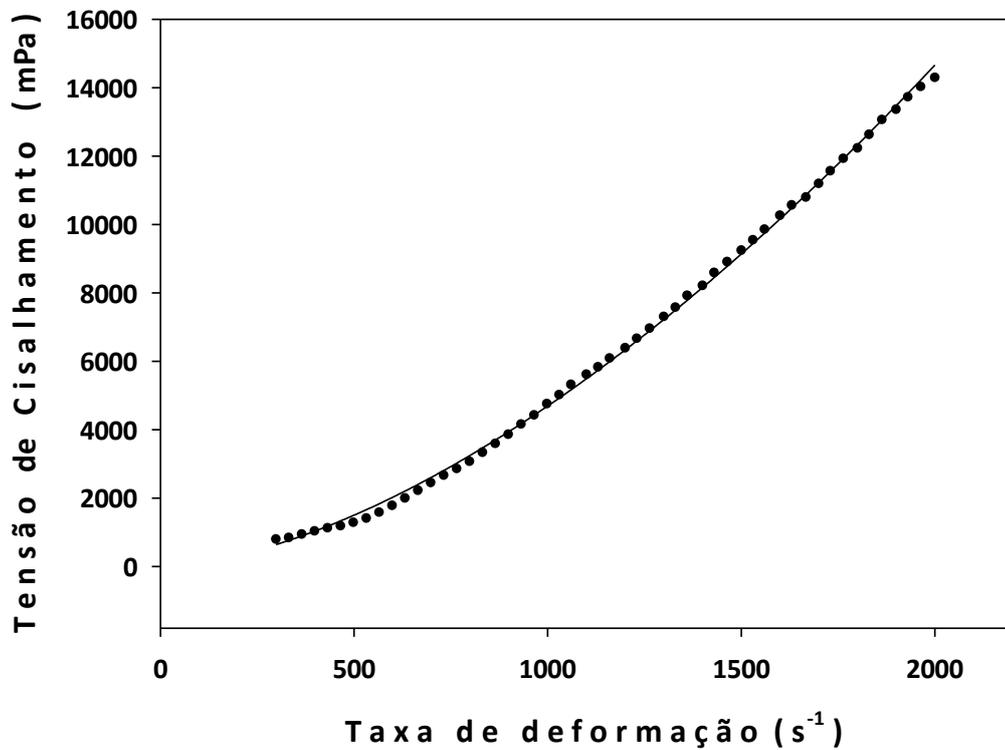
**Figura H.17** Regressão linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo Newtoniano.



**Figura H.18** Regressão linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Bingham.



**Figura H.19** Regressão não-linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Ostwald de Waele.



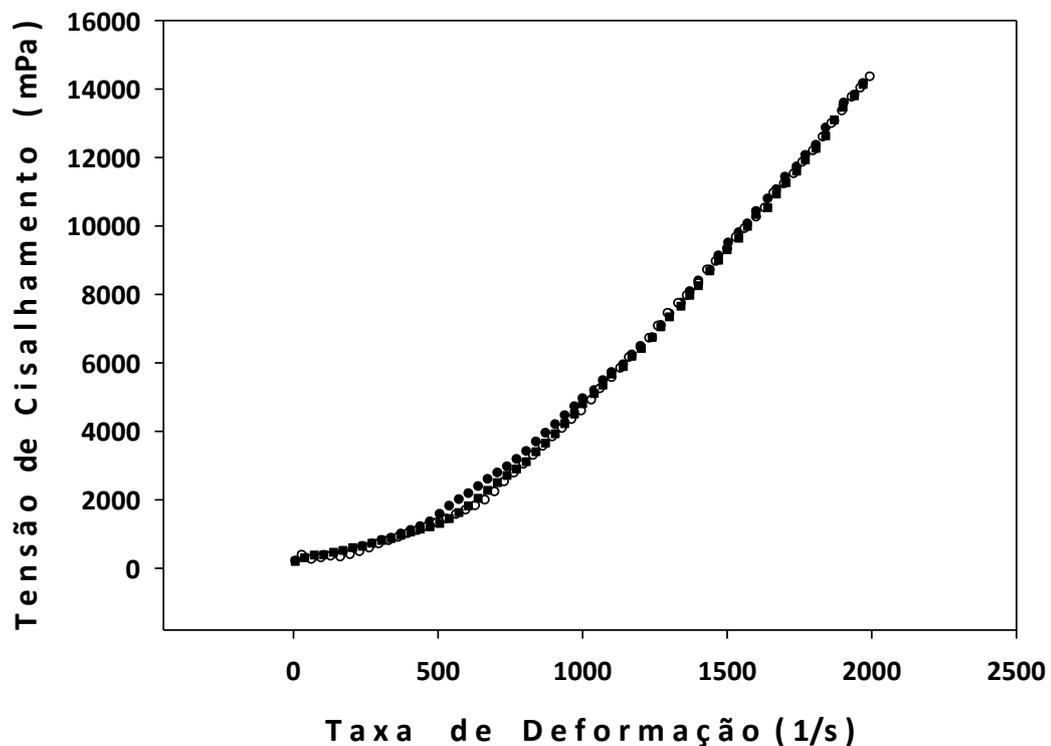
**Figura H.20** Regressão não-linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para microalgas sem rompimento, modelo de Herschel-Bulkley.

**Tabela H.5** Análise de significância ( $\alpha = 5\%$ ) dos coeficientes das regressões dos modelos reológicos.

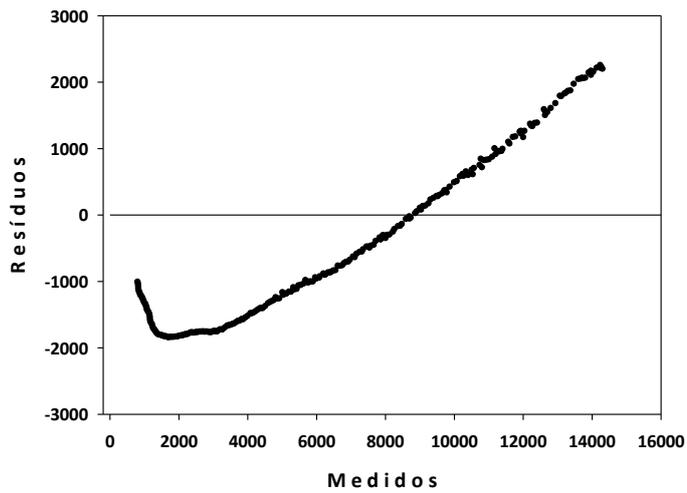
Modelo	Equação		Coeficientes			t	valor-P	R <sup>2</sup>
Newtoniano (linear)	$\tau = \mu\dot{\gamma}$	$\mu$	6,0497	±	0,0672	90,0422	<0,0001	0,8960
Bingham (linear)	$\tau = \tau_0 + \mu\dot{\gamma}$	$\tau_0$	-3164,22	±	77,8430	-40,6487	<0,0001	0,9861
		$\mu$	8,3780	±	0,0623	134,4205	<0,0001	
Ostwald de Waele (potência)	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	$K$	0,0551	±	0,0018	29,9740	<0,0001	0,9991
		$n$	1,6435	±	0,0045	363,1823	<0,0001	
Herschel-Bulkley (potência)	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$	$\tau_0$	-297,8171	±	31,9179	-9,3307	<0,0001	0,9993
		$K$	0,1005	±	0,0068	14,6957	<0,0001	
		$n$	1,5663	±	0,0088	177,6322	<0,0001	

**Tabela H.6** Análise de variância dos coeficientes da regressão não linear do modelo reológico.

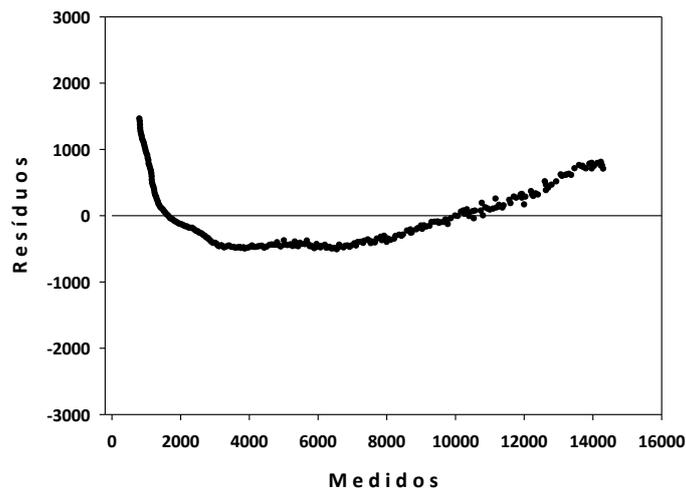
Pigmentos	Soma Quadrática			Graus de Liberdade			Média Quadrática			F	valor-P
	SQR	SQRes	SQT	GLR	GLRes	GLT	MQR	MQRRes	MQT		
Newtoniano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bingham	4,35E9	6,12E6	4,4E9	1	254	255	4,35E9	2,41E5	1,73E7	1,81E4	<0,0001
Ostwald de Waele	4,41E9	4,19E6	4,41E9	1	254	255	4,41E9	1,65E4	1,73E7	2,67E5	<0,0001
Herschel-Bulkley	4,41E9	3,04E6	4,41E9	2	253	255	2,20E9	1,20E4	1,73E7	1,83E5	<0,0001



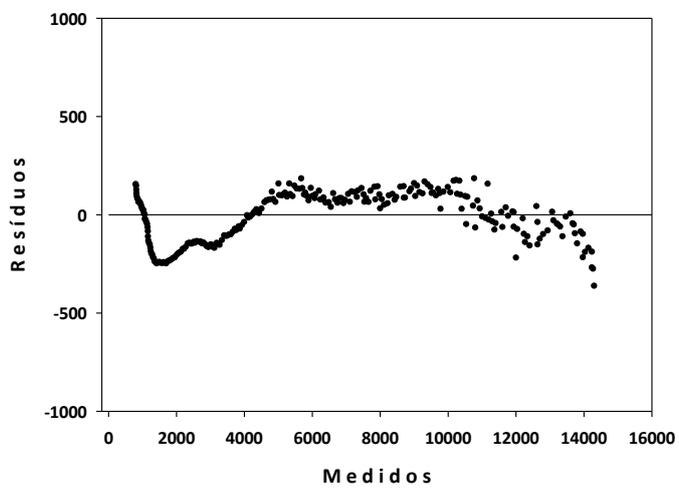
**Figura H.21** Reograma de dados médios com representação das 3 rampas analisadas, subida 1 (●), descida 1 (■) e subida 2 (○).



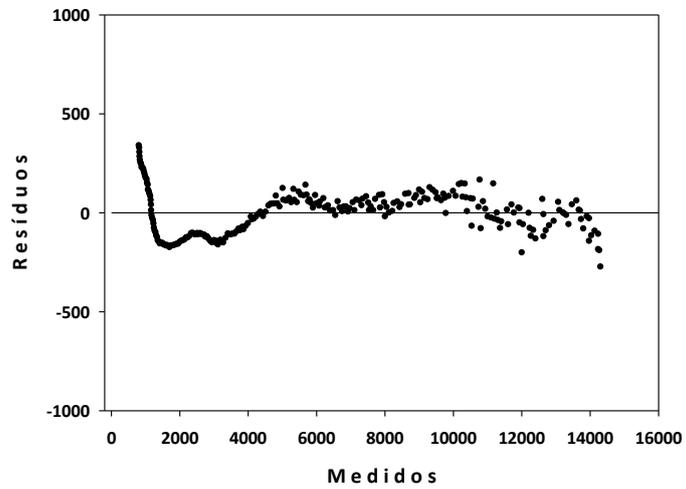
(a)



(b)



(c)



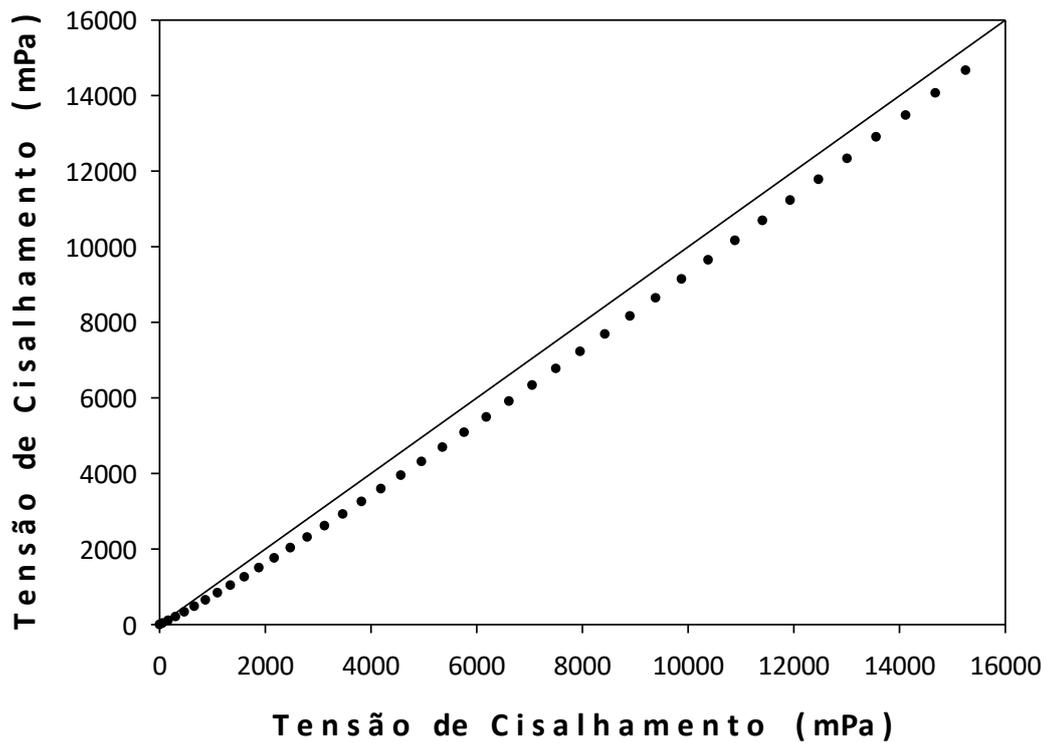
(d)

**Figura H.22** Distribuição dos resíduos do modelo reológico de microalgas rompidas da rampa de subida 1 (a), descida 1 (b) e subida 2 (c).

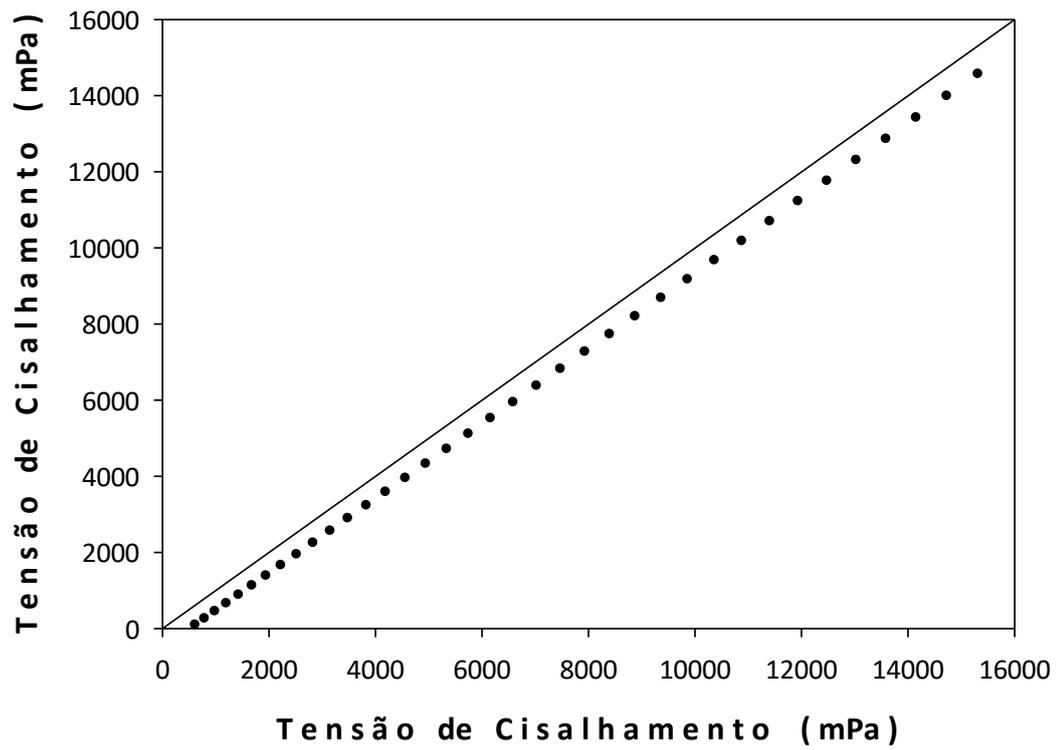
### H.3 Validação como indicador de rompimento celular

**Tabela H.7** Dados reológicos de microalgas sem rompimento e rompidas.

Modelo	Equação	Coeficientes		
Ostwald de Waele sem rompimento	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	$K$	0,1578	± 0,0048
		$n$	1,5102	± 0,0041
Ostwald de Waele rompida	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	$K$	0,0551	± 0,0018
		$n$	1,6435	± 0,0045
Herschel-Bulkley sem rompimento	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$	$\tau_0$	186,1425	± 37,6652
		$K$	0,1112	± 0,0087
		$n$	1,5551	± 0,0101
Herschel-Bulkley rompida	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$	$\tau_0$	-297,8171	± 31,9179
		$K$	0,1005	± 0,0068
		$n$	1,5663	± 0,0088



**Figura H.23** Análise de identidade dos modelos reológicos das microalgas sem rompimento (eixo x) e microalgas rompidas (eixo y), modelo Ostwald-de-Waele.



**Figura H.24** Análise de identidade dos modelos reológicos das microalgas sem rompimento (eixo x) e microalgas rompidas (eixo y), modelo Herschel-Bulkley.