

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR COMERCIAL A  
PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL POR EXTRAÇÃO COM  
FLUIDO SUPERCRÍTICO (EFS)**

**Diego Filócomo**

**Agosto, 2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR COMERCIAL A PARTIR DE  
BIOMASSA MICROALGAL POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO  
(EFS)**

**Diego Filócomo**

*Orientador*

**Dr. Gerson Luiz Vieira Coelho**

*Co-Orientador*

**Dr. Pedro Celso Nogueira Teixeira**

Dissertação submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau em **Mestre em  
Ciências**, em Engenharia Química, Área de  
Concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ  
Agosto, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Diego Filócomo**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_\_

---

Gerson Luiz Vieira Coelho (Dr.-Ing./ Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ)  
(Orientador e Presidente)

---

Pedro Celso Nogueira Teixeira (Dr.Sc./Divisão de Energia/INT/RJ)  
(Co-Orientador)

---

Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira (Dra.Sc./ Divisão de Energia/INT/RJ)

---

Cristiane Hess de Azevedo Meleiro (Dra.Sc./ Departamento de Tecnologia de Alimentos/IT/UFRRJ)

*"Do nascimento, o homem carrega o peso da gravidade em seus ombros. É aparafusado à terra. Mas homem só tem que afundar embaixo da superfície e ele estará livre. Boiado por água, ele pode voar em qualquer direção - para cima, para baixo de lado - por mero sacudir a sua mão. Sob água, homem torna-se um arcanjo"*

*Jacques-Yves Cousteau*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação, primeiramente, aos meus pais Dirceu e Marymélia e meu irmão Guilherme, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e acreditando na importância do trabalho que venho desenvolvendo ao longo destes anos.

A minha esposa Fabíola por estar sempre ao meu lado me dando força, carinho, amor e principalmente tendo muita compreensão nos momentos mais difíceis, e também por fazer parte dos momentos mais alegres.

Por fim, dedico a todos os amigos conquistados durante esses dois anos, que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse concluir esse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, pelas oportunidades e realizações presentes em minha vida.

Ao meu guia espiritual por me acompanhar na jornada da vida.

Aos meus pais e irmão por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e aconselhando.

A minha amada esposa por todo o apoio, paciência e compreensão durante esses dois anos.

Ao meu orientador Dr. Gerson L. V. Coelho, pela confiança e oportunidade de realização desse trabalho.

Ao e meu co-orientador Dr. Pedro C. N. Teixeira e a Dra Cláudia M. L. Teixeira, que muito me ensinaram e acompanham minha trajetória desde o ano 2011, sempre contribuindo para o meu desenvolvimento intelectual.

Aos amigos do Laboratório de Processos de Separação pelo companheirismo e ajuda quando preciso. Em especial Andrew e Camila por me ajudarem a solucionar os problemas encontrados durante o desenvolvimento do trabalho e compartilharem os momentos de dificuldades da forma mais descontraída possível.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Microalgas pelo companheirismo e ajuda quando preciso. Em especial, Carla Ferreira e Gustavo Melo Lima pela ajuda e dedicação, nos experimentos de cultivo.

Aos amigos Carlos Felipe e Souhayl Ayoubi, pelo acolhimento e companheirismo durante esses dois anos, bem como a todos os amigos do alojamento M6.

Ao amigo Sr. Elias, do Laboratório de Escoamento de Fluidos Giulio Massarani, que sempre me ajudou nos momentos de dificuldade.

À CAPES e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Nascido em 10 de julho de 1987, em Poá, São Paulo, filho de Dirceu Filócomo e Marymélia di Franch Rabello Filócomo, cursou o Ensino Fundamental no Colégio Técnico Batuíra e o Ensino Médio no Colégio Suzano concluído ao final do ano de 2004.

Em 2005, ingressou no Centro Universitário Monte Serrat (UNIMONTE), Santos - SP, onde obteve o grau de bacharel em Oceanografia no segundo semestre de 2009. Sempre esteve envolvido em atividades de campo, laboratoriais e acadêmicas. Em 2006, participou como bolsista do programa de Iniciação Científica apoiado pela Pró-reitoria de Pesquisa, Extensão, Pós-Graduação da UNIMONTE, onde iniciou suas pesquisas voltadas para a área de ecologia do fitoplâncton marinho. Em 2007 participou do projeto CIRSAN - Circulação na Baía de Santos e Dispersão de Organismos e Poluentes, envolvido em atividades de coleta e contagem de microalgas marinhas. Em 2011 atuou como bolsista DTI-C vinculado ao Instituto Nacional de Tecnologia no projeto intitulado: Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Tecnologia para a Produção e Uso de Biodiesel Derivados de Óleos de Microalgas. No primeiro semestre de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, conduziu no Laboratório de Processos de Separação (LPS) sua pesquisa voltada para a Obtenção de compostos de alto valor comercial a partir de biomassa microalgal por extração com fluido supercrítico. Participou de eventos, como VIII e IX Fórum da Pós-Graduação da UFRRJ, além do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, com apresentação de pôster e IOUSP e II WCI do INT como palestrante.

## RESUMO

FILÓCOMO, Diego. **Obtenção de compostos de alto valor comercial a partir de biomassa microalgal por extração com fluido supercrítico (EFS). 2015 78p.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Neste estudo, foi avaliado o potencial da técnica de extração com fluido supercrítico para a obtenção de compostos de alto valor comercial (carotenóides e clorofila-a) da biomassa de *Spirulina* spp., bem como o desempenho desta microalga em meios de cultivo de baixo custo, visando à alta produtividade em biomassa e em pigmentos. A extração com fluido supercrítico apresentou uma alta seletividade em relação à obtenção dos pigmentos, principalmente dos carotenóides. Os maiores rendimentos de extração supercrítica para ambos os pigmentos foram observados a 200bar sob a condição isotérmica de 40 °C, tendo sido obtidas concentrações de 13,55  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de clorofila-a e 7,82  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenóides totais no extrato metanólico utilizado do material extraído. A extração de clorofila em relação aos carotenóides, aumentou com o aumento da pressão, indicando a possibilidade de um processo de extração em duas etapas. Nos cultivos, foi observado um ótimo desempenho da microalga cultivada no meio Mod.III(2,5), comparado aos cultivos realizados em meio Zarrouk, onde alcançou, após oito dias, uma concentração em biomassa final de 1,28  $\text{g L}^{-1}$ , concentração de clorofila de 11,51  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e carotenóides de 3,98  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Palavras chave:** compostos de alto valor comercial, *Spirulina* spp., meios de cultivo de baixo custo, extração com fluido supercrítico.



## ABSTRACT

FILÓCOMO, Diego. **Obtaining high-value compounds from microalgal biomass by supercritical fluid extraction (EFS). 2015 78p.** Dissertation (Mater of Science in Chemical Engineering, Chemical Technology). Institute of Technology, Department of Chemistry Engenhara, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

This study evaluated the potential of the extraction technique with supercritical fluid for obtaining high commercial value compounds (carotenoids and chlorophyll-a) biomass of *Spirulina* spp., And the performance of this microalgae in low cost culture medium, aiming at high productivity in biomass and pigments. The supercritical fluid extraction showed high selectivity in relation to the achievement of pigments, particularly the carotenoids. The larger supercritical extraction yields for both pigments were observed at 200bar under isothermal condition of 40 ° C, the concentrations being 13.55 mg L<sup>-1</sup> of chlorophyll-a and 7.82 mg L<sup>-1</sup> of total carotenoid the methanol extract used the extracted material. Chlorophyll extraction with respect to carotenoids increased with the increase in pressure, indicating the possibility of an extraction process in two steps. On crops, it was observed a great performance from the microalgae cultivated in the Mod.III (2.5) medium, compared to cultures performed in the Zarrouk medium, where it reached, after eight days, a concentration in the final biomass of 1,28 g L<sup>-1</sup>, chlorophyll concentration of 11,51 µg mL<sup>-1</sup> and carotenoids 3,98 µg mL<sup>-1</sup>.

**Keywords:** high-value compounds, *Spirulina* spp., low-cost culture medium, supercritical fluid extraction.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

cm: centímetro

g: grama

h: hora

Kg: quilograma

L: litro

m: metro

mg: miligrama

mL: mililitro

nm: nanômetro

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

s: segundo

v: volume

$\mu\text{m}$ : micrômetro

$\mu\text{E}$ : microeisten

$\beta$ : beta

TC: taxa de crescimento

T<sub>c</sub>: Temperatura crítica

P: pressão

T: Temperatura

CB<sub>f</sub> : Concentração em biomassa final

MOD. : MODIFICADO

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 Microalgas .....	2
2.2 O gênero <i>Arthrospira</i> (Spirulina) .....	4
2.3 Fatores relacionados ao cultivo.....	5
2.4 Meio de Cultivo .....	6
2.5 Cultivo de microalgas .....	7
2.6 Pigmentos.....	11
2.6.1 Clorofila .....	11
2.6.2 Carotenoides.....	12
2.7 O fluido supercrítico .....	16
2.8 O Dióxido de carbono como fluido supercrítico .....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Cepas.....	21
3.2 Manutenção e aclimação das cepas.....	21
3.3 Meios de cultivo.....	22
3.3.1 Preparo dos meios de cultivo .....	23
3.4 Sistema de Cultivo .....	26
3.4.1 Modificação de uma Câmara Incubadora.....	26
3.4.2 Dosimetria .....	29
3.5 O cultivo das microalgas.....	30
3.5.1 Os inóculos .....	30
3.5.2 Acompanhamento do crescimento .....	31
3.5.3 Determinação da massa seca e concentração em biomassa .....	32
3.6 Extração e análise dos pigmentos da biomassa produzida nos cultivos .....	32
3.7 Extração com fluido supercrítico .....	33
3.7.1. Unidade de EFS.....	33
3.7.2 Preparo da biomassa para extração com fluido supercrítico .....	35
3.7.3 Caracterização do extrator e preparo do leito.....	36
3.7.4 Experimentos de extração com fluido supercrítico .....	37
3.7.5 Operação da unidade .....	37

3.7.6 Obtenção e análise dos extratos .....	38
3.7.7 Cálculos de rendimento .....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1. Avaliação do crescimento de <i>S. platensis</i> e <i>S. máxima</i> cultivadas nos meios Zarrouk, Mod. I e Mod. II.....	39
4.2. Avaliação do crescimento e produção de carotenoides e clorofila de <i>S. platensis</i> e <i>S. máxima</i> cultivadas nos meios Mod. I e Mod.III. ....	44
4.3. Avaliação do meio Mod. III (2,5) no cultivo de <i>S. platensis</i> em relação aos meios Zarrouk e RM6.....	47
4.4 Perfil de crescimento, peso seco da <i>S. platensis</i> cultivada no meio Mod. III (2,5) para a EFS.....	50
4.5 Extração com fluido supercrítico (EFS) .....	51
5 CONCLUSÕES .....	58
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
Anexos.....	70
Anexo1. Resultados estatísticos referente ao tópico - Avaliação do crescimento e produção de carotenoides e clorofila de <i>S. platensis</i> e <i>S. máxima</i> cultivadas nos meios Mod. I e Mod.III.....	70
Anexo2. Avaliação do meio Mod. III (2,5) no cultivo de <i>S. platensis</i> em relação aos meios Zarrouk, RM6, Mod. I. ....	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mulheres de Kanem produzindo o "dihé" .....	4
Figura 2 - <i>Spirulina platensis</i> vista em microscópio óptico (10X) .....	5
Figura 3 - Sistemas de cultivo aberto tipo Raceway da Earthrise Nutritionals, em Califórnia, E.U.A.....	7
Figura 4 - Sistema de cultivo aberto tipo lagoa no Hutt Lagoon, em Western Austrália.....	8
Figura 5 - Sistema de cultivo fechado tipo fotobiorreator tubular. ....	8
Figura 6 - Sistema de cultivo fechado tipo fotobiorreator planar com iluminação LED .....	9
Figura 7 - Fases de crescimento das microalgas.....	10
Figura 8 - Estrutura química das moléculas de clorofilas a e b.....	12
Figura 9 - Principais carotenos .....	13
Figura 10 - Principais xantofilas.....	14
Figura 11 - Fluxograma dos principais estágios da biossíntese dos carotenoides.....	15
Figura 12 - Diagrama P-T para uma substancia pura. ....	17
Figura 13 - Diagrama P-V de um componente puro .....	18
Figura 14 - Diagrama de fases para o CO <sub>2</sub> . ....	20
Figura 15 - Sistema de iluminação para câmara incubadora. ....	26
Figura 16 - Integração das duas adaptações realizadas na câmara incubadora. ....	27
Figura 17 - Montagem da fonte reguladora de tensão. ....	27
Figura 18 - Fixação do motor ao suporte de vidro para os frascos de cultivo.....	28
Figura 19 - Parte interna da câmara incubadora. A: motor preso à parede da câmara; b: suporte de vidro; c: grade de sustentação; d: linhas de nylon de alta resistência em 4 pontos .....	29
Figura 20 - Placa de vidro subdividida em pequenos retângulos e esquema utilizado para a o posicionamento do dosímetro sobre a placa. ....	30
Figura 21 - Disposição dos inóculos dentro da câmara incubadora. ....	31
Figura 22 - Desenho esquemático da unidade de extração supercrítica do LPS - UFRRJ.....	33
Figura 23 - Modificações na linha de ar comprimido. ....	34
Figura 24 - Modificação do compressor de ar: (A) compressor antigo (1,5cv) e (B) compressor atual (5cv).....	34
Figura 25 - Modificações na linha de extração (A) medidor de fluxo e (B) linha de extração dentro do banho termostático. ....	35
Figura 26 - Modificações na linha de recolha do extrato.(A) válvula de expansão, (B) tubo de nylon, (C) caixa de isopor com sistema de recolha, (D) medidor de fluxo. ....	35
Figura 27 - Fotobiorreator adaptado para produção de biomassa destinada a EFS.....	36
Figura 28 - Biomassa de microalga sendo pesada e microesferas de vidro. ....	37
Figura 29 - Sistema de recolha após 4h de experimento contendo extrato antes (A) e após a lavagem com o solvente (B). ....	38
Figura 30 - Curvas de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> em diferentes meios de cultivo.. ..	40
Figura 31 - Curvas de crescimento da <i>Spirulina maxima</i> em diferentes meios de cultivo.....	41
Figura 32 - Influência dos meios de cultivo na taxa de crescimento e na concentração final em biomassa de <i>S. platensis</i> .....	41

Figura 33 – Influência dos meios de cultivo na taxa de crescimento e na concentração final em biomassa de <i>S. maxima</i> . .....	42
Figura 34 - Dissolução do bicarbonato em água do mar (A), precipitado formado após a reação com os íons metálicos (B). .....	43
Figura 35 - Influência da concentração de Salitre do Chile nos meios de cultivo em relação a taxa de crescimento e a concentração final em biomassa de <i>S. platensis</i> . .....	44
Figura 36 - Influência da concentração de Salitre do Chile nos meios de cultivo em relação a taxa de crescimento e a concentração final em biomassa de <i>S. maxima</i> . .....	45
Figura 37 - Influência da concentração de Salitre do Chile nos meios de cultivo em relação a concentração de pigmentos na biomassa de <i>S. platensis</i> . .....	46
Figura 38 - Influência da concentração de Salitre do Chile nos meios de cultivo em relação a concentração de pigmentos na biomassa de <i>S. maxima</i> . .....	46
Figura 39 - Influência dos meios de cultivo em relação a taxa de crescimento e a concentração final em biomassa de <i>S. platensis</i> . .....	48
Figura 40 - Influência dos meios de cultivo em relação a concentração de pigmentos na biomassa de <i>S. platensis</i> . .....	48
Figura 41 - Avaliação visual da interferência dos micronutrientes .....	49
Figura 42 - Perfil de crescimento de <i>Spirulina platensis</i> cultivada em meio Mod. III (2,5) para a EFS. ....	50
Figura 43 - Rendimento de extração em diferentes pressões e condições isotérmicas de 60°C (□) e 40 °C (■). .....	51
Figura 44 - Efeito da pressão sobre a concentração de carotenoides, 40 °C (■) e 60 °C (●) e clorofila-a, 40 °C(□) e 60 °C (○). .....	52
Figura 45 - Rendimento da extração por composto em relação a massa total dos pigmentos: carotenoides, 40 °C (■) e 60 °C (●) e clorofila-a, 40 °C (□) e 60 °C (○). .....	53
Figura 46 - Imagens em MEV no aumento de 5000X: biomassa de <i>Spirulina platensis</i> produzida em laboratório antes (A) e após os processos de extração com metanol (P.A.) (B) e EFS (C), e biomassa de <i>Spirulina platensis</i> comercial antes (D) e após os processos de extração com metanol (P.A.) (E) e EFS (F). .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação das composições gerais entre alguns alimentos e diferentes biomassas de microalgas (% massa seca). .....	3
Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo Zarrouk, RM6 e variantes.....	22
Tabela 3 - Composição das soluções estoque.....	23
Tabela 4 - Condições utilizadas nas extrações com fluido supercrítico.....	37
Tabela 5 - Custo em reais (R\$) para o preparo de 1L dos meios de cultivo: Zarrouk, RM6 e Mod III (2,5).....	50
Tabela 6 - Comparação da EFS com a extração com metanol, em termos de concentração de pigmentos nos extratos e razão entre as concentrações de carotenóides totais e clorofila-a....	54
Tabela 7 - Comparação entre os rendimentos de EFS obtidos com a biomassa produzida em laboratório e adquirida comercialmente na condição de 200 bar e 40 °C.....	54
Tabela 8 - Comparação entre a EFS (200bar e 40°C) e extração com metanol (P.A.).....	55
Tabela 9 - Comparação entre as principais etapas de cultivo e pós-cultivo aplicadas às biomassas estudadas.....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O uso da biomassa de microalgas como matéria prima em processos químicos industriais tem se tornado cada vez mais frequente. As cianobactérias ou microalgas azuis apresentam altíssimo potencial biotecnológico, podendo ser utilizadas para obtenção de produtos variados, tais como fármacos, marcadores fluorescentes, biopigmentos, enzimas, antioxidantes, exopolissacarídeos usados como gelificantes, emulsificantes, flocculantes e hidratantes, além de diversos nutrientes como minerais, vitaminas, lipídios, proteínas e carboidratos (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A elevada taxa de reprodução e alta eficiência de conversão energética em compostos bioativos, em conjunto com características específicas conferidas a cada espécie, permite o uso destes microorganismos nos mais variados setores da indústria, incluindo aplicações ambientais (SCHMITZ *et al.*, 2012), algumas em especial ganham destaque, como as do gênero *Spirulina*, que por conter altos índices de proteína em sua composição (BELAY, 2002), são comumente utilizadas em dietas alimentares de seres humanos (BELAY, 1993; KENT *et al.*, 2015), e também na composição de ração animal para aves (BASEGGIO, 2001) e peixes (SARKER *et al.*, 2015). Outra característica significativa é que além de produzirem proteínas, aminoácidos essenciais e vitaminas, incluindo a vitamina B<sub>12</sub> (LEI *et al.*, 2012), as cianobactérias deste gênero também são excelentes produtoras de compostos de interesse com alto valor comercial, como ficocianina (KUDDUS *et al.*, 2013; YOSHIDA & TAKAGAKI 1996), ácido  $\gamma$ -linolênico (ômega 6) (KENT *et al.*, 2015) e  $\beta$ -caroteno, estes, assim como outros compostos bioativos conferem a biomassa de microalgas um alto poder nutracêutico (ALI *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2009).

No processo produtivo da biomassa algácea, as condições estabelecidas para o crescimento das células são fundamentais para se obter os melhores rendimentos tanto em biomassa, quanto em pigmentos, assim como outros compostos de interesse comercial. Manipulando estas condições, é possível alterar a quantidade e a qualidade da biomassa, dos compostos e dos pigmentos gerados durante o cultivo (CONVERTI *et al.*, 2009), o que torna a etapa de cultivo extremamente importante para garantir um produto final de qualidade. Para obter sucesso no emprego definitivo da biomassa de microalgas como matéria prima e estabelecer sua produção comercial em alguns setores, é necessário otimizar o processo produtivo como um todo e extrair ao máximo o que cada espécie pode oferecer, agregando assim, valor ao produto final. Neste sentido, a escolha do método de extração mais apropriado a cada microalga é de fundamental importância, a fim de aumentar a eficiência da obtenção dos compostos e garantir a qualidade da biomassa residual após a extração. Solventes como hexano, metanol, etanol e misturas como clorofórmio:metanol são comumente utilizados para extração de compostos de microalgas (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013). Em geral, dependendo do solvente utilizado, mais etapas de separação são necessárias para que se tenha cada composto separado, purificado e livre de solventes residuais. A utilização de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente em processos de extração com fluido supercrítico (EFS), mostra um grande potencial para obtenção de compostos de microalgas (CRAMPON *et al.*, 2011), sendo o CO<sub>2</sub>, o solvente mais indicado em processos deste tipo por apresentar nula toxicidade, ser de fácil obtenção em altos níveis de pureza, não ser inflamável, apresentar inércia química em relação à matéria prima, baixa temperatura crítica (31,06 °C) e moderada pressão crítica (73,4 bar); essas características, tornam favoráveis à sua aplicação principalmente na indústria de alimentos (ARAÚJO, 1997; MENDES *et al.*, 2003; CRAMPON *et al.*, 2011).

As vantagens apresentadas pela extração via CO<sub>2</sub> supercrítico, fazem desta metodologia uma ferramenta estratégica para a obtenção de compostos produzidos por microalgas, de



forma limpa e seletiva (YEN *et al.*, 2014), agregando valor ao processo produtivo e proporcionando o uso da biomassa residual após a extração. Assim, neste trabalho, foi avaliada a extração com fluido supercrítico como processo para obtenção de pigmentos de alto valor comercial (carotenoides e clorofila-a) da microalga *Spirulina*. Além disto, seguindo a estratégia de valorização do uso da biomassa de *Spirulina* para a produção dos pigmentos em questão, a fim de diminuir o custo de produção da biomassa, foram estudados o crescimento da microalga, a produção de biomassa e destes pigmentos, em cultivos realizados com meios modificados pelo uso de compostos de baixo custo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Microalgas

As microalgas, incluindo as cianobactérias, são organismos extremamente flexíveis do ponto de vista evolutivo, podendo ser encontradas tanto em ambientes marinhos como em ambientes de água doce (MOAZAMI *et al.*, 2012), apresentam em sua composição, uma gama variada de pigmentos e se encontram na base da cadeia alimentar, além de serem responsáveis pela maior parte da produção do oxigênio presente na atmosfera e por 50 % da fixação do carbono orgânico mundial (BORGES, 2007; ROSSI *et al.*, 2014; RATHA & PRASANNA, 2012), o que lhes confere um importante papel ecológico. Constituem a parte vegetal do plâncton (fitoplâncton) e podem ser definidas como organismos fotossintetizantes talófitos, portanto, não contém folhas, caule, embriões, sistema vascular e raízes. Suas células podem medir de 2 a 300µm, apresentando-se como estruturas individuais (uma única célula), interligadas (em cadeias alongadas) ou até mesmo formando pequenas colônias.

O termo “microalgas” não apresenta valor taxonômico, uma vez que engloba micro-organismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (DERNER, 2006). Segundo REVIERS (2006), as microalgas estão classificadas em 11 divisões distintas: Cyanophyta, Glaucophyta, Rodophyta, Cryptophyta, Euglenozoa, Cercozoa, Haptophyta, Dinophyta, Ochroophyta, Streptophyta e Chlorophyta. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta. Em termos de abundância podemos citar as principais linhagens de microalgas: *Diatomáceas* (*Bacillariophyta*), com aproximadamente 100.000 espécies, sendo considerada dominante dentre o fitoplâncton oceânico, podendo ser encontrada em ambientes de água doce; *Algas Verdes* (*Chlorophyceae*), representadas por cerca de 17.000 espécies; *Algas azuis* (*Cyanophyta*), com cerca de 2.000 espécies conhecidas por desempenharem papel importante na atmosfera: a fixação de oxigênio, sendo encontradas em diversos ambientes; *Algas Douradas* (*Chrysophyceae*) que possuem cerca de 1.000 espécies, com habitat predominantemente doce, porém encontradas em ambiente marinho (RAVEN *et al.*, 2001).

A composição química das microalgas pode variar de acordo com cada espécie em função das condições nutricionais e ambientais as quais são submetidas durante o seu ciclo de vida, como por exemplo, as fases de crescimento, escassez de nutrientes específicos, regime de luz, temperatura (SHIFRIN; CHISHOLM, 1981; SUKENIK; CARMELI, 1990; ROSSI *et al.*, 2014; TEO *et al.*, 2014). Além da produção natural de compostos bioativos, muitas

espécies de microalgas podem ser induzidas a acumular quantidades consideráveis destes compostos, quando cultivadas pelo homem, como é o caso dos lipídios e também de alguns pigmentos (MATA, *et al.*, 2010). Dentre as espécies utilizadas com esta finalidade destacam-se *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Synechococcus sp.*, *Nostoc ellipsosporum*, *Chlamydomonas nivalis*, *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum* (CHACÓN-LEE & GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010). Através da Tabela 1 podemos comparar a composição bioquímica geral em relação a massa seca, entre algumas espécies de microalgas e alguns alimentos.

Tabela 1 - Comparação das composições gerais entre alguns alimentos e diferentes biomassas de microalgas (% massa seca).

<b>Amostras</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Carboidratos (%)</b>	<b>Lipídios (%)</b>
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Feijão	37	30	20
<i>Anabaena Cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas Rheinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella Vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella Salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium Cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

FONTE: Adaptado de BECKER (1994)

Algumas espécies de microalgas apresentam ótimas características para serem utilizadas como alimento humano e animal (KENT *et al.*, 2015; SARKER *et al.*, 2015). O cultivo e a alimentação a base destes microorganismos já é praticado há séculos. Há relatos, por exemplo, do uso da biomassa de *Spirulina sp.* pelo povo Asteca do Império Tenochtitlan, atual cidade do México, em meados do século XVI (SASSON, 1997). À beira do lago Chade até hoje a *Spirulina sp.* é utilizada como suplemento alimentar por nativos africanos de Kanem, povoado com baixíssimos níveis de desnutrição, apesar da região ser pobre em alimentos com alto teor de proteínas. Eles cultivam a *Spirulina* em lagos alcalinos naturais, coletam e a secam de maneira artesanal, produzindo uma massa base conhecida como “dihé” utilizada no preparo de vários produtos alimentícios (Figura 1) (AHSAN *et al.*, 2008).



Figura 1 - Mulheres de Kanem produzindo o "dihé" (Fonte: [www.algaeindustrymagazine.com](http://www.algaeindustrymagazine.com)).

## 2.2 O gênero *Arthrospira* (*Spirulina*)

A *Spirulina* (Figura 2), também conhecida como *Arthrospira*, faz parte do reino Bactéria, divisão Cianobactéria, da classe Cianofíceas e da família *Oscillatoriaceae*, e tem como espécies de maior relevância *A. platensis* e *A. máxima*. Em geral possuem filamentos helicoidais com comprimento de aproximadamente 200-300  $\mu\text{m}$  e 5-10  $\mu\text{m}$  de largura, que podem variar de formato consideravelmente de acordo com as condições ambientais, podendo chegar até mesmo à forma linear. Apresentam estrutura celular típica das cianobactérias gram-negativa, composta pela membrana citoplasmática e uma parede celular constituída de peptidoglicano, contendo poros, cujo padrão de disposição é utilizado em estudos de sistemática. No gênero *Arthrospira* esses poros têm diâmetro de 15 nm, e são arranjados em uma fileira próxima às paredes transversas (PALINSKA; KRUMBEIN, 2000).

Este gênero, por apresentar alta tolerância para pH alcalino, na natureza é encontrado principalmente em lagos alcalinos e salobros como espécie dominante, já que a maioria dos micro-organismos não suportam as mesmas condições. Desta forma, ao se trabalhar em sistemas de cultivo artificiais, a chance de contaminação por outros organismos é menor favorecendo o cultivo em larga escala (CHRONAKIS *et al.*, 2000; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

As microalgas deste gênero são consideradas uma excelente fonte proteica por possuírem de 60 a 70% de proteínas em relação a sua massa seca (NIU *et al.*, 2007). Além disto, é uma das fontes naturais mais ricas em vitamina B12, e contém uma gama natural de biopigmentos, com altíssimos poderes funcionais (PINERO ESTRADA *et al.*, 2001) como por exemplo clorofila-a constituindo 1,15% de sua biomassa (DANESI *et al.*, 2004), ficocianina constituindo até 20% do peso seco da proteína celular (SILVEIRA *et al.*, 2007) e  $\beta$ -caroteno que, dos carotenos totais, representa cerca de 80% (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

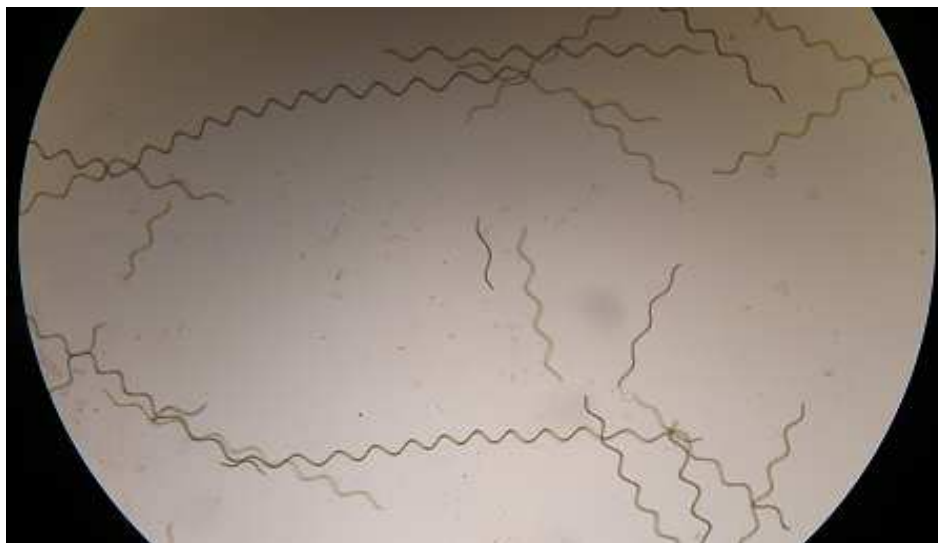


Figura 2 - *Spirulina platensis* vista em microscópio óptico (10X). Fonte: O autor (2014)

### 2.3 Fatores relacionados ao cultivo

Por serem fotoautotróficos, o crescimento e a produção de biocompostos por parte destes organismos são altamente influenciadas pelos mesmos fatores que afetam diretamente o processo fotossintético como: temperatura, intensidade luminosa, agitação, nutrientes e pH (MIAO e WU, 2004). As diferentes combinações possíveis entre estes fatores bem como a intensidade como que eles são aplicados no processo de cultivo das microalgas, podem gerar diferentes respostas de crescimento e produção de compostos de interesse comercial, fazendo do controle destas variáveis uma importante ferramenta para elaboração das diferentes estratégias de cultivo, que visam o aumento da produtividade em biomassa e de compostos de interesse comercial (DUARTE, 2001).

A temperatura pode influenciar significativamente na composição química e no crescimento das microalgas. Oliveira e colaboradores (1999) afirmam que a faixa ótima de temperatura para o desenvolvimento dessa microalga é de 30 a 35 °C, e que a biomassa cultivada a 35°C apresentou redução no conteúdo de proteínas. Santos; de Macedo; Alegre (2003) também avaliaram o efeito da temperatura na composição da biomassa produzida a 35 °C e notaram na biomassa a redução de 28,84 % no teor de proteínas, porém acompanhado de um aumento de 30,34 % no teor de carboidratos e de 287,90 % nos lipídios totais, associando-se a utilização de 0,2 g.L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>. Quando cultivada sob a temperatura de 25°C, os autores relatam a redução de 40,28% no teor de proteínas, aumento de 88,90% no teor de carboidratos e 321,25% no teor de lipídios totais.

A disponibilidade de luz esta diretamente ligada com o crescimento das células de microalgas e conseqüentemente com a produtividade tanto em biomassa quanto dos compostos por elas produzidos (LACAZ-RUIZ, 1996). A energia luminosa induz a atividade enzimática, tendo influencia sobre a síntese de proteínas (RUYTERS, 1984; UMINO, SATOH e SHIRAIWA, 1991).

A produção de alguns pigmentos pelas microalgas pode variar em função da quantidade de luz disponível durante seu crescimento, como é o caso da clorofila que se apresenta em menor quantidade na biomassa gerada em condições de luminosidade menos

intensas (KEBEDE e AHLGREN, 1996) e dos carotenoides, que em condições de alta incidência luminosa atuam como protetores das células, captando a energia luminosa e realizando sua transferência para as moléculas de clorofila (OLAIZOLA e DUERR, 1990). O excesso de luz no processo de fotossíntese pode provocar o efeito conhecido como foto-oxidação, onde na presença do oxigênio, ocorre à formação do peróxido de hidrogênio, substância letal para as células de microalgas (HIRAYAMA, UEDA e SUGATA, 1996).

A agitação é de extrema importância para garantir a troca gasosa dentro dos sistemas de cultivos, evitar a deposição de células no fundo, aumentar a disponibilidade de luz e aumentar a chance de contato entre as células e os nutrientes presentes no meio de cultura (BECKER e VENKATARMAN, 1984; RICHMOND et al., 1993). O pH do meio também é importante, e pode variar de neutro a alcalino dependendo da espécie de microalga cultivada (RAVEN, 1990).

## 2.4 Meio de Cultivo

Meio de cultivo é o ambiente específico, onde são encontrados os nutrientes e as condições necessárias para o desenvolvimento das microalgas. No processo de fotossíntese, as microalgas necessitam da luz, temperatura ideal e quantidades específicas de nutrientes essenciais que variam de espécie para espécie, o que inclui macronutrientes como C, N, P, S, K, Fe (e Si, para o caso das diatomáceas), e micronutrientes como Co, Mo e Mn, e vitaminas, como a cianocobalamina e tiamina, para produzirem biomassa e multiplicarem-se (CHOI & LEE, 2014). Existem dois principais tipos de meios de cultivos para microalgas, que podem variar de acordo com o objetivo e espécie em foco no estudo. Os principais meios de cultura podem, portanto, ser divididos em: definidos e semidefinidos (LOURENÇO, 2006).

O meio definido é caracterizado a partir do preparo utilizando água de elevada pureza, onde são adicionados nutrientes em concentrações conhecidas a fim de estimular o crescimento das células. Esse tipo de meio é normalmente utilizado para estudos específicos onde é necessário conhecer a composição exata dos nutrientes, para compreender o comportamento das microalgas durante o cultivo, resultante desta composição. Geralmente por se tratar de uma grande quantidade de nutrientes utilizadas para enriquecimento, torna-se um meio de alto custo (LOURENÇO, 2006).

Já o meio semidefinido é aquele que tem como base a água coletada em corpos hídricos naturais, como por exemplo, a água do mar, que por sua vez é enriquecida com alguns nutrientes de composição conhecida. O meio é dito semidefinido, pois as concentrações adicionadas são conhecidas, porém não se conhece com exatidão a composição da água do mar que está sendo utilizada. Uma vez que a quantidade de nutrientes adicionada é muito maior que da composição da água do mar, assume-se que as concentrações finais do meio correspondem àquelas dos componentes adicionados. Em relação a seu custo, é relativamente baixo, possuindo diversas aplicações como em manutenção de cultivos em laboratório, pesquisas, além do uso na produção de biomassa para fins comerciais (LOURENÇO, 2006).

No caso da *Spirulina*, o meio ideal é encontrado em águas salobras. Porém, em alguns casos, a quantidade de nutrientes presentes na água coletada para o cultivo em corpos hídricos naturais, não é o suficiente para um crescimento expressivo da microalga, sendo necessário

seu enriquecimento com quantidades maiores e conhecidas de nutrientes, que pode variar de espécie para espécie (LOURENÇO, 2006).

## 2.5 Cultivo de microalgas

A produção de microalgas pode ser realizada em sistemas de cultivo de diferentes geometrias e volumes, que são divididos em duas categorias principais: os sistemas abertos e os sistemas fechados. Dentre os sistemas abertos mais utilizados podemos citar os tanques do tipo pista (Raceway Ponds) (Figura 3) e os sistemas em formato de lagoas (Figura 4). Os sistemas fechados, também conhecidos por fotobiorreatores, possuem uma maior variedade de formatos (HANDLER et al., 2012), podendo ser de formato tubular (Figura 5), planar (Figura 6), dentre outros.



Figura 3 - Sistemas de cultivo aberto tipo Raceway da Earthrise Nutritionals, em Califórnia, E.U.A. (MOSTAFA 2012).



Figura 4 - Sistema de cultivo aberto tipo lagoa no Hutt Lagoon, em Western Austrália.



Figura 5 - Sistema de cultivo fechado tipo fotobiorreator tubular. fonte: <http://www.brasilecola.com/quimica/biodiesel-algas.html>.

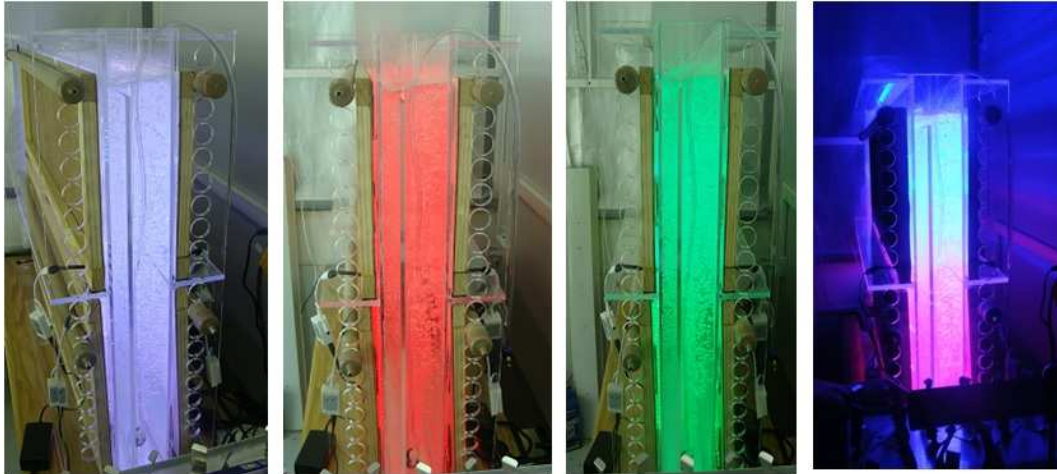


Figura 6 - Sistema de cultivo fechado tipo fotobiorreator planar com iluminação LED. Fonte: o autor .

Os sistemas abertos são mais utilizados em cultivos em escala comercial por apresentarem menores custos de implementação, operação e manutenção. Entretanto apresentam desvantagens como maior taxa de evaporação, maior exposição do cultivo a intempéries, o que dificulta o controle dos parâmetros de cultivo e aumenta o risco de contaminações por outros microorganismos (UGWU *et al.*, 2008, SINGH & SHARMA, 2012). Já os sistemas fechados, em geral apresentam custos de implementação, operação e manutenção mais elevados, porém podem ser projetados e otimizados de maneira a atingir maiores taxas de produção, bem como garantir a geração de compostos específicos pelas microalgas, uma vez que através deste tipo de sistema, é possível ter um maior controle dos parâmetros de cultivo como temperatura, luminosidade e pH, além da redução do risco de contaminações. (SIERRA *et al.*, 2008; SINGH & SHARMA, 2012; GROSS *et al.*, 2013).

Em comparação ao cultivo de vegetais superiores o cultivo de microalgas apresenta inúmeras vantagens como: maior produtividade do que qualquer outro sistema agrícola, maior eficiência de conversão energética em compostos bioativos (PLAVŠIĆ *et al.*, 2002, PULZ & GROSS, 2004; NUNNERY *et al.*, 2010), menor área requerida para o cultivo, dentre outras que fazem destes organismos uma matéria prima promissora para os mais variados setores da indústria, ganhando destaque, principalmente nas indústrias de alimentos e fármacos devido à produção de compostos de interesse e alto valor comercial (BECKER, 1994; PULZ & GROSS, 2004; RICHIMOND, 2004; RICHA *et al.*, 2011).

As microalgas são capazes de realizar diferentes formas de metabolismo, podendo ser organismos autotróficos, heterotróficos ou mixotróficos, realizando mudanças metabólicas em função das condições ambientais as quais são submetidas durante o cultivo (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Ao realizarem o metabolismo de forma autotrófica, as células captam a energia da luz e o carbono do CO<sub>2</sub> presente na atmosfera, produzindo através da fotossíntese biomoléculas como: proteínas, polissacarídeos, lipídios, e ácidos nucleicos. No metabolismo heterotrófico a principal fonte de energia é obtida através de compostos orgânicos. Já no mixotrófico, as células se utilizam da energia luminosa além da fonte de carbono oriunda de compostos orgânicos e inorgânicos (JIANG *et al.*, 2011).



Em geral, sob condições climáticas adequadas e nutrientes suficientes, as microalgas apresentam excelente crescimento, comumente dobrando sua biomassa em um período de 24h e até mesmo dentro de 3,5h durante a fase de crescimento exponencial (CHISTI, 2007).

As fases de crescimento são caracterizadas como: fase de adaptação, fase exponencial, fase linear, fase estacionária, e fase de declínio ou morte, como ilustradas na Figura 7.

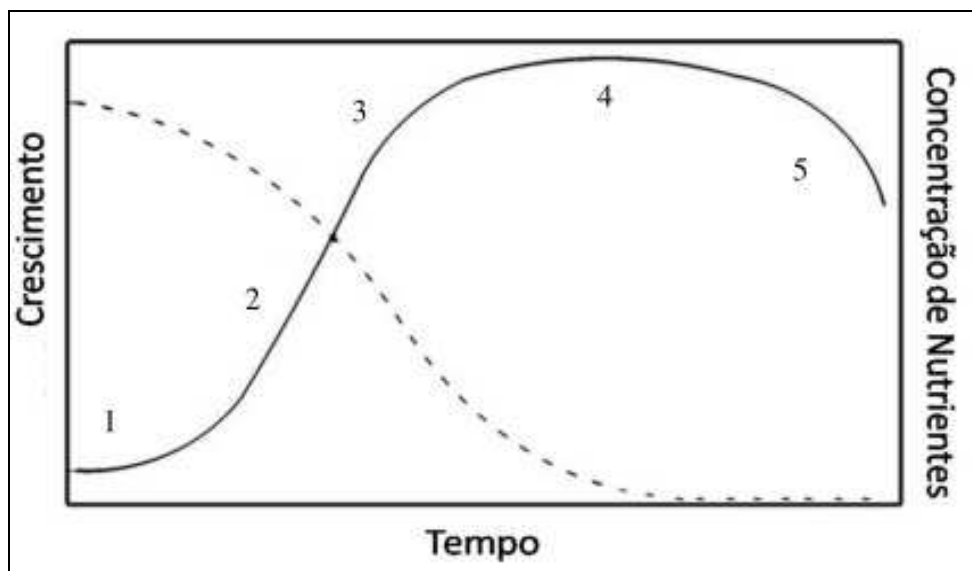


Figura 7 - Fases de crescimento das microalgas. Fonte: (MATA et al., 2010).

De acordo com DERNER (2006) as fases do crescimento são definidas da seguinte forma: “(1) *Fase de Indução ou Fase Lag*: ocorre logo após a repicagem, não existe um incremento na população devido à adaptação das células algais às novas condições de cultivo, podendo inclusive ocorrer uma redução na densidade celular; (2) *Fase Exponencial ou Fase Log*: é a fase de crescimento na qual a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos regulares de tempo, ou seja, a cultura apresenta uma elevada e constante (logarítmica) velocidade (taxa) de crescimento; (3) *Fase de Diminuição do Crescimento Relativo*: o tempo requerido para a duplicação celular aumenta, reduzindo assim a taxa de crescimento. Isto é consequência da diminuição na quantidade de nutrientes disponíveis no meio (os quais foram assimilados pelas microalgas) e, principalmente, da redução da atividade fotossintética devido ao incremento da densidade microalgal, sendo que desta forma, a quantidade de energia luminosa por célula torna-se bastante reduzida (autossombreamento); (4) *Fase Estacionária*: nesta fase não há incremento líquido da população (a densidade celular permanece constante), a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade, podendo existir alta contaminação; (5) *Fase de Morte da Cultura*: é resultado da depleção de nutrientes e do autossombreamento a um nível que não suporta o crescimento, bem como da possível ocorrência de um nível tóxico de metabólitos presentes na cultura”.

Apesar das microalgas serem consideradas uma matéria prima promissora com utilidade em diversos setores industriais, seu cultivo para algumas finalidades ainda apresenta gargalos de produção, como é o caso do processo de separação das microalgas do meio de cultura, que pode ser realizada de várias maneiras como: centrifugação, floculação, sedimentação, filtração, eletroflotação, com o auxílio de biofloculantes e etc (NURRA *et al.*,

2014; TEIXEIRA *et al.*, 2012; MATA, *et al.*, 2010), é uma das etapas de maior gasto energético representando cerca de 20 -30 % dos custos totais da produção (PRAGYA *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2012), ou até mesmo na competição por preço no mercado como é o caso da produção da *Spirulina* para servir como suplementos em rações, cujo o custo médio é de US\$ 8-15 por kg de massa seca, e quando comparado, por exemplo, com farinha de peixe e soja, que apresentam em média um custo de produção de US\$ 1 por kg, seu custo de produção torna-se relativamente alto, o que mostra o quanto a otimização do processo de produção em escala industrial se faz necessária (JIMENEZ, COSSIO e NIELL, 2003; LEE, 2001).

## 2.6 Pigmentos

As microalgas são ricas em pigmentos como clorofila (0,5% a 1% da massa seca em média), carotenoides (0,1% a 0,2% da massa seca em média) e ficobiliproteínas. Estas moléculas tem uma ampla aplicação comercial (BROWN *et al.* 1999; BOROWITZKA, 1988), podendo ser utilizadas principalmente na fabricação de fármacos e nutracêuticos, como insumo para a produção alimentos (animal e humano) e até mesmo na indústria de cosméticos. O principal microrganismo usado na produção comercial de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) é a microalga. *Spirulina* ou *Arthrospira*, cianobactéria azul-verde. O potencial primário dessas moléculas é para a produção de corantes naturais, mas o crescente número de investigações tem mostrado suas propriedades farmacológicas e nutracêuticas (ALI *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2009). Estes pigmentos no mercado podem atingir preços que variam de US\$ 3 - US\$ 25/mg para o pigmento bruto, a US\$ 1500/mg para o pigmento purificado (SPOLAORE *et al.*, 2006).

### 2.6.1 Clorofila

As clorofilas localizam-se nos cloroplastos, e são fundamentais no processo da fotossíntese, onde ocorrem as duas reações importantes: a fotoquímica, nas membranas dos tilacóides e a bioquímica, no estroma do cloroplasto. Tais organelas, além das clorofilas, contêm outros pigmentos chamados acessórios, como os carotenóides (carotenos e xantofilas). As ligações entre as moléculas de clorofilas são muito frágeis (não-covalentes), rompendo-se com facilidade ao macerar o tecido em solventes orgânicos. O caráter hidrofílico/hidrofóbico de uma substância influi diretamente na escolha do melhor solvente para a sua extração. As cianobactérias como a *Spirulina* são só possuem em sua composição bioquímica a clorofila a representada na (Figura 8) A clorofila-a apesar de ser empregada principalmente para a produção de corantes naturais em substituição ao corante verde sintético pode ser utilizada em várias composições farmacêuticas, como cosméticos, materiais de higiene bucal, em dietas, culinária e até mesmo em alguns detergentes (MA & DOLPHIN, 1999).

As clorofilas *a* e *b* (Figura 8) quase sempre são encontradas em conjunto, sendo a clorofila *a* mais abundante na maioria dos casos. Particularmente nas algas do gênero *Spirulina*, apenas a clorofila *a* se faz presente, com rendimento de até 2% do seu peso seco (MA & DOLPHIN, 1999; CHRONAKIS *et al.*, 2000). A fórmula molecular da clorofila *a* é dada por  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$  e se difere da clorofila *b* pela presença de um grupo funcional aldeído ao invés de um grupo metila ligado ao átomo de carbono 7 (Figura 8).

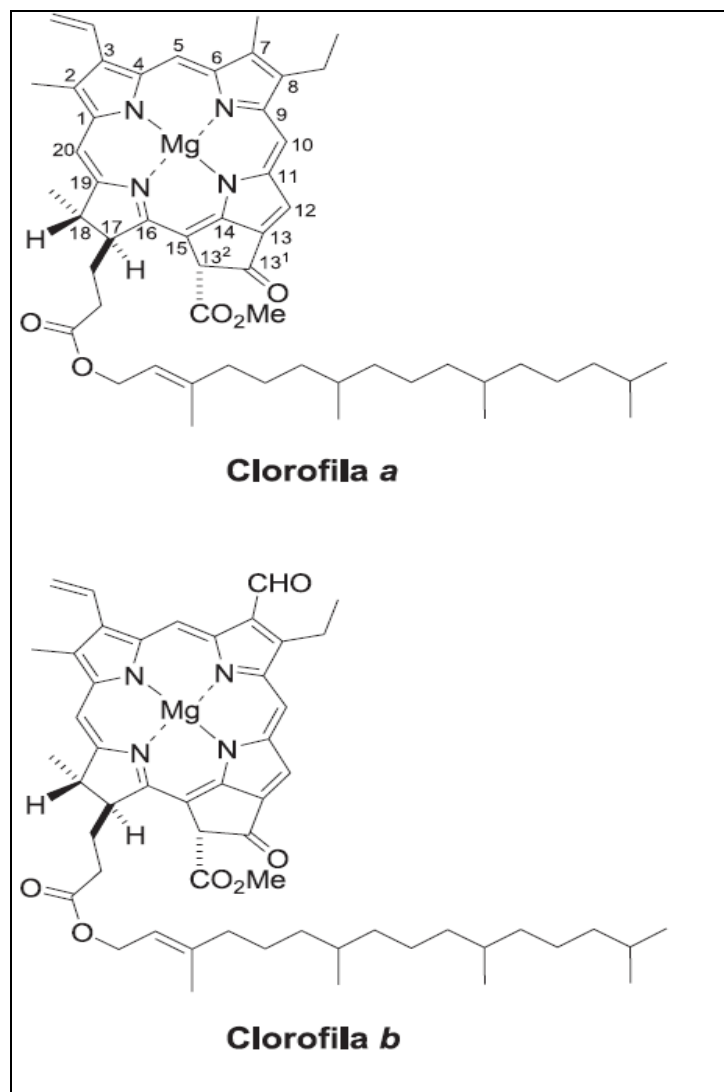


Figura 8 - Estrutura química das moléculas de clorofilas a e b  
 Fonte: (MAESTRIN et al., 2009).

### 2.6.2 Carotenoides

Os carotenoides estão amplamente distribuídos na natureza, e podem ser encontrados em insetos, animais, plantas, micro-organismos como, por exemplo, no conteúdo intra celular de diversas espécies de microalgas (UENOJO *et al.*, 2007; RIBEIRO, 2008; TATSCH, 2008). Foram identificadas mais de 600 variantes estruturais. São formados por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, que compõem uma estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos (C<sub>40</sub>) linear e simétrica, com ordem invertida na porção central. Podem ser subdivididas em 2 classes: carotenos (hidrocarbonetos poliinsaturados) e xantofilas (derivados oxigenados dos carotenos) (FONTANA *et al.*, 2000; VALDUGA, 2005; DUFOSSÉ *et al.*, 2005; UENOJO *et al.*, 2007). No grupo dos carotenos são exemplos:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno, licopeno, fitoflueno, dentre outros (Figura 9). No das xantofilas:  $\beta$ -criptoxantina, luteína, astaxantina, zeaxantina, violaxantina, capsantina e bixina (Figura 10) (RIBEIRO, 2008).

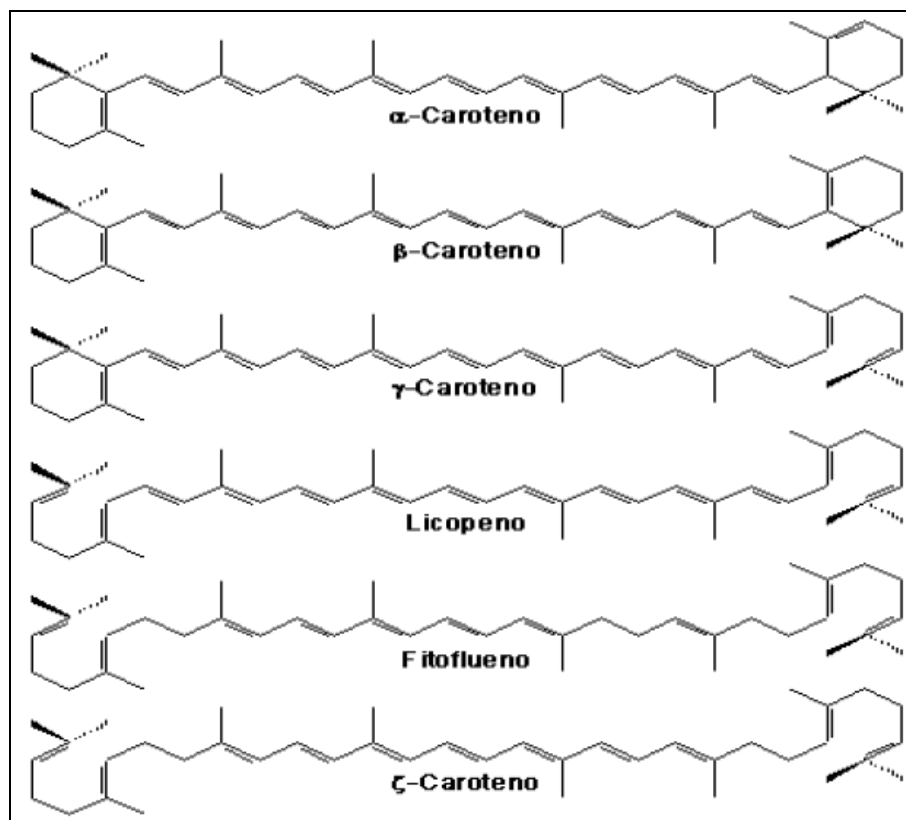


Figura 9 - Principais carotenos Fonte: RIBEIRO (2008).

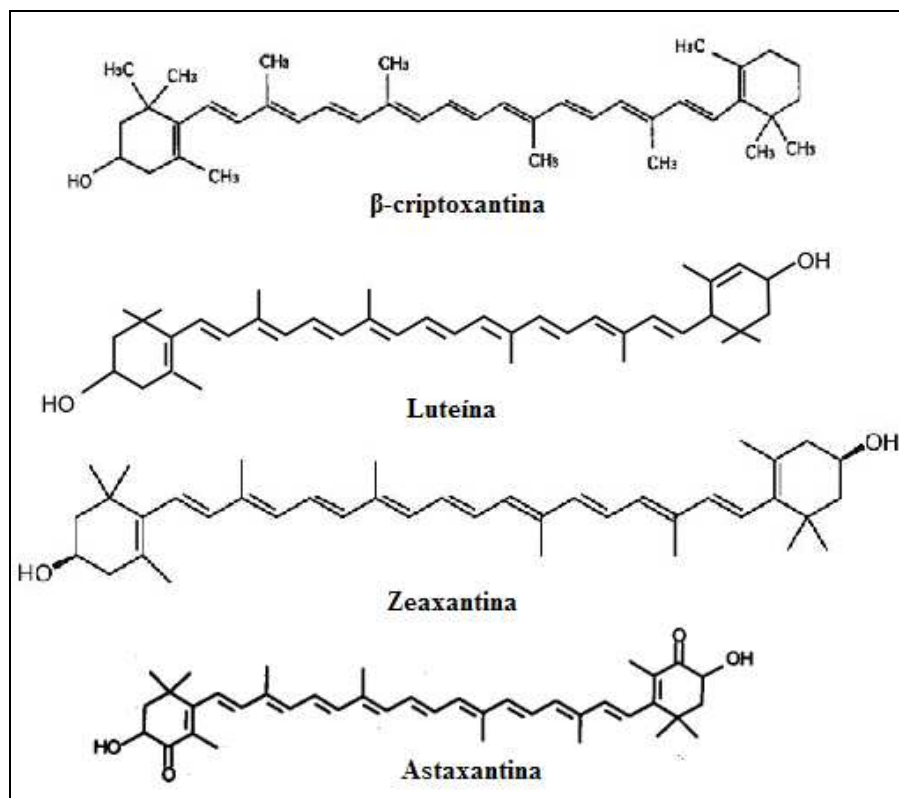


Figura 10 - Principais xantofilas. Fonte: RIBEIRO (2008).

A rota de biossíntese dos carotenoides pode ser dividida em cinco etapas: estágio inicial, formação de fitoeno, desaturação, ciclização e formação das xantofilas, conforme apresentado na Figura 11.

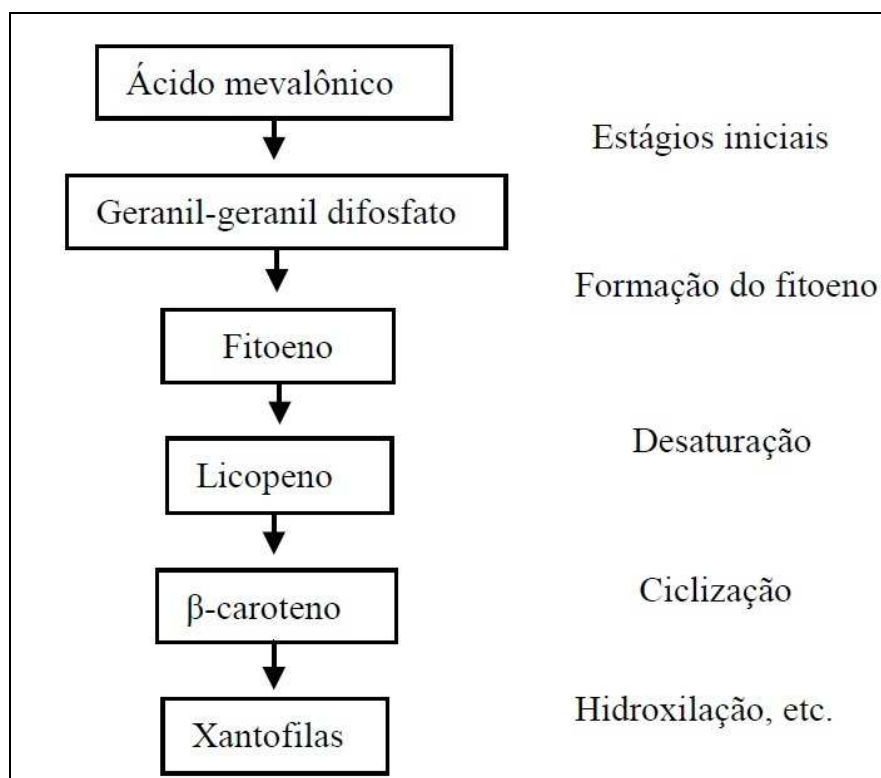


Figura 11 - Fluxograma dos principais estágios da biossíntese dos carotenoides.  
Fonte: Silva (2004)

O ácido mevalônico é o primeiro precursor específico da biossíntese dos terpenóides e é convertido em isopentil difosfato, que após sofrer isomeração forma o dimetil difosfato que servirá de base para o alongamento das cadeias. Após sucessivas adições de moléculas de isopentil difosfato, ocorre a formação do geranyl difosfato (dez carbonos), farnesil difosfato (quinze carbonos) e geranyl-geranyl difosfato (vinte carbonos). A reação de dimerização de duas moléculas de geranyl-geranyl difosfato, levam a formação do fitoeno (primeiro composto de quarenta carbonos) e consecutivamente uma série de desaturações para a formação do fitoflueno, zetacaroteno, neurosporeno e por fim, o licopeno. Tanto o neurosporeno quanto o licopeno podem iniciar a ciclização. O neurosporeno ao sofrer a ciclização em uma de suas extremidades, forma o anel  $\beta$  do  $\beta$ -zeacaroteno ou o anel  $\alpha$  do  $\alpha$ -zeacaroteno, que após a introdução de uma dupla ligação transforma estes dois carotenos em  $\gamma$ -caroteno e  $\delta$ -caroteno respectivamente. O licopeno ao ser ciclizado em uma de suas extremidades gera o  $\gamma$ -caroteno e  $\delta$ -caroteno que ao serem ciclizados na outra extremidade resultam na formação das moléculas de  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno (bicíclicos) respectivamente. Após a formação dos carotenoides cíclicos com a introdução das hidroxilas, ocorre a formação das xantofilas a partir das moléculas de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno (SILVA, 2004).

Industrialmente, os carotenoides são obtidos por síntese química ou pela extração a partir de plantas ou algas, embora existam vários micro-organismos capazes de sintetizá-los (VALDUGA *et al.*, 2009). Dentre os carotenoides pró-vitaminicos o  $\beta$ -caroteno ganha destaque por ser precursor de duas moléculas da vitamina A (RIBEIRO, 2008), vitamina esta, essencial para o corpo humano, que em falta pode acarretar problemas de visão (UENOJO *et al.*, 2007) e mutação celular (ANTUNES & ARAÚJO, 2000). Nas algas, o  $\beta$ -caroteno é o

pigmento predominante em relação aos outros carotenoides. Algumas espécies são capazes de produzir cerca de 400 mg de  $\beta$ -caroteno por dia (RIBEIRO, 2008).

No setor alimentício os corantes são freqüentemente utilizados para conferir, intensificar, restaurar ou alterar a coloração de alimentos e bebidas, com o intuito de conferir aos produtos industrializados uma aparência natural, ou apenas, torná-los mais atrativos (CONSTANT, STRINGHETA & SANDI, 2002; ANVISA, 2009). Entretanto, o uso intensivo destes aditivos em alimentos e bebidas, podem estar diretamente ligados à problemas de saúde humana (KAPOOR *et al.*, 2001), principalmente, porque a maior parte dos corantes utilizados nas indústrias alimentícias são de origem sintética, e dependendo da concentração ingerida, podem ocasionar vários efeitos colaterais, como reações alérgicas, ação mutagênica e carcinogênica, anemias, mortalidade de fetos entre outros (ANTUNES & ARAÚJO, 2000; LEE *et al.*, 2001; ALMEIDA, 2005; CARVALHO, 2005; VERÍSSIMO *et al.*, 2008).

O uso de pigmentos naturais torna-se uma alternativa em potencial para a substituição dos corantes sintéticos. A produção industrial destes compostos, tem movimentado mais de 1 bilhão de dólares por ano (GUZMAN, 2005; RIBEIRO, 2008). Este mercado é ainda impulsionado pela piscicultura que utiliza os carotenoides na composição de rações (MEYERS, 1994; MALDONADE, 2003). O mercado mundial de carotenoides cresce cerca de 3,1% ao ano, com previsão de chegar a 1,4 bilhões de dólares em 2018, sendo que o  $\beta$ -caroteno ficará responsável por cerca de 334 milhões de dólares do faturamento mundial em 2018. Estima-se que o mercado de ingredientes nutracêuticos crescerá de 23,8 bilhões em 2013 para 33,6 bilhões dólares em 2018, numa taxa estimada de crescimento anual composta de 7,2% de 2013 a 2018 (MARKETS AND MARKETS, 2014).

## 2.7 O fluido supercrítico

Podemos considerar um fluido supercrítico como qualquer substância submetida a uma temperatura e pressão acima de seu ponto crítico. Acima deste ponto não existe equilíbrio líquido-vapor. No gráfico (Figura 12) o diagrama P-T, representa o comportamento de fases de uma substância pura, são mostrados a temperatura e a pressão crítica,  $T_c$  e  $P_c$ , respectivamente assim como a região representativa na qual se encontra o fluido no estado supercrítico.

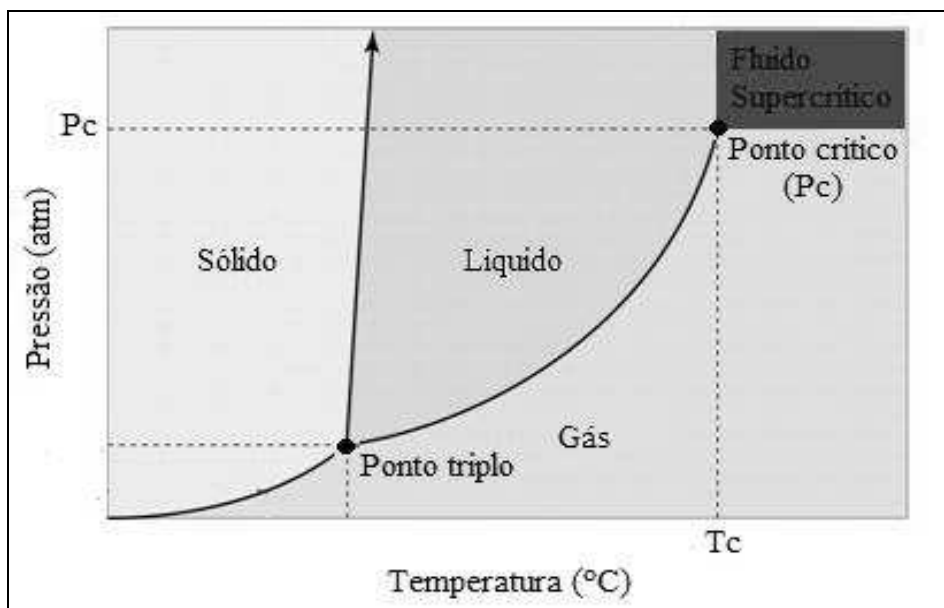


Figura 12 - Diagrama P-T para uma substância pura. Fonte: Adaptado de <http://www.freewebs.com/ultrachemistry/diagrama%20fase%20CO2.gif>.

O Gráfico mostra as curvas que representam a temperatura e pressão onde duas fases coexistem em equilíbrio (no ponto triplo, as três fases coexistem). A curva de coexistência entre gás-líquido é definida como curva de vaporização. Quando a temperatura e a pressão ao longo da curva de vaporização são aumentadas, a densidade da substância no estado líquido diminui devido à expansão térmica e no estado gasoso a densidade aumenta em função do aumento da pressão. Eventualmente, as densidades das duas fases convergem e tornam-se idênticas, a distinção entre o gás e o líquido desaparece, e a curva de vaporização chega ao final no ponto crítico. Uma das principais propriedades do fluido supercrítico é a de apresentar características intermediárias entre líquido e gás. Nas regiões próximas ao ponto crítico o fluido tem densidade e difusividade similar à do líquido, porém viscosidade comparável à dos gases.



A temperatura crítica ( $T_c$ ) é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica ( $P_c$ ) é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido. O ponto crítico representa a maior temperatura e pressão em que a substância pode existir como vapor e líquido em equilíbrio. A área em torno do ponto crítico de um componente ou de uma mistura, pode ser chamada de “região crítica”, abrangendo tanto condições sub quanto supercríticas onde pequenas alterações de pressão e temperatura, promovem maiores variações na densidade do fluido supercrítico e por consequência alteram seu poder como solvente (BRUNNER, 1994).

Os fluidos supercríticos apresentam características atrativas para processos de extração. Nas proximidades do ponto crítico, substâncias no estado gasoso em condições normais, apresentam densidades próximas às dos líquidos e sua capacidade de solvatação muito elevada, uma vez que a mesma é dependente da pressão (McHUGH; KRUKONIS, 1994). Além disso, os fluidos no estado supercrítico apresentam propriedades de transporte, como difusividade e viscosidade, com valores intermediários entre as dos gases e dos fluidos. (VASCONCELLOS, 2007) o que garante ao fluidos supercríticos um bom poder de solvatação e uma alta difusividade (BRUNNER, 2005).

Mesmo não estando no estado supercrítico, substâncias em condições de estado próximas a essa região podem apresentar propriedades semelhantes àquelas dos fluidos supercríticos. Nesse caso, considera-se o estado como subcrítico. Esse fato pode ser observado através da visualização de um esquema do gráfico de pressão em função do volume específico de um composto puro como mostrado no gráfico (Figura 13) (VASCONCELLOS, 2007).

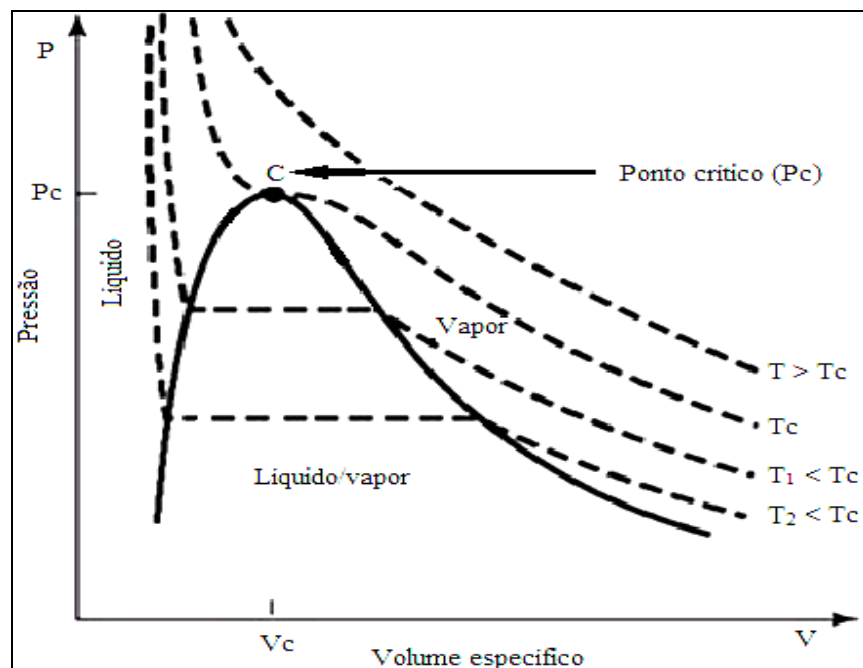


Figura 13 - Diagrama P-V de um componente puro. Fonte: Adaptado de <http://www.proenergia.com/id82.html>.

No gráfico da Figura 13, podemos observar que para uma dada temperatura T1 (menor que a temperatura crítica), há uma variação do volume específico da substância em relação à mudança de fase, já na isoterma que representa a temperatura crítica Tc como não há região de equilíbrio entre as fases, líquida e vapor, não são verificadas variações bruscas nas propriedades do fluido (VASCONCELLOS, 2007).

## **2.8 O Dióxido de carbono como fluido supercrítico**

Para que um solvente possa ser utilizado em processos extração como fluido supercrítico, além de possuir um alto poder de solvatação, ser inerte em relação a matéria prima, facilmente separado das moléculas de interesse, relativamente barato e de fácil obtenção, além de apresentar baixas pressão e temperatura crítica por razões que envolvem desde a eficiência energética do processo até a preservação dos compostos a serem extraídos. O uso do dióxido de carbono como solvente no processo de extração supercrítica, além de apresentar estes requisitos pode ser comumente empregado na indústria de alimentos, aromas e fármacos por não ser tóxico, carcinogênico e inflamável. (BRUNNER, 1994). O dióxido de carbono tem sido utilizado em processos de extração de vários produtos de alto valor e estudado como um importante substituto para o hexano, o qual é altamente tóxico e inflamável, ocasionando danos ao meio ambiente quando liberado na atmosfera (SANTOS; BOSS; MACIEL, 2000). O dióxido de carbono possui seu ponto crítico a 31,06 °C e 73,4 bar (Figura 14), valores considerados relativamente baixos quando comparado a ao ponto crítico de outras substâncias, por exemplo, da água que ocorre a 374,2 °C e 220,5 bar, (McHUGH; KRUKONIS, 1994).

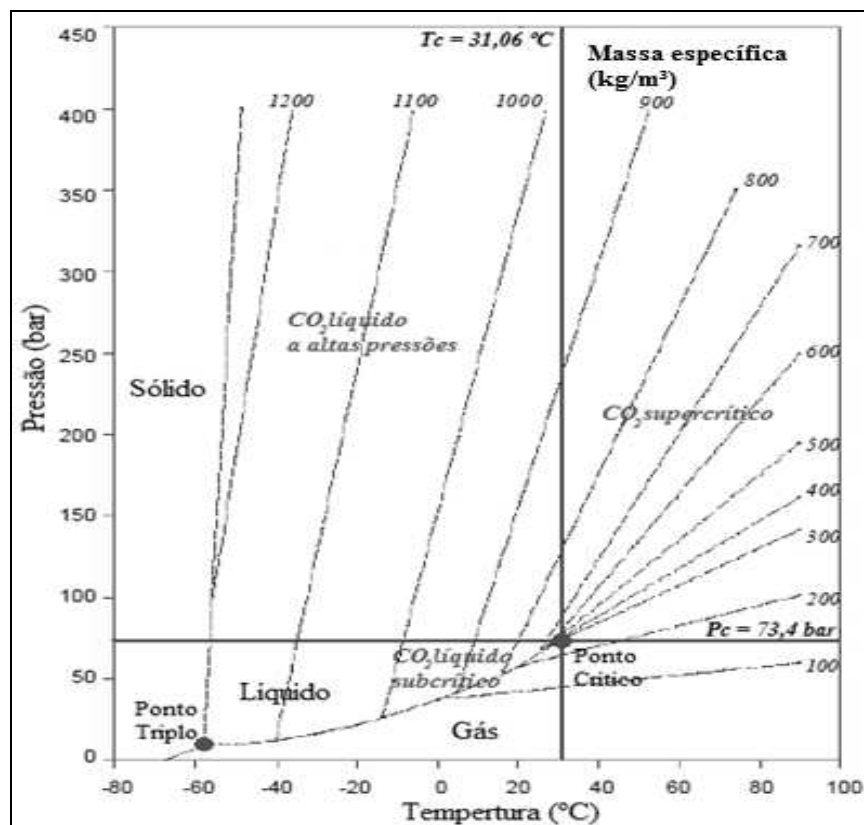


Figura 14 - Diagrama de fases para o CO<sub>2</sub>. Fonte: Adaptado de BROGLE, 1982.

Essa característica termodinâmica bem como suas características químicas possibilita a utilização do CO<sub>2</sub> como solvente de extração em processos industriais, uma vez que os compostos de interesse não são necessariamente expostos a altas temperaturas, que por sua vez podem induzir alterações na composição química do produto final; além disso, devido à sua baixa pressão crítica, as pressões utilizadas no processo de extração não necessariamente altas, reduzindo assim os custos de investimento e conseqüentemente os custos de operação.

As propriedades físico químicas do dióxido de carbono são atrativas especialmente quando se trata da extração supercrítica de compostos derivados de materiais biológicos (McHUGH; KRUKONIS, 1994); vários estudos vêm sendo realizados com o uso desta técnica e solvente, para obtenção de compostos de microalgas (CRAMPON *et al.*, 2011). Canela e colaboradores 2002, avaliaram a extração de ácidos graxos e carotenoides da biomassa de *Spirulina* via dióxido de carbono em condições supercríticas, sob pressões variando de 15 a 180bar e temperaturas de 20 a 70°C, observando que os extratos obtidos apresentaram-se ricos em carotenoides e ácidos graxos essenciais, exceto para a condição de 100bar e 45°C, que não foi identificada a presença de carotenoides. Segundo Gouveia e colaboradores 2007, é possível a extração de pigmentos e óleos funcionais da biomassa de *C.vulgaris* fazendo uso do método de extração com fluido supercrítico, os autores concluem que a não utilização de solventes orgânicos torna este tipo de extração interessante para a indústria de alimentos, principalmente alimentos de origem marinha. Atualmente a empresa Algatech®, cultiva microalgas em meio ao deserto em Israel e já faz uso da extração supercrítica para a produção de astaxantina em escala comercial, o que mostra que o uso desta técnica de extração para obtenção de compostos de alto valor comercial, como é o caso deste

carotenóide, pode justificar os custos de implementação e manutenção para este tipo de processo de extração que ainda são elevados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os cultivos, as extrações convencionais e as análises dos pigmentos das microalgas foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), para o tratamento estatístico utilizou-se a técnica de análise de variância não paramétrica e o teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn ( $P < 0,05$ ) através do programa Bioestat versão 5.0. As extrações via fluido supercrítico foram realizados no Laboratório de Processos de Separação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

#### 3.1 Cepas

As cepas de *Spirulina máxima* e *Spirulina platensis* utilizadas nesses estudos, foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Sérgio Lourenço da Universidade Federal Fluminense (UFF).

#### 3.2 Manutenção e aclimação das cepas

As cepas foram mantidas em câmara incubadora à temperatura ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminação ( $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) constante em tubos de ensaios contendo 10 mL de suspensão celular, em meio Zarrouk modificado por George (1966). Essas suspensões foram agitadas manualmente, duas vezes por semana, e a cada 20 dias repicadas para meio de cultivo novo.

Na primeira fase do processo de aclimação, foram produzidos inóculos de *Spirulina máxima* e/ou *Spirulina platensis*, em frascos do tipo erlenmeyer (de 125mL) contendo 40 mL do meio Zarrouk e acondicionados em uma câmara incubadora modificada. Nesta incubadora, esses inóculos foram mantidos a uma temperatura de  $32^\circ\text{C}$ , intensidade luminosa média de  $110 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e agitação orbital constante a  $86 \pm 3 \text{rpm}$ , por três gerações sucessivas, sendo os repiques realizados em intervalos de seis em seis dias. Após esta primeira fase de aclimação à temperatura e à intensidade luminosa, as células foram então submetidas a uma segunda fase de aclimação. Nesta segunda fase, os repiques desses cultivos, em vez de serem feitos somente em meio Zarrouk, foram também realizados nos meios RM6 (proposto por RAOOF *et.al.*, 2006) e variantes - meio modificado I (Mod. I), modificado II (Mod. II) e modificado III (Mod. III). e as condições de temperatura e intensidade luminosa foram as mesmas utilizadas na primeira fase da aclimação.

### 3.3 Meios de cultivo

Foram utilizados os meios Zarrouk modificado por GEORGE (1966), o meio RM6 (RAOOF *et al.*, 2006) e variantes. A composição química de cada meio é apresentada na Tabela 2, seguindo os procedimentos descritos no tópico 3.3.1.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo Zarrouk, RM6 e variantes.

Meios de Cultivo					
Componentes	Composição (g L <sup>-1</sup> )				
<b>Solução A</b>					
	Zarrouk	RM6	Mod. I	Mod. II	Mod. III
Salitre do Chile					2,5/3,5/4,5
NaHCO <sub>3</sub>	13,61	8	8		8
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,03	2,36	2,36	2,36	2,36
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5				
Superfosfato		1,25	1,25	1,25	1,25
Água destilada	500 mL	500 mL pré-tratada	500mL pré-tratada	333 mL pré-tratada	500mL pré-tratada
Água do mar				167 mL pré-tratada	
<b>Solução B</b>					
NaNO <sub>3</sub>	2,5	2,5	2,5	2,5	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0				
NaCl	1,0	0,5	0,5		0,5
KCl		0,898	0,898	0,898	0,898
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	0,15	0,15		0,15
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04	0,04	0,04		0,04
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01		0,01	0,01	0,01
EDTA	0,08				
Micronutrientes	5 mL		5mL	5mL	5mL
Água destilada	500 mL	500 mL pré-tratada	500mL pré-tratada	333 mL pré-tratada	500 mL pré-tratada
Água do mar				167 mL pré-tratada	

### 3.3.1 Preparo dos meios de cultivo

#### 3.3.1.1 Meio Zarrouk

Para obtenção de um litro de meio foram preparadas três soluções: solução (A), solução (B) e solução de micronutrientes. Para o preparo da solução (A) foram pesados 13,61g de Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), 4,03g de Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0,5g de Fosfato de Potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), sendo solubilizados separadamente em água destilada. As soluções obtidas foram transferidas para proveta e foi adicionada água destilada até o volume de 500mL, e, em seguida, a solução resultante foi transferida para erlenmeyer de 1,0L. Para a solução (B) foram pesados 2,5g de Nitrato de Sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), 1,0g de Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ ), 0,2g de Sulfato de Magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,08g de EDTA, 0,01g de Sulfato de Ferro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), e 0,04g de Cloreto de Cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sendo os sais solubilizados separadamente em água destilada. As soluções obtidas foram transferidas para proveta, onde foi colocada água destilada até o volume de 495mL, e em seguida, a solução resultante foi transferida para erlenmeyer de 1L. Como os elementos da solução de micronutrientes devem ficar em uma concentração muito baixa no meio, foram preparadas soluções estoque diluídas (Tabela 3) e a partir delas foram retiradas as alíquotas para integrar a solução de micronutrientes.

Tabela 3 - Composição das soluções estoque.

Soluções estoque				
		Concentração (%)	$\text{g L}^{-1}$	$\text{g mL}^{-1}$
1	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1	1,00	0,001
2	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,0005	0,005	0,000005
3	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	10	0,01
4	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	0,1	1,00	0,001
5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,1	1,00	0,001
6	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,1	1,00	0,001

Das soluções estoque de número 1 a 5 foi retirado 1,0mL, e da solução 6 foram retirados 2mL, e foram colocados em 500mL de água destilada; em seguida, foram acrescentados 0,7g de Sulfato de Ferro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e 0,8g de EDTA, e a solução obtida foi avolumada em proveta com água destilada até o volume de 1,0L, então, transferida para erlenmeyer. Após o preparo, as três soluções foram autoclavadas separadamente. Depois de frias, as soluções A e B foram transferidas, em ambiente estéril, para frasco âmbar estéril, e a esta solução foram acrescentados 5mL da solução de microelementos, sendo o pH determinado e, caso necessário, corrigido para uma faixa entre 8,9 – 9,2 com o uso de solução de NaOH ou HCl. O meio já pronto foi armazenado em ambiente refrigerado até o momento de seu uso.

### 3.3.1.2 Meio RM6

Para a obtenção de 1,0L de meio, o preparo das soluções foi dividido em três etapas: Etapa 1 (tratamento da solução de superfosfato), Etapa 2 (solubilização dos sais) e Etapa 3 (esterilização do meio).

Etapa 1 - Para o tratamento de 1,0L de solução foram pesados 1,25g de superfosfato simples e 0,20g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) grau comercial. Primeiramente o superfosfato foi solubilizado em água destilada com o auxílio de placa agitadora magnética, sob agitação constante, e após a solubilização do superfosfato, foi adicionado o bicarbonato de sódio. A solução foi então mantida sob agitação vigorosa por 2 minutos e depois por mais 18 minutos sob agitação branda para a formação do precipitado decorrente da reação química entre o superfosfato e o bicarbonato de sódio. O precipitado formado foi removido através do processo de filtração, onde primeiramente a solução foi filtrada em duas camadas de filtro de papel para preparo de café, e posteriormente em membrana de papel com porosidade de 5-10 $\mu\text{m}$ . Após esse procedimento, o filtrado foi reservado, constituindo a solução tratada de superfosfato.

Etapa 2 - A solução de superfosfato tratada foi dividida em duas partes, uma de 900mL e outra de 100mL. Com a parte dos 900mL foram solubilizados em separado, 8g de Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) grau comercial, 2,36g de Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0,898 g de Cloreto de Potássio (KCl), 0,04g de Cloreto de Cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,15g de Sulfato de Magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,5g de Cloreto de Sódio (NaCl) e 2,5g Nitrato de Sódio ( $\text{NaNO}_3$ ). As soluções obtidas foram transferidas para proveta de 1L, onde foi acrescentada solução de superfosfato tratada que havia ficado à parte até ser atingido o volume de 1L.

Etapa 3 - A solução obtida na etapa 2 foi levada para um ambiente estéril onde foi filtrada em membranas de acetato celulose (0,22 $\mu\text{m}$ ) com o auxílio de um kit de filtração à vácuo previamente autoclavado. O pH foi analisado e, caso necessário, corrigido para uma faixa entre 8,9 – 9,2 com o uso de solução de NaOH ou HCl estéril. O volume filtrado foi reservado e armazenado em frascos âmbar estéreis em ambiente refrigerado, constituindo assim o meio RM6.

### 3.3.1.3 Meio Mod. I

O preparo do meio Mod. I foi realizado da mesma forma que o do meio RM6, entretanto, recebeu o acréscimo de 0,01g de Sulfato de Ferro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), e a adição de 5mL da solução de micronutrientes na solução B.

### 3.3.1.4 Meio Mod. II

O meio Mod. II é uma modificação do meio RM6, feita com intuito de diminuir o custo do cultivo. Alguns elementos foram retirados com relação ao meio RM6 original, pois a base para confecção do meio é a água do mar que já contém uma carga razoável de nutrientes. A água do mar utilizada no preparo dos meios foi cedida pelo Instituto de Eco

desenvolvimento da Baía de Ilha Grande (IED-BIG) em Angra dos Reis, RJ. A água foi coletada na Baía da Ilha Grande, filtrada e esterilizada com iluminação ultravioleta (UV) e armazenada em recipientes fechados, mantidos abrigados da luz. Para a obtenção de 1L de meio, o preparo das soluções foi dividido em três etapas: Etapa 1A (tratamento da solução de superfosfato em água destilada) e Etapa 1B (tratamento da água do mar), Etapa 2 (solubilização dos sais), e Etapa 3 (esterilização do meio).

Etapa 1A - Para o tratamento de 1L de solução foi realizado o mesmo tratamento descrito na etapa 1 de preparo do meio RM6

Etapa 1B - Para o tratamento de 1L de solução foram pesados 19,5g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) grau comercial. Primeiramente o bicarbonato de sódio foi solubilizado em água do mar com o auxílio de placa agitadora magnética, sob agitação constante, e aquecimento a  $35^\circ\text{C}$ . Após a adição do bicarbonato de sódio o pH da solução foi ajustado para uma faixa entre 9,0 - 9,2. A solução foi então mantida sob agitação vigorosa por 2 minutos e depois por mais 18 minutos sob agitação branda para a formação do precipitado. O precipitado formado foi removido através do processo de filtração, onde primeiramente a solução foi filtrada em duas camadas de filtro de papel para preparo de café e posteriormente em membrana de papel com porosidade de 5-10 $\mu\text{m}$ . Após esse procedimento, o filtrado foi reservado constituindo a solução tratada de superfosfato.

Etapa 2 - Após realizados os tratamentos das soluções separadamente, da solução de superfosfato obtida foram retirados 666mL e da solução de água do mar tratada obtida foram retirados 334mL. Com a parte dos 666mL foram solubilizados separadamente 2,36g de Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0,898 g de Cloreto de Potássio (KCl), 2,5g Nitrato de Sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) e 0,01g de Sulfato de Ferro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). As soluções obtidas foram transferidas para proveta de 1L, e com a solução que ficara à parte, foi avolumada solução para o total de 995mL.

Etapa 3 - A solução obtida na etapa 2 foi levada para um ambiente estéril onde foi filtrada em membranas de acetato celulose (0,22 $\mu\text{m}$ ) com o auxílio um kit de filtração a vácuo previamente autoclavado. Foram adicionados 5mL da solução de micronutrientes completando 1L de solução, o pH foi analisado e, caso necessário, corrigido para uma faixa entre 8,9 – 9,2 com o uso de solução de NaOH ou HCl estéril. Realizado este procedimento, o volume filtrado foi reservado e armazenado em frascos âmbar em ambiente refrigerado, constituindo assim o meio Mod. II.

### **3.3.1.5 Meio Mod. III**

O preparo do meio Mod. III foi realizado da mesma forma que o do meio Mod. I, porém o Nitrato de Sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) como fonte de nitrogênio foi substituído pelo uso do Salitre do Chile comercial (Fertilizante Mineral Simples – VITAPLAN<sup>®</sup>). Foram preparados meios Mod. III em três diferentes concentrações de Salitre do Chile 2,5g L<sup>-1</sup>, 3,5g L<sup>-1</sup>, e 4,5g L<sup>-1</sup>.



### 3.4 Sistema de Cultivo

#### 3.4.1 Modificação de uma Câmara Incubadora

Para garantir a manutenção e uniformidade das condições de cultivo estudadas, tornou-se necessário modificar uma câmara de incubação de modo que se pudesse produzir agitação e iluminação do cultivo de maneira controlada e uniforme.

Existem no mercado algumas câmaras especiais que serviriam para esta finalidade, no entanto, estes equipamentos nem sempre possibilitam a distribuição homogênea de luz em seu interior. Com o intuito de sanar as limitações citadas, em uma câmara incubadora (marca Ethiktechnology®, modelo B.O.D 411 FTP) com capacidade de ajuste e controle de temperatura na faixa ideal de crescimento para cepas estudadas (entre 30 e 35°C), adaptações foram realizadas com materiais de fácil obtenção e de alta eficiência para realização do controle da agitação e garantia da homogeneidade da distribuição de luz. Nela, foram feitas duas adaptações: um novo sistema de iluminação e um sistema de agitação orbital para os frascos de cultivo.

O sistema de iluminação foi projetado para lâmpadas eletrônicas fluorescentes de até 20W de potência (Figura 15). Neste, foram fixados dezoito soquetes, que foram cuidadosamente posicionados de maneira a tornar as lâmpadas equidistantes. Aos soquetes, foram soldados em esquema de circuito paralelo, fios flexíveis de cobre de 1,5 mm de diâmetro e um fio paralelo de 2,0mm de diâmetro, com um interruptor e um plug "macho" para conectar a rede elétrica e alimentar o sistema.



Figura 15 - Sistema de iluminação para câmara incubadora.

Esse sistema foi posicionado dentro da câmara incubadora na parte inferior, possibilitando uma melhor homogeneidade na distribuição luminosa e maiores intensidades

de luz em relação ao sistema de iluminação de fábrica que acompanha o equipamento. Outra vantagem desta modificação é que a luz é disponibilizada de baixo para cima, permitindo a iluminação pela base dos erlenmeyers de cultivo, com conseqüente maior área de exposição, o que em conjunto com o sistema de agitação desenvolvido, garantiu uma distribuição da luz mais eficaz e homogênea, (Figura 16).



Figura 16 - Integração das duas adaptações realizadas na câmara incubadora.

A agitação do cultivo foi realizada através de um sistema de agitação constituído basicamente por uma mesa de vidro temperado suspensa no interior da câmara de incubação por fios de nylon, impulsionada por um motor à corrente contínua com mecanismos de redução de velocidade. Este motor é preso à parede interna dessa câmara e alimentado por uma fonte de tensão regulável (Figura 17), o que possibilita a operação do mesmo em velocidades variadas de rotação.



Figura 17 - Montagem da fonte reguladora de tensão.

Um eixo excêntrico foi adaptado ao eixo do motor e conectado a mesa de vidro por uma guia de aço que permite a transmissão do movimento de rotação (Figura 18).

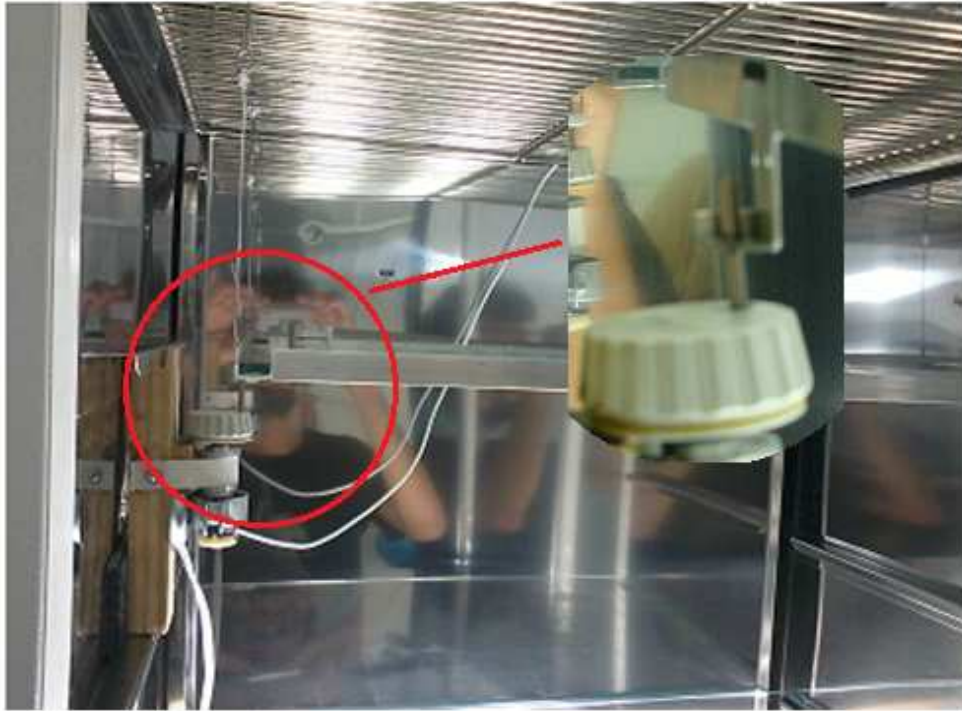


Figura 18 - Fixação do motor ao suporte de vidro para os frascos de cultivo.

A mesa de vidro foi emoldurada em perfis de alumínio que permitiam através das linhas de nylon de alta resistência suportar e suspender essa mesa em quatro pontos de apoio fixados na prateleira superior (grade metálica) da própria incubadora, dando origem a um sistema de rotação orbital. Na Figura 19, podemos observar a disposição interna da área de cultivo, o motor de agitação preso à parede da incubadora (Figura 19a), a mesa de vidro (Figura 19b) e os pontos de sustentação da mesma (Figura 19c).

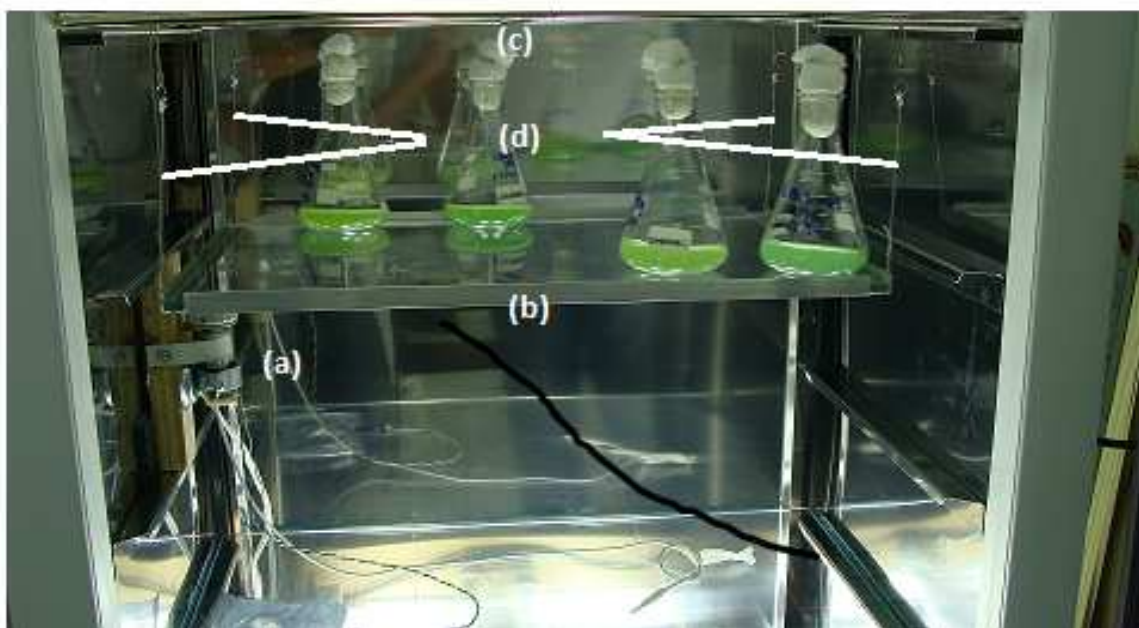


Figura 19 - Parte interna da câmara incubadora. A: motor preso à parede da câmara; b: suporte de vidro; c: grade de sustentação; d: linhas de nylon de alta resistência em 4 pontos

### 3.4.2 Dosimetria

Após a montagem e instalação do sistema de iluminação, este foi avaliado com o auxílio de um dosímetro (Biospherical Instrument, QSL 2100) quanto à distribuição e intensidade de luz (em  $110 \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) que atravessa a área exata destinada ao cultivo. Para tanto, uma placa de vidro temperado foi colocada na mesma posição da mesa de cultivo. Nesta placa de vidro foi desenhada uma matriz com 70 retângulos de  $4.5 \times 5\text{cm}$  (Figura 20), que serviram de referência espacial ao posicionamento do sensor do dosímetro. As medidas de intensidade luminosa foram realizadas posicionando o sensor no centro de cada retângulo, na ordem mostrada na (Figura 20). As medidas foram feitas com a porta da câmara fechada, desta forma não houve interferência luminosa da sala, possibilitando assim a obtenção de dados com maior exatidão sobre as condições luminosas do ambiente de cultivo. Foram levantados os dados de distribuição da intensidade luz em diferentes situações de iluminação, utilizando-se 4, 6, 8, 10 ou 14 lâmpadas fluorescentes de 20W de potência cada, e com base nestes resultados foi definido o uso de 4 lâmpadas. Os dados foram tabelados em Excel para posteriores análises.

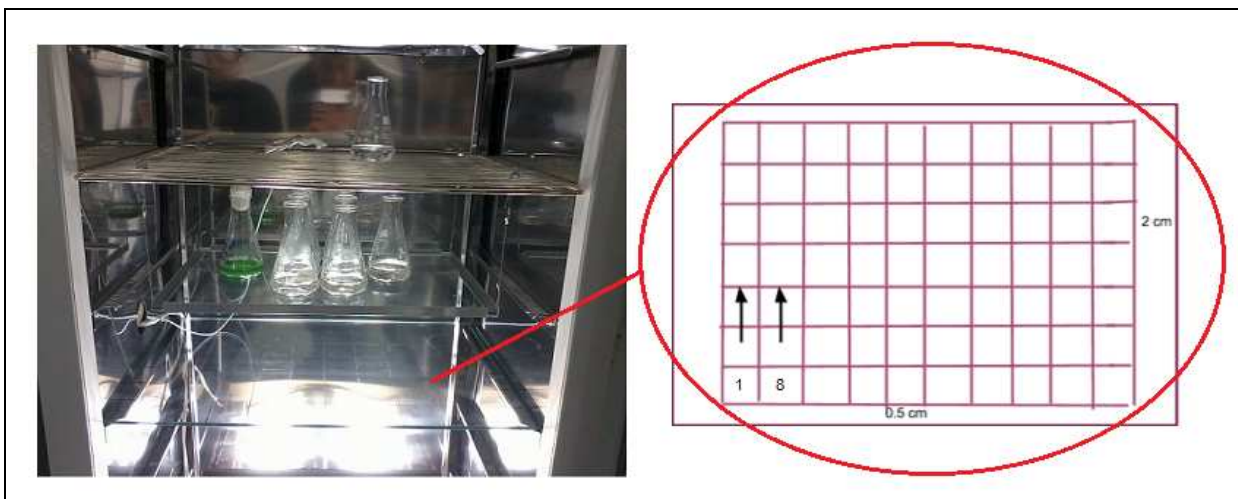


Figura 20 - Placa de vidro subdividida em pequenos retângulos e esquema utilizado para a o posicionamento do dosímetro sobre a placa.

### 3.5 O cultivo das microalgas

Os cultivos foram realizados em frascos do tipo erlenmeyer de 125mL, contendo 40 mL de suspensão celular, na câmara incubadora modificada, onde foram mantidos a uma temperatura de 32°C, intensidade luminosa média de  $110\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e agitação orbital constante a  $86\pm 3\text{rpm}$ . Os frascos de cultivo (24) foram revezados diariamente em relação as suas posições no sistema de agitação da câmara incubadora. Este revezamento foi realizado seguindo uma planilha de posicionamento de ordem aleatória gerada em programa Excel especialmente construída para este fim (anexo I) e teve como objetivo garantir a homogeneidade na distribuição de luz entre os frascos de cultivo.

#### 3.5.1 Os inóculos

Como estratégia para garantir a disponibilidade de inóculo em eventuais situações emergenciais, onde avaliações adicionais fossem necessárias, culturas aclimatadas de acordo com o tópico 3.2, foram mantidas como culturas estoques, sendo repicadas, para manutenção das células, a cada quinze dias. Essas culturas, acondicionadas em frascos do tipo erlenmeyer de 125mL, contendo 40 mL de suspensão e mantidas na parte superior interna da incubadora (Figura 21).



Figura 21 - Disposição dos inóculos dentro da câmara incubadora.

Os inóculos que deram origem ao primeiro experimento de cada tipo de avaliação partiram das culturas da última etapa de aclimação. Daí em diante, os experimentos com o mesmo propósito de avaliação tiveram como inóculo a cultura do experimento anterior (no oitavo dia de cultivo). O volume de inóculo utilizado em cada repique foi determinado através do cálculo de diluição variando em função da densidade celular da cultura. A cada vez que o propósito de avaliação foi modificado, uma nova etapa de aclimação das cepas foi realizada.

### 3.5.2 Acompanhamento do crescimento

O crescimento das culturas foi acompanhado através de sua densidade óptica (DO) em 730nm lida em espectrofotômetro da marca Spectrum, modelo SP-1105. De cada cultura, diariamente, foram recolhidas alíquotas de 700 $\mu$ l e transferidas para cubeta de vidro com caminho óptico de 1cm, para as medidas de DO. O crescimento foi acompanhado durante oito dias. A partir destes valores, foram realizados os ajustes lineares aos respectivos pontos de dados, estabelecendo-se assim, as curvas de crescimento para cada condição estudada, sendo que o coeficiente linear destes ajustes foi relacionado com a taxa de crescimento da cultura e com o valor do coeficiente linear obtido no referido ajuste.

### 3.5.3 Determinação da massa seca e concentração em biomassa

A partir do valor da massa seca, foi calculada a concentração em biomassa final da cultura (em g L<sup>-1</sup>). Para obtenção do peso seco, ao final do período de cultivo (8 dias), duas amostras de 40mL de suspensão celular, para cada condição de cultivo, foram retiradas da cultura, filtradas à vácuo em membranas de fibra de vidro (0,7-1,2µm - Sartorius®) previamente pesadas em balança analítica da marca Shimadzu, modelo Y220. Então, a biomassa úmida foi lavada com água destilada (40 mL) por duas vezes, para a retirada dos sais provenientes do meio de cultivo. Por fim, as membranas contendo a biomassa foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido e mantidas assim até o momento de serem submetidas ao processo de secagem, realizado em balança determinadora de umidade (a 105°C) da marca Ohaus®, modelo, MB45. Após a secagem, as membranas foram novamente pesadas na mesma balança, visto que a balança determinadora de umidade não tem exatidão necessária para estas análises. O valor de massa seca é calculado a partir da subtração do peso da membrana com biomassa seca do peso da membrana sem biomassa.

### 3.6 Extração e análise dos pigmentos da biomassa produzida nos cultivos

A quantificação dos pigmentos foi realizada através da metodologia descrita por LICHTENTHALER (1987). Após a etapa de filtração e quantificação do peso seco, as membranas com a biomassa seca foram utilizadas para a extração de clorofila-a e carotenoides totais. Isto só foi possível devido a um teste prévio realizado no Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM) que demonstrou que a secagem prévia da biomassa pouco influencia no resultado de carotenoides totais e clorofila-a na biomassa de *Spirulina*.

As membranas secas contendo a biomassa filtrada foram então depositadas em um tubo de ensaio de 20mL, embebidas em 10mL de metanol PA e trituradas com o auxílio de um bastão de vidro. As amostras foram incubadas durante 2 horas à -20°C. Após o período de incubação, o extrato de pigmentos passou por uma filtração em pipeta Pasteur com algodão na ponta e posteriormente por um processo de centrifugação em centrífuga da marca Hettich, modelo ROTIXA 50 RS, a 4°C e 3.500 rpm por 15min, evitando assim a permanência de resquícios de impurezas no extrato, que poderiam influenciar na análise de varredura por espectrofotometria. Os extratos assim obtidos, foram diluídos a 1/5 da concentração original e transferidos para uma cubeta de quartzo. Para a quantificação de carotenoides totais e clorofila a, foi realizada leitura do extrato em metanol em espectrofotômetro Genesys®, modelo 10S UV-Vis, para a obtenção das absorbâncias nos comprimentos de onda relacionados a absorção dos pigmentos. A quantificação dos pigmentos foi realizada através das equações descritas por LICHTENTHALER (1987). As equações originais descritas por este trabalho são:

$$C_a = 16,72A_{665,2} - 9,16A_{652,4} \dots \dots \dots (1)$$

$$C_b = 34,09A_{652,4} - 15,27A_{665,2} \dots \dots \dots (2)$$

$$C_{\text{Car t}} = (1000A_{470} - 1,91C_a - 95,15C_b) + 225 \dots \dots \dots (3)$$

Onde:  $C_a$ = Concentração de clorofila-a em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $C_b$ = Concentração de clorofila-b em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $C_{\text{Car t}}$ = Concentração de carotenoides totais em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $A_{665,2}$ = Absorbância em 665,2nm;  $A_{652,4}$ = Absorbância em 652,4nm;  $A_{470}$ = Absorbância em 470nm. Tendo em vista que a microalga *Spirulina platensis*, não possui clorofila-b, foi possível realizar a simplificação destas equações eliminando o termo de concentração desta clorofila. Sendo assim, as duas equações obtidas e utilizadas foram:

$$C_a = 12,6A_{665,2} \dots\dots\dots(4)$$

$$C_{\text{Car t}} = (1000A_{470} - 1,63C_a) + 22 \dots\dots\dots(5)$$

### 3.7 Extração com fluido supercrítico

Os experimentos de extração com fluido supercrítico (EFS) foram realizados no Laboratório de Processos de Separação (LPS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

#### 3.7.1. Unidade de EFS

A unidade de extração do LPS (Figura 22) passou por uma reformulação para atingir as pressões desejadas neste trabalho, sendo que os ajustes foram executados pelo mestrando, autor desta dissertação. As modificações realizadas garantiram não só a operação da unidade em pressões de até 300bar, como também um controle preciso deste parâmetro durante todo o processo de extração. Na figura 22, podemos observar os seguintes componentes da unidade: A1.banho termostático, A2.caixa térmica, C1.compressor de ar, F1.medidor de fluxo, M1.manômetro do compressor, M2.manômetro da linha de extração, P1.cilindro de CO<sub>2</sub>, P2.bomba pressurizadora, P3.extrator, R1.regulador de ar com purgador, R2.regulador de ar e controle da bomba, T1.Tubo de recolha, V1.válvula reguladora do cilindro de gás, V2. Válvula de bloqueio da linha, V3.válvula anti-retorno, V4.válvula de expansão.

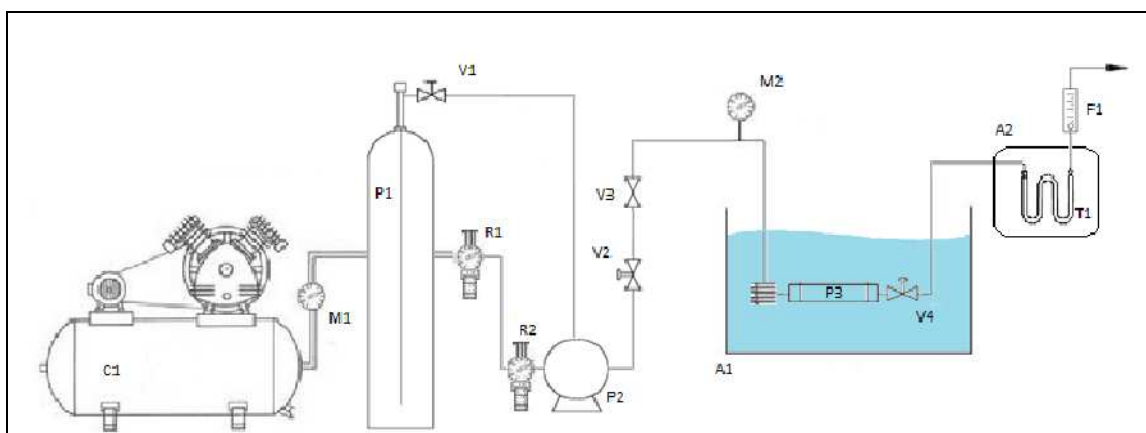


Figura 22 - Desenho esquemático da unidade de extração supercrítica do LPS - UFRRJ.

Neste sentido, foram dimensionadas novas válvulas, manômetros, mangueiras e reguladores para suportar pressões mais elevadas (Figura 23).





Figura 23 - Modificações na linha de ar comprimido.

Para que essas pressões fossem alcançadas, foi necessária também a instalação de um compressor de ar de maior potência. Este compressor fornece o ar pressurizado que impulsiona à bomba pneumática, elemento que eleva a pressão do sistema à faixa desejada (Figura 24).

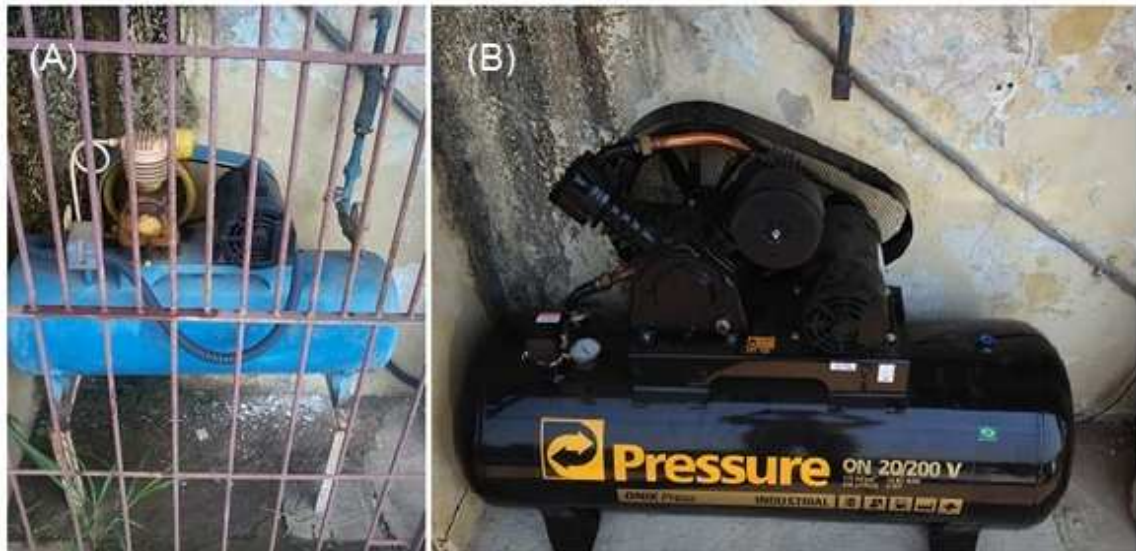


Figura 24 - Modificação do compressor de ar: (A) compressor antigo (1,5cv) e (B) compressor atual (5cv).

Além destas modificações, também foram feitas mudanças na linha de extração. Um manômetro foi instalado antes da entrada do extrator para o monitoramento da pressão. Toda a linha por sua vez, foi montada dentro de um banho termostático com controle de temperatura (Figura 25), para garantir não só o controle da temperatura na linha e dentro do extrator, como também o controle do efeito Joule-Thomson na válvula de expansão.

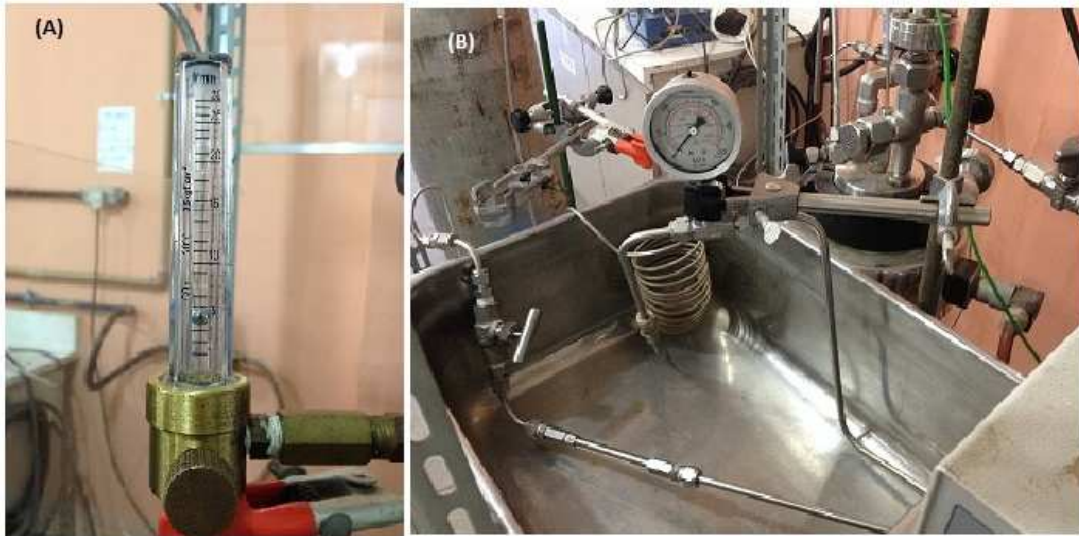


Figura 25 - Modificações na linha de extração (A) medidor de fluxo e (B) linha de extração dentro do banho termostático.

A válvula de expansão foi conectada por meio de um tubo de nylon a um sistema para recolha do extrato, composto de três tubos de vidro em formato de "U" interligados. Este sistema foi colocado em uma caixa de isopor fechada contendo gelo para garantir a preservação do extrato e aumentar a eficiência de recolha. Após o sistema de recolha foi ligado a um medidor de fluxo para o monitoramento da vazão durante os experimentos (Figura 26).



Figura 26 - Modificações na linha de recolha do extrato. (A) válvula de expansão, (B) tubo de nylon, (C) caixa de isopor com sistema de recolha, (D) medidor de fluxo.

### 3.7.2 Preparo da biomassa para extração com fluido supercrítico

Foram utilizadas duas biomassas de *Spirulina platensis* diferentes; primeiramente foi utilizada uma biomassa comercial, comprada para a realização dos experimentos preliminares e determinação dos parâmetros de extração, posteriormente uma biomassa gerada em laboratório.

A biomassa comercial de *Spirulina platensis* foi adquirida da empresa Brasil Vital® em embalagens contendo 15g cada, segundo informações adicionais sobre o cultivo das microalgas fornecidas pelo produtor, as microalgas foram cultivadas em tanques tipo "raceway", separadas do meio de cultivo por centrifugação e secas em estufa durante pernoite a 40°C. Já a biomassa produzida em laboratório, foi gerada no INT em um fotobiorreator adaptado (12L) montado dentro de uma câmara climatizada (Climus®) mantida à temperatura (32±1°C) e iluminação constante (340μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) (Figura 27), o meio de cultivo utilizado foi o meio Mod III contendo 2,5g L<sup>-1</sup> de salitre de acordo com a tabela 1. Após ter sido produzida, a biomassa gerada foi separada do meio de cultivo através de filtração em tela de nylon 120μm, lavada com água destilada, liofilizada e armazenada em frascos âmbar em freezer convencional até o momento de seu uso.



Figura 27 - Fotobiorreator adaptado para produção de biomassa destinada a EFS.

As duas biomassas foram levadas ao LPS - UFRRJ, moídas com o auxílio de um moinho (A-10 Analyticalmill-Tekmar®), sendo reduzida a um pó bem fino. As amostras foram, então, peneiradas em peneira granulométrica de 48mesh (Granutest, série Tyler, Abrosinox, Brasil). Após esse processo, foram armazenadas em frasco âmbar até o momento de seu uso.

### 3.7.3 Caracterização do extrator e preparo do leito

Foi utilizado um extrator tubular cilíndrico de aço inox do tipo (SFE vessel P.máx 9.000psi) com capacidade de 1,67mL, contendo filtros sinterizados de aço inox em suas extremidades, para que não ocorresse arraste do material fino particulado que compõe a amostra. O leito foi formado por 1g de material, contendo 50% de microesferas de vidro de granulometria mista variando entre 20 e 30 mesh (Potters Industrial Ltda, 3R, Brasil) e 50% de biomassa de *Spirulina platensis* (Figura 28).



Figura 28 - Biomassa de microalga sendo pesada e microesferas de vidro.

Estes materiais após serem pesados em balança analítica de precisão, foram misturados manualmente com o auxílio de um bastão de teflon, de maneira a tornar o material uma mistura bem homogênea. Após este procedimento, foi realizado o empacotamento do leito, buscando sempre manter a homogeneidade e garantindo que toda a amostra fosse compactada no interior do extrator até o seu preenchimento completo.

### 3.7.4 Experimentos de extração com fluido supercrítico

Foram realizados oito experimentos de extração, onde foram avaliadas quatro pressões e duas temperaturas diferentes; a vazão e o tempo total de extração foram iguais em todos os experimentos. As condições nas quais cada experimento foi conduzido estão apresentadas na Tabela 4:

Tabela 4 - Condições utilizadas nas extrações com fluido supercrítico.

Experimento	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
1	150	40
2	200	40
3	250	40
4	300	40
5	150	60
6	200	60
7	250	60
8	300	60

Fonte: Dados do autor

### 3.7.5 Operação da unidade

A unidade foi ligada e, então, foi iniciado o procedimento de ajuste dos parâmetros de operação (P,T). O registro do cilindro com tubo pescador foi aberto, e o CO<sub>2</sub> líquido vindo do cilindro foi bombeado através de uma bomba pneumática pressurizadora (Air Driven Liquid Pump - G35 LVE - CO<sub>2</sub>). Durante o aumento da pressão de operação no sistema, a válvula de expansão foi mantida na abertura mínima, e à medida em que a pressão foi aumentando, um novo ajuste de vazão era realizado até que a vazão desejada alcançasse a estabilidade; tendo sido utilizado, para este ajuste, um medidor de fluxo (rotâmetro) ligado ao sistema de recolha

do extrato. Ao atingir a pressão desejada na linha de extração e a estabilidade da vazão, foi aguardado o tempo de uma hora para o equilíbrio do sistema. Durante esse tempo, foram realizados os procedimentos de preparo do extrator, empacotamento do leito (tópico 3.7.3), pesagem do sistema de recolha para o cálculo do rendimento em massa, e em seguida foi iniciada a contagem do tempo de extração (4h). Decorrido o tempo de extração, foi iniciado o processo de despressurização e, por fim, foi efetuado o processo de limpeza da linha para uma nova extração.

### 3.7.6 Obtenção e análise dos extratos

O extrato foi coletado continuamente durante todo o experimento (4h) (Figura 29), em um sistema de tubos de vidro refrigerado, e após o término de cada extração o sistema de recolha foi desconectado e colocado em um dessecador contendo sílica, sob vácuo e abrigado da luz, até atingir a temperatura ambiente. Feito este procedimento, o sistema foi pesado e o valor do peso final anotado para o cálculo da massa retida, que é obtida descontando-se o valor do peso inicial do tubo do peso final.

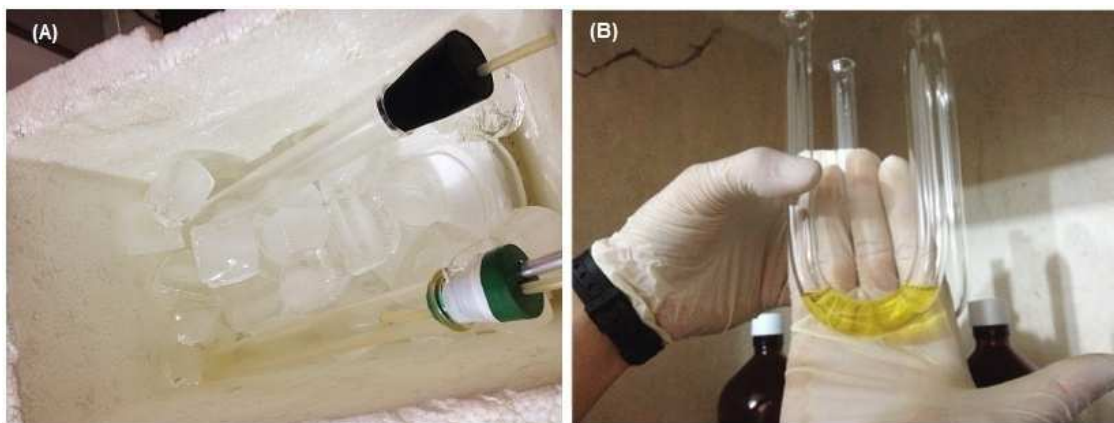


Figura 29 - Sistema de recolha após 4h de experimento contendo extrato antes (A) e após a lavagem com o solvente (B).

Para a quantificação de carotenoides totais e clorofila a, foi realizada leitura do extrato em metanol em espectrofotômetro Genesys®, modelo 10S UV-Vis, para a obtenção das absorvâncias nos comprimentos de onda relacionados a absorção dos pigmentos.

A quantificação dos pigmentos foi realizada através das equações descritas por Lichtenthaler (1987). As equações originais descritas por este trabalho são:

$$C_a = 16,72A_{665,2} - 9,16A_{652,4} \dots \dots \dots (6)$$

$$C_b = 34,09A_{652,4} - 15,27A_{665,2} \dots \dots \dots (7)$$

$$C_{Cart} = (1000A_{470} - 1,91C_a - 95,15C_b) + 225 \dots \dots \dots (8)$$

Onde:  $C_a$ = Concentração de clorofila-a em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $C_b$ = Concentração de clorofila-b em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $C_{Cart}$ = Concentração de carotenoides totais em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $A_{665,2}$ = Absorvância em

665,2nm;  $A_{652,4}$ = Absorbância em 652,4nm;  $A_{470}$ = Absorbância em 470nm. Tendo em vista que a microalga *Spirulina platensis*, não possui clorofila-b, foi possível realizar a simplificação destas equações eliminando o termo de concentração desta clorofila. Sendo assim, as duas equações obtidas e utilizadas foram:

$$C_a = 12,6A_{665,2} \dots\dots\dots(9)$$

$$C_{Car t} = (1000A_{470} - 1,63C_a) + 22 \dots\dots\dots(10)$$

### 3.7.7 Cálculos de rendimento

O rendimento total das extrações ( $R_{ext}\%$ ), foi calculado através da equação:

$$R_{ext}\% = \frac{m}{M} * 100 \dots\dots\dots(11)$$

Onde: m é massa de extrato obtida (grama) e M a carga de biomassa de microalgas g colocada no extrator.

O rendimento por pigmento extraído ( $R_{pig}\%$ ), foi calculado através da equação:

$$R_{pig}\% = \frac{mip}{mtp} * 100 \dots\dots\dots(12)$$

Onde: (mip), é a massa individual de cada pigmento ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), clorofila-a ou carotenoides totais e (mtp) é massa total dos pigmentos ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) obtida pela soma da massa de clorofila-a com a massa de carotenoides totais.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação do crescimento de *S. platensis* e *S. máxima* cultivadas nos meios Zarrouk, Mod. I e Mod. II

Com o objetivo de reduzir custos na confecção dos meios de cultivo foram realizadas modificações na composição dos meios de cultivo. Nesta etapa foram analisados os meios Mod.I, o qual teve a fonte de fosfato P.A substituída por um fertilizante agrícola de menor pureza (superfosfato simples), além da carga de nutrientes menor em relação ao meio Zarrouk e Mod.II com a mesma composição química do meio Mod.I mas contendo em sua composição uma parcela de água do mar (Tabela 2).

Após o processo de aclimação, descrito no tópico 3.2, foram realizados cultivos de *S. platensis* e *S. máxima* nos meios Zarrouk, Mod. I e Mod. II segundo as condições definidas no

tópico 3.5. O crescimento foi avaliado através de medidas diárias de DO e a produção de biomassa, através da obtenção da massa seca ao final do cultivo, gerando os dados de concentração final em biomassa. Os gráficos das Figuras 30 e 31 dizem respeito ao acompanhamento do crescimento. Aos pontos de dados dos gráficos foram ajustadas as melhores retas, pelo método de mínimos quadrados. Estes ajustes apresentaram valores de coeficiente de correlação linear quadrático ( $R^2$ ) superiores a 0,9, indicando uma alta correlação linear, o que justificou o uso desta função para representar a tendência de comportamento linear dos pontos dos dados apresentados, e o uso do coeficiente linear obtido nesses ajustes como a taxa de crescimento (TC).

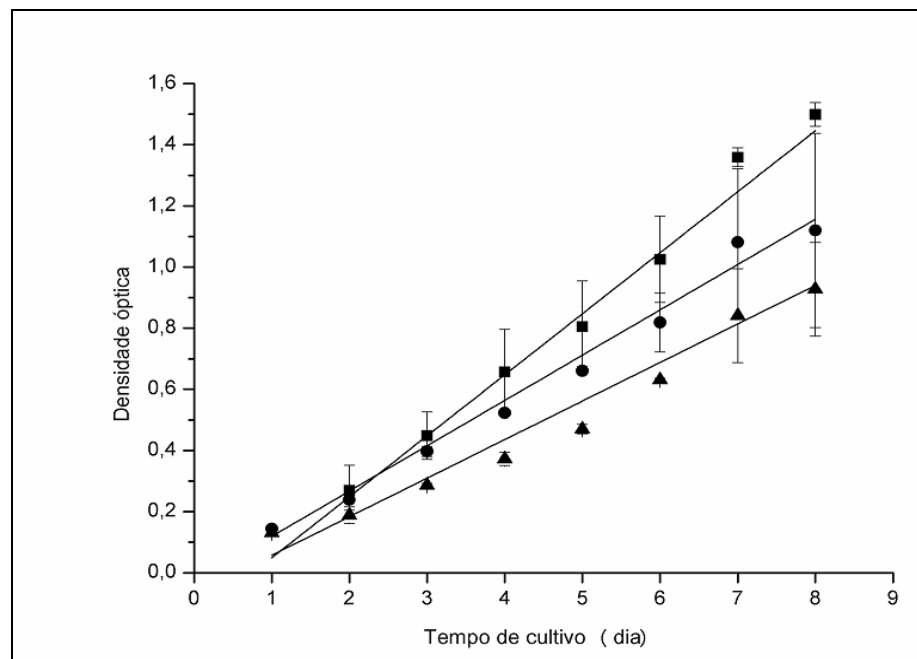


Figura 30 - Curvas de crescimento da *Spirulina platensis* em diferentes meios de cultivo. Zarrouk (■) Mod.I (●), e Mod.II (▲).

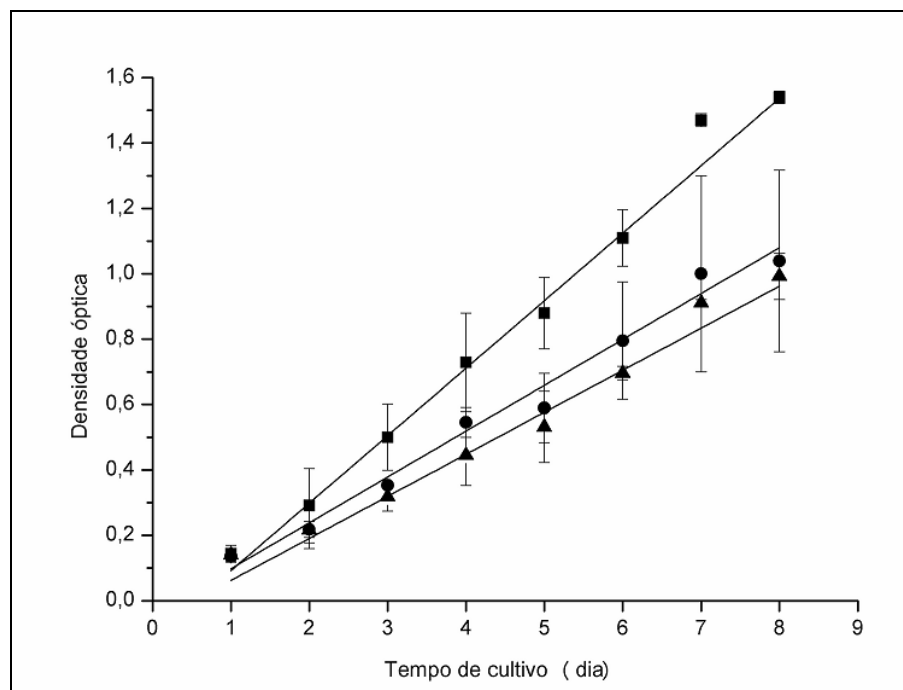


Figura 31 - Curvas de crescimento da *Spirulina maxima* em diferentes meios de cultivo. Zarrouk (■), Mod.I (●), e Mod.II (▲).

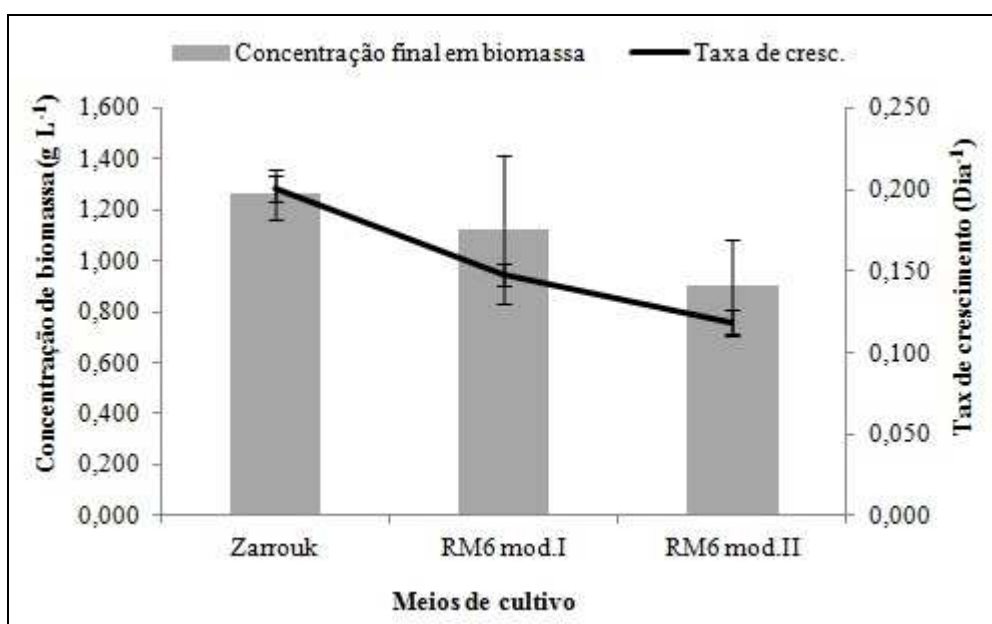


Figura 32 - Influência dos meios de cultivo na taxa de crescimento e na concentração final em biomassa de *S. platensis*.



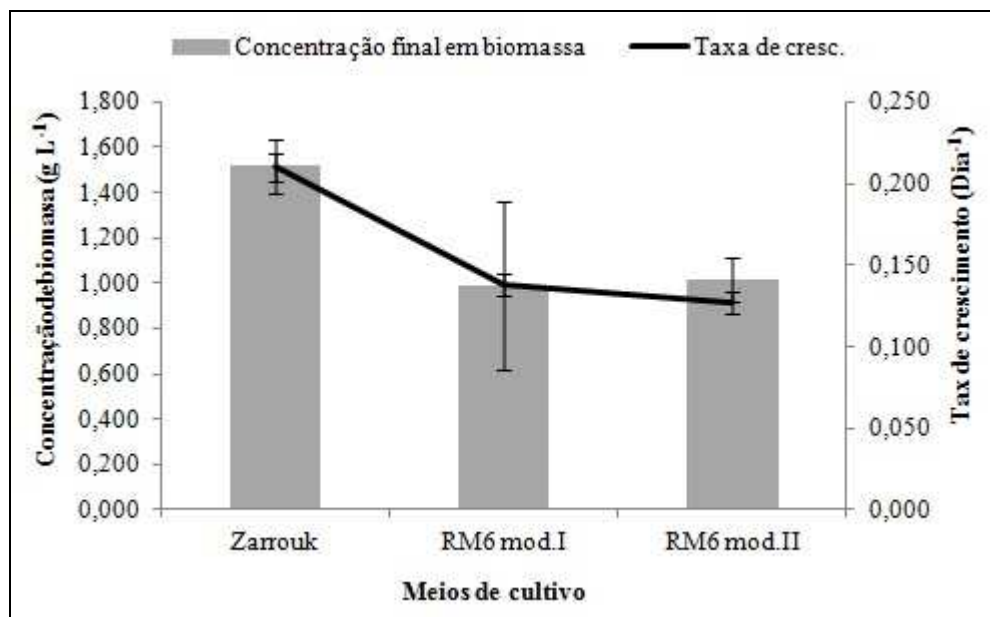


Figura 33 – Influência dos meios de cultivo na taxa de crescimento e na concentração final em biomassa de *S. maxima*.

Analisando as curvas de crescimento e os dados de TC apresentados nas Figuras 27 e 28, notamos que tanto a *S. platensis* quanto a *S. maxima*, adaptaram-se razoavelmente bem aos meios Mod. I e II, relativamente ao meio Zarrouk. Como esperado, os melhores resultados em TC (0,2) e  $CB_f$  ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (Figuras 32 e 33) foram obtidos para ambas as espécies quando cultivadas em meio Zarrouk, meio padrão que proporciona condições nutricionais mais favoráveis ao desenvolvimento desses micro-organismos.

DEVANATHAN & RAMANATHAN 2012 avaliaram o crescimento das células de *Spirulina platensis* cultivadas em meios de cultivo de baixo custo, tendo como base, água do mar, e resíduo da produção de aves como fonte de nitrogênio, e obtiveram bons resultados de crescimento apresentando valores de concentração em biomassa seca que variaram de  $0,518 \text{ mg mL}^{-1}$  até  $0,572 \text{ mg mL}^{-1}$  de cultura após 20 dias de crescimento; assim, os autores afirmaram que o uso da água do mar para a confecção dos meios de cultivo, em conjunto com fontes alternativas de nutrientes, oferece redução de custos considerável. GAMI *et al.*, 2011 relatam que os cultivos de *Spirulina sp.* em água do mar sem suplementação adicional de nutrientes, geraram uma concentração final máxima com base em massa seca de  $0,28 \text{ g L}^{-1}$  após 15 dias de crescimento; entretanto, mediante suplementação com  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$  nas concentrações de 10 e  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente, foi alcançada concentração máxima de  $0,37 \text{ g L}^{-1}$ , o que mostra a importância da adição destes nutrientes à água do mar, que por sua vez é considerada um meio semidefinido, podendo apresentar variações significativas em sua composição química (LOURENÇO, 2006).

No presente estudo, foram obtidas concentrações celulares máximas, tanto para os cultivos de *Spirulina platensis* realizados no meio Mod. I ( $1,125 \text{ g L}^{-1}$ ) quanto para os realizados em meio Mod. II ( $0,901 \text{ g L}^{-1}$ ), bastante superiores aos valores encontrados nos dois trabalhos citados; a diferença de resultados pode estar relacionada à diferença de comportamento das cepas utilizadas neste trabalho, assim como às condições de cultivo. Entretanto, menores valores obtidos por GAMI *et al.*, 2011, em relação aos obtidos neste estudo, para meio Mod.II, podem estar relacionados a não realização do pré-tratamento da

água do mar para a eliminação dos íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  presentes em excesso em sua composição, como descrito por (FAUCHER *et al.*, 1979), o que pode ter gerado uma situação desfavorável para o crescimento das células, no que diz respeito à quantidade de nutrientes disponíveis, contribuindo para a baixa produtividade observada pelos autores, já que estes não relatam a realização de nenhum tipo de tratamento prévio da água do mar para o preparo dos meios de cultivo.

De modo geral, a análise dos dados apresentados nos gráficos das Figuras 32 e 33, e revela grande semelhança de comportamento das duas espécies para os meios estudados e uma boa adaptação aos meios Mod. I e Mod. II. Entretanto, o meio Mod. II, apesar de ter se mostrado eficiente em promover o crescimento das células e de em sua composição conter uma parcela considerável de água do mar, o que contribuiria para a redução de custos no processo produtivo da biomassa de microalgas, apresentou sérias dificuldades operacionais em sua confecção. Além de demandar duas etapas de tratamento - uma para a parcela de água destilada onde foi solubilizado o superfosfato e outra para o tratamento da própria água do mar, a quantidade de bicarbonato necessária para a realização desta última foi alta, chegando a  $19,5\text{g L}^{-1}$ ; outra dificuldade encontrada foi em relação ao procedimento de separação do precipitado formado após a reação entre íons metálicos presentes na água do mar e o bicarbonato (Figura 34). Este procedimento demandou várias etapas de filtração em membranas de diferentes porosidades, o que aumentou o tempo e a quantidade de material gasto no preparo do meio. Partindo destas observações, por questões operacionais, o meio Mod.II não foi mais avaliado.

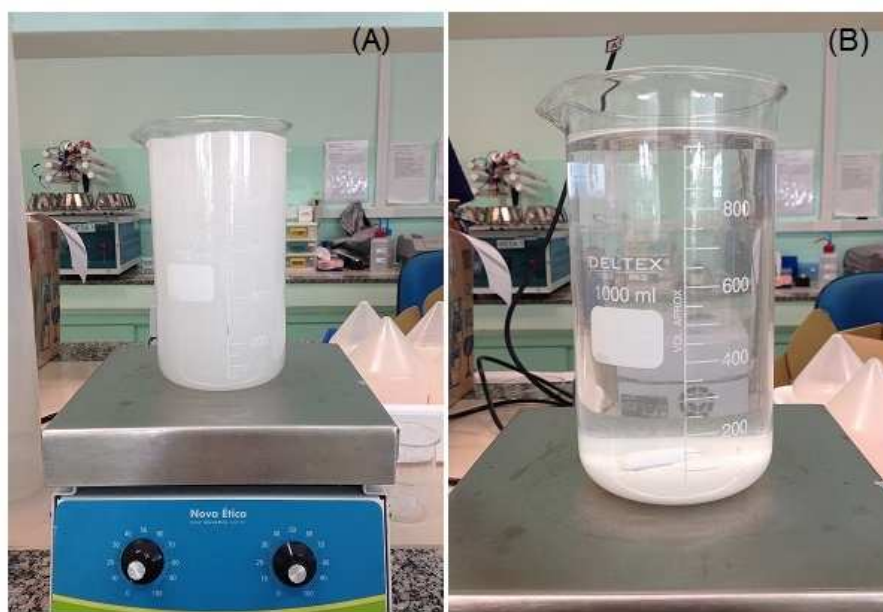


Figura 34 - Dissolução do bicarbonato em água do mar (A), precipitado formado após a reação com os íons metálicos (B).

#### 4.2. Avaliação do crescimento e produção de carotenoides e clorofila de *S. platensis* e *S. máxima* cultivadas nos meios Mod. I e Mod.III.

Nesta série de experimentos, ambas as espécies foram cultivadas em meio Mod.I e Mod. III. No meio Mod. III, o Nitrato de Sódio (P.A.) foi substituído pelo salitre do Chile comercial em três concentrações diferentes 2,5, 3,5 e 4,5 g L<sup>-1</sup> (Tabela 2), sendo, então, a influência desta substituição avaliada por meio dos parâmetros TC e CB<sub>f</sub> e, principalmente, pela produção de carotenoides e clorofila-a para as duas espécies de *Spirulina* estudadas. Representamos nos gráficos das Figuras 35 e 36 os dados de TC e CB<sub>f</sub>, para cada espécie, nos diferentes meios avaliados. Analisando os dados referentes ao desempenho da espécie *S. platensis*, representados no gráfico da Figura 35, observamos que diferenças significativas (P < 0,05) entre os valores de CB<sub>f</sub> obtidos para o meio Mod.I (0,837g L<sup>-1</sup>) e aqueles obtidos para os meios Mod. III (3,5) (1,189g L<sup>-1</sup>), tendo estes se revelado superiores aos do meio Mod. I e em relação aos valores de TC, diferenças significativas (P < 0,05) foram observadas entre os meios Mod. III (2,5) (0,184 Dia<sup>-1</sup>) e Mod. III (4,5) (0,150 Dia<sup>-1</sup>) e entre os meios Mod. III (3,5) (0,187 Dia<sup>-1</sup>) e Mod. III (4,5) (0,150 Dia<sup>-1</sup>), evidenciando de modo geral, um bom desempenho de crescimento das células de *Spirulina platensis* nos meios suplementados com salitre do Chile comercial em relação ao meio Mod.I que foi utilizado como controle experimental.

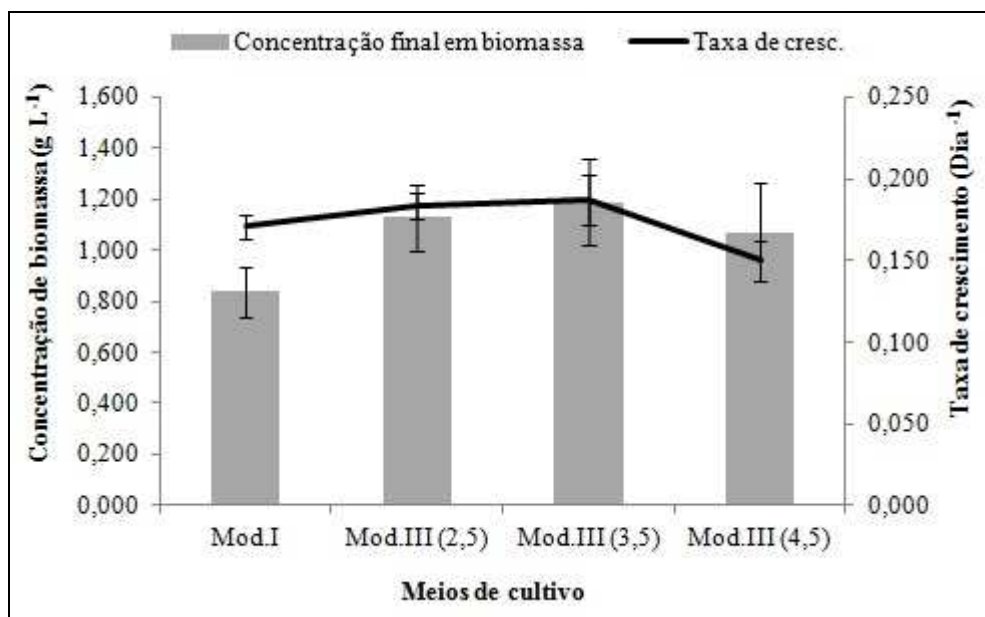


Figura 35 - Influência da concentração de Salitre do Chile nos meios de cultivo em relação a taxa de crescimento e a concentração final em biomassa de *S. platensis*.

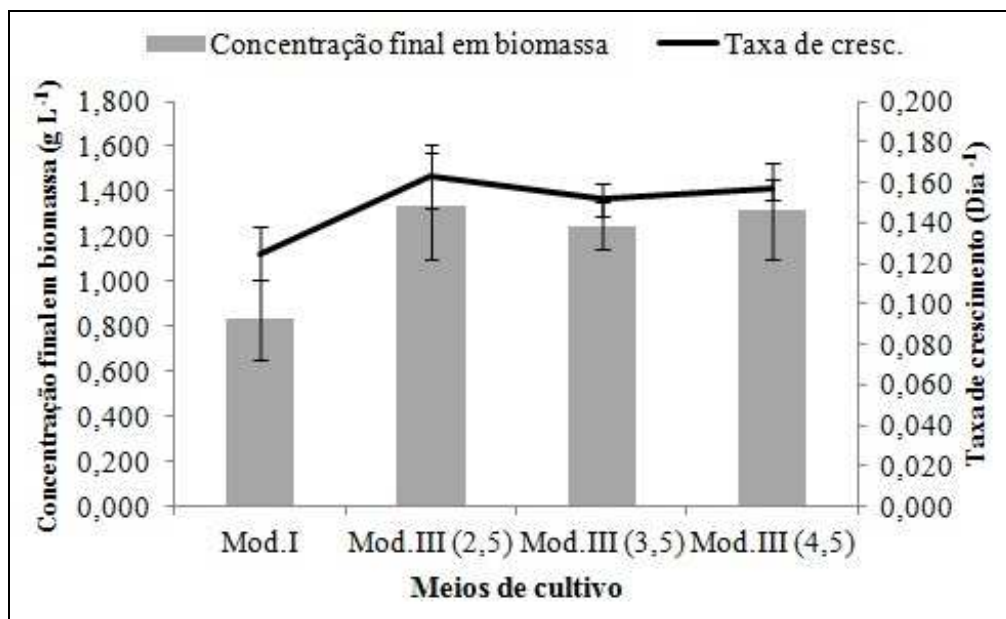


Figura 36 - Influência da concentração de Salitre do Chile nos meios de cultivo em relação a taxa de crescimento e a concentração final em biomassa de *S. maxima*.

Já para *S. máxima*, nos resultados apresentados no gráfico da Figura 36, podem ser notadas diferenças significativas para TC entre Mod.I (0,125 Dia<sup>-1</sup>) e Mod.III (2,5) (0,163 Dia<sup>-1</sup>) e entre os meios Mod.I (0,125 Dia<sup>-1</sup>) e Mod.III(4,5) (0,157 Dia<sup>-1</sup>) apresentando valores de  $P < 0,05$ , entretanto em relação a concentração final em biomassa não foram verificadas diferenças significativas frente aos diferentes meios avaliados.

Os resultados obtidos das análises de pigmentos (carotenoides totais e clorofila-a) estão apresentados nas Figuras 37 e 38. Podemos observar no gráfico da Figura 37 que para a *Spirulina platensis* diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) ocorreu tanto na produção de carotenoides totais como na de clorofila-a entre os cultivos realizados nos meios Mod.III (3,5) e Mod.III (4,5) em relação aos demais meios de cultivo avaliados não foram constatadas diferenças relevantes. O uso deste meio de cultivo gerou na biomassa cultivada no meio Mod.III (4,5) concentrações desses pigmentos, carotenoides totais (2,79  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e clorofila-a (6,46  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), inferiores as observadas nas biomassas produzidas nos outros meios, principalmente no que diz respeito ao teor de clorofila-a presente nas amostras.

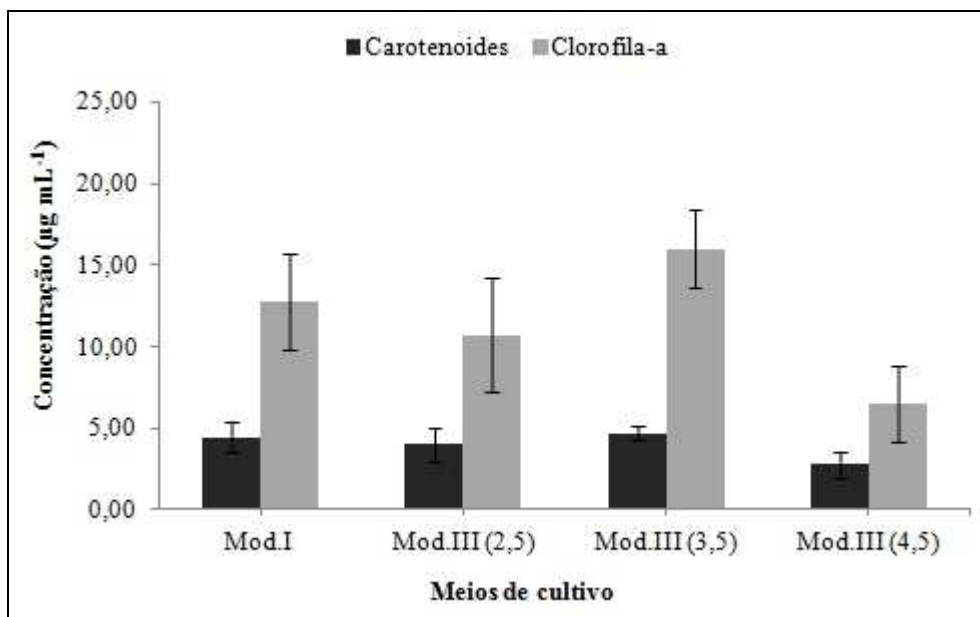


Figura 37 - Influência da concentração de Salitre do Chile nos meios de cultivo em relação a concentração de pigmentos na biomassa de *S. platensis*.

Já para *Spirulina maxima*, os dados apresentados no gráfico da Figura 38, mostram que a melhor resposta foi para o meio de cultivo Mod. I. Todavia, foi observado um aumento significativo nas concentrações dos pigmentos proporcional ao aumento de concentração de salitre nos meios Mod. III, o que promoveu para a concentração de 4,5 g L<sup>-1</sup> uma concentração de carotenoides totais (6,026  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) semelhante àquela observada no meio Mod. I (6,564  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), e de clorofila, uma concentração próxima chegando a (16,840  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

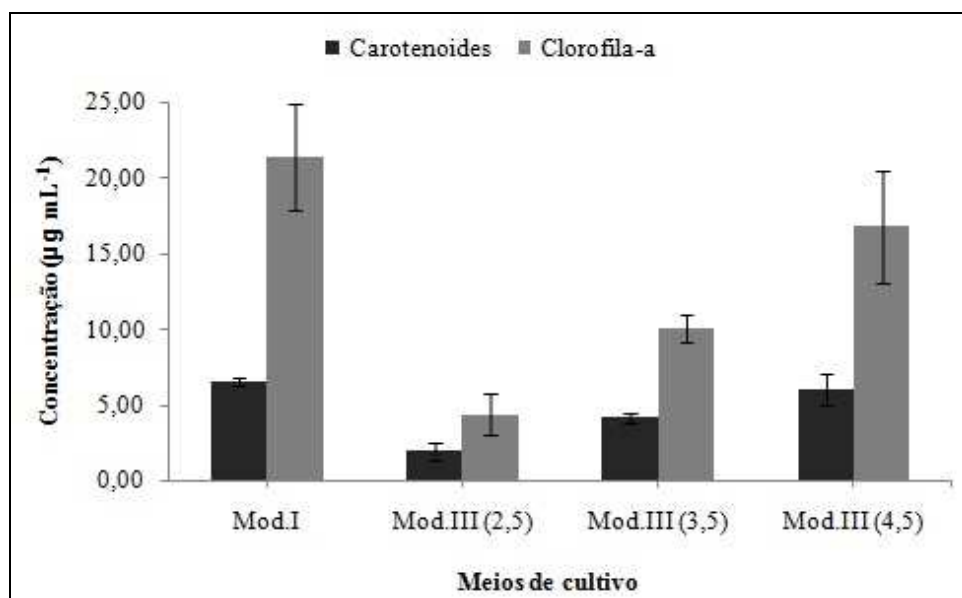


Figura 38 - Influência da concentração de Salitre do Chile nos meios de cultivo em relação a concentração de pigmentos na biomassa de *S. maxima*.

De modo geral, os resultados revelaram diferenças nas respostas entre as duas espécies avaliadas, principalmente no que tange à produção de seus pigmentos em resposta as diferentes concentrações de salitre do Chile avaliadas. A espécie *S. maxima* teve uma produção maior de pigmentos (carotenoides totais e clorofila) quando cultivada nos meios Mod.I e Mod III (4,5) e uma produção menor desses pigmentos quando cultivada no meio Mod. III (2,5). Levando-se em consideração que dentre as duas espécies de microalga avaliadas, os melhores resultados em termos de concentração de pigmentos e  $CB_f$  foram obtidos no cultivo de *S. platensis* nas concentrações mais baixas de salitre (2,5 e 3,5g L<sup>-1</sup>), optamos pela utilização dessa espécie e o seu cultivo em meio Mod. III (2.5), como uma estratégia para minimizar a relação custo/produção da biomassa, fazendo uso da mais baixa concentração de salitre do Chile e garantindo uma boa produção de carotenoides totais e clorofila a. Desta forma, para as próximas avaliações, focamos nossos estudos somente na espécie *S. platensis*.

#### **4.3. Avaliação do meio Mod. III (2,5) no cultivo de *S. platensis* em relação aos meios Zarrouk e RM6**

RAOOF *et al.*(2006), avaliaram diferentes meios de cultivo em relação ao meio Zarrouk, diminuindo a concentração de alguns sais, e substituindo outros de menor pureza, como por exemplo, o fertilizante agrícola superfosfato simples que foi utilizado em substituição a fonte de fosfato presente no meio Zarrouk. O autor relata um bom crescimento das células frente às modificações e apresenta o meio RM6 como o mais indicado para o cultivo de *Spirulina*. Entretanto, no período de aclimatação das células, ao utilizarmos o meio RM6, notamos que após sucessivos repiques a falta dos micronutrientes teve forte influência na produção dos pigmentos, principalmente na produção de clorofila-a. Os autores por sua vez, não relatam nenhum processo de aclimatação das células antes do experimento de avaliação, daí o provavelmente o sucesso deste meio, comentado no artigo.

Com o objetivo de obtermos um panorama geral do desempenho da *S. platensis* para os diferentes meios estudados, avaliamos os parâmetros TC e  $CB_f$ , assim como a concentração de seus pigmentos (carotenoides totais e clorofila a) quando cultivada nos meios Zarrouk, RM6, Mod.I e Mod.III (2,5). No gráfico da Figura 39 estão representados os dados de TC e  $CB_f$  obtidos para o cultivo de *S. platensis* em todos os meios analisados. Neste gráfico, podemos observar que o desempenho mais baixo, em termos de produção de biomassa ocorreu para o meio RM6. O meio Mod.III (2,5) teve um desempenho equivalente ao do meio Zarrouk, produzindo em relação aos meios modificados os melhores resultados. Diferenças significativas de TC foram encontradas apenas entre os meios RM6 (0,027 Dia<sup>-1</sup>) e Mod. III (2,5) (0,202 Dia<sup>-1</sup>).

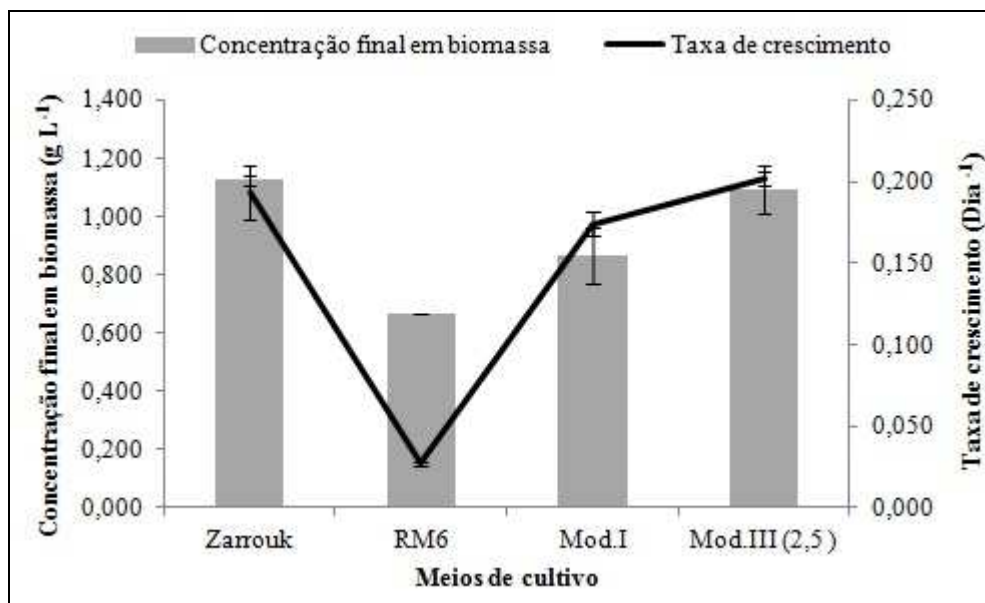


Figura 39 - Influência dos meios de cultivo em relação a taxa de crescimento e a concentração final em biomassa de *S. platensis*.

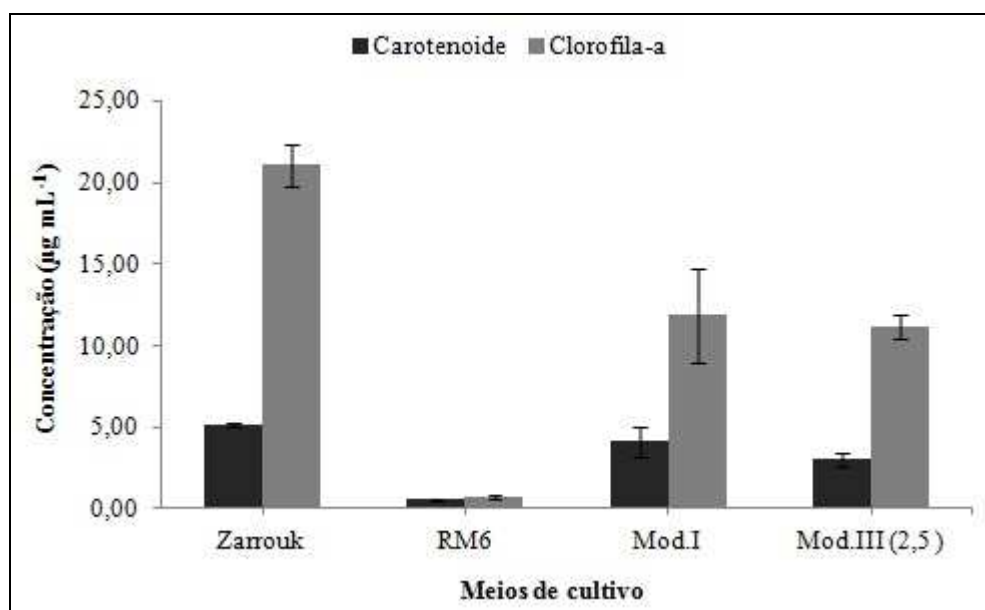


Figura 40 - Influência dos meios de cultivo em relação a concentração de pigmentos na biomassa de *S. platensis*.

Em termos de concentração de pigmentos podemos observar, no gráfico da Figura 40, um comportamento semelhante ao observado no gráfico da Figura 37, diferindo com relação à concentração de clorofila-a em meio Zarrouk, que foi bem superior a dos demais meios de cultivo. Analisando o conjunto de dados das Figuras 39 e 40, percebemos que, em comparação ao meio Zarrouk, obtivemos bons resultados tanto para o meio Mod. I quanto para o Mod.III (2,5) sendo que os resultados mais baixos tanto em relação aos parâmetros de avaliação do crescimento (TC e Cbf) quanto para os teores de pigmentos presentes na biomassa, foram observados para os cultivos realizados em meio RM6.

Analisando a Figura 41, fica notória a falta de clorofila-a nas células crescidas em RM6, que não tem micronutrientes, quando comparadas as células do cultivo controle crescido em Zarrouk (E). Entretanto, quando as células crescidas em meio Zarrouk são inoculadas em meio RM6 sem micronutrientes (B) foi observada se coloração da cultura próxima a da cultura cultivada em meio Zarrouk, provavelmente devido à origem do inóculo ser um meio que contém uma alta carga de nutrientes. Podemos evidenciar a importância destes micronutrientes, como por exemplo o magnésio que é fundamental para a formação da molécula de clorofila nas microalgas, quando observamos a imagem (D), onde cultura crescida em RM6 sem micronutrientes, ao ser inoculada no meio RM6 com micronutrientes, retoma a coloração verde-azulada. Com base nestas observações, e também nos resultados de pigmentos e concentração final em biomassa seca obtidos nos experimentos anteriores, podemos dizer que o processo de aclimação foi fundamental para a avaliação real do desempenho das células aos novos meios de cultivo, o que nos leva a acreditar que os resultados obtidos por RAOOF *et al*, (2006) possam ter influência da origem do inóculo, como observado no experimento descrito acima, além do mais verificamos que não há vantagens em excluir os micronutrientes da composição dos meios de cultivo, uma vez que estes se mostraram essenciais para o bom desempenho das células e não representam aumento expressivo no custo da confecção dos meios como apresentado na Tabela 5.

Com base nos resultados apresentados para o meio Mod. III (2,5) em comparação ao meio Zarrouk, meio RM6 e demais meios modificados utilizados neste estudo, além do fato de que o uso de salitre do Chile em substituição ao nitrato de sódio diminui sobremaneira o custo da confecção do meio Mod.III (2,5) frente aos meios que utilizam o nitrato de sódio (Tabela 2), podemos indicar o uso deste meio para os cultivos de *S. platensis* em escala de laboratório ou comercial, com vantagens de custos (cerca de dez vezes mais barato que o meio Zarrouk) na produção de biomassa e dos pigmentos clorofila e carotenoides.

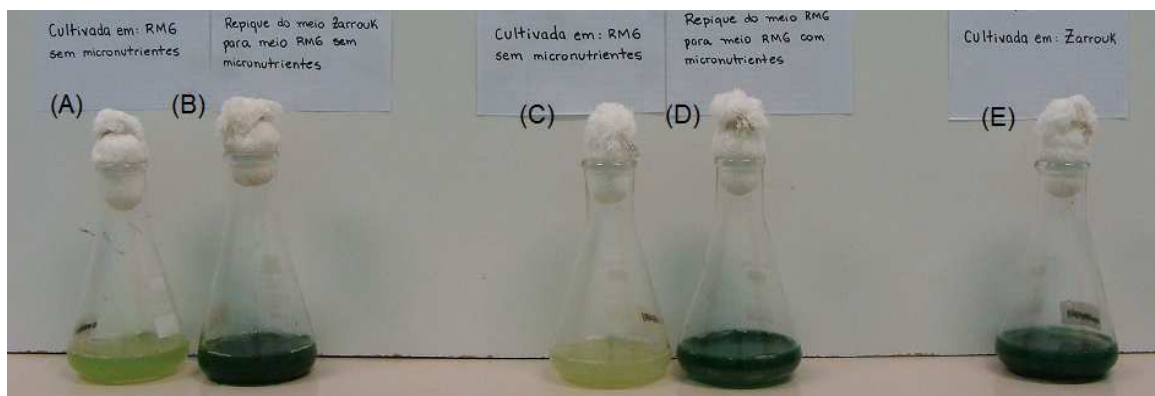


Figura 41 - Avaliação visual da interferência dos micronutrientes



Tabela 5 - Custo em reais (R\$) para o preparo de 1L dos meios de cultivo: Zarrouk, RM6 e Mod III (2,5).

Meio de Cultivo	Com micronutrientes	Sem micronutrientes
Zarrouk	0,30199	0,30198
RM6	0,10181	0,10179
Mod.III (2,5)	0,03180	0,03179

#### 4.4 Perfil de crescimento, peso seco da *S. platensis* cultivada no meio Mod. III (2,5) para a EFS

O gráfico da Figura 42 representa o perfil de crescimento da microalga *Spirulina platensis*, ao longo dos dias de cultivo no fotobiorreator de 12L adaptado para cultivo de geração da biomassa destinada a EFS, aos dados obtidos foi aplicada a função de S Gompertz para o ajuste dos pontos de dados.

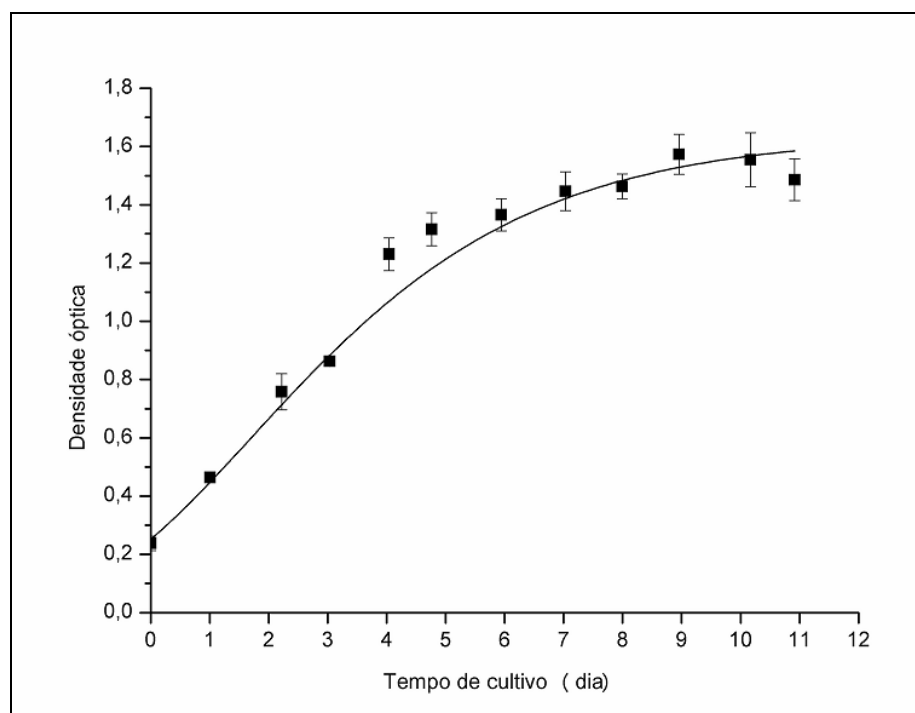


Figura 42 - Perfil de crescimento de *Spirulina platensis* cultivada em meio Mod. III (2,5) para a EFS.

O perfil de crescimento das células, observado na Figura 42, assim como os dados de concentração em biomassa final ( $1,28 \pm g L^{-1}$ ), indicam novamente um ótimo crescimento da microalga *Spirulina platensis* quando cultivada no meio Mod. III (2,5) apresentando valor levemente superior aos obtidos nos cultivos em menor escala ( $1,12 \pm g L^{-1}$ ), como pode ser constatado no gráfico da Figura 35.

#### 4.5 Extração com fluido supercrítico (EFS)

A série de experimentos preliminares apresentados a seguir foi realizada utilizando a biomassa de *Spirulina platensis* adquirida da empresa Brasil Vital®, com o objetivo de encontrarmos as melhores condições de extração dos pigmentos (clorofila-a e carotenoides totais). No gráfico da Figura 43 são representados os rendimentos de extração ( $R_{ext}$ %) do processo de extração com fluido supercrítico e os ajustes lineares de seus pontos, em duas condições isotérmicas.

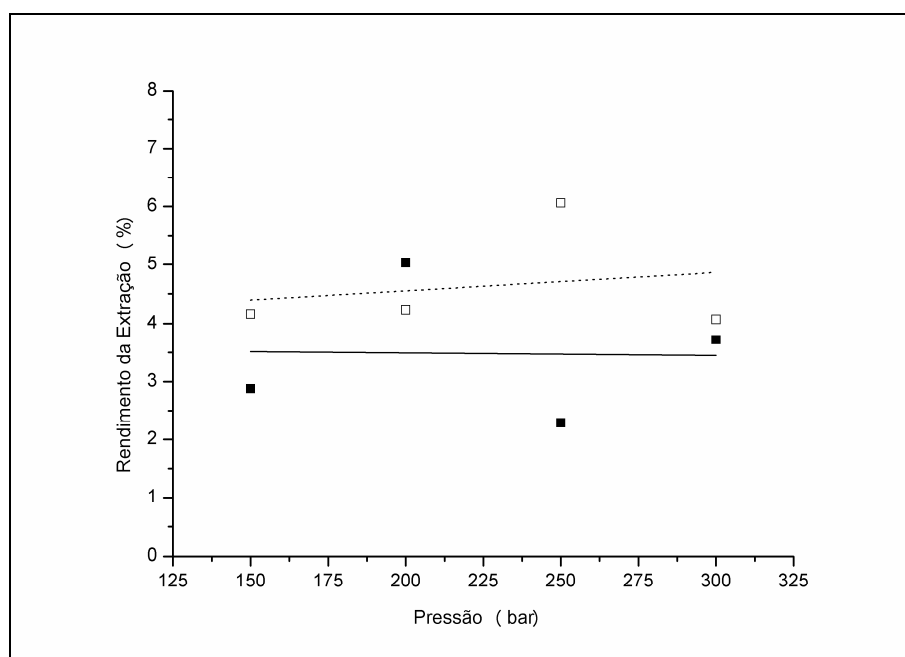


Figura 43 - Rendimento de extração em diferentes pressões e condições isotérmicas de 60°C (□) e 40°C (■).

Pode-se observar neste gráfico que a linha gerada pelo ajuste linear dos rendimentos de extração para a isoterma de 60°C foi superior à observada para a isoterma de 40°C, revelando um aumento da solubilidade do material extraído com relação à temperatura. Em relação à pressão, não fica muito claro se o rendimento de extração exibe alguma correlação.

Quantitativamente estes resultados estão em boa concordância, com os resultados de obtidos por TAHER *et al.*, 2014 para *Scenedesmus sp.*, que observaram rendimentos de 3,61 e 3,53 % na condição de extração de 200 bar a 35 e 65 °C respectivamente.

Com o objetivo de analisar as condições mais apropriadas da EFS entre as avaliadas, em termos de pressão e temperatura, para a extração de clorofila-a e de carotenoides totais, foram utilizados os resultados das concentrações destes pigmentos nos extratos obtidos após a solubilização do extrato da EFS com metanol. No gráfico da Figura 44, podemos observar as concentrações de carotenoides totais e de clorofila-a em diferentes pressões e nas temperaturas de 40 e 60 °C.

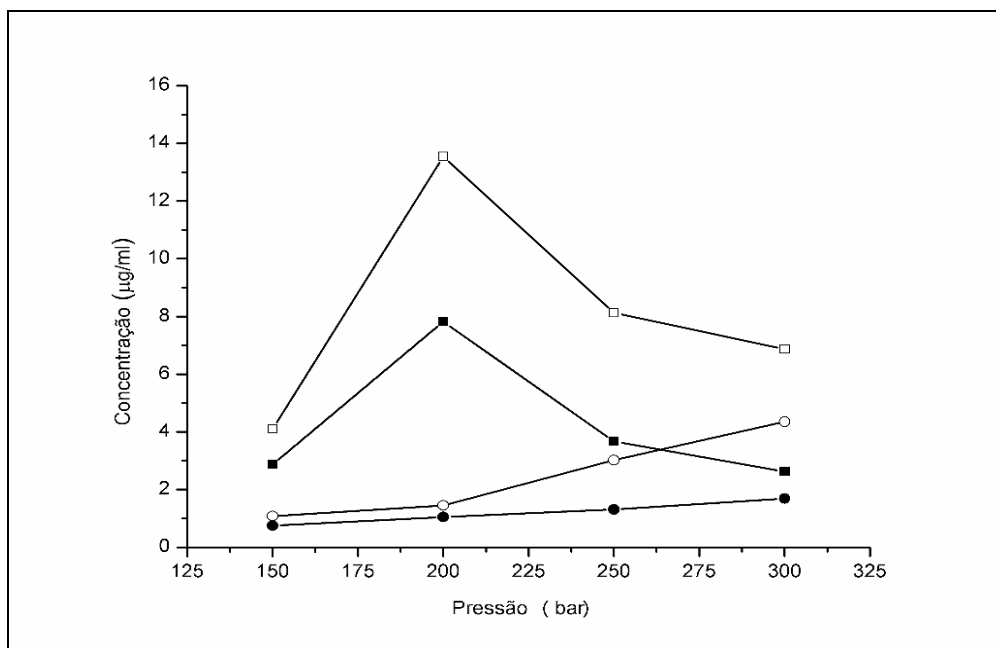


Figura 44 - Efeito da pressão sobre a concentração de carotenoides, 40 °C (■) e 60 °C (●) e clorofila-a, 40 °C(□) e 60 °C (○).

Analisando estes resultados, observamos que os maiores valores de extração, para ambos os pigmentos, foram obtidos na condição isotérmica de menor temperatura (40°C), com pico de extração para ambos os pigmentos em 200bar, resultados semelhantes para carotenoides foram obtidos por WANG *et al.*, 2007. Estes resultados indicam que esses pigmentos apresentam uma maior solubilidade ao CO<sub>2</sub> supercrítico na mais baixa temperatura, mas também não podemos descartar a possibilidade de a menor concentração encontrada a 60°C ter sido devido à degradação desses pigmentos, já observada em temperaturas superiores a 50°C (CANELA *et al.*, 2002; QUEROIS *et al.*, 2005)

Conforme o resultado da avaliação anterior, a extração na temperatura de 40°C e pressão de 200bar levará a uma maior extração de ambos os pigmentos, contudo, a fim de identificar a condição na qual clorofila-a e carotenoides totais tenham, cada um, a sua extração privilegiada em relação ao outro pigmento, foi calculado o rendimento percentual (R<sub>pig</sub>%) de cada um deles em relação à soma das massas de ambos. Na Figura 45, é notado que o aumento da pressão favoreceu a extração de clorofila-a, como observado por GUEDES *et al.* 2013 e desfavoreceu a extração de carotenoides em ambas as condições de temperatura estudadas.

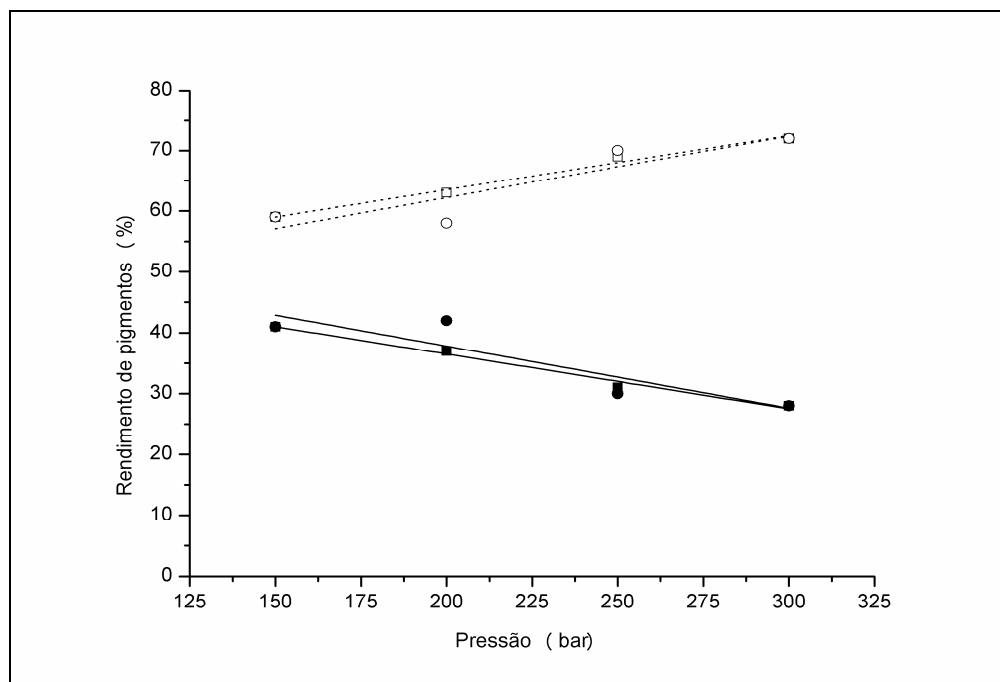


Figura 45 - Rendimento da extração por composto em relação à massa total dos pigmentos: carotenoides, 40 °C (■) e 60 °C (●) e clorofila-a, 40 °C (□) e 60 °C (○).

Essa diferença entre os  $R_{pig}\%$  de cada pigmento para as diferentes pressões possibilita a extração destes pigmentos em duas etapas como uma estratégia para obtenção dos dois compostos, com maior grau de pureza no extrato produzido, simplesmente pelo aumento da pressão de trabalho, após a extração do composto de rendimento maior a mais baixa pressão.

Os valores das concentrações de pigmentos obtidos nas extrações com fluido supercrítico foram comparados com os obtidos através do método de extração com solvente orgânico (metanol), apresentados na Tabela 6. Podemos notar que o maior valor de concentração do total de pigmentos (concentração de carotenoides totais somada a de clorofila-a),  $21,37\mu\text{g mL}^{-1}$ , referente à extração realizada a 200bar e 40°C, foi similar ao obtido através da extração realizada pelo método referência ( $24,48\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Contudo, a extração supercrítica apresentou valores de razão carotenoides totais/clorofila-a superiores ao apresentado pelo processo de extração por metanol, indicando uma alta seletividade do processo de EFS, já observado por outros autores (GUEDES *et al.* 2013, CRAMPON, *et al.* 2013). O controle dessa seletividade ocorre somente pela mudança de pressão, com a variação do  $R_{pig}\%$  em relação a concentração relativa de carotenóide, inversamente proporcional a pressão, e em relação a concentração relativa de clorofila-a, diretamente proporcional à pressão, como evidenciado pelos os ajustes lineares aos pontos de dados (Figura 45).

Tabela 6 - Comparação da EFS com a extração com metanol, em termos de concentração de pigmentos nos extratos e razão entre as concentrações de carotenóides totais e clorofila-a.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Vazão (L min <sup>-1</sup> )	Clorofila-a (µg mL <sup>-1</sup> )	Carotenóides	Razão Carot./Clorof.-a
40	150	5	4,10	2,87	0,70
40	200	5	13,55	7,82	0,58
40	250	5	8,13	3,67	0,45
40	300	5	6,87	2,62	0,38
60	150	5	1,08	0,76	0,70
60	200	5	1,45	1,05	0,73
60	250	5	3,02	1,31	0,43
60	300	5	4,35	1,69	0,39
<b>Processo de extração com metanol (100%)</b>			21,48	2,65	0,12

Fonte: Dados do autor

Após definida, através dos experimentos preliminares, a melhor condição de pressão e temperatura para extração dos pigmentos, foi dado início às extrações da biomassa de microalgas gerada no LABIM sob melhores condições de cultivo encontradas. Na Tabela 7 são apresentados os rendimentos obtidos no processo EFS realizado a 200bar e 40°C, com esta biomassa de *Spirulina platensis*, produzida em laboratório, e com a biomassa de *Spirulina platensis* adquirida comercialmente. O melhor  $R_{ext}$  % foi observado para a amostra produzida em laboratório chegando a 8,2%, que também apresentou o maior  $R_{pig}$  % em relação à extração de carotenóides (95,2%). Por outro lado, em relação à clorofila-a, o maior  $R_{pig}$  % foi obtido a partir da extração com a biomassa comercial, chegando a 63,4%.

Tabela 7 - Comparação entre os rendimentos de EFS obtidos com a biomassa produzida em laboratório e adquirida comercialmente na condição de 200 bar e 40 °C.

Biomassa	Rendimentos (EFS)		
	$R_{ext}$ %	$R_{pig}$ % CL-a	$R_{pig}$ % Carot
Comercialmente adquirida	5,0	63,4	36,6
Produzida em laboratório	8,2	4,8	95,2

Fonte : Dados do autor

Analisando os dados apresentados na Tabela 8, onde é feita uma comparação entre a extração com fluido supercrítico e a extração com metanol, para as duas biomassas, podemos

dizer que as maiores concentrações de pigmentos encontradas foram referentes ao uso da biomassa comercial, tanto nos extratos obtidos pelo processo EFS quanto aos obtidos pelo processo de extração com metanol, sendo uma exceção o resultado da extração dos carotenoides totais por metanol. Entretanto, nota-se que as extrações utilizando a biomassa gerada em laboratório apresentaram maior seletividade na extração dos carotenoides em relação à clorofila-a, principalmente quando comparamos o processo de EFS que demonstrou uma seletividade cerca de 40 vezes superior à seletividade encontrada com o uso da biomassa comercial.

Tabela 8 - Comparação entre a EFS (200bar e 40°C) e extração com metanol (P.A.).

Tipo de extração	Biomassa	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Razão
		Clorofila-a	Carotenoides	Carot./Clorof.-a
EFS	Comercialmente adquirida	13,55	7,82	0,58
	Produzida em laboratório	0,14	2,92	20,8
Extração com metanol	Comercialmente adquirida	21,48	2,65	0,12
	Produzida em laboratório	10,0	4,40	0,44

Fonte: Dados do autor

A eficiência da solubilização dos compostos em processos de extração depende da interação dos solventes com a matriz da qual se quer extraí-los; assim, as características da superfície sobre qual o solvente irá atuar interferem diretamente sobre a transferência de massa (CRAMPON *et al.*, 2011). Para a definição destas características se tem que levar em consideração não só o pré-tratamento dado à amostra antes do processo de extração, como também os processos de cultivo e pós-cultivo. Na Tabela 9, são apresentadas as particularidades relacionadas à cada biomassa, no que diz respeito aos processos de cultivo e pós-cultivo.

Tabela 9 - Comparação entre as principais etapas de cultivo e pós-cultivo aplicadas às biomassas estudadas.

Principais etapas	<i>Spirulina platensis</i>	
	Comercialmente adquirida	Produzida em laboratório
Sistema de cultivo	Tanque Raceway	Fotobiorreator
Meio de cultivo	Não informado pelo produtor	Mod.III(2,5)
Processo de separação	Filtração em tela de nylon	Filtração em tela de nylon
Secagem	Estufa com fulxo de ar. Temp < 40°C	Liofilização. Temp < -20°C

Fonte: Dados do autor

A biomassa adquirida comercialmente demandou um tempo de moagem muito maior do que a biomassa produzida em laboratório, provavelmente este fato se deve ao tipo de secagem ao qual a biomassa foi submetida, haja vista que a biomassa que passou pelo processo de secagem em estufa, estava muito mais compactada e rígida, o que dificultou o processo de redução do tamanho da amostra; a biomassa liofilizada, por sua vez, que por se encontrar mais "solta", rapidamente foi moída e reduzida a um pó fino. Portanto, a alta seletividade de extração dos carotenoides, verificada nas extrações com a biomassa produzida em laboratório, pode estar diretamente associada a diferentes formas de processamento principalmente em relação aos modos de secagem, onde até mesmo a variações de temperatura dentro de um mesmo processo de secagem, interferem na nas características do material final obtido (DESMORIEUX & HERNANDEZ, 2004).

Com o objetivo de observar a estrutura morfológica da biomassa, antes e após os diferentes processos de extração, foram realizadas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das diferentes amostras de biomassa estudadas. As imagens de MEV das Figuras 46 mostram grandes diferenças quando comparadas as biomassas, produzida em laboratório antes (Figura 46 A) e pós os processos de extração com metanol (P.A) (Figura 46 B) e com CO<sub>2</sub> supercrítico (Figura 46 C) e a biomassa comercialmente adquirida da Brasil Vital®, antes (Figura 46 D) e pós os processos de extração com metanol (P.A) (Figura 46 E) e com CO<sub>2</sub> supercrítico (Figura 46 F).

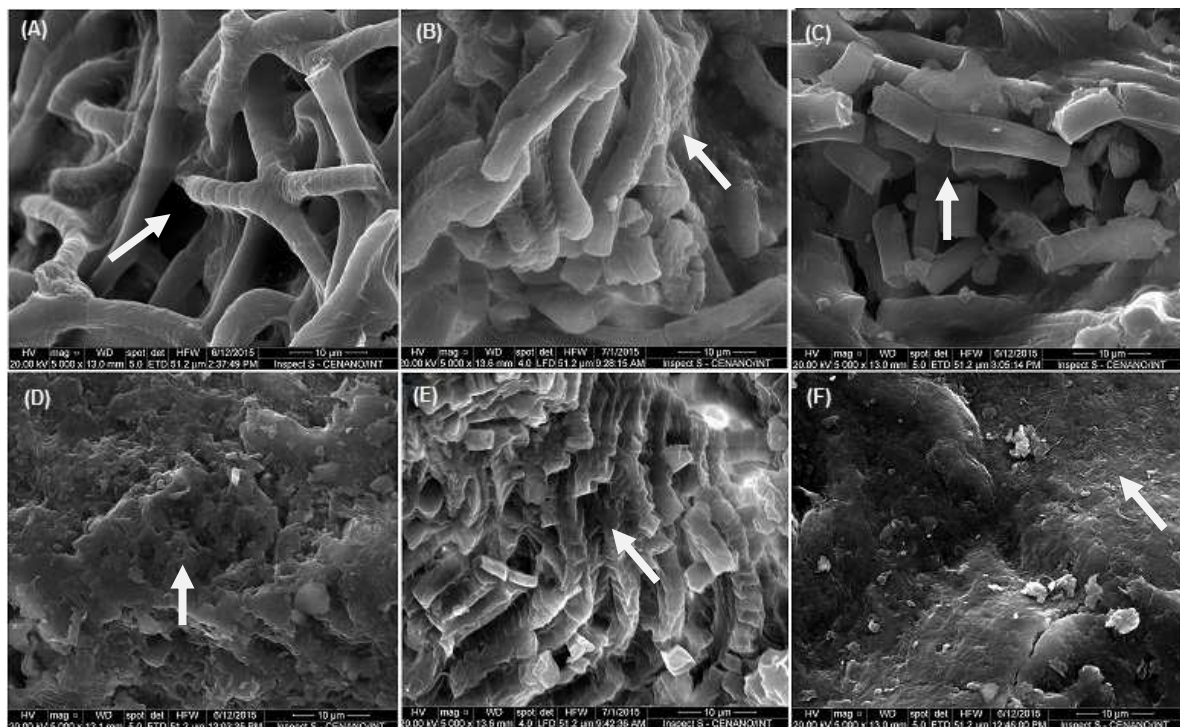


Figura 46 - Imagens em MEV no aumento de 5000X: biomassa de *Spirulina platensis* produzida em laboratório antes (A) e após os processos de extração com metanol (P.A.) (B) e EFS (C), e biomassa de *Spirulina platensis* comercial antes (D) e após os processos de extração com metanol (P.A.) (E) e EFS (F).

Comparando as imagens A e C podemos perceber que, após sofrer o processo de EFS, as células não sofreram grandes modificações nota-se somente um aumento no volume das células assim como o rompimento de algumas estruturas decorrente do efeito da alta pressão. Já para a extração com metanol, através da análise das Figuras 46 A e B, podemos visualizar claramente as características morfológicas da *Spirulina platensis* cultivada em laboratório, antes do processo de extração (Figura 46 A), sendo possível visualizar até mesmo as unidades celulares individualmente. Após o processo de extração com solvente orgânico (Figura 46 B), fica nítida a ação danosa sobre as células, sendo possível perceber que além do aumento do tamanho das células, houve a ruptura da parede celular em vários pontos, sendo visível extravasamento do conteúdo intracelular, como indicado pela seta. Ao compararmos as imagens D e E, correspondentes a biomassa comercial podemos notar novamente alterações morfológicas na amostra analisada pós-extração com metanol (P.A.), indicando a forte influência deste solvente sobre as características morfológicas da amostra.

Observando as imagens A e D da Figura 46, é possível notar que a biomassa comercialmente adquirida (Figura 46 D), antes mesmo da extração supercrítica, já apresentava estruturas amorfas muito diferentes da biomassa produzida em laboratório (Figura 46 A) que revelou claramente as estruturas em forma de tricomas normalmente observadas para *Spirulina* spp. (VONSHAK, 2002); provavelmente esta perda estrutural da biomassa comercial se deve a fatores ligados ao processo pós-cultivo, especialmente à secagem, que aliada ao tratamento de moagem dado a amostra, no laboratório antes da extração, pode ter danificado as estruturas celulares das microalgas através da ação mecânica sobre as células promovida pelo moinho, por fim descaracterizando a morfologia da amostra.

Comparando as imagens D e F, foi possível observar que, após ter sido submetida à pressão elevada no processo de extração (EFS), a biomassa residual da extração com a amostra comercial apresentou-se compactada, mas sem grandes modificações. Por outro lado, a imagem C evidencia que o processo de secagem por liofilização preservou mais as estruturas celulares, sendo possível notar a característica cilíndrica das células de *Spirulina*, que formam os tricomas (VONSHAK, 2002). Sabe-se da literatura que o processo de liofilização justamente por preservar a estrutura das células, limita a transferência de massa através da membrana das células, sendo esta comandada pelo processo de difusão (CRAMPON et al. 2013) o que pode ter contribuído para a alta seletividade observada no processo EFS utilizando a biomassa produzida em laboratório.

Analisando as imagens da Figura 46, de modo geral, percebemos com perfeição, a excelente característica do processo EFS em preservar as células durante a ação do solvente, que por apresentar alta difusibilidade passa através das células com facilidade, mantendo, no entanto, um alto poder de solvatação em função de sua de densidade no estado supercrítico.



## 5 CONCLUSÕES

- Cultivo das microalgas

Com relação aos experimentos de cultivo, podemos perceber que o processo de aclimação foi fundamental para os resultados de crescimento e produção de pigmentos na biomassa, e que a não realização desta etapa pode levar a um falso resultado da avaliação do desempenho das células no meio de cultivo.

- Meio de cultivo

Os resultados de comparação entre os meios de cultivo apontam o meio Mod.III (2,5) como um potencial meio de cultivo para uso em escala laboratorial e até mesmo para cultivos em escala comercial, garantindo uma ótima produção de biomassa de *Spirulina platensis* em um curto espaço de tempo, rica em pigmentos e com redução de custos de até 10 vezes em relação ao meio Zarrouk.

- Extração supercrítica

Analisando os resultados de EFS apresentados, de maneira geral, podemos concluir que a obtenção de compostos de alto valor comercial da biomassa de microalgas via fluido supercrítico, mostrou ser uma técnica bastante eficiente, possibilitando a extração dos pigmentos de forma muito seletiva, mantendo a integridade das células após a extração.

- Alta seletividade

O comportamento da extração dos pigmentos, em relação à variação da pressão, indica a possibilidade de uma extração em duas etapas devido à alta seletividade observada no processo de extração supercrítica, que variou entre os pigmentos em função da pressão. Com o uso das diferentes biomassas, foi observado que a seletividade está diretamente ligada aos processos cultivo e pós-cultivo por elas sofridos, principalmente no que diz respeito ao processo de secagem e ao tratamento da amostra antes do processo de extração.

Para que se tenha a maior eficiência de extração, além da otimização do processo como um todo é necessário que se conheça bem a origem da matéria-prima utilizada, os processos de cultivo e pós-cultivo a qual a mesma foi submetida, analisando o processo produtivo dos compostos de interesse de forma holística, levando em consideração todos os aspectos desde a produção da biomassa a ser utilizada, até a obtenção do produto final desejado.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Aprofundar os estudos utilizando o meio Mod.II a fim de diminuir as etapas de filtração, facilitando as processo de preparo do meio de cultivo e contribuindo ainda mais com a redução dos custos, principalmente visando seu uso em cultivos em escala comercial.
- ✓ Aprofundar os estudos termodinâmicos, buscando aumentar a eficiência do processo de extração supercrítica, através do estudo dos parâmetros cinéticos da extração, bem como da modelagem do processo dentro das faixas de pressão e temperatura avaliadas neste trabalho.
- ✓ Desenvolvimento de um sistema de cultivo de baixo custo e de alta eficiência em produção de biomassa, capaz de operar nas mesmas condições de cultivo avaliadas neste trabalho, para a geração de uma biomassa rica em compostos de interesse comercial e a alta produtividade, a fim de integrar o processo de obtenção de compostos de alto valor como um todo e de forma estratégica, garantindo o uso da biomassa microalgal como matéria prima em determinados setores da indústria.
- ✓ Determinar a pureza dos produtos produzidos, bem como o perfil de co-produtos gerados durante os processos de produção da biomassa e extração com fluido supercrítico, visando o uso da biomassa residual não só para a composição de ração animal mas também para alimentação humana.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHSAN, M.; HABIB, B; PARVIN, M; HUNTINGTON, C; HASAN, R. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food humans and feeds for domestic animals and fish FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034, 33 p. 2008.

ALI, E. A. I; BARAKAT, B. M.; HASSAN, R. Antioxidant and Angiostatic Effect of *Spirulina platensis* in Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritis in Rats, PLoS ONE, 10, 1-13, 2015.

ALMEIDA, G.M.D. *Rhodotorula* spp. Isolada de hemocultura no hospital das clínicas da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo: Características clínicas e microbiológicas. Tese de doutorado em Ciências, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2005.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings, Revista Nutrição, 13 (2), p. 81-88, 2000.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2009. Decreto nº. 55.871/65 de 26 de março de 1965.

ARAÚJO. M. E. Estudo Do Equilíbrio De Fases Para Sistemas Óleo Vegetal/Dióxido de Carbono Empregando Equações de Estado Cúbicas, 308p. Tese de Doutorado Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, 1997.

BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, Great Britain, 181, p. 1994.

BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue green alga *Spirulina* in India. Biomass, v. 4, n. 2, p. 105-125, 1994.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*, J. Appl. Phycol., 5, p. 235-241, 1993.

BELAY, A. The potential of *Spirulina* (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management, J. Amer. Nutraceutical Association, 5 (2), p. 27-48, 2002.

BASEGGIO, G. Indicações Técnicas sobre Farinhadas, Revista Pássaros, 27, p. 44-46, 2001.

BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. Atlântica, Rio Grande, v. 29, n.1, p. 35-46, 2007.

BOROWITZKA, M. A. Fats, oils and hydrocarbons. Cambridge University Press, Cambridge, p. 257–287, 1988.

BROWN, M. R.; MULAR, M.; MILLER, I.; FARMER, C.; TRENERRY, C. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. Journal of Applied Phycology, v. 11, p. 247–255, 1999.

BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and Applications to Separation Processes, 1ª Edição, Steinkopff Darmstadt, New York, Springer, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical Fluids: Technology and Application to Food Processing. J. Food. Eng, 67, p. 21-3, 2005.

CANELA, A.; ROSA, P. T.; MARQUES, M. O.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of fatty acids and carotenoids from the microalgae *Spirulina maxima*. Industrial & engineering chemistry research, 41(12), p. 3012-3018, 2002.

CARVALHO, P. R. Aditivos dos alimentos. Revista Logos, 12: p. 57-69, 2005.

CHACÓN-LEE, T. L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “Healthy” Foods — Possibilities and Challenges. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 9, n. 6, p. 655-675, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from Microalgae. Biotechnology Advances, v. 25, p.294. 2007.

CHOI, H.J., LEE, S.M. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. Bioprocess and biosystems engineering, p. 1-6, 2014.

CHOJNACKA, K.; MARQUES-ROCHA, F. J. Kinetic. Stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the cultura of microalgae. Biotechnology. v.3, n. 1, p. 21 – 34. 2004.

CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behavior of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/72water interface. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. v. 173, p. 181-192, 2000.

CONSTANT, P. B.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. Boletim do CEPPA, 2 (20): 203-220, 2002.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing, 48, 1146-1151, 2009.

CRAMPON, C.; BOUTIN, O.; BADENS, E. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Molecules of Interest from Microalgae and Seaweeds. Ind. Eng. Chem. Res., 50, p. 8941-8953, 2011.

CRAMPON, C.; MOUAHID, A.; TOUDJI, S. -A. A.; LÉPINE, O.; BADENS, E., 2013. Influence of pretreatment on supercritical CO<sub>2</sub> extraction from *Nannochloropsis oculata* J. Supercrit. Fluids, 79, p. 337-344, 2013.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Biomass and Bioenergy, v. 26, n. 4, p. 329-335, 2004.

DERNER, R. B.. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 158 p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DERNER, R. B., S. OHSE, M. VILLELA, CARVALHO, S. M.; R. FETT. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 6, n. 36, p. 1959 -1967. 2006.

DESMORIEUX, H., HERNANDEZ, F. Biochemical and physical criteria of *Spirulina* after different drying processes. In: Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS), B, p. 900–907, 2004.

DEVANATHAN, J., RAMANATHAN, N. Pigment production from *Spirulina platensis* using sea water supplemented with dry poultry manure. *J. Algal Biomass Utln.* 3 (4), p. 66- 73. 2012.

DUARTE, I. C. S. Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales). Rio Claro. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista 2001.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C. & RAVISHANKAR, G. A. Microorganism and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Food Science & Technology*, 16: 389- 406, 2005.

FAUCHER, O.; COUPAL B.; LEDUY, A. Utilization of sea water and urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. *Canadian Journal of Microbiology.* 25, 752, 1979.

FONTANA J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F. & PASSOS, M. Carotenoides: cores atraentes e ação biológica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 13: 40-45, 2000.

GAMI, B.; NAIK, A.; PATEL, B. Cultivation of *Spirulina* species in different liquid media. *J. Algal Biomass Utln*, 2 (3): 15-26, 2011.

GIL-CHÁVEZ, J.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA, F. J.; HEREDIA, B. J.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E.M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 12, 5-23, 2013.

GOUVEIA, L.; NOBRE, B.P.; MARCELO, F.M.; MREJEN, S.; CARDOSO, M.T.; PALAVRA, A.F.; MENDES, R.L. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry*, 101, p. 717-723, 2007.

GIL-CHAVEZ GJ, VILLA JA, AYALA-ZAVALA JF, HEREDIA JB, SEPULVEDA D, YAHIA, EM, GONZALEZ-AGUILAR GA. 2013. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 12:5–23.

GROSS, M., HENRY, W., MICHAEL, C., WEN, Z. Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. *Bioresource Technology*, 150, 195-201, 2013.

GUEDES, A. C., GIÃO, M. S., MATIAS, A. A., NUNES, A. V. M., PINTADO, M. E., DUARTE, C. M. M., & MALCATA, F. X. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, band c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing. *Food Bioprocess Technology*, 116 (2), 478-482, 2013.

GUZMAN, D. Value of carotenoids sector to cross billion dollar mark. *Chemical Market Report*, 268 (1): 33. 2005.

HANDLER, R.M., CANTER, C.E., KALNES, T.N., LUPTON, F.S., KHOLIQOV, O., SHONNARD, D.R., BLOWERS, P. Evaluation of environmental impacts from microalgae cultivation in open-air raceway ponds: Analysis of the prior literature and investigation of wide variance in predicted impacts. *Algal Research*, 1(1), 83- 92, 2012.

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Free Radical Research*, v.25, n.3, p.247-257, 1996.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. *Appl. Energy*, v.88, p.3336. 2011.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B. R.; NIELL, F. X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture*, v. 221, p. 331-345, 2003

JUKIĆ, Dragan; KRALIK, Gordana; SCITOVSKI, Rudolf. Least-squares fitting Gompertz curve. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, v. 169, n. 2, p. 359-375, 2004.

KAPOOR, M.; BEG, Q.K.; MAHAJAN, L. & HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 326 – 338. 2001.

KEBEDE, E.; AHLGREN, G. Optimum growth conditions and light utilization efficiency of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) (Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. *Hydrobiologia*, Boston, v.332, p.99-109, 1996.

KENT, M.; WELLADSEN, H. M.; MANGOTT, A.; LI, Y.; Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements *PLoS One*, 10, 1-14, 2015.

KUDDUS, M. P.; SINGH, G. THOMAS, AND AWDAH AL-HAZIMI.; Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin *Corporation BioMed Research International*, v 2013, 1-9, 2013.

Kumar, N.; Singh, S.; Patro, N.; Patro, I.; Evaluation of protective efficacy of *Spirulina platensis* against collagen induced arthritis in rats. *Inflammopharmacology*, 17, 181-190, 2009.

- LACAZ-RUIZ, R. Utilização de meios de cultura a base de solução de cinzas, efluente da indústria cítrica e meios de cultura alternativos formulados através de programa específico de computação para cultivo de *Spirulina platensis* (Norst.). Rio Claro, 133 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1996.
- LEE, YUAN-KUN. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, v. 13, p. 307-315, 2001.
- LEE, B. K.; PARK, N. H.; PIAO, H. Y. & CHUNG, W. J. Production of red pigments by *Monascus purpureus* in submerged culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6: 341-346, 2001.
- Li, L., Zhao, X., Wang, J., Muzhingi, T., Suter, P. M., Tang, G., & Yin, S. A. Spirulina can increase total-body vitamin A stores of Chinese school-age children as determined by a paired isotope dilution technique. *Journal of nutritional science*, 1, e19, 2012.
- LICHTENTHALER, H.K.; Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes, *Methods Enzymol.*, 148, 350-382, 1987.
- LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RIMA, 606 p., 2006.
- Ma, L.; Dolphin, D.; The metabolites of dietary chlorophylls. *Phytochemistry*, 50, p. 195-202, 1999.
- MAESTRIN, A.P.J.; NERI, C.R.; OLIVEIRA, K.T; SERRA, O.A.; IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1670-1672, 2009.
- MALDONADE, I.R. Produção de carotenoides por leveduras. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos da UNICAMP. Campinas. 2003.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, p. 217-232. 2010.
- MARKETS AND MARKETS, Carotenoids Market by Type (Astaxanthin, Beta-Carotene, Canthaxanthin, Lutein, Lycopene, & Zeaxanthin), Source (Synthetic and Natural), Application (Supplements, Food, Feed, and Cosmetics), & by Region - Global Trends & Forecasts to 2019. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carotenoid-market-158421566.html>> Acesso em: 05 de julho de 2015.
- MCHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice, 2nd Ed., Butterworth-Heinemann, 1994.
- MENDES, R. L.; NOBRE, B.; CARDOSO, M.; PEIREIRA, A.; PALAVRA, A. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae *Inorganica Chimica Acta.*, 356, 328-334, 2003.

MEYERS, S.P. Developments in world aquaculture, feed formulation and role of carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 66: 1069 – 1976. 1994.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, v.110, p.85-93, 2004.

MOAZAMI, NASRIN, ALIREZA ASHORI, REZA RANJBAR, MEHRNOUSH TANGESTANI, ROGHIEH EGHTESEADI, AND ALI SHEYKHI NEJAD. Large-scale Biodiesel Production Using Microalgae Biomass of *Nannochloropsis*, *Biomass and Bioenergy*, 39 (April), p. 449–453, 2012.

MOSTAFA, SOHA S M. *Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications*, Intech., 12, 275-314, 2012.

NIU, JIAN-FENG; WANG, GUANG-CE; LIN, XIANG-ZHI; ZHOU, BAI-CHENG. Large scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 850, p. 267-276, 2007.

NUNNERY, J. K.; MEYERS, E.; GERWICK, W. H. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 2010.

NURRA, C., CLAVERO, E., SALVADÓ, J., TORRAS, C. Vibrating membrane filtration as improved technology for microalgae dewatering. *Bioresource Technology*, 157(0), 247-253, 2014.

OLAIZOLA, M.; DUERR, E. O. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, v.2, n.2, p.97-104, 1990.

OLIVEIRA, W. C.; OLIVEIRA, C. A.; GALVÃO, M. E. M.C.; CASTRO, V. C.; NASCIMENTO, A. G. Cianobactérias: uma revisão sobre potencial nutricional e alguns aspectos biotecnológicos. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, 2, 49-67. 2013

OLIVEIRA, M. A. C.; MONTEIRO, L M. P. C.; ROBBS, P. G.; LEITE, S. G. F. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*, v. 7, n. 4, p. 261-275. 1999.

PALIŃSKA K.A.; KRUMBEIN W.E.; Perforation patterns in filamentous cyanobacteria. *Journal of Phycology* 36, p. 139-145, 2000.

PINERO ESTRADA, J. E.; BERMEJO BESCOS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *IL Farmaco*, v. 56, p. 497-500, 2001.

PLAVŠIĆ, M.; TERZIC, S.; AHEL, M.; VAN DEN BERG, C. M. G. Folic acid in coastal waters of the Adriatic Sea. *Marine and Freshwater Research*, v. 53, n. 8, p. 1245-1252, 2002.



PRAGYA, N., PANDEY, K.K., SAHOO, P.K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24(0), p. 159-171, 2013.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

QUEROIS, M. I.; LOPE, E. J.; ZEPKA, L. Q.; MITTERER, M. L.; GOLDBECK, R.; PINTO, L. A.; TREPTOW, R. O. Avaliação da cor da cianobactéria *Aphanothece microscopica nageli* em diferentes condições de secagem, *Vetor*, Rio Grande, 15, p. 33-40. 2005

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, v 92, p. 133-141, 2004.

RAOOF, B., KAUSHIK, B. D.; PRASANNA, R. Formulation of a low- cost medium for mass production of Spirulina. *Biomass and Bioenergy* 30, p. 537-542, 2006.

RATHA, S.K., PRASANNA, R. Bioprospecting microalgae as potential sources of "Green Energy"-challenges and perspectives (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(2), p. 109-125, 2012.

RAVEN, J. A. Sensing pH? *Plant, Cell and Environment*, v.13, p.721-729, 1990.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. *Biologia vegetal*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 906p. 2001.

REVIERS, B. *Biologia e filogenia das algas*. Tradução: Iara Maria Franceschini. 280 p. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RIBEIRO, B. D. Aplicação de tecnologia enzimática na obtenção de  $\beta$ -caroteno a partir de óleo de buriti (*Mauritia vinifera*). Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

RICHA, R. P.; RASTOGI, S.; KUMARI, K. L.; SINGH, V. K.; KANNAUJIYA, G.; SINGH, M.; KESHERI, R. P. Biotechnological Potential of Mycosporine-like Amino Acids and Phycobiliproteins of Cyanobacterial. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*, v. 1, n. 2, p. 159-171, 2011.

RICHMOND, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p.

ROSSI, F., OLGUÍN, E.J., DIELS, L., DE PHILIPPIS, R. Microbial fixation of CO<sub>2</sub> in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification. *New Biotechnology*, 1, 109-119, 2014.

RUYTERS, G. Effects of blue light on enzymes. In: *BLUE light effects in biological systems*. Berlin: Springer-Verlag., p. 283-301, 1984.

SANTOS, G. M.; de MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p. 17-21, 2003.

SANTOS, M. M.; BOSS, E. A.; MACIEL FILHO, R. Supercritical extraction of oleaginous: Parametric sensitivity analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, São Paulo, v. 17, n. 4-7, Dez. 2000.

SARKER, P. K.; GAMBLE, M. M.; KELSON, S.; KAPUSCINSKI, A. R.; Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients *Aquacult. Nutr.* (2015), doi: 10.1111/anu.12230.

SASSON, A. Micro Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries. BIOTEC Publication 1/2542. pp. 11–31. Place de Fontenoy, Paris. France. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO).1997.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. *Revista CIATEC – UPF*, v.4, n. 1, p.48-60, 2012.

SHIFRIN, N. S.; CHISHOLM, S. W. Phytoplankton lipids: inespecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles. *Journal of Phycology*, v.17, p.374-384. 1981.

SIERRA, E., ACIÉN, F.G., FERNÁNDEZ, J.M., GARCÍA, J.L., GONZÁLEZ, C., MOLINA, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 138(1–3), 136-147, 2008.

SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 2004.

SILVIERA, S.T., BURKERT, J.F.M., COSTA, J.A.V., BURKERT, C.A.V.; KALIL, S. J.; Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Biores Technol* 98, p. 1629-1634, 2007.

SINGH, R.N., SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2347-2353, 2012.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *J. Bioscience and Bioengineering*, v. 101, No. 2, p. 87-96, 2006.

SUKENIK, A.; CARMELI, Y. Lipid synthesis and fatty acid composition in *nannochloropsis* sp (*Eustigmatophyceae*) grown in light-dark cycle. *Journal Phycology*, v. 26, p. 463–469. 1990.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. HAIK, Y.; FARID, M.; TARIQ, S. Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up, *Journal of Supercritical Fluids*, 86, 57-66, 2014.

TATSCH, P. O. Produção de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, 2008.

TEIXEIRA, C.M.L.L.; KIRSTEN, F.V.; TEIXEIRA, P.C.N. Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 24, p. 557-563, 2012.

TEO, C.L., ATTA, M., BUKHARI, A., TAISIR, M., YUSUF, A.M., IDRIS, A. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource Technology*, 162, p. 38-44, 2014.

UENOJO, M.; MARÓSTICA, M. R. J & PASTORE, G. M. Carotenóides: Propriedades, aplicações e biotransformação para a formação de compostos de aroma. *Química Nova*, 3(30): p. 616-622, 2007.

UGWU, C.U., AOYAGI, H., UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), p. 4021-4028, 2008.

UMINO, Y.; SATOH, A.; SHIRAIWA, Y. Factors controlling induction of external carbonic anhydrase and charge in K<sub>1/2</sub> (CO<sub>2</sub>) of photosynthesis in *C. vulgaris*. *Plant and Cell Physiology*, v. 32, p. 379-384, 1991.

VALDUGA, E. Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. 2005. 200 f. Tese de Doutorado em Engenharia Química, do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGERMANN, L.; TREICHEZ, H.; TONIAZZO, G. ZENI, J. LUCCIO, M. & JÚNIOR, A.F. Produção de carotenoides: micro-organismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova*, 32 (9). p. 2429-2436. 2009.

VASCONCELLOS, C. M. C. Extração Supercrítica dos Óleos Voláteis de *Achyrocline satureioides* (Marcela) e *Vetiveria zizanioides* (Vetiver): Determinação da Cinética de Extração e Estimativa de Custos de Manufatura. 2007, 144p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

VERÍSSIMO, S. A.; OLIVEIRA, E. L.; LADCHUMANANANDASIVAM, R.; AQUINO, M. S.; ALEXANDRE, M. E. O. Aproveitamento do corante natural (Bixa orellana) no tingimento de fibra celulósica. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 2, p. 35-39, 2008.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology: Bristol 2002, cap.1.

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction, *Food Chemistry*, 105, p. 36-41, 2007.

WU, Z., ZHU, Y., HUANG, W., ZHANG, C., LI, T., ZHANG, Y., LI, A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technology*, 110(0), p. 496-502, 2012.

YEN, H.-W.; YANG, S.-C.; CHEN, C. -H.; JESISCA; CHANG, J.-S. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass, *Bioresour. Technol.* 2014, doi:10.1016/j.biortech.2014.10.030.

YOSHIDA, A.; TAKAGAKI, Y.; NISHIMUNE. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of spirulina color in foods, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 60, p. 57-60. 1996

## Anexos

### **Anexo1. Resultados estatísticos referente ao tópico - Avaliação do crescimento e produção de carotenoides e clorofila de *S. platensis* e *S. máxima* cultivadas nos meios Mod. I e Mod.III.**

Resultados estatísticos para taxa de crescimento (TC) - <i>Spirulina maxima</i>				
H =	11,6361			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0087			
R 1 = Mod.I	16			
R 2 = Mod.III (2,5)	75			
R 3 = Mod.III (3,5)	53			
R 4 = Mod.III (4,5)	66			
R 1 (posto médio) =	3,2			
R 2 (posto médio) =	15			
R 3 (posto médio) =	10,6			
R 4 (posto médio) =	13,2			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	11,8	3,1537	2,635	< 0.05
Postos médios 1 e 3	7,4	1,9777	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	10	2,6726	2,635	< 0.05
Postos médios 2 e 3	4,4	1,1759	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	1,8	0,4811	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	2,6	0,6949	2,635	ns

Fonte: dados do autor.

---

**Resultados estatísticos para concentração de biomassa final (CBf) - *Spirulina maxima***

---

H =	8,4171
Graus de liberdade =	3
(p) Kruskal-Wallis =	0,0381
R 1 = Mod.I	20
R 2 = Mod.III (2,5)	68
R 3 = Mod.III (3,5)	57
R 4 = Mod.III (4,5)	65
R 1 (posto médio) =	4
R 2 (posto médio) =	13,6
R 3 (posto médio) =	11,4
R 4 (posto médio) =	13

Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	9,6	2,5657	2,635	ns
Postos médios 1 e 3	7,4	1,9777	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	9	2,4054	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	2,2	0,588	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	0,6	0,1604	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	1,6	0,4276	2,635	ns

---

Fonte: dados do autor.

---

**Resultados estatísticos para concentração de clorofila-a - *Spirulina maxima***

---

H =	17,3314			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0006			
R 1 = Mod.I	15			
R 2 = Mod.III (2,5)	88			
R 3 = Mod.III (3,5)	40			
R 4 = Mod.III (4,5)	67			
R 1 (posto médio) =	3			
R 2 (posto médio) =	17,6			
R 3 (posto médio) =	8			
R 4 (posto médio) =	13,4			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	14,6	3,902	2,635	< 0.05
Postos médios 1 e 3	5	1,3363	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	10,4	2,7795	2,635	< 0.05
Postos médios 2 e 3	9,6	2,5657	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	4,2	1,1225	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	5,4	1,4432	2,635	ns

---

Fonte: dados do autor.

---

**Resultados estatísticos para concentração de carotenoides - *Spirulina maxima***

---

H =	16,3029			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,001			
R 1 = Mod.I	15			
R 2 = Mod.III (2,5)	82			
R 3 = Mod.III (3,5)	40			
R 4 = Mod.III (4,5)	73			
R 1 (posto médio) =	3			
R 2 (posto médio) =	16,4			
R 3 (posto médio) =	8			
R 4 (posto médio) =	14,6			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	13,4	3,5813	2,635	< 0.05
Postos médios 1 e 3	5	1,3363	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	11,6	3,1002	2,635	< 0.05
Postos médios 2 e 3	8,4	2,245	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	1,8	0,4811	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	6,6	1,7639	2,635	ns

---

Fonte: dados do autor.



---

**Resultados estatísticos para taxa de crescimento (TC) - *Spirulina platensis***

---

H =	16,1759			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,001			
R 1 = Mod.I	68			
R 2 = Mod.III (2,5)	103			
R 3 = Mod.III (3,5)	108			
R 4 = Mod.III (4,5)	21			
R 1 (posto médio) =	11,3333			
R 2 (posto médio) =	17,1667			
R 3 (posto médio) =	18			
R 4 (posto médio) =	3,5			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	5,8333	1,4289	2,635	ns
Postos médios 1 e 3	6,6667	1,633	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	7,8333	1,9188	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	0,8333	0,2041	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	13,6667	3,3476	2,635	< 0.05
Postos médios 3 e 4	14,5	3,5518	2,635	< 0.05

---

Fonte: dados do autor.

---

**Resultados estatísticos para concentração de biomassa final (CBf) - *Spirulina platensis***

---

H =	11,6517			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0087			
R 1 = Mod.I	27			
R 2 = Mod.III (2,5)	90			
R 3 = Mod.III (3,5)	106			
R 4 = Mod.III (4,5)	77			
R 1 (posto médio) =	4,5			
R 2 (posto médio) =	15			
R 3 (posto médio) =	17,6667			
R 4 (posto médio) =	12,8333			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	10,5	2,572	2,635	ns
Postos médios 1 e 3	13,1667	3,2252	2,635	< 0.05
Postos médios 1 e 4	8,3333	2,0412	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	2,6667	0,6532	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	2,1667	0,5307	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	4,8333	1,1839	2,635	ns

---

Fonte: dados do autor.

---

**Resultados estatísticos para concentração de clorofila-a - *Spirulina platensis***

---

H =	12,0376			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0073			
R 1 = Mod.I	62			
R 2 = Mod.III (2,5)	49			
R 3 = Mod.III (3,5)	81			
R 4 = Mod.III (4,5)	18			
R 1 (posto médio) =	12,4			
R 2 (posto médio) =	9,8			
R 3 (posto médio) =	16,2			
R 4 (posto médio) =	3,6			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	2,6	0,6949	2,635	ns
Postos médios 1 e 3	3,8	1,0156	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	8,8	2,3519	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	6,4	1,7105	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	6,2	1,657	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	12,6	3,3675	2,635	< 0.05

---

Fonte: dados do autor.

<b>Resultados estatísticos para concentração de carotenoides - <i>Spirulina platensis</i></b>				
H =	9,4271			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0241			
R 1 = Mod.I	63,5			
R 2 = Mod.III (2,5)	50			
R 3 = Mod.III (3,5)	75,5			
R 4 = Mod.III (4,5)	21			
R 1 (posto médio) =	12,7			
R 2 (posto médio) =	10			
R 3 (posto médio) =	15,1			
R 4 (posto médio) =	4,2			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	2,7	0,7216	2,635	ns
Postos médios 1 e 3	2,4	0,6414	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	8,5	2,2717	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	5,1	1,363	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	5,8	1,5501	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	10,9	2,9131	2,635	< 0.05

Fonte: dados do autor.

**Anexo2. Avaliação do meio Mod. III (2,5) no cultivo de *S. platensis* em relação aos meios Zarrouk, RM6, Mod. I.**

Resultados estatísticos para taxa de crescimento (TC) - <i>Spirulina platensis</i>				
H =	9,6667			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0216			
R 1 = Zarrouk	26			
R 2 = RM6	6			
R 3 = Mod. I	15			
R 4 = Mod.III(2,5)	31			
R 1 (posto médio) =	8,6667			
R 2 (posto médio) =	2			
R 3 (posto médio) =	5			
R 4 (posto médio) =	10,3333			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	6,6667	2,2646	2,635	ns
Postos médios 1 e 3	3,6667	1,2455	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	1,6667	0,5661	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	3	1,019	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	8,3333	2,8307	2,635	< 0.05
Postos médios 3 e 4	5,3333	1,8116	2,635	ns

Fonte: dados do autor.

---

**Resultados estatísticos para concentração de biomassa final (CBf) - *Spirulina platensis***

---

H =	8,5368			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0361			
R 1 = Zarrouk	55			
R 2 = RM6	23			
R 3 = Mod. I	20			
R 4 = Mod.III(2,5)	38			
R 1 (posto médio) =	13,75			
R 2 (posto médio) =	5,75			
R 3 (posto médio) =	5			
R 4 (posto médio) =	9,5			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	8	2,3764	2,635	ns
Postos médios 1 e 3	8,75	2,5991	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	4,25	1,2624	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	0,75	0,2228	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	3,75	1,1139	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	4,5	1,3367	2,635	ns

---

Fonte: dados do autor.

---

**Resultados estatísticos para concentração de clorofila-a - *Spirulina platensis***

---

H =	12,1985			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0067			
R 1 = Zarrouk	57			
R 2 = RM6	10			
R 3 = Mod. I	35			
R 4 = Mod.III(2,5)	34			
R 1 (posto médio) =	14,25			
R 2 (posto médio) =	2,500			
R 3 (posto médio) =	8,750			
R 4 (posto médio) =	8,500			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	11,75	3,4903	2,635	< 0.05
Postos médios 1 e 3	5,5	1,6337	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	5,75	1,708	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	6,25	1,8565	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	6	1,7823	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	0,25	0,0743	2,635	ns

---

Fonte: dados do autor.

---

**Resultados estatísticos para concentração de carotenoides - *Spirulina platensis***

---

H =	11,9338			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0,0076			
R 1 = Zarrouk	55			
R 2 = RM6	10			
R 3 = Mod. I	41			
R 4 = Mod.III(2,5)	30			
R 1 (posto médio) =	13,75			
R 2 (posto médio) =	2,5			
R 3 (posto médio) =	10,25			
R 4 (posto médio) =	7,5			
<b>Comparações (método de Dunn)</b>	<b>Dif. Postos</b>	<b>z calculado</b>	<b>z crítico</b>	<b>p</b>
Postos médios 1 e 2	11,25	3,3417	2,635	< 0.05
Postos médios 1 e 3	3,5	1,0397	2,635	ns
Postos médios 1 e 4	6,25	1,8565	2,635	ns
Postos médios 2 e 3	7,75	2,3021	2,635	ns
Postos médios 2 e 4	5	1,4852	2,635	ns
Postos médios 3 e 4	2,75	0,8169	2,635	ns

---

Fonte: dados do autor.