



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



Estudo do tempo de extração de carotenoides a partir de *Heterochlorella luteoviridis* utilizando campo elétrico moderado e etanol

Autor: Eduardo Antonio Merlo

Orientadora: Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadora: Débora Pez Jaeschke

Porto Alegre, julho de 16

Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Símbolos	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1 Introdução	1
2 Objetivos	2
2.1 Objetivo geral	2
2.2 Objetivos específicos	2
3 Revisão Bibliográfica	3
3.1 Microalgas	3
3.1.1 Definição, importância e divisão	3
3.1.2 Microalga Chlorella	6
3.1.3 Tipos de cultivo	7
3.2 Carotenoides	7
3.2.1 Definição geral, características e importância	7
3.2.2 Divisão quanto à polaridade	9
3.2.3 Divisão quanto à funcionalidade	9
3.2.4 Fatores que afetam a concentração de carotenoides nas microalgas	10
3.2.5 Carotenoides e saúde	10
3.3 Extração de carotenoides	11
3.4. Campo Elétrico Moderado	12
4 Materiais e Métodos	15
4.1 Preparo da biomassa	15
4.1.1 Ajuste da condutividade elétrica e lavagem	15
4.2 Pré-tratamento de extração – aplicação de campo elétrico moderado	16
4.3 Etapa difusiva	17
4.4 Experimentos controle	17
4.5 Preparo das amostras para análise	18
4.5.1 Centrifugação, filtração e armazenamento	18
4.6 Análise do teor de carotenoides	19
4.6.1 Saponificação	19
4.6.2 Lavagem da amostra após a saponificação	19
4.6.3 Preparo das soluções para a leitura no espectrofotômetro de absorção	20
4.6.4 Leitura no espectrofotômetro	20
4.7 Extração exaustiva	21
4.8 Análise de cor	21

4.9	Análise estatística	22
5	Resultados	23
5.1	Concentração de carotenoides nos extratos e rendimento de extração	23
5.2	Análise de cor	26
6	Conclusões e Trabalhos Futuros	27

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras, professora Ligia Damasceno Ferreira Marczak pela oportunidade de poder trabalhar no LATEPA e fazer parte do grupo e à Débora Pez Jaeschke pelo aprendizado, ajuda e dedicação;

Aos meus pais, Aloir e Rosana, meu tio Waldson e à família toda pela ajuda durante a graduação;

Às bolsistas Angélica e Laura pela ajuda no laboratório;

A todos os colegas do LATEPA;

A todos os meus amigos.

Resumo

As microalgas são organismos unicelulares que têm a capacidade de sintetizar diversos compostos de interesse como, por exemplo, vitaminas, pigmentos, proteínas, ácido graxos e polissacarídeos. Os carotenoides, que podem ser extraídos dessas microalgas, são pigmentos de interesse comercial devido, principalmente, à sua capacidade antioxidante. O objetivo principal desse trabalho foi avaliar o tempo de extração dos carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis* utilizando o campo elétrico moderado (MEF) na etapa de pré-tratamento e o etanol foi usado como solvente de extração. Esse trabalho também comparou o MEF com experimentos controle, nos quais a extração foi realizada com banhos de aquecimento e resfriamento. Além disso, os rendimentos de extração dos dois métodos foram avaliados com base em extração exaustiva realizada com acetona e acetato de etila. Na etapa de pré-tratamento, utilizou-se 25 % de etanol e 75 % de água destilada durante 10 minutos, e uma tensão de 180 V. Nessa etapa, foram coletadas amostras nos tempos 1, 5 e 10 minutos. Na etapa difusiva, cessou-se o campo elétrico e adicionou-se etanol e água para que a proporção ficasse 75 % de etanol e 25 % de água destilada. Essa etapa teve duração de 50 minutos e os pontos coletados foram em 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 minutos. A extração com campo elétrico moderado proporcionou um melhor rendimento de extração quando comparada ao controle. Ainda, o uso do MEF implicou em uma difusão mais rápida dos carotenoides. Isso provavelmente aconteceu devido ao fato de o campo elétrico, possivelmente, aumentar a permeabilidade da membrana celular das microalgas, assim aumentando a difusão. As análises de concentração de carotenoides e as análises de cor dos extratos mostraram que o campo elétrico não foi capaz de promover uma extração eficaz quando a concentração de etanol foi de 25 %, indicando que uma etapa difusiva, com maior concentração de etanol, seria necessária para que ocorresse a extração de carotenoides.

Lista de Figuras

Figura 3.1: Comparação entre os espectros de carotenoides e clorofilas.	5
Figura 3.2: Distribuição, atividade biológica e aplicações comerciais dos pigmentos derivados de microalgas.....	6
Figura 3.3: Dados de absorção UV-Vis de compostos insaturados e o diagrama de energia.	8
Figura 3.4: Diferentes tipos de carotenoides.....	9
Figura 3.5: Estrutura do β -caroteno.	11
Figura 3.6: Representação da eletroporação.....	13
Figura 4.1: Aparato experimental utilizado para realizar a extração.....	16
Figura 4.2: Comparação entre os perfis de temperatura quando utilizando o campo elétrico moderado e banho quente (controle) para aquecimento.....	18
Figura 4.3: Visualização do aspecto final das amostras.	19
Figura 4.4: Ilustração da lavagem nos funis de separação.	20
Figura 5.1: Concentração de carotenoides nos extrato em diferentes tempos de coleta..	24
Figura 5.2: Variação da concentração de carotenoides da etapa difusiva com o tempo ...	25

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Comparação de algumas fontes de biodiesel.....	4
Tabela 3.2: Carotenoides totais em microalgas.....	4
Tabela 3.3: Teor e quantidade de carotenoides presentes na microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	7
Tabela 4.1: Fator de perda de massa e volume do extrato na hora da coleta para os extratos coletados.	21
Tabela 5.1: Concentração de carotenoides totais, desvio padrão e rendimento de extração para diferentes pontos de coleta nos dois experimentos e extração exaustiva*.	23
Tabela 5.2: Teste de Tukey para os valores de L*, a* e b* dos experimentos de controle de campo elétrico.	26

Lista de Símbolos

ΔE^* – Diferença de cor total.

a^* – coordenada para as cores verde e vermelha; positivo significa esverdeado e negativo significa avermelhado.

b^* – coordenada para as cores azul e amarelo; positivo significa amarelado e negativo significa azulado.

L^* – significa luminosidade; $L^* = 0$ significa cor preta; $L^* = 100$ significa cor branca.

Lista de Abreviaturas e Siglas

MEF – *Moderate Electric Field* – Campo elétrico moderado

PT – Pré-tratamento

ED – Etapa difusiva

1 Introdução

As microalgas são organismos unicelulares, normalmente encontradas em ambientes aquáticos, que utilizam a luz solar para produzir biomassa e oxigênio a partir dióxido de carbono, água e nutrientes, pelo processo de fotossíntese. O cultivo de microalgas se torna interessante pelo fato de esses microrganismos sintetizarem produtos de alto valor agregado, tais como vitaminas, pigmentos, proteínas, ácido graxos, polissacarídeos, entre outros.

Carotenoides são compostos orgânicos sintetizados por plantas e outros organismos fotossintéticos, tais como algas, alguns tipos de fungos e bactérias. As moléculas de carotenoides absorvem a luz em comprimentos de onda na faixa de 430-480 nm do espectro visível. Portanto, são responsáveis pela coloração amarela, vermelha e laranja de frutas, verduras e alguns animais aquáticos. A coloração dos carotenoides é dependente do número de insaturações presentes na cadeia carbônica do carotenoide. A presença de um número elevado de ligações duplas conjugadas é importante na caracterização dos diferentes carotenoides, em virtude de que cada um deles apresenta um espectro de absorção da Luz Ultravioleta e Visível (UV-Vis) com um comprimento de onda máximo específico.

Uma das características mais importante dos carotenoides é a capacidade anti-inflamatória e antioxidante dessas moléculas. Dessa forma, o consumo de alimentos com alto teor da substância está associado à redução da incidência de câncer nos seres humanos, prevenção de doenças degenerativas, redução do risco de doenças cardiovasculares, entre outros. Além disso, alguns carotenoides são precursores da formação da vitamina A, como o β -caroteno.

Contudo, a extração de carotenoides ainda é considerada um desafio por ser um processo oneroso, baseado na utilização de solventes tóxicos, como acetona, hexano e acetato de etila. Assim, no presente trabalho utilizou-se a tecnologia de campo elétrico moderado como uma etapa de pré-tratamento para avaliar o tempo de extração de carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a influência do campo elétrico moderado como etapa de pré-tratamento no tempo de extração de carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis* utilizando etanol como solvente de extração.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- avaliar a concentração de carotenoides totais nos extratos coletados em diferentes tempos de pré-tratamento e etapa difusiva;
- avaliar a diferença de cor nos extratos e comparar com os resultados de concentração de carotenoides totais;

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Microalgas

3.1.1 Definição, importância e divisão

As microalgas são organismos unicelulares, normalmente encontradas em ambientes aquáticos, que utilizam a luz solar para produzir biomassa e oxigênio a partir dióxido de carbono, água e nutrientes, pelo processo de fotossíntese. Os cultivos podem ser realizados em terras secas, inclusive em terras áridas, onde há boa incidência solar e a atividade agrícola é restrita, não competindo com a agricultura. Por esse motivo, as microalgas são consideradas fontes promissoras de uma gama de produtos, tais como biomateriais, bioquímicos e biocombustíveis (Leu e Boussiba, 2014).

As microalgas podem ser divididas de acordo com a organização celular: procariontes e eucariontes, com um único núcleo ou com multinúcleos. O núcleo celular de uma microalga eucarionte possui uma membrana, no qual está contida a maior parte dos genes, distribuídos nos cromossomos e no nucléolo. O microrganismo contém um citoplasma que é dividido em compartimentos e organelas envoltas por membranas. Dentre essas organelas, pode-se citar: complexo de Golgi, mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolos, centríolos e plastídios. Cada uma dessas organelas está designada a uma função específica, vital para o funcionamento da célula (Richmond, 2004).

As microalgas são cultivadas a fim de produzir uma grande quantidade de produtos de alto valor agregado, tais como vitaminas, pigmentos, proteínas, ácido graxos, polissacarídeos, entre outros. Além disso, as microalgas são consideradas de grande potencial para a produção de biocombustíveis e se prevê que elas terão um papel importante no setor de energia renovável (Markou *et al.*, 2014).

Uma das grandes aplicações das microalgas é na produção de biodiesel. Isso ocorre devido ao alto teor de lipídios (normalmente de 20 a 50 %), eficiência fotossintética e grande taxa de crescimento quando comparado a outras fontes (Chisti, 2007), conforme indicado na Tabela 3.1. Pode-se notar que as microalgas apresentam um rendimento maior se comparado às outras fontes e também necessitam de uma área menor para alcançar 50 % de todos os combustíveis utilizados nos Estados Unidos. Porém, por ser uma tecnologia relativamente nova, o custo de cultivo ainda é alto e, por esse motivo, o percentual da área de colheita dos Estados Unidos é baixo.

Tabela 3.1: Comparação de algumas fontes de biodiesel. Adaptado de Chisti (2007)

Fonte do biodiesel	Rendimento do óleo (L/ha)	Área necessária para alcançar 50% dos combustíveis utilizados nos EUA (Mha)	Porcentagem da área de colheita dos EUA (%)
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Côco	2689	99	54
Azeite de dendê	5950	45	24
Microalga (70% de óleo)	136900	2	1,1
Microalga (30% de óleo)	58700	4,5	2,5

As microalgas representam uma fonte sustentável de produtos naturais, sendo que mais de 15.000 novos compostos originados da biomassa das microalgas foram descobertos. Como grande parte das microalgas acumulam uma alta quantidade de carotenoides, esse organismo acaba se tornando uma grande fonte natural do pigmento (Sun *et al.*, 2016). Na tabela 3.2, há alguns exemplos do teor de carotenoides em microalgas variando as condições de operação utilizando extração supercrítica (Guedes *et al.*, 2011).

Tabela 3.2: Carotenoides totais em microalgas

Microalga	Condições de operação (pressão/temperatura/tempo)	Carotenoides total (mg/g biomassa seca)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	200 bar/ 40 °C/ 180 min	0,152
<i>Chlorella vulgaris</i>	200 bar/ 40 °C/ 198 min	0,011
<i>Synechococcus sp.</i>	200 bar/ 40 °C/ 180 min	0,386

Uma das características mais proeminentes das microalgas é a sua cor, que é determinada pelo seu pigmento. Esses pigmentos são substâncias químicas coloridas que fazem parte do sistema fotossintético do microrganismo. Eles podem ser divididos em três grupos: carotenoides (0,1 - 0,2 % de peso seco em média, mas pode chegar a 14 % de β -caroteno em algumas espécies), clorofilas (0,5 - 1,0 % de peso seco) e ficobiliproteínas (até 8 % de peso seco) (Kim, 2015).

Quando se faz a análise espectrofotométrica da luz Ultravioleta e Visível (UV-Vis) dos carotenoides (será explicado no capítulo de materiais e métodos), as clorofilas podem interferir no valor de absorbância. Por exemplo, uma comparação entre os espectros da clorofila e de diferentes carotenoides está ilustrado na Figura 3.1. Se a remoção das clorofilas não for feita, é nítido que elas irão interferir no espectro dos carotenoides, pois elas também apresentam espectros de absorção na faixa de 400 a 500 nm.

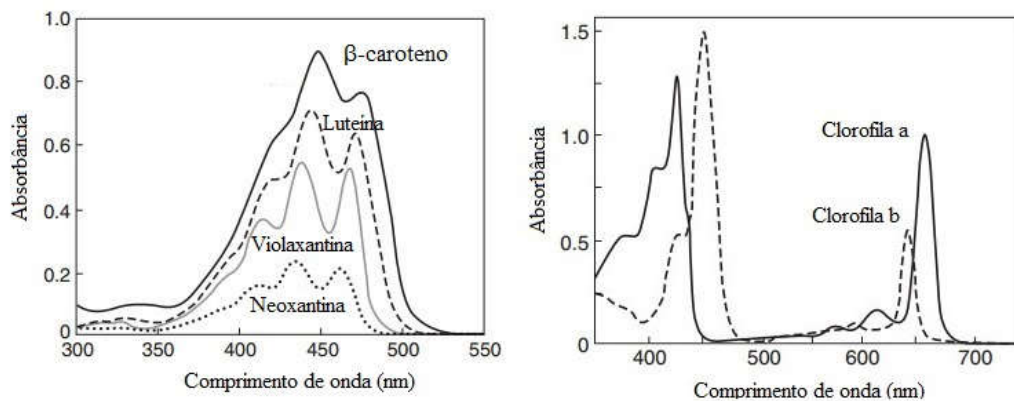


Figura 3.1: Comparação entre os espectros de carotenoides e clorofilas. Fonte: Adaptado de (Lichtenthaler e Buschmann, 2001)

Na Figura 3.2, pode-se observar a distribuição, atividade biológica e aplicações comerciais dos pigmentos derivados de microalgas.

Nota-se que os pigmentos naturais de microalgas são benéficos para a saúde humana, e isso ocorre justamente pelo fato de os carotenoides terem características antioxidantes. As características e propriedades das moléculas de carotenoides serão abordadas com maiores detalhes no Capítulo 3.2.

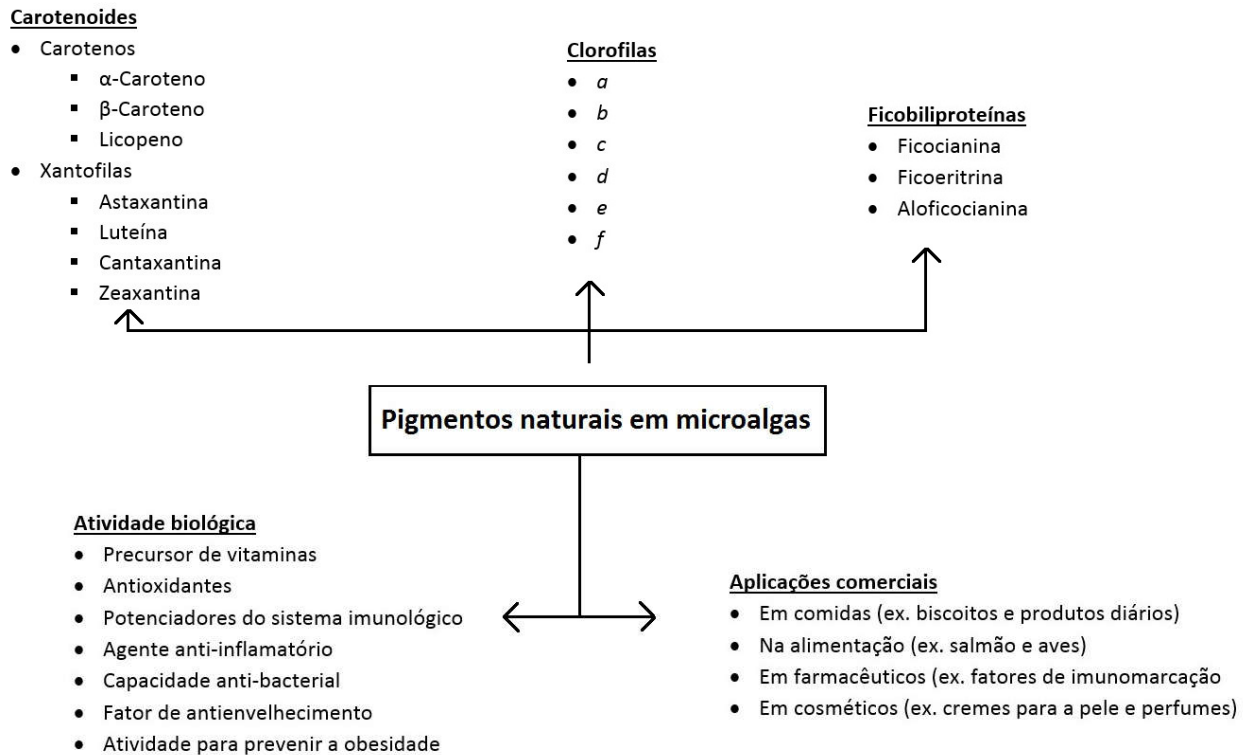


Figura 3.2: Distribuição, atividade biológica e aplicações comerciais dos pigmentos derivados de microalgas. Adaptado de (Kim, 2015).

3.1.2 Microalga *Chlorella*

Nesse trabalho, foi utilizada a microalga *Heterochlorella luteoviridis*. Como há poucos dados na literatura sobre ela, para fins de Revisão Bibliográfica serão consideradas a microalgas do gênero *Chlorella*, similar à microalga estudada.

Chlorellas são algas verdes unicelulares, de formato esférico, globular ou elipsoidal e não móvel, de diâmetro que varia na faixa de 2,0 a 10,0 micrômetros. Elas podem ser encontradas em água doce de lagoas e valas, no solo úmido, ou em outros lugares com umidade, tais como tronco de árvores, potes de água e paredes úmidas e em águas marinhas. As células não têm flagelo, estigma e vacúolos contráteis, mas contém um núcleo localizado na parte central. Sua composição é de aproximadamente 20 % de gordura, 45 % de proteína, 20 % de carboidratos, e 10 % de vitaminas e vários minerais (Phukan *et al.*, 2011).

Em 1950, devido ao aumento da população mundial e a previsão de uma insuficiência proteica, estudos sobre uma fonte alternativa de proteínas começaram a acontecer. Naquela época, a biomassa de algas era uma boa candidata. Dessa forma, no começo da década de 60, culturas em largas escalas para uso comercial da microalga *Chlorella* surgiram no Japão. Em 1980, já existiam 46 fábricas na Ásia produzindo mais de 1000 kg de microalgas (maior parte composta de *Chlorella*) por mês. Logo surgiram outras plantas comerciais em outras partes do mundo (Spolaore *et al.*, 2006).

Essa microalga pode ser utilizada na nutrição humana, sendo normalmente vendidas como aditivos alimentares na forma de pó ou de tabletes. Ela também tem uso na

medicina, como proteção contra falha renal. Além disso, tem usos na alimentação animal e na aquicultura. No caso da alimentação animal, a *Chlorella* pode melhorar a imunidade, fertilidade e controle de peso, além de promover uma pele mais saudável. Já na aquicultura, a microalga pode servir de fonte de alimento para moluscos, camarões e peixes; ela também pode ser usada na coloração de salmões e na melhoria do sistema imunológico dos peixes (Brennan e Owende, 2010).

Na tabela 3.3, pode-se observar a concentração de alguns carotenoides presentes na *Chlorella pyrenoidosa*. A luteína, por ser um componente estrutural e funcional de grande importância na sobrevivência celular, será encontrada em quantidade maior quando comparada a outros carotenoides (Inbaraj et al., 2006).

Tabela 3.3: Teor e quantidade de carotenoides presentes na microalga *Chlorella pyrenoidosa*

Carotenoide	Teor (%)	Quantidade (mg/g)
Luteína	93,1	153,01 ± 0,1
β-caroteno	2,6	4,31 ± 0,03
α-caroteno	2,6	4,23 ± 0,02
Zeaxantina	1,3	2,17 ± 0,01
β-criptoxantina	0,2	0,33 ± 0,006

Fonte: Adaptado de Inbaraj et al. (2006)

3.1.3 Tipos de cultivo

O cultivo das microalgas pode ser realizado em sistemas de cultivo aberto, como é o caso de lagos, lagoas e lagoas artificiais, e sistemas de cultivos fechados de alto controle, tal como fotobiorreatores (Mata et al., 2010; Wijffels et al., 2013). Os sistemas fechados oferecem melhores opções para a maioria das microalgas, pois há a proteção da cultura de contaminações por microrganismos indesejados, controle das condições do processo, alta produtividade e melhor qualidade da biomassa. Para a escala industrial, sistemas fechados acabam tendo um custo muito elevado (Kim, 2015). Para a realização do presente trabalho, as microalgas foram cultivadas em sistema fechado (8 fotobiorreatores).

3.2 Carotenoides

3.2.1 Definição geral, características e importância

Carotenoides são pigmentos orgânicos sintetizados por plantas e outros organismos fotossintéticos, tais como algas, alguns tipos de fungos e bactérias. Esses pigmentos são responsáveis pelas cores amarelo, vermelho e laranja de frutas e verduras e de alguns animais aquáticos (Sun et al., 2016). Os carotenoides desempenham um papel de grande importância na fotossíntese e na proteção dos tecidos das plantas contra a luz solar. Essa proteção ocorre devido à habilidade dos carotenoides de inativar e extinguir espécies reativas de oxigênio, especialmente o oxigênio singlete (Fennema, 2007). Eles funcionam

como um filtro molecular para a luz que vem do sol, em especial a luz ultravioleta A, B e C e parte da luz visível na região do azul. Eles também desempenham um papel importante na saúde humana, o qual será explicado posteriormente.

A coloração dos carotenoides é dependente do número de insaturações presentes na cadeia carbônica do carotenoide. A presença de um número elevado de ligações duplas conjugadas é importante na caracterização dos diferentes carotenoides, em virtude de que cada um deles apresenta um espectro de absorção da Luz Ultravioleta e Visível (UV-Vis) com um comprimento de onda máximo específico.

O espectro de absorção ou de emissão dos carotenoides é consequência da presença da longa cadeia com duplas ligações conjugadas. A absorção da luz acontece através dos orbitais moleculares das ligações π (π) do polieno. Quanto maior o número de insaturações, mais fácil é o processo de transição eletrônica de um orbital π ligante para um orbital π antiligante. Para os carotenoides, as transições eletrônicas tornam-se mais fáceis devido à deslocalização dos elétrons através das conjugações do grupo responsável pela cor – cromóforo. Se a emissão de luz cair na região do visível, o material terá uma cor característica. Quanto maior o número de duplas ligações conjugadas, menor é a energia necessária para promover a excitação e conseqüentemente o valor do comprimento de onda máximo de absorção é maior. Nos exemplos da figura 3.3, o eteno apresenta o menor comprimento de onda de absorção máxima em 165 nm, enquanto que o pentaeno apresenta o maior comprimento de onda de absorção máxima em 334 nm. O diagrama de energia dos orbitais moleculares a direita descreve esquematicamente o efeito das inserções de ligações duplas conjugadas no polieno. As transições eletrônicas responsáveis pelas bandas de absorção acontecem entre os orbitais π e π^* . Quanto menor a diferença de energia, mais fácil é a transição eletrônica envolvendo os elétrons π . Por esse motivo, os carotenoides β -caroteno e licopeno apresentam comprimento de onda máximo de absorção em 455 nm e 474 nm, respectivamente.

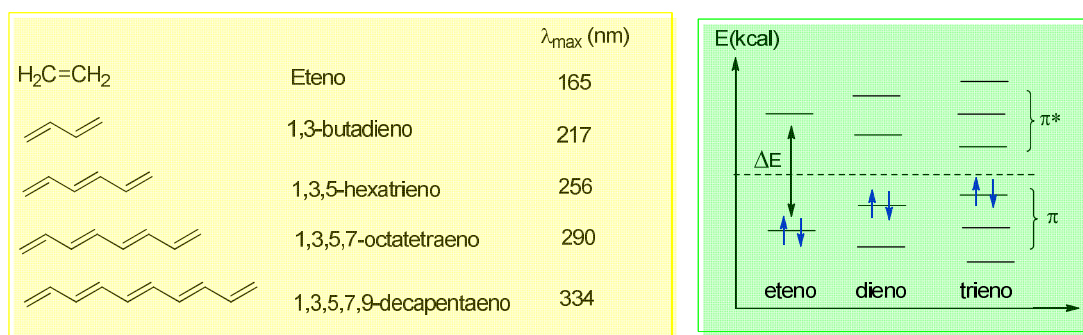


Figura 3.3: Dados de absorção UV-Vis de compostos insaturados e o diagrama de energia.

Como os carotenoides absorvem a luz em comprimentos de onda na faixa de 430-480 nm, eles tem a capacidade emitir parte da luz absorvida na faixa da luz visível deslocada para a região do vermelho. Por isso, esses compostos geralmente têm a coloração amarela, laranja e vermelha. Assim, eles absorvem na região da luz visível do azul e emitem luz na região da luz visível do vermelho. Portanto, alimentos com essa coloração são ricos na substância. Por exemplo, os tomates são compostos por licopeno; cenouras são compostas por α - e β -carotenos; milho por luteína, entre diversos outros alimentos. Mas isso não quer dizer que alimentos com outra coloração, especialmente verde, não sejam ricos em carotenoides. Os vegetais de folhas verdes também contêm carotenoides, mas a coloração

é mascarada pela clorofila verde. De modo geral, os vegetais que apresentarem maior quantidade de pigmentos de clorofila, irão apresentar as maiores concentrações de carotenoides (Fennema, 2007).

3.2.2 Divisão quanto à polaridade

Os carotenoides são divididos em dois grupos estruturais: os carotenos, estrutura formada por apenas carbono e hidrogênio e as xantofilas, compostos que além de carbono e hidrogênio também possuem oxigênio em sua estrutura. Os carotenos são moléculas altamente apolares, enquanto que as xantofilas são carotenoides mais polares, já que são moléculas compostas por grupos funcionais oxigenados, tais como hidroxila epóxi, aldeído e cetona. Ambas as classes são caracterizadas por serem compostos lipofílicos e, portanto, solúveis em óleos e solventes orgânicos. Além disso, os carotenoides são considerados moderadamente termoestáveis e podem sofrer perda de cor quando oxidados (Fennema, 2007). Na figura 3.4, pode-se observar exemplos de carotenoides polares e apolares.

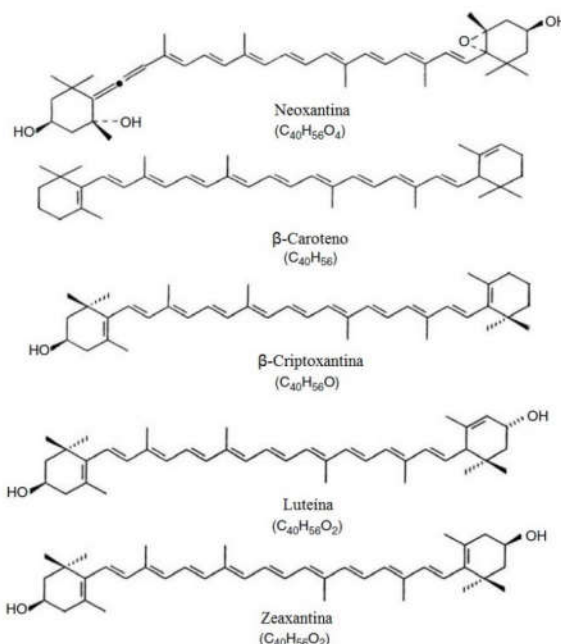


Figura 3.4: Diferentes tipos de carotenoides. Adaptado de Fennema (2007)

A neoxantina, que é polar, tem coloração amarela e pode ser encontrada em folhas verdes. O β-caroteno, de coloração amarela, é apolar e pode ser encontrado em cenouras e batatas doces. A β-criptoxantina, polar e de coloração amarela, é encontrada em milho. A luteína, carotenoide majoritário de microalgas, é polar e também ocorre em folhas verdes, milho e margaridas. Por fim, a zeaxantina pode ser extraída de milho e safrão, é polar e também tem coloração amarela (Fennema, 2007).

3.2.3 Divisão quanto à funcionalidade

Os carotenoides também podem se distinguir entre primário e secundário. Os primários, tais como β-caroteno e luteína, são componentes funcionais e estruturais do aparato fotossintético e estão diretamente envolvidos na fotossíntese. Dessa forma, eles têm o papel de captura da luz solar, assim como proteção do sistema fotossintetizante contra a oxidação. Já os carotenoides secundários, tais como astaxantina e a cantaxantina,

não estão intrinsicamente relacionados a esse aparato. Eles são sintetizados por cloroplastos e acumulados no citoplasma. Dependendo das condições do cultivo e do ambiente, como por exemplo incidência de luz, pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, concentração de sal, entre outros, esse tipo de carotenoide pode ser induzido a ter uma maior produção. Portanto, sua função é apenas a filtração da luz solar para proteção celular. Devido ao caráter imprevisível das enzimas no metabolismo de microalgas, é difícil prever condições para que a produção de carotenoides primários e/ou secundários seja facilitada (Kim, 2015).

3.2.4 Fatores que afetam a concentração de carotenoides nas microalgas

O tipo e a quantidade de carotenoides presente em determinada planta depende de várias variáveis, que vão desde fatores pré e pós colheita, até genótipo, grau de amadurecimento, método de cultivo, condições climáticas e processamento. Ainda, diferentes partes de uma planta podem conter diferentes tipos de carotenoides. Por exemplo, a casca de uma fruta normalmente tem mais carotenoides do que a polpa (Saini *et al.*, 2015).

Normalmente, o grau de amadurecimento tem efeito positivo na concentração de carotenoides, isto é, quanto mais a fruta estiver amadurecida, maior será a quantidade. Tomando o tomate como exemplo, a concentração de licopeno aumenta conforme a fruta amadurece. Mesmo após ser colhido, a concentração pode aumentar, pois os carotenoides podem continuar a serem sintetizados (Fennema, 2007).

Com relação ao processamento, tanto processos térmicos (secagem por aquecimento), como não térmicos (alta pressão, aplicação de campo elétrico pulsado, secagem por ultrassom) podem degradar significativamente o nível de carotenoides em frutas, vegetais e microalgas (Saini *et al.*, 2015). Para a maioria dos vegetais, o processo de secagem pode provocar uma perda de 10 a 20 % de carotenoides (Saini *et al.*, 2014). Além disso, processos térmicos podem causar mudança nos isômeros dos carotenoides. Por exemplo, ocorre a isomerização de *trans* para *cis* do β -caroteno e da luteína conforme é aplicada temperatura (Colle *et al.*, 2015). Isso não é algo benéfico, pois os isômeros *cis* apresentam atividade provitamina menos potente do que os isômeros *trans* (And e West, 1998). O grau de degradação que processos térmicos impõem é maior do que em processos não térmicos. Mesmo assim, a maioria das indústrias alimentícias preferem usar processos térmicos à processos mais avançados pois esses são caros e de difícil operação. No futuro, processos não térmicos tais como alta pressão e campo elétrico podem desempenhar um papel muito importante na preservação dos componentes bioativos dos alimentos, incluindo os carotenoides (Saini *et al.*, 2015).

3.2.5 Carotenoides e saúde

O estudo dos carotenoides é de grande importância, pois eles apresentaram caráter anti-inflamatório e antioxidante. Isso ocorre, pois essas moléculas apresentam grande quantidade de ligações duplas conjugadas, tornando esses compostos facilmente oxidáveis, como se pode observar na figura 3.5. O consumo de frutas e vegetais com alto teor em carotenoides está associado com a redução na incidência de câncer nos seres humanos, assim como prevenção de doenças degenerativas, como por exemplo o Alzheimer (Peto *et al.*, 1981; Niizu, 2003).

Uma das funções mais importantes dos carotenoides na dieta de humanos e animais é a possibilidade de servir de precursores para a formação da vitamina A. Para tal, o carotenoide deve ter no mínimo um anel de β -ionona não substituído e possuir cadeia lateral poliênica de pelo menos onze carbonos. Entre eles, podemos citar o β -caroteno. (Ambrosio *et al.*, 2006)

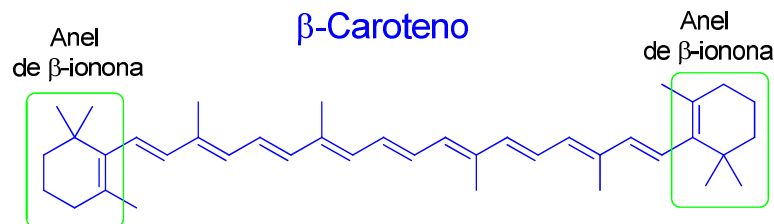


Figura 3.5: Estrutura do β -caroteno. Adaptado de Ambrosio *et al.* (2006)

Pesquisas recentes apontam que o consumo de carotenoides está associado com redução do risco de doenças cardiovasculares. Além disso, o consumo de licopeno pode reduzir a progressão do câncer de próstata; a luteína e a zeaxantina possivelmente desempenham um papel importante na manutenção da saúde do olho. Contudo, prever o benefício de determinado carotenoide na prevenção de doenças ou na manutenção da saúde pode ser desafiador, já que a fonte dos carotenoides é muito similar (predominantemente frutas e verduras). Isso significa que quando uma fruta ou verdura é ingerida, vários tipos de carotenoides também são ingeridos. Assim, fica difícil prever o benefício que determinado carotenoide pode prover. Por esse motivo, vários estudos têm sido realizados com o objetivo determinar a influência dos carotenoides na saúde humana (Woodside *et al.*, 2015).

Dessa forma, o consumo de carotenoides ajuda a manter o corpo saudável, prevenindo diversas doenças e retardando o envelhecimento. Assim, o consumo de alimentos com alta concentração de carotenoides é benéfico para a saúde, devido à presença da substância de interesse (Krinsky e Johnson, 2005).

3.3 Extração de carotenoides

Extração é uma operação unitária com o objetivo de separar determinados compostos de uma matriz, sólida ou líquida, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (M. Prado *et al.*, 2014). Algumas das técnicas mais usuais são a extração por solventes orgânicos e a destilação. Como os carotenoides apresentam degradação térmica e alta massa molar, não é possível extrai-los por destilação. Dessa forma, a extração utilizando solventes orgânicos é a mais usual.

A extração por solventes orgânicos se baseia no princípio da difusão do solvente para a matriz, assim solubilizando os compostos de interesse, no caso os carotenoides. Esse processo é normalmente acompanhado da aplicação de calor e agitação. No caso das microalgas, o solvente precisa entrar na célula, e para isso é necessário passar pela membrana celular. A escolha do solvente adequado é vital para promover uma extração eficiente, pois além de determinar o grau de afinidade com o composto a ser extraído, irá promover determinada ruptura na parede da célula (Henriques *et al.*, 2007). Entre os solventes utilizados nessa extração, podemos citar os seguintes: hexano, acetona, etanol, metanol, éter de petróleo, éter dietílico, entre outros (M. Prado *et al.*, 2014). Nesse

trabalho, foi utilizado o etanol como uma alternativa mais ecológica e menos agressivo do ponto de vista da toxicidade.

O etanol tem a capacidade de desordenar a estrutura física da membrana celular; ele consegue interferir no empacotamento das moléculas na bicamada fosfolipídica da membrana celular, aumentando assim a permeabilidade. O etanol consegue penetrar na membrana em uma faixa de tempo de aproximadamente 200 ns. Esse efeito pode ser observado em diferentes tipos de células, tais como neurônios, hemácias e hepatócitos, assim como membranas de organelas intracelulares. A facilidade que o etanol tem em passar pela bicamada lipídica pode ser explicada pela natureza hidrofóbica do terminal carbônico do etanol, facilitando a passagem pela região hidrofóbica da bicamada lipídica. (Goldstein, 1986; Patra *et al.*, 2006)

Quando o poder de ruptura celular do solvente não é suficiente, que pode ser intencional para evitar danos aos compostos que serão extraídos, pode-se aplicar longos períodos de extração ou então uma tecnologia em paralelo, para ajudar a aumentar o rendimento de extração (Henriques *et al.*, 2007). No caso do presente trabalho, foi utilizada a tecnologia de campo elétrico moderado para auxiliar na extração dos carotenoides. Essa tecnologia será apresentada em maiores detalhes na seção 3.4.

3.4. Campo Elétrico Moderado

A aplicação de campo elétrico moderado (MEF, do inglês *Moderate Electric Field*) pode ser definida como um processo de permeabilização controlado e possivelmente reversível, através de aplicação de campos elétricos com comprimento de onda arbitrário, de intensidade que pode variar de 1 até 1000 V/cm (Kulshrestha e Sastry, 2003). A partir do momento que esse campo é aplicado em células biológicas, tais como as de microalgas, há um acúmulo de cargas elétricas na membrana da célula. O rompimento da membrana ocorre quando o potencial excede um valor crítico de 1 V (Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2011). Esse rompimento é denominado de eletroporação. Como consequência, há um aumento da permeabilidade da membrana. A eletroporação também pode ocorrer pelo uso do campo elétrico pulsado, que não será analisado neste trabalho.

Vários modelos foram criados para tentar explicar esse fenômeno. Entre eles, o mais aceito é o modelo transiente dos poros aquosos. De acordo com esse modelo, ocorre a formação de poros hidrofílicos na bicamada lipídica da membrana da célula quando essa é exposta a campos elétricos. Dentro da membrana celular, poros hidrofóbicos são formados por flutuações térmicas espontâneas da membrana lipídica. Assim, a diferença de potencial elétrico fornece energia suficiente para que a membrana fosfolipídica se reorganize, de forma que esses poros hidrofílicos se formem (Vorobiev e Lebovka, 2008).

Como pode-se observar na figura 3.6, dependendo da intensidade do campo elétrico aplicado, a eletroporação pode ocorrer de maneira reversível, irreversível ou simplesmente não ocorrer. Se a força do campo aplicado exceder o valor crítico de força de campo E_c , um potencial na membrana será induzido (varia de 0,2 a 1,0 V para a maioria das membranas celulares). Com isso, há a formação de poros, de forma reversível ou irreversível, dependendo da força do campo elétrico aplicado. Se essa força for próxima de E_c , a permeabilização será reversível, de tal forma que a membrana celular possa recuperar sua estrutura e funcionalidade. Caso o campo seja mais intenso, há a ocorrência de eletroporação irreversível, resultando na desintegração da membrana e perda de sua

viabilidade. Se o campo tiver intensidade menor que E_c , não haverá a formação de poros (Donsi *et al.*, 2010).

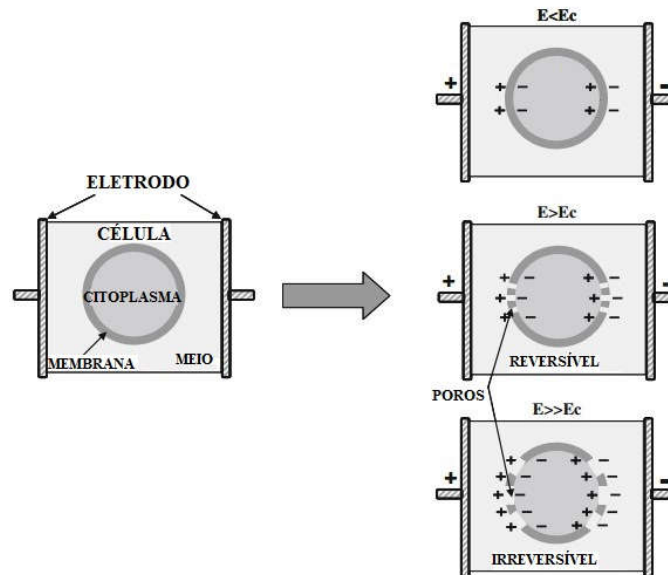


Figura 3.6: Representação da eletroporação. Fonte: Adaptado de Donsi *et al* (2010)

O processo de eletroporação consiste das seguintes etapas (Donsi *et al.*, 2010):

- carga e polarização das membranas (processo que dura em torno de $1\mu\text{s}$);
- desestabilização temporal e criação de poros (ocorre em faixas de tempo de aproximadamente 10 ns);
- expansão e agregação dos diferentes poros (pode demorar de centenas de microssegundos a milissegundos);
- fechamento dos poros que ocorre após a aplicação do campo elétrico (duração de segundos até horas).

De Oliveira *et al.* (2015) estudaram a extração de pectina da casca do maracujá a partir de campo elétrico moderado. Os autores concluíram que a aplicação do campo é uma alternativa eficiente, rápida e ecologicamente correta para a extração, principalmente para pectinas com alto grau de esterificação e concentração de ácido galacturônico maior que 65g/100g de pectina. Além disso, segundo os autores, a utilização de MEF como uma etapa de pré-tratamento pode ser uma alternativa para aumentar o rendimento do processo de extração, já que o campo impõe um aumento na permeabilidade.

Kusnadi e Sastry (2012) estudaram o efeito do campo elétrico na difusão de sal em tecido de vegetais. Os autores chegaram à conclusão que o coeficiente de difusão do sal aumentou significativamente com o aumento da temperatura e da força do campo elétrico. Também foi concluído que é possível usar o MEF para melhorar a difusão do sal sem tratamento térmico. Porém, a combinação do tratamento térmico e de MEF é mais efetiva com relação a cada um dos processos aplicados separadamente. Os autores também apontam que houve uma diminuição da energia de ativação da difusividade quando foram

utilizados campos elétricos mais intensos, indicando que o papel da temperatura é menor no aumento da difusividade quando comparado ao campo elétrico de maior intensidade.

Kulshrestha e Sastry (2010) avaliaram a mudança da permeabilidade dos tecidos da beterraba com a aplicação de campo elétrico moderado. Os autores concluíram que a aplicação do MEF a baixas tensões aumentou a difusividade sem ocasionar danos permanentes na célula. Assim, segundo os autores, tratamentos com baixa energia podem ser utilizados para aumentar a difusividade em tecidos vegetais.

4 Materiais e Métodos

Este capítulo irá abordar o procedimento para a realização dos experimentos de extração de carotenoides de microalgas assistido por campo elétrico moderado (MEF), bem como a realização dos experimentos controle. Também serão abordadas as metodologias utilizadas para realização da extração exaustiva e o método de quantificação da concentração de carotenoides totais. Os experimentos utilizando MEF e os experimentos controle foram realizados em duplicata.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e na Central Analítica, ambos localizados no Departamento de Engenharia Química da UFRGS.

A biomassa foi disponibilizada pelo laboratório de BioEng do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA).

4.1 Preparo da biomassa

4.1.1 Ajuste da condutividade elétrica e lavagem

A primeira etapa para a realização do experimento consistiu na pesagem da biomassa. Foram pesados 4 gramas de microalgas liofilizadas em um béquer de 100 mL e o valor exato foi anotado. Uma vez que o cultivo das microalgas foi realizado em meio de alta concentração salina (34 g/L), foi necessário a retirada do sal. Esse procedimento foi necessário para que fosse possível manter, durante a aplicação do MEF, a temperatura da amostra até 30 ± 2 °C.

Quando se aplica um campo elétrico a uma solução, a taxa de aquecimento é proporcional à quantidade de íons presentes nessa solução, pois os íons tendem a se mover conforme é aplicado o campo elétrico. Essa locomoção gera atrito, gerando calor e aquecimento (processo denominado aquecimento ôhmico). Quanto maior a quantidade de íons, maior será o atrito e maior será a taxa de aquecimento. Como o experimento foi realizado a 30 °C, a temperatura precisou ser mantida em torno desse valor. Dessa forma, foi necessário ajustar o valor da condutividade elétrica para que os íons que estão presentes na solução não gerem um aquecimento alto a ponto de ultrapassar o valor de 30 ± 2 °C. Segundo Sun (2014), condutividades elétricas a partir de 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ são adequadas para aplicação de campo elétrico moderado e aquecimento ôhmico. Assim, o valor da condutividade foi ajustado para esse valor.

As lavagens foram realizadas adicionando-se 80 mL de água destilada ao béquer contendo as microalgas liofilizadas, seguido de homogeneização. Esse conteúdo foi dividido em 6 tubos falcon de 50 mL, cada tubo contendo aproximadamente 13 mL do conteúdo inicial da solução de microalgas (80 mL), completados com 45 mL de água destilada, e centrifugados (*Sigma*, Z-16KL, 10000 g, 10 min, 10 °C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, a biomassa foi homogeneizada novamente em 45 mL de água destilada e centrifugada pela segunda vez. A condutividade elétrica do sobrenadante da segunda lavagem foi monitorada com um condutivímetro (*Digimed*, DM-3P, Brasil); o valor esperado era de aproximadamente 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se o valor estivesse acima de 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, seria necessário realizar outra lavagem. Caso o valor de condutividade estivesse abaixo desse valor, o sobrenadante era retirado.

Após retirada do sobrenadante, a biomassa foi ressuspensa em 60 mL de água e 20 mL de etanol (25 % de etanol) e a condutividade elétrica foi ajustada com solução de NaCl (2 g/L) até o valor de 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para realização do pré-tratamento de extração.

4.2 Pré-tratamento de extração – aplicação de campo elétrico moderado

O aparato experimental utilizado para realização dos experimentos de extração pode ser visualizado na Figura 4.1.

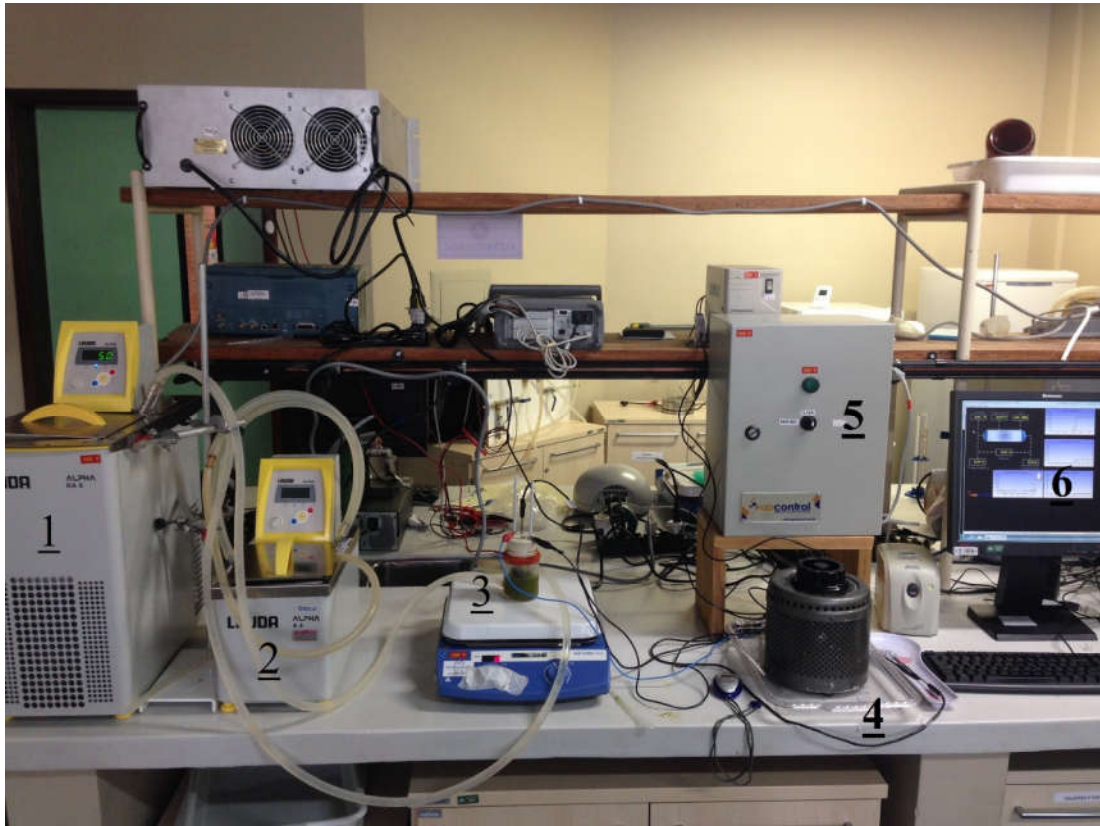


Figura 4.1: Aparato experimental utilizado para realizar a extração: 1) banho frio; 2) banho quente; 3) célula de extração e agitador magnético; 4) transformador de tensão; 5) painel de aquisição de dados; 6) computador.

O aparato experimental compreendeu duas células de extração: uma delas foi utilizada no pré-tratamento, com volume de 100 mL (mostrada na Figura 4.1), e a outra de volume maior, 300 mL, utilizada durante a etapa difusiva. Ambas as células são em vidro Pyrex e encamisadas. Além disso, o sistema contou com um banho frio (LAUDA, Alpha RA 12, Alemanha), um banho quente (Polystat, Cole-Parmer, USA), um agitador magnético (IKA C-MAG, HS 10, Alemanha), um transformador (0 a 220 V) (Sociedade Técnica Paulista LTDA, Varivolt, Brasil), um medidor de temperatura Pt-100 (Novus, Brasil) e dois eletrodos de titânio.

A tensão escolhida foi de 180 V, pois o objetivo de aplicação do campo elétrico foi aumentar o rendimento da extração e, conforme mencionado no Capítulo de Revisão Bibliográfica, quanto maior a tensão aplicada, maior o dano à estrutura celular. Além disso,

diferentes valores de tensão foram avaliados em estudo anterior e o valor de 180 V se mostrou o mais adequado para a extração de carotenoides. Como explicado anteriormente, com a passagem de corrente elétrica há um aquecimento da amostra (aquecimento ôhmico). Como o experimento foi realizado a 30 °C, realizou-se a passagem de água pela camisa da célula para que a temperatura fosse mantida na faixa desejada. Para tanto, o banho frio foi ajustado para 5 °C.

Após a etapa de lavagem e ajuste da condutividade elétrica, a célula de extração, que possui uma camisa de troca térmica, foi conectada ao banho frio através de mangueiras e o fluxo do banho de resfriamento foi ligado (juntamente com a agitação magnética), para que a amostra ficasse na temperatura de 6 ± 1 °C. Depois de a solução ter atingido essa temperatura, o experimento foi iniciado. A partir do momento em que a tensão foi ajustada para 180 V, marcou-se o tempo com um cronômetro. Na etapa de pré-tratamento, retiraram-se amostras de 15 mL (tubos falcon de 15 mL) nos tempos 1, 5 e 10 minutos.

4.3 Etapa difusiva

Uma vez terminada a etapa de pré-tratamento, a solução contendo a biomassa foi transferida para uma célula de extração de volume maior. Nessa etapa, foram adicionados etanol e água, de tal forma que a concentração final de etanol fosse de 75 %. A partir do momento em que o etanol foi adicionado, o tempo foi cronometrado novamente até 50 min. O banho quente, já pré-ajustado para 30 °C, foi conectado na célula, para que a solução se mantivesse nessa temperatura. Os tempos de coleta de amostra foram os seguintes: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 minutos. De maneira similar à etapa de pré-tratamento, foram coletados 15 mL de amostra em cada ponto.

4.4 Experimentos controle

A fim de avaliar a influência do campo elétrico moderado como etapa de pré-tratamento na extração de carotenoides de microalgas, é necessário um controle para que se possa eliminar a influência da temperatura na extração. Para tanto, os experimentos controle foram realizados de tal maneira que os perfis de aquecimento fossem iguais aos perfis de aquecimento dos experimentos com campo elétrico moderado.

O experimento controle de extração de carotenoides foi realizado de maneira similar ao experimento com campo elétrico. Ao invés de serem utilizados eletrodos, utilizou-se um banho quente para simular o aquecimento gerado pelo campo elétrico. Para igualar os perfis, foram realizados vários testes, nos quais foram alterados vários fatores, entre eles: temperatura do banho quente, temperatura do banho frio e tempo em que a temperatura do banho quente foi alterada.

Para tanto, a célula de extração, contendo a biomassa, foi conectada ao banho frio até a temperatura da amostra atingir 6 ± 1 °C. Uma vez atingido o equilíbrio térmico, trocou-se o banho frio pelo banho quente. No instante da troca, foi cronometrado o tempo para a etapa de pré-tratamento. No instante de 1 minuto e 30 segundos (ou quando a temperatura da biomassa atingiu 15 °C), aumentou-se a temperatura do banho quente para 32 °C. Os tempos de coleta foram os mesmos do experimento com campo elétrico moderado. O procedimento realizado para a etapa difusiva foi realizado da mesma maneira do que o realizado nos experimentos com campo elétrico moderado. A comparação entre os perfis de temperatura do experimento de extração com campo elétrico moderado e do controle está apresentada na Figura 4.2.

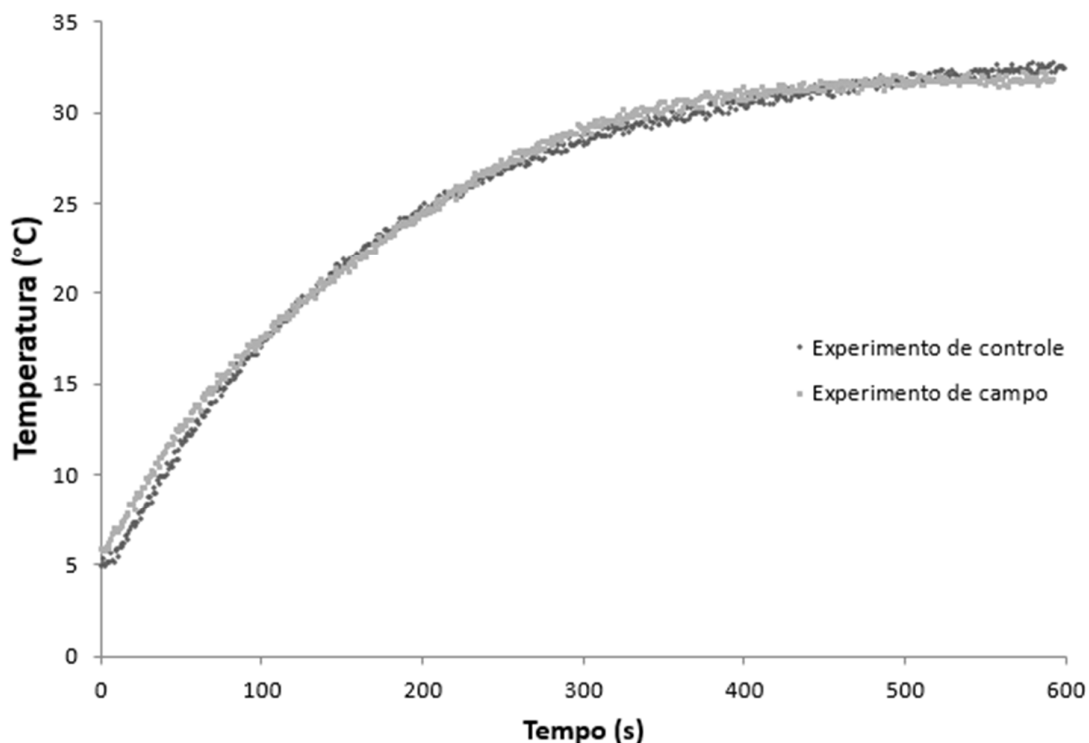


Figura 4.2: Comparação entre os perfis de temperatura quando utilizando o campo elétrico moderado e banho quente (controle) para aquecimento.

Como se pode notar, o perfil do experimento controle ficou similar ao perfil de temperatura do experimento com campo elétrico moderado. Assim, a extração de carotenoides será majoritariamente afetada pela ação do campo elétrico moderado.

4.5 Preparo das amostras para análise

4.5.1 Centrifugação, filtração e armazenamento

Depois de as amostras terem sido coletadas, elas foram centrifugadas (*Sigma*, Z-16KL, 10000 g, 20 minutos, 10 °C) para separar o sobrenadante (contendo os carotenoides extraídos) da biomassa. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado a vácuo com filtro de 0,45 µm. A etapa de filtração foi necessária para garantir que nenhum sólido tenha ficado no sobrenadante líquido, podendo ocasionar erro nas análises. Entre as filtrações, foram realizadas lavagens com álcool 70 % para garantir que a amostra seguinte não carregasse carotenoides da amostra anterior. Depois de filtrada, as amostras foram guardadas em frascos identificados e armazenados na geladeira. Como os carotenoides são sensíveis à luz e à temperatura, o armazenamento na geladeira foi necessário, pois as análises não foram realizadas no mesmo dia do experimento. Na Figura 4.3, é possível visualizar o aspecto final dos extratos contendo os carotenoides.



Figura 4.3: Visualização do aspecto final das amostras.

4.6 Análise do teor de carotenoides

A análise de carotenoides foi realizada de acordo com a metodologia apresentada por Rodriguez-Amaya (2001), com modificações. A seguir serão apresentadas as etapas da análise detalhadamente.

Para avaliar os diferentes tempos de extração foram selecionados tempos distintos, tanto na etapa de pré-tratamento, quanto na etapa difusiva. Os tempos escolhidos no experimento de controle foram os mesmo do campo elétrico.

Na etapa de pré-tratamento, foram escolhidos os tempos 1 e 10 minutos. Na etapa difusiva, escolheram-se os tempos 0, 5, 30 e 50 minutos. Para cada tempo escolhido, a análise foi feita em triplicata.

4.6.1 Saponificação

Quando se faz a extração de microalgas com etanol, vários componentes, além de carotenoides, são extraídos. Entre eles podemos citar lipídios e principalmente clorofilas. Como o objetivo do presente trabalho é apenas a quantificação de carotenoides, esses componentes que são extraídos podem gerar erros na hora de fazer a leitura no espectrofotômetro (será explicado no Capítulo 4.6.4). Para evitar que isso aconteça, é realizada a saponificação das amostras, garantindo assim que apenas carotenoides estejam presentes na amostra. A saponificação promove a hidrólise alcalina dos lipídios, assim como a hidrólise das clorofilas.

Foram pesados aproximadamente 3 gramas do extrato etanólico em frascos âmbar (para evitar contato com a luz) e anotado o valor exato de cada pesagem. A seguir, foi adicionada, em cada frasco, 3 mL da solução de saponificação (KOH-Metanol, 10 %). A reação de saponificação foi realizada *overnight* (17 horas). A análise foi realizada em triplicata.

4.6.2 Lavagem da amostra após a saponificação

Antes de realizar a quantificação do teor de carotenoides, foi necessário retirar os interferentes, que agora estão solubilizados na solução de saponificação, evitando, desta forma, erros, conforme discutido anteriormente. Esse procedimento é realizado em funis de separação, mostrado na Figura 4.4. Foram adicionados aproximadamente 15 mL de água destilada no funil e, em seguida, foram adicionados 30 mL de éter (éter etílico e éter de petróleo, 1:1). Essas etapas foram realizadas para que, quando o extrato contendo os carotenoides fosse levado ao funil de separação, ocorresse a dissolução das moléculas de

carotenoides na fase éter e de compostos mais polares na fase aquosa. Utilizaram-se dois éteres, pois, dependendo do carotenoide, ele só será capaz de ser dissolvido por solvente de polaridade similar. O éter etílico, mais polar, dissolverá majoritariamente os carotenoides polares, enquanto que o éter de petróleo, sendo apolar, irá dissolver os carotenoides apolares.



Figura 4.4: Ilustração da lavagem nos funis de separação.

Em seguida, a amostra foi adicionada ao funil de separação com pipeta de vidro. Adiciona-se água destilada até o funil ficar praticamente cheio. A solução de saponificação ficará na fase aquosa. Por ser mais densa, a água é retirada pela torneira, assim eliminando a solução que contém os interferentes. Normalmente, são feitas duas lavagens. Caso o pH da solução de descarte ainda esteja alcalino, se procede com mais uma lavagem. Retira-se a fase aquosa o máximo possível sem perder a fase éter. O solvente foi coletado em um erlenmeyer contendo duas espátulas do agente secante sulfato de potássio para remover possíveis gotas de água. O funil é lavado com um pouco de éter para garantir que nenhum carotenoide tenha sido perdido. A solução é então transferida para o balão do rota-evaporador, tomando cuidado para não transferir o sal nem perder amostra.

4.6.3 Preparo das soluções para a leitura no espectrofotômetro de absorção

O éter presente nos balões foi evaporado no rota-evaporador (banho do rota a 30 °C e banho de resfriamento a 7 °C). Os carotenoides, que agora estão na parede do balão, são dissolvidos com pequenas quantidades de etanol com auxílio de um banho de ultrassom. A seguir, o etanol contendo os carotenoides é transferido para um balão volumétrico. Esse procedimento é realizado tantas vezes quantas forem necessárias para que todos os carotenoides tenham sido dissolvidos, isto é, até o etanol presente no balão ficar transparente. Depois de o balão volumétrico ter sido completado com etanol, a amostra é vertida nas cubetas para proceder com a leitura no espectrofotômetro.

4.6.4 Leitura no espectrofotômetro

As amostra foram lidas em espectrofotômetro de absorção UV-Vis (*PG Instruments Ltd.*, T80 UV-Vis, United Kingdom) em solução de etanol. A determinação do teor de carotenoides foi realizada por medidas de absorbância dos extratos, de acordo com a Equação 4.1, na qual Abs é a absorbância medida, v é o volume de etanol utilizado na ressuspensão (mL), V é o volume de líquido (etanol + água) no instante da coleta da amostra, A_c é coeficiente de absorção da luteína em etanol (2550), m_1 é a massa total de biomassa utilizada no experimento de extração (g), F é o fator de perda de massa a cada

retirada de amostra e m_2 é a massa do extrato etanólico retirado para análise. A concentração de carotenoides foi expressa em μg de luteína equivalente/g amostra.

$$\text{Concentração de carotenoides} = \frac{\text{Abs} \cdot v \cdot 10000}{\text{Ac} \cdot \frac{m_1}{F}} \cdot \frac{V}{m_2} \quad (4.1)$$

De acordo com essa equação, para cada tempo de coleta existem diferentes fatores e diferentes volumes do extrato. Isso é demonstrado na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Fator de perda de massa e volume do extrato na hora da coleta para os extratos coletados.

Tempo (min)	Fator	Volume do extrato na hora da coleta (mL)
Pré-tratamento		
1	0	80
10	1,60	50
Etapa difusiva		
0	2,29	255
5	2,77	210
30	3,53	165
50	4,31	135

Conforme apresentado na Tabela 3.3 da seção 3.1.2, o carotenoide majoritário da microalga *Chlorella* é a luteína. Assim, o teor de carotenoide é calculado no pico da luteína, que se encontra em aproximadamente 450 nm. Além da leitura do pico, é feita uma varredura de 750 a 400 nm, não apenas para ver o comportamento da absorvância em diferentes faixas de comprimento de onda, mas também para verificar se não houve interferência de clorofilas.

4.7 Extração exaustiva

A fim de determinar o conteúdo total de carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis*, foi realizada uma extração exaustiva, em triplicata. Essa extração foi realizada de acordo com a metodologia apresentada por Mandelli *et al.* (2012) com algumas modificações. A biomassa foi macerada com acetato de etila seguido por acetona e centrifugação. Esse procedimento se repetiu até que a biomassa não apresentasse coloração. Os passos seguintes se deram da mesma maneira que foi enunciado anteriormente (Seção 4.6).

4.8 Análise de cor

Para complementar o estudo do tempo de extração, foram feitas análises de cor nos extratos (HunterLab, ColorQuest XE, USA). O parâmetro utilizado para avaliar a cor foi o ΔE^* , que pode ser interpretado como a diferença total de cor. O ΔE^* é calculado como a distância Euclidiana de dois pontos no espaço tridimensional definido por L^* , a^* e b^*

(Equação 4.2). O L^* se refere à luminosidade ($L^* = 0$ significa cor preta; $L^* = 100$ significa cor branca). O a^* tem coordenadas negativas para cores verdes e positivas para cores vermelhas. Já o b^* tem valores positivos para cores amarelas e negativos para cores azuis (Sant'anna *et al.*, 2013).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2} \quad (4.2)$$

As amostras que foram analisadas não passaram pela etapa de saponificação, elas foram analisadas como extratos puros.

4.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados coletados foi feita usando *software* Statistica® (7.0, Statsoft Inc., Tulsa, USA). Utilizou-se o teste de Tukey e ANOVA para determinar diferenças significativas com 95% de confiança.

5 Resultados

Neste capítulo, serão apresentados os resultados de concentração de carotenoides totais dos extratos, bem como o rendimento da extração em comparação com a extração exaustiva. Ainda, serão mostrados os resultados da análise de cor de alguns extratos para fins comparativos com os resultados da análise de carotenoides.

5.1 Concentração de carotenoides nos extratos e rendimento de extração

A partir da análise dos extratos no espectrofotômetro foi possível obter os valores de absorbância. Utilizando a Equação 4.1, apresentada no capítulo de materiais e métodos, calculou-se a concentração de carotenoides para cada tempo de coleta. Como as análises foram realizadas em triplicata, calculou-se a média de concentração em cada ponto. Os experimentos de extração foram realizados em duplicata, calculando-se a média. A partir dessa média, calculou-se o rendimento de extração para cada tempo de coleta a partir do resultado da extração exaustiva. Na Tabela 5.1, são mostrados a média das duplicatas dos experimentos, o desvio padrão e o rendimento de extração para cada ponto analisado. Os pontos PT 1 e PT 10 representam os tempos 1 e 10 minutos da etapa de pré-tratamento, respectivamente. Já os pontos ED 0, ED 5, ED 30 e ED 50 representam os tempos 0, 5, 30 e 50 minutos da etapa difusiva, respectivamente.

Tabela 5.1: Concentração de carotenoides totais, desvio padrão e rendimento de extração para diferentes pontos de coleta dos experimentos de extração controle, utilizando MEF e extração exaustiva*

Ponto de Coleta	Concentração de carotenoides totais (μg de luteína equivalente/g amostra)		Rendimento de extração	
	Controle	MEF	Controle	MEF
PT 1	3,89 ^{Ec} \pm 0,12	4,19 ^{Ed} \pm 0,12	0,23%	0,25%
PT 10	8,17 ^{Ec} \pm 1,10	8,04 ^{Ed} \pm 1,22	0,48%	0,47%
ED 0	556,73 ^{Db} \pm 13,32	617,0 ^{Dc} \pm 15,27	32,62%	36,15%
ED 5	524,42 ^{Db} \pm 8,68	832,16 ^{CBbc} \pm 19,12	30,67%	48,76%
ED 30	717,22 ^{Ca} \pm 36,68	882,59 ^{Bab} \pm 8,3	42,03%	51,72%
ED 50	807,09 ^{Ba} \pm 31,72	976,25 ^{Aa} \pm 47,59	47,29%	57,21%
Extração exaustiva	1706,55 \pm 0,11			

*média \pm desvio padrão; amostras com a mesma letra minúscula na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$); amostras com a mesma letra maiúscula em colunas diferentes não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

A análise desta tabela revela que não houve diferença significativa entre os pontos ED 50 e ED 30 do experimento de extração via MEF. Esse mesmo comportamento acontece no experimento controle. Fazendo a comparação entre mesmos pontos de coletas dos dois experimentos, nota-se que para os pontos ED 5, ED 30 e ED 50, nenhum deles é estatisticamente igual evidenciando que o campo elétrico de fato proporciona uma melhor extração. Por exemplo, no ponto ED 5 do controle, o teor foi de 524,42 μg de luteína equivalente/g amostra, enquanto no campo elétrico foi de 832,16 μg de luteína equivalente/g amostra. Os pontos ED 30 e ED 5 do campo elétrico são estatisticamente iguais, indicando que a maior parte dos carotenoides foi extraída no começo da etapa

difusiva, comportamento que não é observado no controle, pois os pontos ED 30 e ED 5 diferem estatisticamente.

Uma possível explicação para esse fenômeno é o aumento da permeabilidade da membrana celular gerada pela aplicação do campo elétrico. Como no controle não há esse aumento, a difusão é mais demorada. O ponto ED 50 do controle é estatisticamente igual ao ponto ED 5 do campo elétrico. Isso mostra que o campo elétrico, de fato, promove uma difusão mais acelerada. Todos os pontos da etapa de pré-tratamento são estatisticamente iguais, comprovando que a concentração de 25 % de etanol não foi suficiente para extrair os carotenoides, uma vez que o ponto PT 1 e PT 10 não apresentaram diferença significativa.

Esses dados são evidenciados na Figura 5.1, que apresenta a concentração de carotenoides nos extratos em diferentes tempos de coleta.

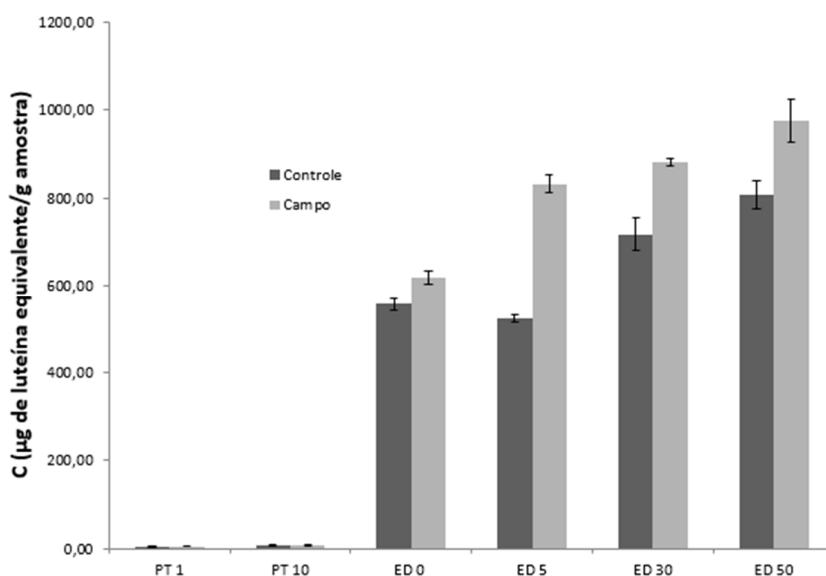


Figura 5.1: Concentração de carotenoides nos extrato em diferentes tempos de coleta.

Com base na Tabela 5.1 e na Figura 5.1, fica claro que a extração utilizando 25 % de etanol na etapa de pré-tratamento não foi suficiente para extrair os carotenoides, pois o rendimento da extração foi muito baixo. Dessa forma, torna-se necessária a utilização da etapa difusiva. Isso é demonstrado na análise dos pontos PT 10 e ED 0. Por exemplo, para o campo elétrico, o rendimento de extração foi de apenas 0,47 % na etapa de pré-tratamento. Já para o tempo 0 minutos da etapa difusiva, ou seja, logo após a adição de mais etanol, o rendimento foi bem maior, no valor de 36,15 %, indicando que a mudança de 25 % para 75 % na concentração de etanol na solução possibilitou uma melhor solubilização dos carotenoides. Fazendo uma comparação entre os desvios padrões de cada ponto de coleta para a etapa difusiva, isto é, uma comparação entre campo e controle para o mesmo ponto, fica claro que o campo elétrico de fato promove uma melhor extração em comparação ao método convencional.

Os resultados de concentração dos diferentes extratos analisados durante a etapa difusiva podem ser visualizados na Figura 5.2, que mostra a concentração de carotenoides em função do tempo.

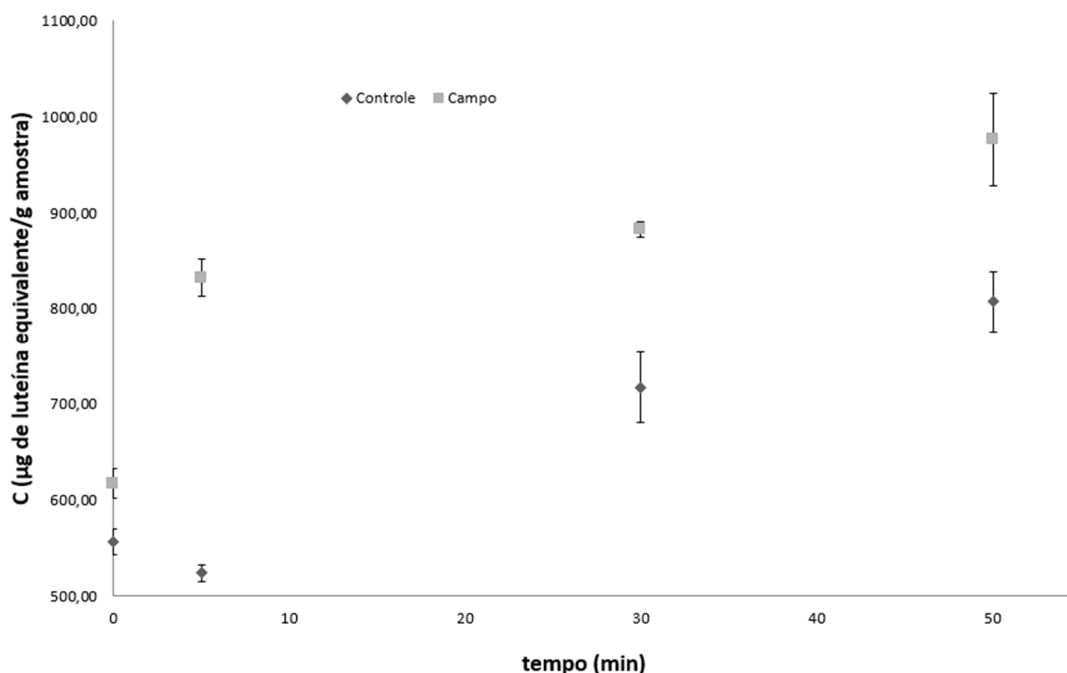


Figura 5.2: Variação da concentração de carotenoides da etapa difusiva com o tempo

No primeiro ponto de coleta da etapa difusiva (ED 0), nota-se que a extração auxiliada por campo elétrico é mais efetiva que pelo método convencional. Como o campo elétrico promove o aumento da permeabilidade da membrana celular, o efeito da adição de mais solvente de extração na etapa difusiva é mais pronunciado para o experimento de campo elétrico. O ponto ED 5 do controle está fora da tendência; provavelmente foi gerado por algum erro na hora da análise ou no próprio experimento. Mesmo assim, o método MEF foi mais efetivo que o controle quanto à extração, pelos motivos citados anteriormente. Esse mesmo comportamento pode ser observado para os demais pontos, evidenciando que o campo elétrico moderado de fato ajuda na extração dos carotenoides de microalgas. Essa conclusão também é apoiada pelos resultados de rendimento da Tabela 5.1. Em todos os pontos da etapa difusiva, o campo elétrico gerou um rendimento de extração maior.

Como não foram encontrados estudos de outros grupos de pesquisa a respeito da extração de carotenoides de microalgas utilizando campo elétrico moderado, os resultados obtidos nesse trabalho serão comparados com a extração utilizando campo elétrico pulsado. Essa tecnologia é similar ao campo elétrico moderado, porém utiliza tensões maiores (> 1kV/cm) do que as utilizadas no campo elétrico moderado (até 1kV/cm).

Parniakov *et al.* (2015) estudaram o efeito do campo elétrico pulsado na extração de compostos de valor nutricional da microalga *Nannochloropsis spp.* usando solventes orgânicos e água. Eles concluíram que a utilização de campo elétrico pulsado permite uma extração efetiva e com uso de solvente em uma quantidade menor, evitando desperdício e incremento de rejeitos. Além disso, notou-se um aumento na extração de pigmentos.

Luengo *et al.* (2014) estudaram o efeito do campo elétrico pulsado na permeabilização e extração de pigmentos de *Chlorella Vulgaris*. Os resultados obtidos indicaram que o campo elétrico pulsado tem o potencial de impor uma melhor extração dos pigmentos, sendo que eficácia pode depender de diversos parâmetros, como por exemplo força do campo, tempo de tratamento e tempo decorrido desde a aplicação do campo até o

processo de extração. Eles ainda comentam que devem ser feitos mais estudos com relação às condições do processo para ter uma extração mais otimizada.

5.2 Análise de cor

Os valores de L^* , a^* e b^* são mostrados na tabela 5.2. Esses valores correspondem às médias dos experimentos feitos em duplicata.

Tabela 5.2: Valores de L^* , a^* e b^* dos experimentos de controle de campo elétrico*.

	L^*		a^*		b^*	
	Controle	MEF	Controle	MEF	Controle	MEF
PT 5	87,8 ± 0,2 ^{Aa}	85,1 ± 0,2 ^{Aa}	-7,5 ± 0,9 ^{Aa}	-6,8 ± 0,3 ^{Aa}	46,8 ± 1,0 ^{Aa}	58,6 ± 0,5 ^{Aa}
ED 1	78,1 ± 0,0 ^{Bb}	77,5 ± 0,2 ^{Bb}	-20,6 ± 0,0 ^{Bb}	-21,1 ± 0,2 ^{Bb}	92,9 ± 0,0 ^{Bb}	93,3 ± 1,8 ^{Bb}
ED 10	79,2 ± 1,2 ^{Bb}	76,9 ± 0,1 ^{Bb}	-21,2 ± 0,1 ^{Bb}	-21,2 ± 0,3 ^{Bb}	90,2 ± 0,4 ^{Bb}	93,5 ± 0,7 ^{Bb}
ED 20	77,9 ± 0,7 ^{Bb}	76,5 ± 0,3 ^{Bb}	-22,0 ± 1,0 ^{Bb}	-21,6 ± 0,2 ^{Bb}	92,2 ± 2,6 ^{Bb}	93,1 ± 0,3 ^{Bb}
ED 40	77,4 ± 0,0 ^{Bb}	77,1 ± 0,9 ^{Bb}	-21,9 ± 2,0 ^{Bb}	-21,1 ± 0,0 ^{Bb}	91,5 ± 1,1 ^{Bb}	93,3 ± 0,8 ^{Bb}
ED 50	77,4 ± 0,0 ^{Bb}	75,2 ± 0,0 ^{Bb}	-22,8 ± 0,0 ^{Bb}	-22,6 ± 0,0 ^{Bb}	90,4 ± 0,0 ^{Bb}	94,9 ± 0,0 ^{Bb}

*média ± desvio padrão; amostras com a mesma letra minúscula na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$); amostras com a mesma letra maiúscula em colunas diferentes não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Como se pode perceber, o valor de b^* para o pré-tratamento (PT 5) é menor, ou menos positivo, que os valores das amostras da etapa difusiva, lembrando que quanto mais positivo é o valor de b^* , mais amarelo será a solução. Como foi concluído na seção 5.1.3, a etapa de pré-tratamento não foi suficiente para extrair os carotenoides e como eles apresentam coloração amarela, é de se esperar que as amostras da etapa difusiva tenham um valor de b^* maior. Como as clorofilas não foram separadas para fazer essa análise, os valores de a^* seguem o mesmo padrão do b^* quando comparamos pré-tratamento com a etapa difusiva (quanto mais negativo é o valor de a^* , mais verde é a amostra). Quando é feita a comparação entre pontos da etapa difusiva, nota-se que para nenhum dos parâmetros (L^* , a^* , b^*) as amostras diferem-se entre si.

Fazendo o uso da Equação 4.2 apresentada na seção 4.8, calculou-se a diferença total de cor entre os pontos ED 1 e ED 50 do experimento de controle e com campo elétrico moderado. Para o controle, o valor de ΔE^* foi de 3,44 e para os experimentos com campo elétrico moderado o valor de ΔE^* foi de 3,23. Segundo Gonnet (1998), valores de ΔE^* iguais ou superiores a 1 representam diferença de cor detectável pelo olho humano. Dessa forma, esses pontos analisados apresentam diferença de cor que foram perceptíveis a olho nu.

A análise de cor não se mostrou adequada quanto à estimativa da concentração de carotenoides nos extratos, que possivelmente seria verificada pelo valor de b^* , como pôde ser visto anteriormente no teste de Tukey e na diferença de cor total. Isso provavelmente aconteceu devido à interferência das clorofilas na análise. Como a concentração das clorofilas em cada tempo coletado não foi determinada e como as clorofilas apresentam absorvância no pico próximo ao amarelo (Figura 3.1 da revisão bibliográfica), a estimativa da concentração dos carotenoides utilizando a análise de cor fica dificultada.

6 Conclusões e Trabalhos Futuros

Esse capítulo tem o propósito de apresentar de maneira resumida as principais conclusões apresentadas no Capítulo 5, assim como as sugestões para trabalhos futuros.

A análise da concentração de carotenoides totais nos extratos evidenciou que o campo elétrico moderado proporciona uma extração com maior rendimento, quando comparado ao método convencional (57,21% comparado a 47,29% de rendimento). Isso foi apoiado pela análise estatística, que mostrou que o ponto ED 50 do campo elétrico é estatisticamente diferente do ponto ED 50 do controle. Outra conclusão gerada foi que o campo elétrico promove uma difusão mais rápida, pois o ponto ED 5 do MEF é estatisticamente igual ao ponto ED 30 do controle. Isso pode ser explicado pela teoria de eletroporação, na qual a aplicação de um campo elétrico aumenta a permeabilidade da membrana celular. Além disso, concentrações de 25 % de etanol não foram suficientes para extrair os carotenoides, mesmo com o uso de campo elétrico. Só foi possível fazer uma extração eficiente com o uso de 75 % de etanol aquoso.

A análise de cor mostrou que, devido à interferência das clorofilas no extrato, não é possível calcular a concentração de carotenoides sem utilizar o procedimento descrito nesse trabalho. Contudo, essa análise apoiou a conclusão gerada pela análise da concentração de carotenoides quando se diz respeito ao baixo rendimento de extração da etapa de pré-tratamento; a cor das amostras do PT tem valores de b^* menos positivos e de a^* menos negativos que as da etapa difusiva, evidenciando que menos carotenoides e clorofilas foram extraídas respectivamente.

Para futuros trabalhos, seria interessante realizar os experimentos em temperaturas diferentes (por exemplo 40, 50 e 60 °C) para a realização de uma cinética de extração, assim determinando os parâmetros da Lei de Arrhenius. Outra possibilidade seria a utilização de diferentes concentrações de etanol em água na etapa de pré-tratamento, e, assim, verificar qual concentração de etanol é necessária para se conseguir uma boa extração nessa etapa. Também poderia ser aplicado o campo elétrico apenas com água no pré-tratamento e verificar a influência desse fator na extração da etapa difusiva.

Referências.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. D. A. C. E. S.; FARO, Z. P. D. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 233-243, 2006. ISSN 1415-5273. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000200010&nrm=iso >.

AND, J. J. M. C.; WEST, C. E. BIOAVAILABILITY AND BIOCONVERSION OF CAROTENOIDS. **Annual Review of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 19-38, 1998. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nutr.18.1.19> >.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2// 2010. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109002408> >.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 5// 2007. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007000262> >

COLLE, I. J. P. et al. Carotene Degradation and Isomerization during Thermal Processing: A Review on the Kinetic Aspects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 00-00, 2015. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.790779> >.

DE OLIVEIRA, C. F. et al. Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 201-208, 5// 2015. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856415000302> >.

DONSÌ, F.; FERRARI, G.; PATARO, G. Applications of Pulsed Electric Field Treatments for the Enhancement of Mass Transfer from Vegetable Tissue. In: (Ed.). **Food Engineering Review**, v.2, 2010. p.109-130.

FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry**. 4th. 2007.

GOLDSTEIN, D. B. Proceedings of the 1986 UAEM/IRIEM Research Symposium on Toxicology Effect of alcohol on cellular membranes. **Annals of Emergency Medicine**,

v. 15, n. 9, p. 1013-1018, 1986/09/01 1986. ISSN 0196-0644. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196064486801202> >.

GONNET, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited - 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 409-415, // 1998. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032211502&partnerID=40&md5=e29b5f3139d9ea641c5c20daba080ce5> >.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 625, 2011. ISSN 1660-3397. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1660-3397/9/4/625> >.

HENRIQUES, M.; SILVA, A.; ROCHA, J. **Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method.** *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: A. Mendez-Vilas Ed. 2007.

INBARAJ, B. S.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, n. 1–2, p. 193-199, 1/13/ 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730502039X> >.

KIM, S.-K. **Handbook of Marine Microalgae** 2015.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459-516, 12// 2005. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009829970500066X> >.

KULSHRESTHA, S.; SASTRY, S. Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 4, n. 2, p. 189-194, 6// 2003. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856403000031> >.

KULSHRESTHA, S. A.; SASTRY, S. K. Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 78-83, 1// 2010. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856409001167> >.

KUSNADI, C.; SASTRY, S. K. Effect of moderate electric fields on salt diffusion into vegetable tissue. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 329-336, 6// 2012. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877412000155> >.

LEU, S.; BOUSSIBA, S. Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 169-183, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84902175878&partnerID=40&md5=f03b4029e64265ac453f6eb189a3ef05> >.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001. ISSN 0471142913.

LUENGO, E. et al. Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. **The Journal of Membrane Biology**, v. 247, n. 12, p. 1269-1277, 2014. ISSN 1432-1424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-014-9688-2> >.

M. PRADO, J.; C. VEGGI, P.; ANGELA A. MEIRELES, M. Extraction Methods for Obtaining Carotenoids from Vegetables - Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 29-66, // 2014. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cac/2014/00000010/00000001/art00005> >.

MANDELLI, F. et al. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 126-134, 2012. ISSN 1517-8382. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000100014&nrm=iso >.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186-202, 11/15/ 2014. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135414005211> >.

MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Pulsed Electric Fields Processing Basics. In: ZHANG, H. Q.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V., et al (Ed.). **Nonthermal Processing Technologies for Food**, 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: a review.**: 217-232 p. 2010.

NIIZU, P. Y., **Fontes de Carotenóides Importantes para a Saúde Humana** [Mastering thesis (Food Science)], Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, 2003.

PARNIAKOV, O. et al. Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 79-85, 2// 2015. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856414001970> >.

PATRA, M. et al. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 4, p. 1121-1135, 2006. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349506723049> >.

PETO, R.; DOLL, R.; BUCKLEY J. D.; SPORN, M. B. **Can dietary betacarotene materially reduce human cancer rates?** 1981. *Natures* 290:201-208.

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307-3312, 10// 2011. ISSN 0306-2619. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261910004897> >.

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

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

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, Part 3, p. 735-750, 2015. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915301356> >.

SAINI, R. K. et al. Effect of dehydration methods on retention of carotenoids, tocopherols, ascorbic acid and antioxidant activity in *Moringa oleifera* leaves and preparation of a RTE product. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2176-2182, 2014. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84921068772&partnerID=40&md5=5560596203c3c4fd10ea87dd7bea5ce2> >.

SANT'ANNA, V. et al. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. **Dyes and Pigments**, v. 98, n. 3, p. 601-608, 9// 2013. ISSN 0143-7208.

Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143720813001381>>.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2// 2006. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172306705497> >.

SUN, D.-W. **Emerging technologies for food processing**. Elsevier, 2014. ISBN 0124104819.

SUN, Z. et al. **Microalgae as a source of lutein: Chemistry, biosynthesis, and carotenogenesis**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 153: 37-58 p. 2016.

VOROBIEV, E.; LEOVKA, N. **Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials**. Springer, 2008.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; KLAAS, J. H. **Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae**: 405-413 p. 2013.

WOODSIDE, J. V. et al. Carotenoids and health in older people. **Maturitas**, v. 80, n. 1, p. 63-68, 2015. ISSN 0378-5122. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378512214003296> >.

