

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

BRUNA ELISE SAUER LEAL

**OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS A PARTIR DA
HIDRÓLISE FOSFÓRICA DA BIOMASSA DE MICROALGAS UTILIZADAS NA
BIOMITIGAÇÃO DE CO₂ DE EFLUENTE GASOSO DE CHURRASCARIA**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2015

BRUNA ELISE SAUER LEAL

**OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS A PARTIR DA
HIDRÓLISE FOSFÓRICA DA BIOMASSA DE MICROALGAS UTILIZADAS NA
BIOMITIGAÇÃO DE CO₂ DE EFLUENTE GASOSO DE CHURRASCARIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Real Prado
Coorientadora: Prof. Dra. Adelia Grzybowski

CURITIBA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L435o Leal, Bruna Elise Sauer
2015 Obtenção de oligossacarídeos prebióticos a partir da hidrólise fosfórica da biomassa de microalgas utilizadas na biomitigação de CO₂ de efluente gasoso de churrascaria / Bruna Elise Sauer Leal.-- 2015.
120 f.: il.; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2015.
Bibliografia: f. 106-115.

1. Oligossacarídeos. 2. Prebióticos. 3. Microalgas.
4. Ácido fosfórico. 5. Polissacarídeos. 6. Probióticos.
7. Ácidos graxos. 8. Alimentos funcionais. 9. Microscopia.
10. Físico-química. 11. Gases - Purificação. 12. Tecnologia ambiental - Dissertações. I. Prado, Marcelo Real, orient.
II. Grzybowski, Adelia, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. IV. Título.

CDD 22 -- 363.7

TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 046/2015

OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS A PARTIR DA HIDRÓLISE FOSFÓRICA DA BIOMASSA DE MICROALGAS UTILIZADAS NA BIOMITIGAÇÃO DE CO₂ DE EFLUENTE GASOSO DE CHURRASCARIA

por

BRUNA ELISE SAUER LEAL

Dissertação apresentada às 9 horas do dia 26 de Fevereiro de 2015, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Real Prado (Orientador)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Dr. Bill Jorge Costa
Programa de Pós-Graduação em Bioenergia
Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR

Prof. Dr. Pedro Ramos da Costa Neto
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Fernando Hermes Passig
Coordenador do PPGCTA

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa

*Aos meus pais, pelo suporte em todos os momentos da minha vida,
sempre me auxiliando na conquista dos meus sonhos,
pela educação e sobretudo
pelo carinho e amor*

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Real Prado, por me acolher na UTFPR durante a fase de adaptação à nova instituição, me auxiliando a fazer novos contatos, me apresentar o belo projeto desenvolvido na churrascaria, pela orientação e confiança depositada em mim durante estes dois anos de trabalho.

À minha coorientadora Prof. Dra. Adelia Grzybowski, por permitir que eu desenvolvesse este trabalho a partir de suas novas ideias, por toda dedicação e envolvimento em todas as etapas do trabalho, e pelos momentos de carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. José Domingos Fontana, pela oportunidade de aprender com toda sua sabedoria e experiência, me acolher em seu laboratório e contribuir ativamente da concepção à conclusão deste trabalho, nunca deixando de lado o bom humor.

Ao grupo de pesquisa do LQBB, fundamentais para o desenvolvimento do trabalho: Marcela Tiboni, por estar sempre pronta para sanar minhas dúvidas e pelo auxílio nos experimentos do cultivo; Heide Koop, pelas análises cromatográficas e preciosas dicas e ajudas; Lucas Scremin, pelo empenho e dedicação nas análises de determinação de proteínas; Cassandra Krüger, por estar sempre disposta a ajudar e pelas incontáveis análises realizadas no espectrofotômetro.

Aos meus pais, Elcio e Elenise, por serem os maiores incentivadores da carreira acadêmica, pela motivação aos estudos, e por não medirem esforços para contribuir com a minha felicidade, me dando todo suporte e amor.

Ao Iohannes, meu amor, por estar sempre presente, compartilhando comigo todos os momentos e emoções que o mestrado me proporcionou, sempre me incentivando e motivando a seguir em frente, com amor e compreensão.

À minha colega Valéria Cavalcanti, pelos vários meses de convívio no laboratório, onde tivemos momentos de aprendizado e de amizade.

Aos meus colegas do PPGCTA que compartilharam momentos de angústia e alegria, e foram muito importantes nesta caminhada.

Ao PPGCTA pela oportunidade, sobretudo aos Professores que contribuíram para a minha formação no programa, me permitindo aprender um pouco a partir de cada um.

Ao Anderson Sakuma e Leandro Pegoraro, que me auxiliaram muito no início do desenvolvimento do trabalho, me inserindo no projeto e cedendo equipamentos e amostras.

Ao Tobias Almeida e Caio, do TECPAR, pela imensa ajuda na realização das coletas de biomassa de microalgas nos fotobiorreatores da churrascaria.

Ao MSc. Giuliano F. Zagonel, do TECPAR, pela realização das análises cromatográficas dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

Ao Dr. Bill Jorge Costa e ao Prof. Dr. Pedro Ramos da Costa Neto pelas valiosas contribuições e críticas realizadas durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Antônio Ostrensky Neto, do Departamento de Zootecnia, da UFPR, e sua aluna Aline Horodesky, por cederem gentilmente amostras de microalgas liofilizadas também utilizadas na realização do trabalho.

Ao Eduardo S. Chaves, da UTFPR - Ponta Grossa pelo contato com o Laboratório de Análises de Resíduos da UFSC, para realização da análise de ICP, realizada pelo MSc. Rui Miguel de Carvalho Júnior.

À Capes, pelo auxílio financeiro durante os dois anos de mestrado.

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados
pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”*

(Albert Einstein)

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

LEAL, Bruna Elise Sauer. **Obtenção de oligossacarídeos prebióticos a partir da hidrólise fosfórica da biomassa de microalgas utilizadas na biomitigação de CO₂ de efluente gasoso de churrascaria**. 2015. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

As microalgas vêm sendo utilizadas na área ambiental nos processos de biomitigação de CO₂, uma vez que o utilizam em seu metabolismo para produzirem biomassa celular, a qual pode ser utilizada para fins nutricional e comercial. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de oligossacarídeos prebióticos oriundos de biomassa microalgal por meio de hidrólise fosfórica em diferentes condições moderadas de pH e termopressurização. Foi utilizada biomassa de um cultivo utilizado no sistema de tratamento de efluente gasoso de uma churrascaria de Curitiba, comparativamente com duas biomassas comerciais, *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*. Foram realizadas análises microscópicas e físico-químicas para a caracterização das biomassas, tais como umidade, cinzas, teor de carboidratos, lipídeos e proteínas. A partir da massa lipídica total foram realizadas transesterificações alcalinas e os resultados analisados por métodos cromatográficos, antes e após clarificação dos ésteres metílicos. A título de comparação inicial com as biomassas *in natura*, as biomassas passaram por pré-tratamentos: remoção dos lipídeos com organossolventes, purificação da parede celular com detergente SDS (*Sódio Dodecil Sulfato*) e recuperação do resíduo polimérico extraído pelo detergente. Estas biomassas derivadas bem como as integrais foram hidrolisadas em termopressurizador a 4,5 atm (156 °C), utilizando ácido fosfórico a pH 2,0 ou controles com água (solvólise). Adicionalmente foram realizados ensaios enzimáticos com α -amilase e β -1,3 glucanase nos oligossacarídeos resultantes dos hidrolisados fosfóricos das biomassas *in natura*. Com as três biomassas de microalgas *in natura* foi realizado planejamento fatorial 3², frente às variáveis ácido fosfórico (pH 2,5, 2,0, e 1,5) e pressão atmosférica (3 atm – 147 °C, 4,5 – 156 °C e 6,0 atm – 175 °C). Para todos os hidrolisados foram analisados pH após a hidrólise, teor de açúcar redutor e de açúcar total e perfil cromatográfico. Os oligossacarídeos obtidos foram utilizados como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos probióticos, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei*, para avaliação do crescimento, pH e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os resultados indicaram que apesar de ter sido inoculada uma cepa de *C. vulgaris* no sistema de fotobiorreatores de mitigação de CO₂ da churrascaria, não se instalou um cultivo puro e, portanto, foi denominado de mescla Devons. O componente majoritário para todas as biomassas foi proteína, sobretudo para *S. platensis* (59,5 %). As transesterificações alcalinas mostraram a eficiência no processo, indicando semelhança no perfil da cromatografia gasosa da mescla Devons e *C. vulgaris*. O tratamento com SDS mostrou maior eficiência na remoção de proteínas, sobretudo em *S. platensis*. As hidrólises das biomassas pré-tratadas mostraram maior teor de oligossacarídeos na amostra *in natura* para mescla Devons, deslipidificada e tratada com SDS para *C. vulgaris* e semelhança entre a *in natura* e os dois primeiros tratamentos para *S. platensis*. Os resultados dos ensaios

enzimáticos indicaram predominância de oligossacarídeos oriundos de laminarina (β -1,3 glucana), portanto prebióticos e resistentes à ação amilásica do trato gastrointestinal (TGI) superior. Os resultados do planejamento fatorial mostraram que a biomassa *in natura* de *S. platensis* foi a que apresentou os melhores resultados de hidrólise em quantidade de açúcar liberado, seguida da biomassa de mescla Devons e *C. vulgaris*. As melhores condições de produção e pureza de oligossacarídeos foram próximas ao ponto central do planejamento fatorial. Os cultivos dos probióticos utilizando os hidrolisados fosfóricos permitiu o crescimento das bacterias benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), e diferenças no pH, bem como na produção de AGCC, sobretudo ácido láctico, monitorado por cromatografia líquida. Portanto, este trabalho mostra que foram produzidos oligossacarídeos prebióticos a partir do tratamento fosfórico da biomassa de microalgas, resultando uma nova aplicação em potencial de tal biomassa formada a partir do CO₂ e outros componentes voláteis presentes no efluente gasoso da churrascaria.

Palavras-chave: Microalgas. Ácido fosfórico. Polissacarídeo. Ácidos graxos de cadeia curta. Probiótico. Nutracêutico.

ABSTRACT

LEAL, Bruna Elise Sauer. **Obtainment of prebiotic oligosaccharides from phosphoric hydrolysis of microalgae biomass used in CO₂ biomitigation in a steakhouse.** 2015. 120 pages. (Master in Environmental Sciences) - Graduation Program in Environmental Science & Technology, Federal Technological University of Paraná, Curitiba, 2015.

Microalgae have been utilized in the environmental area in CO₂ biomitigation processes as they use it in their metabolism for the production of cellular biomass, which can then be utilized for nutritional and commercial purposes. Within this scope, the current research elected as the main objective, the obtention of nutraceutical oligosaccharides from microalgae biomasses through a phosphoric acid hydrolysis under different and moderated pH and thermopressurization conditions. One biomass, coming from a gaseous effluent treatment system from a steakhouse was compared to commercial biomasses, *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*. Microscopic and physicochemical analyses were carried for these biomasses characterization, namely moisture, ashes, carbohydrates, lipids and protein contents. Alkaline methyl transesterifications were realized in the total lipid fractions and then the corresponding products analyzed by chromatographic methods. As compared to the native biomasses, they were subjected to pretreatments: organic solvents removal of lipids, cell wall purification with detergent SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) and recovery of polymeric molecules of the later extracts. These derived biomasses fractions, as well as the whole ones were partially or totally hydrolyzed with thermopressurization at 4.5 atm (156 °C) using diluted phosphoric acid at pH 2 or with water as controls (solvolysis). Enzyme assays were further performed with α -amylase and β -1,3 glucanase in the phosphoric acid hydrolyzed oligosaccharides from native biomasses. A 3² factorial design was carried out with the three samples of whole microalgae biomasses, considering the variables phosphoric acid pH (2.5, 2.0, e 1.5) and atmospheric pressure (3 atm – 147 °C, 4.5 – 156 °C and 6.0 atm – 175 °C). For all hydrolysates were analyzed pH after hydrolysis, total and reducing sugar contents and chromatographic profiles. The resulting oligosaccharide samples were offered as carbon source for the culture of probiotic microorganisms *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* for the evaluation of bacterial growth and short chain fatty acids (SCFAs) production. Overall results indicated that irrespective to the pure native of the *C. vulgaris* inoculum into the CO₂ mitigation system of the steakhouse, a pure massive biomass did not result and hence the designation of Devons' blend for. The major component of microalgae biomasses was protein, above all for *S. platensis* (59.5 %). Alkaline transesterification showed the efficiency of the process, indicating similarity among the methyl esters arising either from *C. vulgaris* or the Devons' blend as analyzed by gas chromatography. SDS treatment was more efficient for protein removal in the case of *S. platensis* biomass. The pretreated biomasses once hydrolysed displayed higher oligosaccharide contents for the Devons' blend native, *C. vulgaris* delipidified and SDS-treated sample as well some similarity between native and both pretreatments in the case of *S. platensis*. The enzymatic assay indicated predominance of laminarin oligosaccharides (β -1,3 glucan), therefore prebiotics are resistant to amylasic action in upper

gastrointestinal tract. The factorial design showed that the particular *S. platensis* native biomass led to the best result of hydrolysis to reducing simple and oligosaccharidic sugars, then decreasingly followed by the Devons' blend and *C. vulgaris* and the best conditions for the production and purity of the oligosaccharides were close to the central point of the factorial design. Probiotic cultures from the phosphoric acid hydrolysates allowed the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, beneficial bacteria growth, pH differences and short chain fatty acids production, above all, lactic acid, as monitored by high performance liquid chromatography. Therefore, this research indicated the feasibility of nutraceutical or prebiotic oligosaccharide production from microalgae biomasses, thus revealing a novel technological destination for these particular biomasses and fractions, once formed at the expense of CO₂ and other volatile components from the gaseous effluent from a steakhouse.

Key-words: Microalgae. Phosphoric acid. Polysaccharide. Short chain fatty acids. Probiotics. Nutraceuticals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da fotossíntese e destinos metabólicos da glucose no metabolismo celular.	24
Figura 2 - Ciclo de Calvin.....	24
Figura 3 - Diferenças entre o metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. .	26
Figura 4 - Produção de <i>Dunaliella salina</i> na Austrália (A), <i>Chlorella sp.</i> em lagoas circulares em Taiwan (B), e representação do sistemas de cultivo aberto de microalgas do tipo <i>raceway</i> (C)	28
Figura 5 - Fotobiorreator tubular compacto desenvolvido pelo NPDEAS – UFPR para produção de biomassa de microalgas.....	29
Figura 6 - Sistemas integrados de algas para biorremediação e produção de biocombustíveis	35
Figura 7 - Estruturas químicas da clorofila-a (acima) e ficocianobilina (abaixo)	38
Figura 8 - Sistema para tratamento e aproveitamento de fumaça utilizando fotobiorreatores contendo microalgas.	43
Figura 9 – Fotografia do termopressurizador utilizado para a realização das hidrólises termo-fosfóricas	51
Figura 10 – Morfologia das microalgas através de microscopia óptica (400x)	57
Figura 11 – Fotografia das biomassas liofilizadas de mescla Devons (A), <i>Chlorella vulgaris</i> (B) e <i>Spirulina platensis</i> (C).	58
Figura 12 - Composição centesimal das biomassas de microalgas	59
Figura 13 – Comparação entre extrato lipídico vegetal, à esquerda e extrato lipídico de microalgas, à direita	61
Figura 14 - Aspecto visual dos óleos transesterificados de microalgas mesclados com sílica gel 60 (1:2)	62
Figura 15 – Purificação dos EMAGs de microalgas através de mini-colunas contendo sílica gel. Frações clorofiladas retidas na fase estacionária (A) e frações purificadas (B).	62
Figura 16 - Perfil de carotenóides das microalgas em espectrofotômetro.....	63
Figura 17 - Perfil cromatográfico de clorofilas e carotenoides das microalgas	64
Figura 18 - Perfil cromatográfico em camada delgada dos EMAGs das microalgas	65
Figura 19 - Tratamento enzimático com hemicelulase e celulases das biomassas comerciais.....	68
Figura 20 – Fotografia dos sobrenadantes das biomassas tratadas sequencialmente com SDS (três extrações)	69
Figura 21 - Espectro de varredura em UV-Vis do primeiro sobrenadante do tratamento com SDS.	69
Figura 22 – Remoção de proteína pelo tratamento com SDS 2 % (m/v)	70
Figura 23 – Precipitação com etanol do sobrenadante da primeira extração com SDS. (A) Mescla Devons, (B) <i>C. vulgaris</i> e (C) <i>S. platensis</i>	70
Figura 24 - Perfil das hidrólises com ácido trifluoroacético das biomassas com diferentes pré-tratamentos	72
Figura 25 - Concentração de ácido fosfórico necessário para obter efetivamente o pH de 2 para as diferentes microalgas e pré-tratamentos das biomassas	74
Figura 26 – pH antes e após hidrólise em termorreator a 4,5 atm dos diferentes pré-tratamentos das biomassas	76
Figura 27–Porcentagem de açúcares totais e redutores dos hidrolisados das biomassas com diferentes pré-tratamentos	77

Figura 28–Perfil cromatográfico comparativo entre os hidrolisados de biomassa com diferentes pré-tratamentos.....	78
Figura 29 - Perfil dos açúcares liberados na hidrólise com as biomassas pré-tratadas	79
Figura 30 - Perfil em cromatografia em camada delgada do teste enzimático com os hidrolisados fosfóricos das biomassas <i>in natura</i>	80
Figura 31 - Porcentagem de proteína nas biomassas residuais na hidrólise comparativa	82
Figura 32 - Aspecto geral dos sobrenadantes dos hidrolisados de microalgas. (A) Mescla Devons; (B) <i>Chlorella vulgaris</i> ; (C) <i>Spirulina platensis</i>	83
Figura 33 - pH após hidrólise das biomassas em termo-reator das amostras do planejamento fatorial	84
Figura 34 - Perfil de açúcares totais e redutores do planejamento fatorial.....	85
Figura 35 - CCD dos hidrolisados com ácido fosfórico das diferentes microalgas. ..	87
Figura 36 - Perfil dos açúcares liberados na hidrólise das biomassas <i>in natura</i>	89
Figura 37 - Gráficos de Pareto para a resposta produção de oligossacarídeos (mg.g ⁻¹).....	91
Figura 38 - Gráficos de Pareto para a resposta pureza de oligossacarídeos (%).....	93
Figura 39 - Gráficos de contorno para as respostas produção e pureza de oligossacarídeos.....	95
Figura 40 – Crescimento dos microrganismos probióticos cultivados em meio contendo oligossacarídeos de microalgas e variação de pH durante o cultivo	98
Figura 41 - Perfil de CLAE para os cultivos de <i>B. animalis</i> e <i>L. casei</i> utilizando os oligossacarídeos da mescla Devons, <i>C. vulgaris</i> e <i>S. platens</i>	100
Figura 42 - Concentração de ácido láctico e ácido acético produzidos pelos microrganismos probióticos no meio de hidrolisado de <i>S. platensis</i> (mg.mL ⁻¹).....	102
Figura 43 – Determinação por CLAE dos oligossacarídeos presentes nos hidrolisados de	103
Figura 44 - Curva analítica para o β -caroteno	116
Figura 45 - Exponencial para determinação do fator de quantificação para proteína por espectrofotômetro	116
Figura 46 - Curva analítica para determinação de açúcares totais pelo método do fenol sulfúrico utilizando glucose como padrão	117
Figura 47 - Curva analítica para determinação de açúcares redutores pelo método do DNS utilizando glucose como padrão	117
Figura 48 - Perfil em cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de mescla Devons e <i>Chlorella vulgaris</i>	118
Figura 49 - Perfil em cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de <i>Spirulina platensis</i>	119
Figura 50 - CLAE dos padrões para as análises do cultivo.....	119
Figura 51 - Curva de calibração do ácido láctico.....	120
Figura 52 - Curva de calibração do ácido acético.....	120
Figura 53 – CLAE dos padrões de oligossacarídeos.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de alguns alimentos e algas em % de matéria seca.	37
Tabela 2- Composição do meio Chu	42
Tabela 3 - Planejamento fatorial para os experimentos de hidrólise termo-fosfórica das biomassas de microalgas	49
Tabela 4 - Composição reagente dinitrosalicílico (DNS)	52
Tabela 5 - Composição de metais da biomassa da mescla Devons	60
Tabela 6 - Composição percentual de ésteres metílicos de ácidos graxos das amostras transesterificadas determinada por cromatografia gasosa	66
Tabela 7 - Biomassa residual (%) após diferentes pré-tratamentos	71
Tabela 8 - Parâmetros obtidos estatisticamente para as respostas produção e pureza de oligossacarídeos.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina tri-fosfato
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicilato
e.g.	<i>exempli gratia</i>
EMAG	Éster metílico de ácido graxo
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> (Ácido Trifluoroacético)
glc	Glucose
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
GP	Grau de polimerização
iPrOH	Isopropanol
L(h)C	Ligno(hemi)Celulose
LQBB	Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa
man	Manose
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OS	Oligossacarídeos
OMM	Organização Meteorológica Mundial
ppm	Partes por milhão
PUFA	<i>Poly unsaturated fatty acids</i> - ácidos graxos poliinsaturados
q.s.p	Quantidade suficiente para
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
vs.	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	ABORDAGEM GERAL DAS MICROALGAS	20
3.2	CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS MICROALGAS	21
3.2.1	<i>Chlorella vulgaris</i>	21
3.2.2	<i>Spirulina platensis</i>	22
3.3	FOTOSSÍNTESE E FIXAÇÃO DE CARBONO PELAS MICROALGAS	23
3.3.1	Crescimento Celular	26
3.4	SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS.....	27
3.4.1	Sistemas abertos	28
3.4.2	Sistemas fechados	29
3.4.3	Sistemas híbridos	29
3.4.4	Histórico do cultivo de microalgas no mundo	30
3.5	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	31
3.5.1	Luz.....	31
3.5.2	Temperatura	31
3.5.3	pH.....	32
3.5.4	Agitação e aeração.....	32
3.5.5	Nutrientes.....	33
3.6	APLICAÇÕES AMBIENTAIS DAS MICROALGAS.....	34
3.6.1	Biofixação de CO ₂	35
3.7	PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DE MICROALGAS	37
3.7.1	Pigmentos	37
3.7.2	Lipídeos.....	38
3.7.3	Proteínas.....	39
3.7.4	Carboidratos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	OBTENÇÃO DAS MICROALGAS	42
4.1.1	Cultivo e processamento da mescla Devons	42
4.1.2	Recuperação da biomassa de microalga	43
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS	44
4.2.1	Determinação do teor de cinzas	44
4.2.2	Determinação do teor de nitrogênio total e estimativa de proteínas	44
4.2.3	Determinação do teor de lipídeos totais	45
4.2.4	Análise de minerais da mescla Devons	46
4.3	TRANSESTERIFICAÇÃO DOS LIPÍDEOS	46
4.4	PRÉ-TRATAMENTOS DAS BIOMASSAS.....	47
4.5	HIDRÓLISES TERMO-FOSFÓRICA DAS BIOMASSAS	49
4.5.1	Determinação da concentração de ácido fosfórico para o pH efetivo	50
4.5.2	Termopressurização com ácido fosfórico	50
4.5.3	Determinação dos açúcares totais.....	51
4.5.4	Determinação dos açúcares redutores	52
4.5.5	Análise dos hidrolisados por Cromatografia em Camada Delgada.....	53

4.5.6	Análise da origem dos carboidratos por meio de teste enzimático	53
4.6	CULTIVO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS UTILIZANDO OS OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS DE MICROALGAS	56
5.1.1	Morfologia e aspecto visual das microalgas	56
5.1.2	Composição Centesimal	58
5.1.3	Análise de Minerais	59
5.2	TRANSESTERIFICAÇÃO ALCALINA METÍLICA DOS ÓLEOS BRUTOS DAS BIOMASSAS.....	60
5.3	PRÉ-TRATAMENTOS DAS BIOMASSAS	67
5.4	OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ATRAVÉS DE HIDRÓLISE FOSFÓRICA.....	73
5.4.1	Hidrólise comparativa das biomassas com diferentes pré-tratamentos.....	73
5.4.2	Hidrólise das biomassas <i>in natura</i> através de planejamento fatorial	83
5.5	CULTIVO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS COM OS OLIGOSSACARÍDEOS.....	96
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
	REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

As microalgas além de serem as principais produtoras primárias de oxigênio, tanto no ambiente fluvial/lacustre quanto marinho, tem sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas devido a sua importância econômica, nutricional e ambiental (ANTELO, *et al.*, 2008; CHEN, 2011). Portanto, novas pesquisas e tecnologias são de suma importância, uma vez que podem trazer benefícios de maneira geral (RICHMOND, 2004).

Estes microrganismos necessitam de nutrientes e CO₂ no processo de fotossíntese. Tomando partido destas características, estão se tornando cada vez mais interessantes no processo de biorremediação, como no tratamento de águas residuais de processos industriais e remoção de metais pesados (LOBO, 2004), assim como na mitigação de CO₂ produzido por atividades naturais ou humanas (KUMAR, 2011; PARK, 2011).

Numa associação com a biorremediação, o potencial da utilização das microalgas tem sido amplamente estudado, pois além de tolerarem e se adaptarem a uma variedade de condições ambientais (JONES, 2012), podem ser utilizadas como subprodutos. Por exemplo, como alternativa para a geração de biocombustíveis (SIALVE, 2009), devido aos lipídeos em sua composição (CHISTI, 2007) ou ainda como a sua biomassa também é constituída de carboidratos, proteínas e pigmentos, portanto, o foco está sendo direcionado para o setor alimentício e farmacêutico (SPOLAORE, 2006).

Neste sentido, uma vez que microalgas estão sendo utilizadas na mitigação de CO₂ e tratamento de odor em biorreator externo na captura de efluente gasoso de uma churrascaria na cidade de Curitiba (TAKAMATSU *et al.*, 2010), há uma grande quantidade de biomassa produzida periodicamente neste sistema, e, portanto, este trabalho está focado no aproveitamento tecnológico desta biomassa com vistas à produção de oligossacarídeos prebióticos.

Os prebióticos são polissacarídeos não-digeríveis e atuam benéficamente no hospedeiro, uma vez que promovem o crescimento dos probióticos, bactérias intestinais benéficas ao cólon intestinal, como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SCHEREZENMEIR, 2001; ROBERFROID, 2002).

Assim, a proposta inovadora para a produção destes oligossacarídeos a partir da biomassa de microalgas recai no uso do ácido fosfórico como agente catalítico, uma vez que é amplamente utilizado na indústria alimentícia (e.g. composição de refrigerantes) e sendo o fostato disseminado nos seres vivos (e.g. ácidos nucleicos, coenzimas, açúcares fosforilados), não há necessidade de etapas posteriores para remoção do catalisador. O uso do ácido fosfórico como catalisador já foi empregado pelo grupo de pesquisa em outras matrizes polissacarídicas para fins alimentícios nos casos de depolimerização de amidos (FONTANA *et al.*, 2008), hidrólise de inulina para obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS) (FONTANA, 2011b) ou hidrólise de hemicelulose de bagaço de cana e serragem de *Pinus taeda* para obtenção de xilo-oligossacarídeos (XOS) e glucogalactomanana oligossacarídeos (GGMOS), respectivamente (TIBONI, 2014). Esta tecnologia, embora antiga (FONTANA, 1984), continua sendo aperfeiçoada também por respeitáveis universidades estrangeiras (e.g, State University of Florida), além de empresas multinacionais, concentrando esforços na viabilização do bioetanol de modelos ligno(hemi)celulósicos [L(h)Cs] como o bagaço de cana (caso da Novozymes).

2 OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Produzir oligossacarídeos prebióticos, responsáveis por estimular a microflora intestinal benéfica, através de hidrólise com ácido fosfórico diluído e termopressurizado da biomassa de microalgas utilizadas na biomitigação de CO₂.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter biomassa de microalga utilizada para a biomitigação de CO₂ e outros voláteis da coifa de exaustão de uma Churrascaria de Curitiba-PR;
- Caracterizar os constituintes da biomassa de microalga (*Chlorella* spp e concorrentes) por meio de análises físico-químicas (carboidratos, proteínas, lipídeos e pigmentos) e microscopia óptica, comparativamente com *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* comerciais;
- Transesterificar por via básica os lipídeos das biomassas com vistas a análise do perfil de ésteres obtidos por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa;
- Hidrolisar comparativamente as biomassas *in natura* e pré-processadas a fim de avaliar a influência dos lipídeos e proteínas na obtenção dos oligossacarídeos;
- Hidrolisar as biomassas *in natura* com ácido fosfórico diluído em termopressurizador através de planejamento fatorial a fim de obter oligossacarídeos prebióticos;
- Cultivar microrganismos probióticos, tais como espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, com os oligossacarídeos prebióticos oriundos das biomassas *in natura* hidrolisadas com ácido fosfórico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

ABORDAGEM GERAL DAS MICROALGAS

O termo microalgas refere-se a uma série de microrganismos de natureza distinta de leveduras, fungos e bactérias, englobando tanto organismos eucarióticos (algas verdes, vermelhas, diatomáceas e dinoflagelados) quanto procarióticos (cianobactérias) (TOMASELLI, 2004). São organismos microscópicos, principalmente encontrados em ambientes marinho, de água doce e no solo, podendo formar colônias e que apresentam coloração variada, devido à presença de pigmentos sejam clorofilas, ficobilinas e carotenoides (RAVEN, 2001).

Fazem parte de um grupo muito diversificado de organismos, e que apresentam fundamental importância, pois são considerados responsáveis por pelo menos 60 % da produção de biomassa primária da Terra (CHISTI, 2007).

Estes microrganismos têm sido classificados quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular, além de aspectos morfológicos (TOMASELLI, 2004).

As microalgas apresentam grande capacidade de se adaptar a diferentes ambientes, sendo capazes de uma mudança metabólica como resposta às mudanças das condições ambientais (MATA, 2010). Portanto, sua composição química depende principalmente de condições de crescimento como pH, temperatura, luminosidade e nutrientes (CONVERTI, 2009).

Além disso, apresentam características fisiológicas semelhantes e análogas às plantas terrestres, podendo destacar algumas vantagens das microalgas (RICHMOND, 2004; DERNER, 2006):

- muitas espécies crescem mais rapidamente, proporcionando maior produtividade;
- apresentam estrutura unicelular, o que assegura a mesma composição bioquímica, diferentemente das plantas terrestres que apresentam compostos localizados em locais específicos (somente nos frutos, nas folhas e raízes);
- possibilidade de induzir a maior síntese ou acúmulo de compostos de interesse por meio da manipulação das condições de cultivo;

- crescem bem em regiões de extremos climáticos e até mesmo em águas residuárias;

- a ocorrência de aparatos fotossintéticos variados permite a captação do CO₂ atmosférico e seus carbonatos mediada pela energia luminosa.

Em adição, algumas microalgas como as cianobactérias tem a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, o que fez com que contribuísse para a sua adaptação e colonização dos ecossistemas (GAO *et al.*, 2004).

CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS MICROALGAS

Taxonomicamente, as algas procarióticas podem ser agrupadas nas divisões Cyanophyta e Prochlorophyta, enquanto as eucarióticas são agrupadas em Glaucophyta, Rhadophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta e Chlorophyta (GUALTIERI, 2006).

Chlorella vulgaris

Divisão taxonômica de *Chlorella vulgaris*:

Filo Chlorophyta

Classe Trebouxiophyceae

Ordem Chlorellales

Família Chlorellaceae

Gênero Chlorella

Espécie *Chlorella vulgaris*

A espécie *Chlorella vulgaris* está inserida no grupo das chamadas algas verdes ou clorófitas, considerado o grupo mais diversificado de todas as algas, compreendendo cerca de 17.000 espécies. A grande maioria das espécies do Filo Chlorophyta habita ambientes de água doce e poucas espécies são marinhas ou terrestres. Os organismos deste grupo apresentam as mais variadas formas de vida,

podendo ser unicelulares flageladas e não-flageladas, coloniais móveis e não-móveis, algas filamentosas e algas formando lâminas celulares (RAVEN, 2001). As espécies de água doce são cosmopolitas, sendo poucas espécies endêmicas de uma determinada área. No ambiente marinho, as algas verdes que ocorrem em águas tropicais e semitropicais tendem a ser muito similares em qualquer lugar do mundo.

C. vulgaris possui forma esférica, medindo de 2 a 8 µm de diâmetro, é unicelular e eucariótica. São microrganismos fotossintetizantes e com reprodução assexuada (DUARTE, 2001). São predominantemente microscópicas e de água doce, podendo existir em águas salgadas, na neve, no solo e sobre folhas de plantas terrestres. Possuem clorofila *a* e *b*, caroteno e xantofilas. Seus cloroplastos são envoltos por um envelope de duas membranas, sem retículo endoplasmático (KRIENITZ, 2004). Apresenta como principal polissacarídeo de reserva a β-1,3 glucana, também chamado de laminarina, um imunoestimulante ativo que atua sobre os radicais livres e auxilia na eliminação dos lipídeos do sangue (BECKER, 2004).

Ainda, *C. vulgaris* possui o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana (COSTA;CALHEIROS, 2006).

Spirulina platensis

Divisão taxonômica de *Spirulina platensis*:

Filo Cyanobacteria

Classe Cyanophyceae

Ordem Oscillatoriales

Família Spirulinaceae

Gênero *Spirulina*

Espécie *Spirulina platensis*

É uma microalga pertencente ao grupo das cianobactérias (anteriormente classificadas como microalgas azul-esverdeadas), microscópica, fotossintética e unicelular, composta por tricomas (cadeias de células cilíndricas dispostas em forma helicoidal), de tamanho entre 20 e 200 µm de comprimento em forma de espiral, que habita águas alcalinas (SHIMAMATSU, 2004). O pigmento de maior concentração em sua composição é a ficocianina (SILVEIRA, 2007), e em menores proporções apresentam carotenoides e clorofila do tipo a. Ao contrário de outras microalgas, apresenta baixa susceptibilidade a contaminação com outros microrganismos, devido ao seu alto pH necessário para se desenvolver, em torno de 8,0 e podendo atingir 11,0 (BARROS, 2007).

Spirulina vem sendo utilizada na alimentação, desde aproximadamente o ano de 1300, principalmente devido à sua alta concentração proteica (RICHMOND, 2004). Os seus constituintes possuem diversas propriedades nutricionais, sendo utilizada como um excelente suplemento alimentar, e até mesmo utilizada na prevenção de algumas doenças, sendo assim caracterizado como um alimento funcional e, portanto, uma alternativa para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos (AMBROSI, 2008). A ingestão dessa microalga é relatada como sendo responsável por inúmeros benefícios. Estudos confirmaram a atividade antioxidante da *Spirulina* com base em seu efeito protetor contra a morte celular induzida por radicais livres, constatando é capaz de proteger a morte celular por apoptose. Os mesmo autores sugerem que esta capacidade antioxidante poderia ser otimizada incorporando-a a alimentos e bebidas industrializadas (CHU *et al.*, 2010). Também é certificada como GRAS pela FDA, podendo ser consumida sem causar riscos à saúde.

FOTOSSÍNTESE E FIXAÇÃO DE CARBONO PELAS MICROALGAS

As microalgas realizam fotossíntese, na presença de luz, água e gás carbônico, sintetizam compostos orgânicos e liberam oxigênio, como mostrado na Figura 1:

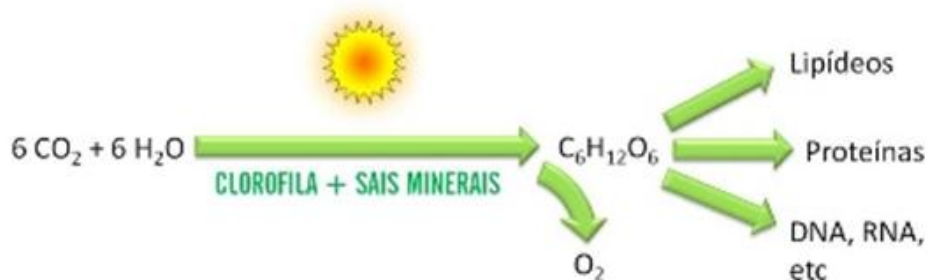


Figura 1 - Representação da fotossíntese e destinos metabólicos da glucose no metabolismo celular.

Fonte: (MORAIS *et al.*, 2011).

Pelo processo fotossintético, as microalgas captam energia luminosa e a armazenam (fase fotoquímica) na forma de adenosina tri-fosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que são usados como fonte de energia (fase química) para produzir moléculas biológicas, como carboidratos (glucose) pelo Ciclo de Calvin-Benson, mostrado na Figura 2, e outros compostos orgânicos a partir da água e da redução do CO_2 (LEHNINGER, 2005).

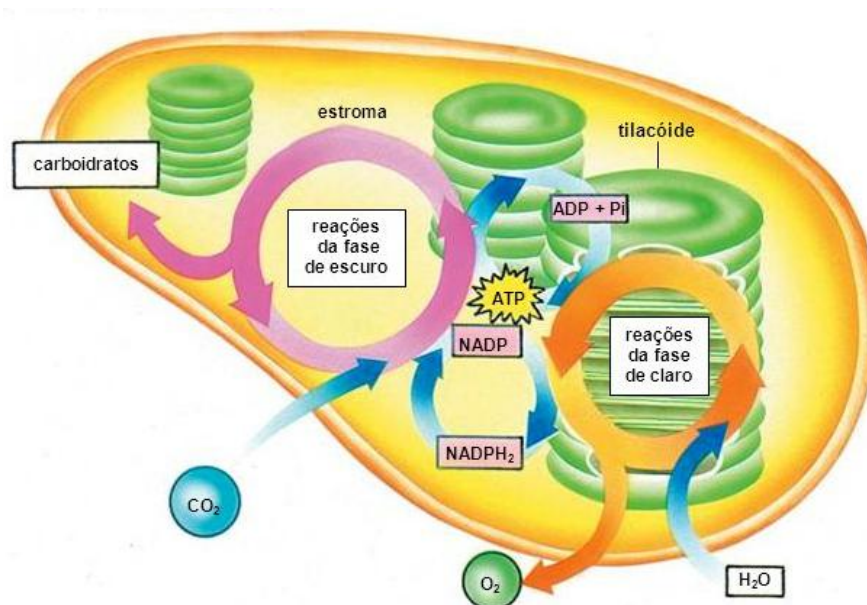


Figura 2 - Ciclo de Calvin.

Fonte: (UNESP, 2014).

Nos cultivos, o carbono é considerado o macronutriente mais importante, visto que constitui aproximadamente 50% da biomassa microalgas, sendo que o crescimento de microalgas pode ser limitado por este composto (GROBBELAAR, 2004).

O CO₂ é a fonte de carbono mais utilizada pelas microalgas, pois se difunde rapidamente por difusão passiva da água para o interior das células e é usado diretamente nos processos de fixação (RAVEN, 2001). A maioria das microalgas apresenta crescimento muito maior e taxas de fixação do CO₂ muito mais altas (entre 10 a 50 vezes maior) do que plantas terrestres, consumindo grande parte do CO₂ produzido naturalmente ou por atividades humanas (HO *et al.*, 2011).

Quanto ao metabolismo relacionado à fixação de carbono as microalgas, podem ser divididas em três tipos: metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, como mostrado na Figura 3 (AZEREDO, 2012):

- Metabolismo autotrófico: as microalgas que possuem este tipo de metabolismo utilizam a luz solar como a principal fonte de energia e o CO₂ como fonte de carbono para o crescimento. Sistemas empregando microalgas com este metabolismo foram os primeiros a serem criados e, portanto, são os mais difundidos atualmente, e podem ser abertos, fechados ou híbridos;

- Metabolismo heterotrófico: essas espécies não necessitam de luz para crescer. Entretanto são dependentes de uma fonte de carbono orgânico, que geralmente é a glucose. A produção heterotrófica pode ocorrer em biorreatores ou fermentadores contendo um substrato orgânico como fonte de carbono. Um fato considerável nos sistemas de produção heterotróficos, que não ocorre nos sistemas abertos, é a alta concentração de biomassa obtida, o que leva a uma redução nos custos do processo de recuperação da biomassa, que representam grande parte dos custos totais de produção em outros sistemas.

- Metabolismo mixotrófico: apresentam duas fases, uma autotrófica e outra heterotrófica. Utiliza simultaneamente uma fonte luminosa e substrato orgânico como fonte de energia, bem como o CO₂ e o substrato orgânico como fontes de carbono. A fotossíntese é a principal fonte energética, embora o carbono orgânico e o CO₂ sejam essenciais.

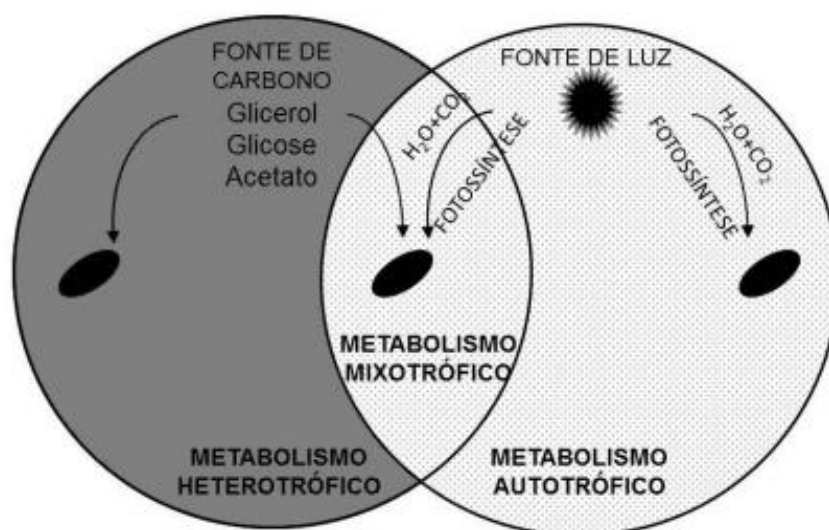


Figura 3 - Diferenças entre o metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico.
 Fonte: (MORAIS, 2012).

Crescimento Celular

O crescimento celular pode ser entendido como o aumento ordenado de todos os componentes químicos celulares. Durante o crescimento equilibrado (quando os microrganismos se encontram completamente adaptados e inseridos num meio adequado), a duplicação da biomassa é acompanhada da duplicação de todas as outras propriedades mensuráveis (proteína, DNA, RNA, entre outras moléculas orgânicas). De forma mais rápida e com menores custos, o crescimento é, normalmente, quantificado em termos de massa ou número de células (RUSSO, 2011).

Um dos métodos empregados para a avaliação do crescimento das populações de microalgas em cultivo é a curva de crescimento celular, que pode ser expressa como sendo a relação entre o aumento da biomassa ou do número de organismos em um determinado volume (densidade celular) pelo tempo. Em cultivo do tipo estacionário, a curva de crescimento celular apresenta cinco fases distintas (DERNER, 2006):

1. Fase de indução: não existe aumento 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: a biomassa se duplica em intervalos regulares de tempo, ou seja, a cultura apresenta uma elevada e constante (logarítmica) velocidade (taxa) de crescimento.
3. Fase de redução do crescimento relativo: o tempo requerido para duplicação celular aumenta, reduzindo assim a taxa de crescimento. Isto é consequência da diminuição na quantidade de nutrientes disponíveis no meio e, principalmente, da redução da atividade fotossintética devido ao aumento da densidade microalgal, sendo que desta forma, a quantidade de energia luminosa por célula microalgal torna-se bastante reduzida.
4. Fase estacionária: nesta fase não há crescimento 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 celular: é resultado da depleção de nutrientes a um nível que não suporta o crescimento, bem como da possível ocorrência de um estado tóxico de metabólicos.

SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser de três formas: sistemas abertos, sistemas fechados e sistemas híbridos. Sendo que existem diversas considerações a respeito de quais sistemas de cultivo devem ser utilizados. Os fatores a serem avaliados incluem: as características biológicas da espécie de alga a ser usada, área de implantação do sistema, clima, a disponibilidade e custo de água, nutrientes e energia, bem como o tipo de produto final desejado (BOROWITZKA, 1999).

Os diversos sistemas de cultivo em larga escala devem ser comparados em suas propriedades básicas tais como, a sua eficiência na utilização da luz, capacidade de controle da temperatura, estresse hidrodinâmico exercido sobre as

microalgas e capacidade de manter a cultura estéril, ou seja, sem a presença de outras espécies de microalgas ou predadores (BOROWITZKA, 1999).

Sistemas abertos

Os sistemas abertos normalmente são feitos em lagoas, utilizados na maioria dos processos de produção de microalgas em escala comercial, devido a seu menor custo e a sua maior facilidade de construção em larga escala (COPLIN, 2012).

Estes sistemas podem variar desde lagoas abertas simples, sem nenhum tipo de aparato mecânico para realizar a mistura da cultura, lagoas circulares, onde há a presença de um braço mecânico central para realizar a mistura e os sistemas conhecidos como *high rate ponds* ou *raceways* que consistem tipicamente de canais independentes de circuito fechado de recirculação em que uma turbina gera um fluxo que é guiado em torno de curvas por defletores colocados no canal de fluxo, como mostrado na Figura 4 (AZEREDO, 2012).

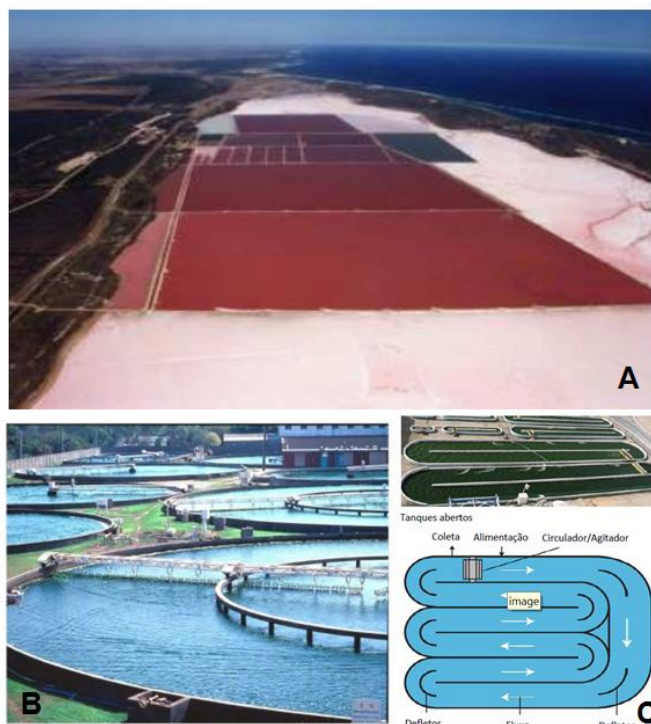


Figura 4 - Produção de *Dunaliella salina* na Austrália (A), *Chlorella sp.* em lagoas circulares em Taiwan (B), e representação do sistemas de cultivo aberto de microalgas do tipo *raceway* (C)
 Fonte: (A) (B) AZEREDO, 2012; (C) WALTER, 2011.

Sistemas fechados

O cultivo em sistemas fechados ocorre em estruturas chamadas fotobiorreatores, como o exemplificado na Figura 5, que podem ser construídos em ambientes internos ou externos.

O cultivo em ambientes externos, tanto em sistemas abertos como fechados faz o aproveitamento da energia solar, porém, está sujeito, durante todo o ano, a diferentes condições climáticas, como variações na luz e temperatura, que afetam os processos de fotossíntese, e por sua vez, impactam as saídas dos sistemas produtivos (LEE, 2001).

Os sistemas de cultivo fechado apresentam como principais vantagens: prevenção de contaminações atmosféricas, perda de água por evaporação, diluição excessiva da cultura causada pela chuva e ocupam menos espaço. Além disso, a produtividade de biomassa pode chegar a treze vezes mais quando comparada a um sistema aberto (CHISTI, 2007).



Figura 5 - Fotobiorreator tubular compacto desenvolvido pelo NPDEAS – UFPR para produção de biomassa de microalgas.

Fonte: (NPDEAS, 2011).

Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos associam os sistemas de cultivo fechados e abertos, e compreendem duas etapas: uma primeira de cultivo em sistema fechado onde condições controladas minimizam a contaminação por outros organismos e estimulam a divisão celular, e, uma segunda etapa em cultivo aberto, a fim de expor as células a condições de estresse de nutrientes e promover a síntese de substâncias de interesse (HUNTLEY, 2007).

Os sistemas abertos associados a sistemas fechados de cultivo possibilitam obter melhores resultados e oferecem um melhor custo-benefício (DEMIRBAS, 2011).

Histórico do cultivo de microalgas no mundo

O cultivo de microalgas em larga escala teve início no Japão, em 1960, com o cultivo de *Chlorella sp.*, seguido do cultivo de *Spirulina sp.* no México, em 1970, e na Tailândia, em 1977, com aplicações voltadas para a área nutricional (LOURENÇO, 2006).

Desde então, países como Estados Unidos, Israel, Austrália e Alemanha, têm investido em tecnologias para o cultivo de microalgas em escala comercial, sendo que o maior fotobiorreator do mundo está localizado na Alemanha, e consiste de 500.000 m de tubos de vidro, dispostos em vinte módulos com volume de 35 m³ cada. Este sistema produz cerca de 150 toneladas de biomassa de *Chlorella sp.* por ano.

No Brasil, os cultivos com microalgas tiveram início em 1970, com Clovis Teixeira e Armando A. H. Vieira, do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, que iniciaram o cultivo de microalgas marinhas, publicando os resultados realizados com *Phaeodactylum tricornutum*, em 1977. Neste mesmo ano, Armando Viera, organizou a primeira coleção de microalgas de água doce, na Universidade Federal de São Carlos. Em 1980, os estudos com microalgas começaram a se difundir pelo país e em 1990, havia 45 laboratórios de cultivo de microalgas no Brasil (LOURENÇO, 2006).

Nos últimos anos, além de instituições de ensino e pesquisa, grandes empresas como a Petrobras, Embrapa-RN e a Empresa Algae, têm feito grandes investimentos em cultivos e pesquisas com microalgas, com interesse voltado principalmente para a produção de biocombustíveis.

CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 2001). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie e a interação com outros organismos. Quanto aos fatores físico-químicos, são principalmente reportados estudos sobre iluminação, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (SPOLAORE, 2006).

Luz

A distribuição e intensidade luminosa interferem no crescimento de microalgas, uma vez que se aplicadas em demasia sobre sua superfície, provocarão fotoinibição (crescimento limitado) e conseqüentemente, baixa conversão de energia luminosa em biomassa, isto é, baixa eficiência fotossintética. A eficiência fotossintética aumenta até a iluminação em excesso torna-se um fator limitante ao crescimento, e por outro lado, a produtividade é negativamente afetada pelas zonas de sombra ou áreas com iluminação deficiente (ERIKSEN, 2008).

Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos. A temperatura utilizada para manutenção das culturas geralmente é a mais próxima daquela onde os organismos foram coletados. De uma forma geral, temperaturas inferiores a 16 °C reduzirão o crescimento das microalgas e temperaturas superiores a 35 °C poderão ser fatais para várias espécies (GUALTIERI, 2006).

Temperaturas constantes são mais apropriadas ao cultivo, pois apresentam maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies. Em salas de cultivos, temperaturas constantes são alcançadas por meio de sistemas de refrigeração, porém o controle da temperatura para cultivos em larga escala é de difícil obtenção (LOURENÇO, 2006).

pH

O controle do pH é essencial, pois afeta diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos, que podem precipitar dependendo do pH do cultivo, assim, o pH deve ser controlado para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas. É fundamentalmente influenciado pelas proporções entre formas de carbono dissolvidas no meio de cultivo, sendo que o consumo de CO₂ aumenta o pH do sistema e pode atingir níveis muito elevados (LOURENÇO, 2006).

Agitação e aeração

A agitação e a aeração das culturas de microalgas também são importantes para uma distribuição homogênea das células, bem como para a iluminação, manutenção da temperatura e para a transferência de gases através da interface gás-líquido (GUALTIERI, 2006).

Em cultivos realizados em grande escala, a suplementação com CO₂ é uma prática amplamente utilizada para aumentar as velocidades de crescimento de

biomassa (COPLIN, 2012). Porém, nem todas as espécies toleram agitação vigorosa, no ambiente natural elas dificilmente sofrem regimes turbulentos, portanto, alguns métodos podem danificar as células, sendo que a aeração deve ser realizada de forma apenas a manter elevada a eficiência fotossintética (WALTER, 2011).

Nutrientes

As composições químicas dos meios de cultivo são fundamentais para o crescimento e produção de biomassa de microalgas. Mudanças da composição dos meios de cultivo têm sido adotadas por meio de experimentos realizados sobre a necessidade ou a limitação por nutrientes. Os principais elementos limitantes são os macronutrientes carbono, nitrogênio e fósforo, e ainda o micronutriente ferro (LOURENÇO, 2006).

- Carbono: componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteína, carboidrato, lipídeo, vitaminas, etc.). São fontes de carbono a difusão natural de CO₂ do ar atmosférico para o meio de cultivo, adição de sais de carbonatos ou bicarbonatos (LOURENÇO, 2006). O fornecimento de concentrações elevadas de CO₂ nos cultivos de microalgas permitem aumentar a transferência de massa de CO₂ para o meio, porém, a redução do pH decorrente do aumento da disponibilidade de CO₂ no meio, pode inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas (PIRES, 2012).

- Nitrogênio: apresenta grande importância para o desenvolvimento das microalgas por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário. Quando há disponibilidade de nitrogênio no cultivo ocorre o aumento das concentrações de proteínas e pigmentos fotossintetizantes, porém, conforme se limita o nitrogênio do meio, reduzem-se as quantidades dessas substâncias, e a diminuição da clorofila aumenta a concentração de carotenoides gerando mudança de coloração no cultivo que tendem ao aspecto amarelado (LOURENÇO, 2006). Por outro lado, a escassez de nitrogênio no meio de cultivo pode aumentar o conteúdo lipídico das microalgas. Isto se deve ao fato que a depleção de nitrogênio direciona o metabolismo das microalgas antes voltado à multiplicação celular para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, preparando a célula

para um período de privação nutricional (XU, 2012). É assimilado, preferencialmente, sob forma amoniacal (NH_3 e NH_4^+), mas também na forma de nitrogênio gasoso ou molecular (algumas cianobactérias), de nitrato (NO_3^-), de nitrito (NO_2^-). As principais fontes são os sais de nitrato, sais de amônio e ureia.

- Fósforo: tem importantes funções na célula, participa de todos os processos de trocas energéticas e na constituição de moléculas estruturais, sendo importante na regulação do metabolismo celular (síntese de lipídeos e carboidratos) e no fornecimento de fosfatos para a geração de energia e na constituição de moléculas estruturais (ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas). O fósforo é assimilado na forma de ortofosfato (HPO_4^{3-}). As microalgas são capazes de absorver quantidades elevadas de fósforo (8 a 16 vezes a mais que a sua cota mínima), isso permite que a célula continue a se desenvolver mesmo que não haja disponibilidade de novas fontes deste elemento. A assimilação do fósforo é dependente de luz, possivelmente em razão da acumulação de energia em ATP. Geralmente as fontes do fosfato são os sais de sódio e potássio (LOURENÇO, 2006).

- Ferro: é o micronutriente mais importante para as algas. Participa de funções como respiração, fotossíntese, da via biossintética da clorofila e do citocromo, reduz o sulfato, o nitrato e o nitrito, fixa o nitrogênio molecular e é co-fator de diversas enzimas (LOURENÇO, 2006).

APLICAÇÕES AMBIENTAIS DAS MICROALGAS

As principais aplicações ambientais de microalgas têm se dado principalmente no tratamento de efluentes líquidos e gasosos. Bons resultados estão sendo obtidos na aplicação das microalgas no aproveitamento de nutrientes como o fósforo e nitrogênio de águas residuárias (DE-BASHAN; GARRIDO, 2008) e também na remoção de metais pesados (LOBO, 2004).

A associação das microalgas em tratamentos de águas residuárias e de emissões gasosas também tem sido amplamente estudada, visando não só as aplicações ambientais, mas também com enfoque no potencial dos compostos bioquímicos contidos na biomassa, principalmente para a extração de lipídeos

utilizados na produção de biocombustíveis, como mostra a Figura 6 (SIVAKUMAR, 2012).

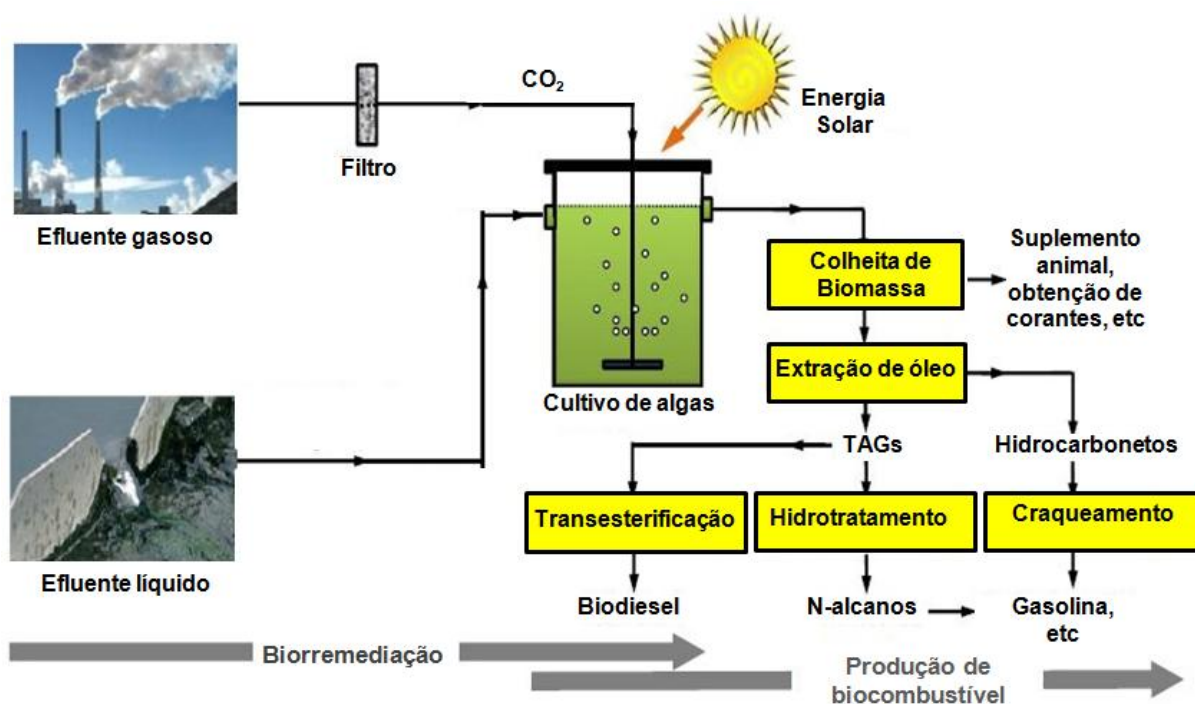


Figura 6 - Sistemas integrados de algas para biorremediação e produção de biocombustíveis
 Fonte: Adaptado de Sivakumar et al. (2012).

Biofixação de CO₂

A crescente concentração de CO₂ na atmosfera parece ser a principal causa do aquecimento global, o que pode ter consequências catastróficas para o ambiente e o clima (CHIU, 2009). Segundo a Organização Meteorológica Mundial (OMM) entre 2012 e 2013, a taxa de acúmulo de CO₂ na atmosfera teve o crescimento mais rápido em um ano desde 1984. A concentração de CO₂ na atmosfera superou 396 partes por milhão (ppm) em 2013, um aumento de quase 3 ppm em comparação com o ano anterior e cerca de 142 % dos níveis pré-industriais. O estudo também indica que este crescimento não se deve apenas a mais emissões, mas a uma redução na capacidade de absorção de carbono pela biosfera.

A fixação de CO₂ por organismos fotossintéticos no planeta pode ajudar muito no ciclo do carbono global. O CO₂ produzido naturalmente ou por atividades humanas pode ser consumido por plantas e algas, e convertido em biomassa e outros produtos metabólicos, pois seu crescimento de microalgas está diretamente relacionado com a taxa de fixação de CO₂ e utilização de energia luminosa.

A fixação de CO₂ por microalgas é muito mais rápida e eficiente do que plantas terrestres, portanto elas têm sido muito utilizadas para a biomitigação das emissões de CO₂ (HO *et al.*, 2011), sendo considerado um dos processos mais eficientes de remoção desse gás, sem a necessidade de mudanças radicais na matriz energética mundial e nas atividades produtivas (HOLLOWAY, 2003).

Esta biomitigação pode ser realizada em fotobiorreatores, onde a perda do CO₂ suplementado para a atmosfera é afetada pelo *design* e pelo modo de operação. Por exemplo, fotobiorreatores de placas planas geralmente possuem uma coluna para passagem de gases mais curta se comparado aos fotobiorreatores tubulares, e conseqüentemente apresentam uma maior perda de CO₂. Essa perda pode ser minimizada ao se reutilizar o efluente gasoso do fotobiorreator na aeração do cultivo, porém um efluente com alta concentração de O₂ pode inibir o crescimento das microalgas (COPLIN, 2012).

Outro parâmetro importante a ser considerado é a seleção de cepas adequadas, que é fundamental para eficácia do processo de biofixação de CO₂, características como altas taxas de utilização de CO₂ e de crescimento, alta tolerância aos constituintes dos gases de combustão, como SO_x e NO_x, facilidade de colheita e a possibilidade de reutilização da biomassa como obtenção de produtos e subprodutos (BRENNAN, 2010).

Muitos autores relatam os benefícios ambientais da utilização das microalgas. Por outro lado, apresentam algumas preocupações com relação a este tipo de cultivo, dentre elas a manutenção dos sistemas de cultivo, gasto de energia no processo de cultivo e recuperação da biomassa da água e os materiais utilizados (materiais translúcidos, lâmpadas e isolamentos) com alto potencial de contaminação ambiental (OLGUÍN, 2003; MUÑOZ, 2006; CAMERINI, 2008; RYAN, 2009).

Assim, todos os impactos ambientais relacionados ao cultivo precisam ser identificados e avaliados como uma forma de desenvolver melhores e mais eficientes técnicas para este processo.

PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DE MICROALGAS

Os principais produtos que podem ser extraídos da biomassa algal são carboidratos e proteínas usados na indústria alimentícia e cosmética; pigmentos (carotenoides, ficobilina e clorofila) utilizados em alimentos, indústria cosmética e farmacêutica; e lipídeos, principalmente ácidos graxos, utilizados na produção de biocombustíveis (SPOLAORE, 2006).

Algumas espécies de microalgas podem apresentar taxas mais elevadas desses compostos químicos se comparadas com outros alimentos comumente utilizados, como mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de alguns alimentos e algas em % de matéria seca.

Alimento	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos
Levedura	39	38	1
Carne bovina	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>Chlorella vulgaris</i>	51 - 58	12 - 17	14 - 22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7

Fonte: Adaptado de Becker (2004).

Pigmentos

As diferenças aparentes na coloração das algas são devidas à presença e distribuição de pigmentos, os quais absorvem a luz visível para iniciar as reações fotossintéticas (VON ELBE, 2000).

As três principais classes de pigmentos encontradas em microalgas são clorofila, carotenoides e ficobilinas (HALL, 1980). Esses pigmentos podem ser utilizados como corantes naturais, especialmente em alimentos e cosméticos, e como antioxidantes, caso dos carotenoides.

As ficobilinas, diferentemente das clorofilas, são constituídas de anéis pirrólicos “lineares” (não cíclicos), conforme mostrado na Figura 7.

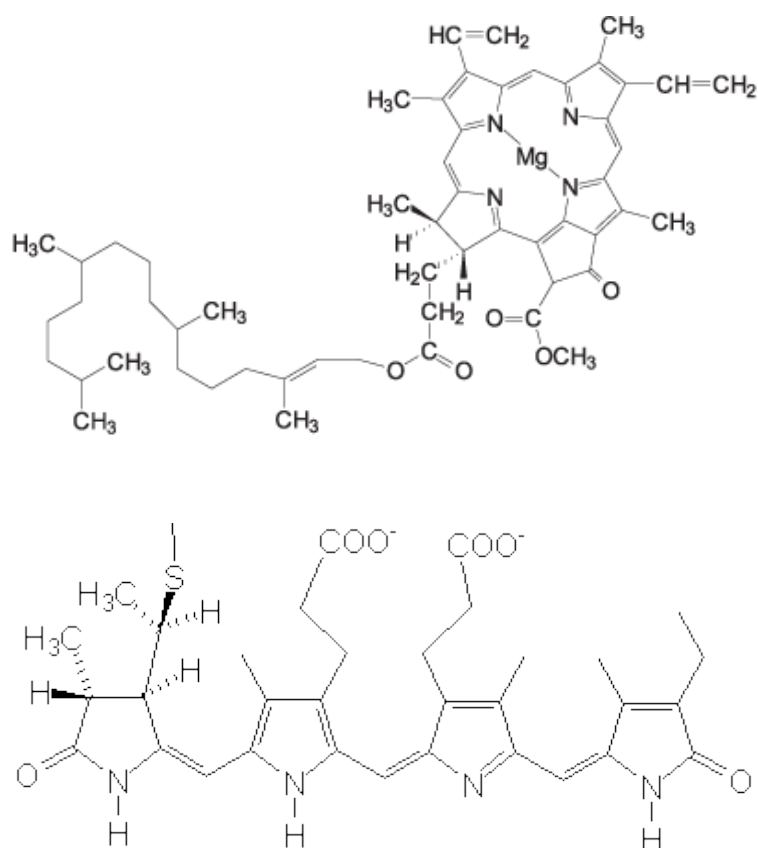


Figura 7 – Estruturas químicas da clorofila-a (acima) e ficocianobilina (abaixo)
 Fonte: (MBARI; MOREIRA, RODRIGUES *et al.*, 2012)

Lipídeos

O conteúdo de lipídeos da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BECKER, 2004). Os lipídeos algais são tipicamente compostos por glicerol ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou polinsaturados.

Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídeos e, em algumas espécies, os PUFAs (“poly unsaturated fatty acids” – ácidos graxos polinsaturados) representam entre 25 e 60% dos lipídeos totais (BROWN, 1991; BECKER, 2004).

Uma extensiva revisão sobre a massa lipídica de microalgas e suas implicações na produção de biodiesel pode ser encontrada em um capítulo especial do livro “Biodiesel para leitores de 9 a 90 anos” (FONTANA, 2011a).

Melhores resultados na biossíntese de lipídeos podem ser obtidos através da aplicação de condições de estresse (deficiência de nutrientes, anaerobiose, temperaturas extremas) na fase de crescimento da biomassa microalgal (BECKER, 2004).

Os lipídeos de microalgas são estudados principalmente para a utilização para produção de biocombustíveis, mas também podem ser utilizados como matéria-prima para produção de outros produtos nas indústrias de alimentos, cosméticas e de fármacos.

Proteínas

As microalgas apresentam uma série de vantagens: são capazes de utilizar tanto carbono inorgânico como orgânico; contém entre 40 e 70 % de teor proteico dependendo da espécie e apresentam tempo de geração curto, sendo fonte alternativa de proteína; são produzidas de forma contínua, ocupam áreas pequenas de cultivo e podem ser passíveis de manipulação genética visando à obtenção da composição nutricional desejada; são facilmente controladas se apresentam multiplicação alta em pouco intervalo de tempo (BENEMAN, 1990).

As proteínas são utilizadas principalmente como suplementos alimentares, adicionados a alimentos para enriquecimento ou para ração animal. Por exemplo, *Spirulina* sp, quando cultivada em tanques rasos, produz 20 vezes mais proteínas do

que a soja e 400 vezes mais do que a carne bovina utilizando a mesma área (HENRIKSON, 2009). Além disso, autores avaliaram as propriedades antifúngicas de proteínas de microalgas, revelando resultados promissores (CORDEIRO, 2006).

Carboidratos

Os carboidratos são uma das mais importantes fontes de energia. Em geral, as taxas de carboidratos de algas podem chegar a 50% do seu peso seco, e são principalmente compostos por amido, glucose, celulose/hemicelulose e outros polissacarídeos de composição mais heterogênea (HO *et al.*, 2013).

Desses, amido e glucose podem ser usados para a produção de biocombustíveis, como bioetanol e hidrogênio, enquanto os demais polissacarídeos representam uma classe de compostos de alto valor, com várias aplicações na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e têxtil (RICHMOND, 2004).

Polissacarídeos provenientes de algas têm demonstrado grande utilização na indústria farmacêutica, devido as suas ações como antioxidante, antitumoral, anticoagulante e antiinflamatório (CHEN, 2011; PARK, 2011). Alguns polissacarídeos de algas, ou mais propriamente macro-algas, ocupam lugar de destaque no mercado mundial de alimentos e produtos farmacêuticos, como o ágar e carragenanas.

Neste sentido, este trabalho está centrado no aproveitamento tecnológico da biomassa resultante do processo de biomitigação de CO₂ e odores de efluente gasoso da Churrascaria Devons utilizando microalgas (TAKAMATSU *et al.*, 2010), uma vez que os carboidratos são passíveis de serem hidrolisados para a formação de oligossacarídeos prebióticos.

Oligossacarídeos prebióticos são componentes não-digeríveis que atuam benéficamente no hospedeiro por promoverem o crescimento dos probióticos, bactérias intestinais benéficas ao cólon intestinal (*e.g.* gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) (SCHEREZENMEIR, 2001; ROBERFROID, 2002), podendo assim, realizar o aproveitamento da biomassa microalgal produzida.

Além disso, a proposta de produção de oligossacarídeos a partir da biomassa de microalgas é inovadora, pois não foram encontrados relatos na literatura deste processo para fins de obtenção de oligossacarídeos prebióticos. Entretanto, a

formação de oligossacarídeos a partir de hidrólises com ácido fosfórico já foi obtida anteriormente pelo grupo de pesquisa do LQBB utilizando outras fontes de polissacarídeos, como inulina e hemiceluloses. No caso do polímero de inulina, composto por unidades de frutose e uma unidade de glucose, foram obtidos os fruto-oligossacarídeos (FOS), que são os prebióticos mais estudados e utilizados mundialmente, não houve a necessidade de termopressurização, uma vez que a inulina possui ligações lábeis do tipo $\beta 2 \rightarrow 1$ entre as unidades D-frutofuranosídicas (FONTANA, 2011b). No caso das hemiceluloses, provenientes de material L(h)C, como bagaço de cana e serragem de *Pinus taeda*, foi necessária a termopressurização, devido ao grau de dificuldade de hidrólise (TIBONI, 2014).

A utilização do ácido fosfórico para obtenção de oligossacarídeos prebióticos de microalgas apresenta a vantagem de não necessitar de etapas de purificação e remoção deste produto ao final do processo, visto que além de ser amplamente utilizado na indústria alimentícia (e.g. composição de refrigerantes), o fostato está disseminado nos seres vivos (e.g. ácidos nucleicos, coenzimas, açúcares fosforilados).

4 MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DAS MICROALGAS

A mescla Devons foi cultivada em fotobiorreatores de placas planas, enquanto as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* são de origem comercial e foram fornecidas pelo Prof. Antônio Ostrensky Neto, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal do Paraná.

Cultivo e processamento da mescla Devons

O inóculo foi preparado no laboratório de microalgas do TECPAR com cepas da microalga *C. vulgaris*, a partir de uma quantidade de 10 % de solução de microalgas em relação ao volume do cultivo em fotobiorreator, ou seja, 40 litros de solução de microalgas para um volume de 360 litros de meio Chu (Tabela 2).

Tabela 2- Composição do meio Chu

Reagente	Fórmula Molecular	Concentração (g.L ⁻¹ ou mg.L ⁻¹)
Nitrato de sódio	NaNO ₃	25 g
Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	7,5 g
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	17,5 g
Cloreto de sódio	NaCl	2,5 g
Titriplex III	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	50 g
Hidróxido de potássio	KOH	31 g
Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98 g
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	11,42 g
Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 mg
Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 mg
Óxido de molibdênio	MoO ₃	0,71 mg
Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 mg
Nitrato de cobaltohexa-hidratado	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49 mg

Fonte: (CHU, 1942)

A microalga foi cultivada em dois fotobiorreatores de placas planas, cada um com capacidade de 512 litros, instalados na cobertura de uma churrascaria localizada em Curitiba – PR, em meio de cultivo Chu, utilizando luz natural e

temperatura ambiente sob injeção de emissões de fumaça provenientes da churrasqueira, conforme representado na Figura 8. Este sistema de tratamento de gases que está em funcionamento está protegido por um pedido de patente de pesquisadores do TECPAR e da UTFPR (TAKAMATSU *et al.*, 2010), que teve início com o objetivo de reduzir os odores oriundos da churrasqueira.

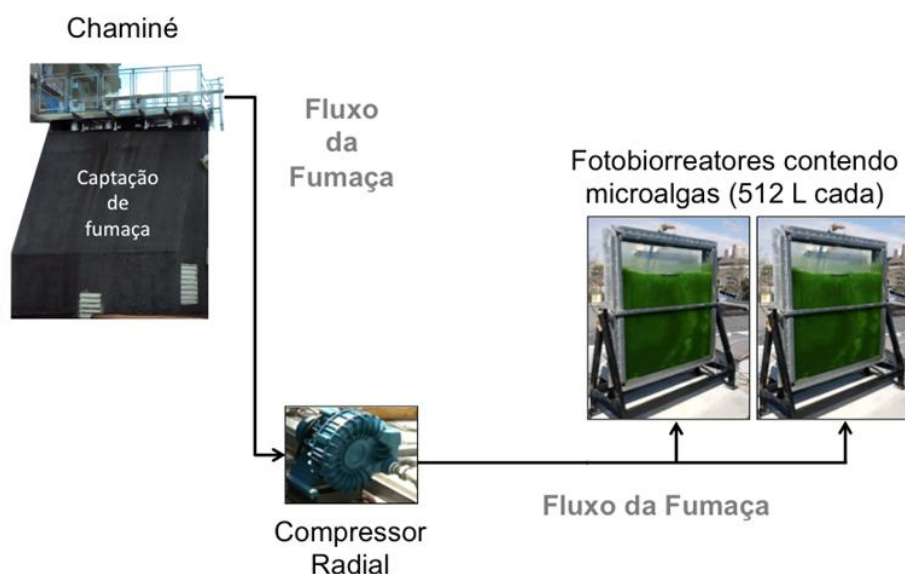


Figura 8 - Sistema para tratamento e aproveitamento de fumaça utilizando fotobiorreatores contendo microalgas.

Fonte: (TECPAR, 2012).

Recuperação da biomassa de microalga

A biomassa foi separada do meio de cultivo por eletroflotação, conforme metodologia estabelecida anteriormente (MICHELON, 2013), realizada em seis bateladas de 60 litros, com recirculação do líquido clarificado para o fotobiorreator. O concentrado de microalgas foi acondicionado em galões de plástico para transporte e posterior armazenamento.

A biomassa coletada foi homogeneizada e armazenada em refrigerador sob temperatura de 4 °C, sendo mantida em repouso por 24 horas para decantação e remoção do excesso de meio. A seguir, foi transferida para copos plásticos de 40 mL

de capacidade, congelada e liofilizada (Labconco free zone). A biomassa liofilizada foi mantida sob temperatura de 4 °C.

CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS

Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado gravimetricamente seguindo metodologia (IAL, 2005), a partir de 1 g da amostra da biomassa em cadinho de porcelana, calcinado e previamente tarado, levado à estufa a 105 °C, *overnight*, e depois carbonizadas as amostras em chapa aquecedora, até eliminação dos compostos orgânicos. A seguir, foram colocados em mufla a 550 °C, onde permaneceram *overnight*. O teor de cinzas (%) presente na biomassa foi estimado pela diferença entre o cadinho contendo o resíduo mineral e cadinho vazio considerando a massa de amostra utilizada no processo de calcinação por meio da Equação 1.

$$\%C = \frac{Cr - Cv}{g} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Onde %C = teor de cinzas, Cr = massa do cadinho + resíduo (g), Cv = massa do cadinho vazio (g) e g = massa de amostra (g).

Determinação do teor de nitrogênio total e estimativa de proteínas

A determinação de nitrogênio foi realizada pelo método de Micro-Kjeldahl (MILLER, 1945).

Amostras de 0,2 g foram colocadas em tubos específicos, adicionando-se 0,5 g de mistura catalítica (sulfato de potássio e sulfato de cobre) e 7 mL de H₂SO₄ concentrado. Os tubos com a mistura foram colocados em bloco digestor com aumento gradativo da temperatura, iniciada em 50 °C até atingir 380 °C. A digestão completa foi observada pela mudança da coloração da mistura até verde claro. Para a destilação foram adicionados 10 mL de água destilada aos tubos e adaptados ao destilador. A amostra foi neutralizada com NaOH 40% e a solução destilada foi coletada em 25 mL de ácido bórico em erlenmeyer acoplado ao final do condensador do destilador. A finalização da destilação foi determinada pela mudança de cor na solução de ácido bórico de roxo para verde, a qual ocorre com volume próximo a 50 mL.

O destilado em seguida foi titulado com H₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ até mudança de coloração de verde para roxo, e o volume anotado para estimativa do teor de proteína bruta por meio da Equação 2, multiplicando o teor de nitrogênio por 6,25.

$$\%PB = \frac{v \times N \times fc \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{g} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde %Pb = porcentagem de proteína bruta, v = volume gasto na titulação, fc = fator de correção do H₂SO₄ e g = massa da amostra (g).

Determinação do teor de lipídeos totais

Os lipídeos totais foram extraídos da biomassa através de modificação do método de extração de Bligh&Dyer (BLIGH&DYER, 1959).

Foi pesado 1 g de cada amostra liofilizada em um erlenmeyer de 50 mL, onde foi adicionado 4 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol. Os erlenmeyers foram hermeticamente fechados e colocados em agitador magnético por 12 horas.

As soluções foram centrifugadas, o extrato lipídico reservado e foram adicionados à biomassa 6 mL de clorofórmio e metanol (2:1), e novamente centrifugado. O processo se repetiu lavando a biomassa com 2,5 mL de clorofórmio

e metanol (1:1), 2,5 mL de etanol e acetona (1:1) e uma última lavagem com acetona.

O extrato lipídico foi colocado em placas de Petri devidamente taradas, para a evaporação dos solventes. Após secas, as placas foram pesadas novamente para a determinação do teor de lipídeos totais por gravimetria.

Análise de minerais da mescla Devons

Foi realizada análise dos minerais presentes na biomassa da mescla Devons. As amostras foram digeridas em forno de micro-ondas (Ethos Plus – Millestone), e aproximadamente 100 mg desta massa foi diretamente pesada nos frascos de teflon e adicionou-se 4 mL de ácido nítrico (HNO_3) bi-distilado, 2 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 0,5 mL de ácido fluorídrico tri-distilado (HF). As análises foram realizadas por meio de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ICP-MS (Perkin Elmer, modelo NexION, Shelton, USA), com introdução da amostra por nebulização pneumática, realizada no Laboratório de Análise de Resíduos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

TRANSESTERIFICAÇÃO DOS LIPÍDEOS

A transesterificação dos lipídeos se deu por via alcalina a partir de 200 mg de amostra previamente extraídas com organossolventes (item 4.2.3), 4 mL de metanol anidro e 15 μL de metóxido de sódio a 30 g% em metanol, de modo a executar o experimento clássico que recomenda uma relação, em massa, de triacilgliceróis totais : metóxido sódico de 100 : 1 – 2 (FONTANA *et al.*, 2009). As amostras ficaram sob agitação magnética por 2 horas. Os transesterificados passaram por processo de purificação em colunas de polipropileno (ponteiras para pipeta de 10 mL), utilizando como fase estacionária sílica gel 60 contendo 10 % (m/m) de CaSO_4 e eluídas sequencialmente com hexano, hexano : acetona (9:1), hexano: acetona (8:2) e hexano: acetona (5:5). As frações de cor verde-escuro, contendo as clorofilas,

ficaram adsorvidas na fase estacionária de sílica, enquanto as frações iniciais de cor amarela (devido à presença de carotenoides e que contem também os ésteres foram recolhidas. Antes da eliminação dos solventes, foi realizada uma análise do perfil de carotenoides por espectrofotometria de varredura de 400 a 700 nm, utilizando como padrão um perfil de β -caroteno (250 $\mu\text{g/mL}$) e uma curva analítica para a quantificação das amostras, conforme Figura 44 do Apêndice.

A seguir, as amostras foram colocadas em placas de Petri para evaporação dos solventes e os sólidos foram retomados em uma mistura de clorofórmio:metanol (1:1), filtrados em lã de vidro compactada, e as concentrações foram normalizadas para 50 mg/mL. As análises dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa (CG), esta última no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Para a análise de CCD foi utilizada uma placa de sílica gel 60 (Merck) como fase estacionária e uma mistura de hexano: éter etílico: ácido acético (24: 6: 0,3) como fase móvel. A corrida foi de 8 cm e a placa foi posteriormente revelada com anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento. Já as análises por CG, foram efetuadas em equipamento da marca Varian, modelo CP-3800 em coluna Varian Capillary Column Select Biodiesel for FAME 30 m, 0,32 mm, 0,25 μm polietileno glicol como fase estacionária. O detector utilizado foi o FID mediante injeção manual de 1 μL com injetor a 250 °C, detector a 250 °C, fluxo de 2 mL/min de H_2 como fase móvel e mantendo o forno a 60 °C por 2 min, a seguir rampa de aquecimento de 10 °C/min até 200 °C, seguindo de 5 °C/min até 240 °C, onde permaneceu por 7 min, preenchendo a rampa de aquecimento por um tempo total de 31 min. O processamento de dados se deu pelo *Software* Galaxie Workstation versão 1.9.3.2, incluindo as quantificações dos componentes (percentuais de áreas). Estas CGs foram executadas pelo MSc. Giuliano F. Zagonel, do corpo técnico do TECPAR.

PRÉ-TRATAMENTOS DAS BIOMASSAS

Inicialmente e como forma comparativa se submeteu as biomassas celulares integrais (*in natura*) das microalgas comerciais de *C. vulgaris* e *S. platensis* ao ataque enzimático com celulasas industriais (produto Cellic 2-C, da Novozymes) para se verificar a capacidade de despolimerização das paredes celulares, sítio onde

se concentram os carboidratos poliméricos de microalgas, incluída - se presente - a celulose. Neste experimento foi incluído manitol $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ como estabilizador osmótico para o caso de protoplastificação eficiente das células.

A seguir, a fim de realizar uma hidrólise comparativa e avaliar a influência dos principais componentes no processo, foram utilizadas biomassas provenientes de diferentes tratamentos como deslipidificação (item 4.2.3), tratamento com o detergente SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate* - Dodecil sulfato de sódio) e a precipitação com etanol deste sobrenadante (usualmente um agregado de proteínas e ácidos nucleicos e quando presente, também amido e seus polímeros assemelhados, amilopectina e glicogênio). A biomassa residual do tratamento com SDS corresponde então às paredes celulares purificadas.

O tratamento com SDS foi realizado a partir de 1 g de biomassa liofilizada (em triplicata) e três extrações consecutivas com SDS 2 % (m/v). Para a primeira extração foram utilizados 50 mL da solução de SDS, sob agitação constante em agitador magnético (Thermolyne Cimarec) durante 12 horas. As amostras foram centrifugadas (Hitachi himac CR 20B2) a 8.000 rpm, durante 25 minutos. O processo foi repetido duas vezes com o precipitado, utilizando 25 mL da solução de SDS e agitação constante durante 1 hora. Todos os sobrenadantes foram recolhidos individualmente e analisados em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650) por varredura de 200 a 900 nm. A partir das absorbâncias da relação entre as 280 e 260 nm foi possível calcular o teor de proteína removido em cada extração utilizando um fator de correção calculado a partir da equação exponencial ($R^2 = 0,979$ e $y = 0,385e^{1,250x}$) gerada com os dados pré-estabelecidos anteriormente, conforme Figura 45 do Apêndice (DAWSON, ELLIOTT *et al.*, 1986). O precipitado de biomassa resultante foi lavado duas vezes com água de osmose reversa para eliminação do excesso de SDS. A seguir, as amostras foram novamente centrifugadas e as biomassas processadas foram liofilizadas, com posterior determinação do peso seco.

A precipitação com etanol foi realizada com o primeiro sobrenadante de cada biomassa do tratamento com SDS, utilizando cinco volumes de etanol 95 %, ou seja, 150 mL de sobrenadante (3 x 50 mL) e 750 mL de etanol. Após decantação durante 12 horas, os precipitados foram recolhidos em frascos de centrifuga e foram adicionados 150 mL de acetona para completa remoção do SDS residual. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 25 minutos. As biomassas

foram transferidas para placas de Petri para completa remoção dos solventes e determinação do peso seco.

As amostras das biomassas *in natura* e pré-tratadas (18 mg) foram colocadas em frascos de vidro e submetidas à hidrólise com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 mol.L⁻¹, durante 30 e 60 minutos, em Banho-Maria a 100 °C. O TFA residual foi completamente removido do sobrenadante do material em equipamento concentrador de amostras (Labconco centrivap) que utiliza vácuo e um *trap*, além de pastilhas de potassa para a captação do ácido. Os hidrolisados foram ressuspensos em água e analisados por CCD, conforme item 4.5.5, exceto pela etapa de purificação com resina dessalinizadora tanto para cátions e ânions.

HIDRÓLISES TERMO-FOSFÓRICA DAS BIOMASSAS

Inicialmente foi realizada uma hidrólise comparativa entre as biomassas *in natura* e pré-processadas (biomassas deslipidificadas, tratadas com SDS e precipitada com etanol), utilizando pH efetivo igual 2,0 e pressão do termo-reator de 4,5 atm. Após as hidrólises foram feitas análises de pH, açúcar total (item 4.5.3), açúcar redutor (item 4.5.4), perfil cromatográfico (CCD) (item 4.5.5) do sobrenadante e determinação de proteína total pelo método de Micro-Kjeldahl (item 4.2.2) na biomassa residual. Com as amostras das biomassas *in natura* hidrolisadas com ácido fosfórico foi também realizado um experimento enzimático para análise de origem dos carboidratos (item 4.5.6).

A seguir, as hidrólises termo-fosfóricas das biomassas *in natura* foram conduzidas através de planejamento fatorial 3² para cada uma das três diferentes microalgas: mescla Devons, *C. vulgaris*, *S. platensis*. As duas variáveis analisadas foram pressão (temperatura) do reator e pH efetivo, utilizando três níveis, com repetição do ponto central, conforme Tabela 3:

Tabela 3 - Planejamento fatorial para os experimentos de hidrólise termo-fosfórica das biomassas de microalgas

Níveis dos fatores	Variáveis	
	Pressão do reator (atm) e temperatura (°C)	pH

(-)	3 (147°C)	1,5
0	4,5 (156°C)	2,0
(+)	6 (175°C)	2,5

As respostas analisadas para o planejamento fatorial foram a produção (mg/g de biomassa) e pureza (%) de oligossacarídeos. Todos os dados foram analisados utilizando o programa Statistica (Statsoft Inc. USA).

Determinação da concentração de ácido fosfórico para o pH efetivo

Amostras de 0,5 g de cada microalga foram suspensas em água em tubos de vidro e tituladas com ácido fosfórico 1,49 mol/L (8,5 % m/v), sob agitação constante até atingir o pH desejado: 2,5, 2,0 e 1,5, monitorado em potenciômetro. A seguir, foi completado o volume para 5 mL e as amostras ficaram em repouso por 12 h, a fim de verificar possíveis alterações no pH. A partir dos resultados em triplicata, foram preparadas, em balões volumétricos de 100 mL, soluções-estoque de ácido fosfórico para cada microalga e pH efetivo.

Termopressurização com ácido fosfórico

Para a hidrólise termo-fosfórica, 0,5 g de biomassa seca de cada microalga foi colocada em tubos de vidro (capacidade 12 mL) e adicionado 5 mL da solução-estoque de ácido fosfórico, além de controles com água de osmose reversa. Os tubos foram fracamente tampados e levados a um termopressurizador (construído pela metalúrgica Scybior para o Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa - LQBB, em 1986), que ser visualizado na Figura 9. Para garantir o fechamento completo do termoreator foi realizada uma vedação prévia com silicone acético termoresistente (PolyStic®), seguida de aquecimento com uma chama de gás até atingir a pressão desejada, mantendo neste pico máximo durante 1 min. A seguir, o

termopressurizador foi desligado e somente após a pressão retornar a 0 atm foi aberto cuidadosamente.



Figura 9 – Fotografia do termopressurizador utilizado para a realização das hidrólises termo-fosfóricas

Após as hidrólises, foi medido o pH das amostras, seguido de centrifugação durante 40 min a uma rotação de 3000 rpm (CELM LS-3 plus). O sobrenadante dos hidrolisados foi transferido cuidadosamente para tubos falcon de 15 mL, sendo a biomassa residual lavada com pequenos volumes de água de osmose reversa, seguida novamente de centrifugação (20 min) e o sobrenadante foi transferido para o tubo falcon, até completar o volume inicial de 5 mL, a fim de padronizar as amostras de acordo com a proporção inicial de biomassa: solução ácida de 0,1: 1.

Determinação dos açúcares totais

As amostras de todos os sobrenadantes dos hidrolisados fosfóricos de microalgas foram diluídos convenientemente e analisados em triplicata através do método do fenol sulfúrico (DUBOIS, 1956).

As amostras foram adicionadas a tubos, em triplicata, contendo água de osmose reversa, padronizadas para o volume de 0,63 mL. Foi adicionado à esta mistura 0,4 mL de solução fenol 5 % (m/v) ($0,53 \text{ mol.L}^{-1}$), seguida de adição rápida de 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram homogeneizadas e permaneceram em repouso até toda a perda de calor, a seguir foram realizadas leituras em espectrofotômetro em 490 nm após calibração com o branco.

Os cálculos de açúcar total foram realizados a partir da equação da reta ($R^2=0,9911$ e $y=0,0169x$) proveniente da curva analítica de glucose contendo de 10 a 50 μg de monossacarídeo, conforme Figura 46 do Apêndice.

Determinação dos açúcares redutores

Nos sobrenadantes dos hidrolisados fosfóricos também foram analisados o teor de açúcares redutores, após diluição conveniente e análises em triplicata, através do método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959), com algumas modificações no volume dos reagentes. Alíquotas de até 150 μL de amostra foram colocadas em tubos de hemólise. A seguir, foram adicionados 100 μL do reagente de DNS, preparado conforme indicado na Tabela 4, e levadas ao aquecimento (100°C) durante 2 minutos. Após a fervura, foram adicionados 750 μL de água de osmose reversa e as medidas de absorbância foram medidas em espectrofotômetro (Shimadzu) no comprimento de onda de 540 nm. Os cálculos de açúcar redutor foram realizados a partir da equação da reta ($R^2=0,9985$ e $y=5,6221x$) oriunda da curva analítica de glucose contendo de 0,025 a 0,3 mg de açúcar, conforme Figura 47 do Apêndice.

Tabela 4 - Composição reagente dinitrosalicílico (DNS)

Ác. 3,5-Dinitrosalicílico	5 g
Solução NaOH 2M	100 mL
Tartarato duplo de Sódio e Potássio	150 mL
H ₂ O destilada	300 mL

NOTA: Volume final completado para 500 mL

Análise dos hidrolisados por Cromatografia em Camada Delgada

As amostras foram previamente purificadas com o objetivo de eliminar o excesso de ácido fosfórico residual nas amostras e melhorar a resolução da CCD, 0,2 mL de cada amostra foi transferido para tubos tipo *ependorfs* e duas resinas de troca iônica foram adicionadas, uma mais forte (Dowex 2x8 (OH⁻) – 2 mg) e uma mais fraca (Amberlyst A-21 Sigma – 1 mg).

As análises pela técnica de CCD foram realizadas utilizando cromatoplasmas de sílica-gel 60 (Merck), sobre as quais foram aplicados pontos do sobrenadante dos hidrolisados concentrados (1 µL), padrões das soluções de monossacarídeos (glucose, galactose, ramnose, xilose, manose, arabinose, ácido galacturônico), maltose e celobiose, oligossacarídeos de xilose (XOS), celo-oligossacarídeos (COS) e dos produtos de degradação (furfural e HMF).

Os solventes utilizados para a preparação da fase móvel foram acetonitrila, isopropanol e água, na proporção 15:3:5 v/v, e o agente revelador utilizado foi o orcinol sulfúrico (250 mg de orcinol/45 mL de metanol e 2,5 mL de H₂SO₄), seguido de aquecimento em chapa aquecedora.

As placas foram fotografadas após aquecimento brando e intenso, para a visualização de diferentes compostos presentes nas amostras, e para uma análise semi-quantitativa dos oligossacarídeos, foi efetuada uma densitometria utilizando o software Image J 1.47v (*National Institutes of Health, USA*).

Análise da origem dos carboidratos por meio de teste enzimático

Foi realizado teste enzimático para análise da origem dos açúcares presentes nas microalgas. Foram adicionadas enzimas α -amilase (Sigma A-4551) e β -1,3 glucanase (endo de *Rhizopus arrhizius* e exo de *Basidio* sp.) na concentração final de 0,4 mg.mL⁻¹ à 100 µL de amostra dos hidrolisados fosfóricos das microalgas,

obtidos nas condições 4,5 atm e pH 2. O volume final de reação foi ajustado para 200 μL , e ao final do ensaio foi adicionado 200 μL de acetona a fim de promover a inativação das enzimas e cessar a reação. Foram utilizados tampões fosfato de potássio 20 mM (pH 7) e citrato de sódio 50 mM (pH 5), respectivamente para α -amilase e β -1,3 glucanase. Os ensaios foram realizados a 45 °C com agitação de 100 rpm em agitador-incubador (Cole-Parmer Instrument Company, Chigaco Illinois 60648) durante 4h e 22 h. Os resultados foram analisados por meio de cromatografia em camada delgada da forma como descrito anteriormente no item 4.5.5, porém a fase móvel foi constituída por uma mistura de acetato de etila:ácido acético:água (2:2:1).

CULTIVO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS UTILIZANDO OS OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS

A partir das análises das melhores condições de hidrólise para obtenção de oligossacarídeos, foram realizados cultivos com duas espécies de microrganismos probióticos, obtidos comercialmente, *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult®) e *Bifidobacterium animalis* (Activia®), utilizando os hidrolisados de cada microalga como meio de crescimento. As soluções dos hidrolisados foram preparadas de forma que todos os meios de cultivo apresentassem quantidades proporcionais de pureza de oligossacarídeos (%).

Um pré-cultivo dos microrganismos foi realizado, utilizando uma diluição de 1:1 (v/v) do produto original e solução contendo extrato de levedura e casaminoácidos (0,2 % de cada), com pH final 6,0, sendo ajustado com hidróxido de sódio a 10% (1 mol.L⁻¹), e mantidos em ambiente anaeróbico a temperatura de 37 °C durante três dias. Os tubos contendo os cultivos, foram centrifugados a 8.000 rpm por 20 min para a recuperação da biomassa, a qual foi lavada sucessivamente com água de osmose reversa para a eliminação dos açúcares e outros constituintes presentes nos produtos originais, de forma a não haver interferências no crescimento dos microrganismos.

Após este processo, uma alíquota celular de cada microrganismo foi inoculada em meios de cultivo previamente preparados utilizando os oligossacarídeos

hidrolisados de cada microalga e 0,2% (m/v) de extrato de levedura e casaminoácidos, ajustando o pH final para 6,0 com solução de hidróxido de sódio. Estes meios de cultivo foram preparados de forma a conter uma quantidade similar de oligossacarídeos para os extratos de cada microalga. Os cultivos foram realizados em triplicata, mantidos em anaerobiose, a temperatura de 37°C pelo período de 14 dias.

Coletas foram realizadas diariamente, a cada 24 h, logo após inoculação até o 7º dia, e após este período, foram realizadas coletas apenas no 9º e 14º dia. Alíquotas de 0,5 mL de cada cultivo foram retiradas em tubos do tipo *eppendorf* e centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min (Eppendorf - Mini Spin Plus).

Os sobrenadantes do meio de cultivo foram reservados para análise de pH e de produção de ácidos orgânicos, enquanto os precipitados contendo as células foram novamente diluídos em 1 mL de solução salina 0,9% (m/v) para análise do crescimento celular, descrita pela técnica de turbidimetria (CARVALHO, 1994), sendo realizada a quantificação de células totais através da leitura em espectrofotômetro em 660 nm.

As análises de variação de pH foram realizadas utilizando potenciômetro previamente calibrado, e a produção de ácidos orgânicos foi realizada por CLAE em equipamento Shimadzu LC-10 station, utilizando coluna Rezex ROA – Organic acids, (300 mm x 7,8 mm) com loop de 20 µL, a temperatura de 50 °C. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico (8mmol/L), utilizando fluxo de 0,5 mL/min e detector de índice de refração (RID).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

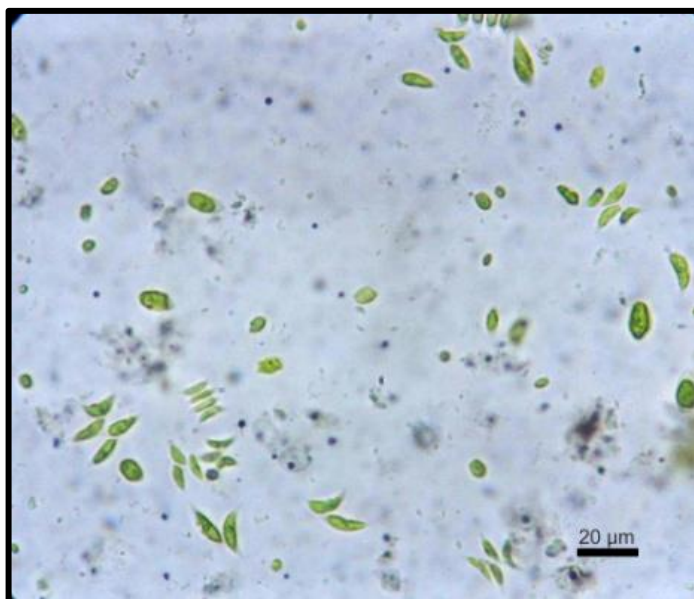
Os resultados a seguir são apresentados de forma a comparar as três biomassas de microalgas utilizadas para a realização dos experimentos deste trabalho, embora apenas a mescla Devons tenha sido cultivada nos fotobiorreatores instalados na churrascaria, apresentando uma produção média de 6 g.L^{-1} de biomassa algal. Não foi possível a quantificação da biomassa algal de *C. vulgaris* e *S. platensis*, pois estas foram adquiridas comercialmente.

CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS DE MICROALGAS

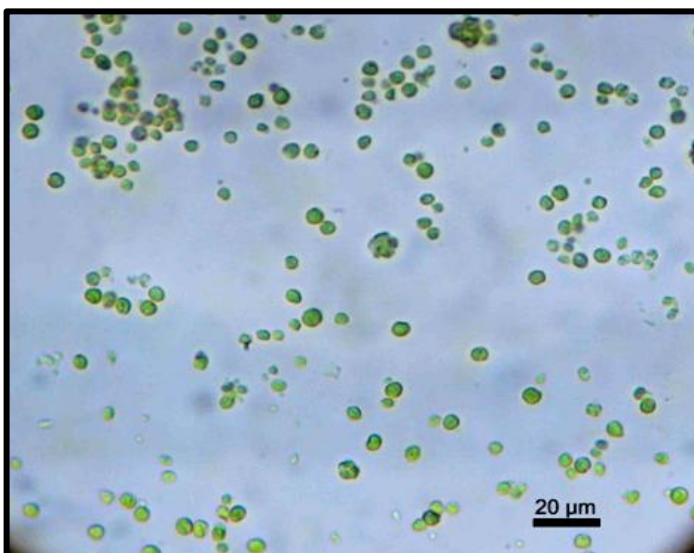
Morfologia e aspecto visual das microalgas

A análise morfológica das células e pureza dos cultivos foi realizada através de microscopia óptica. O cultivo realizado nos fotobiorreatores instalados no sistema de tratamento de efluente gasoso da Churrascaria Devons foi originalmente inoculado com uma cepa aparentemente axênica de *C. vulgaris*, porém foi possível observar uma contaminação com outras espécies de microalgas já na primeira coleta após adensamento celular, portanto, como não se trata de um cultivo puro, a biomassa resultante foi denominada de mescla Devons, como pode ser visualizado na Figura 10. Esta contaminação com outras espécies de microalgas pode ser explicada devido ao fato que um dos fotobiorreatores instalados na churrascaria, estava anteriormente funcionando com um cultivo de *Desmodesmos subspicatus* e o outro com um cultivo misto de microalgas cujo inóculo correspondia a uma coleta do Passeio Público de Curitiba-PR (RICO, 2014). Como estes fotobiorreatores tem capacidade individual de 512 L, existe uma diferença em relação aos cultivos em escala laboratorial (bancada), uma vez que neste último caso, é possível manter um controle mais adequado de esterilidade dos frascos e meio de cultivo, garantindo uma inoculação mais adequada do ponto de vista de cultivos puros.

Mescia Devons



Chlorella vulgaris



Spirulina platensis



Figura 10 – Morfologia das microalgas através de microscopia óptica (400x)

Portanto, considerando os objetivos do trabalho de obter oligossacarídeos prebióticos a partir de hidrólise fosfórica, foram selecionadas duas microalgas comerciais, *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*, a fim de comparar o perfil dos resultados com biomassas bem estabelecidas na literatura. As análises microscópicas para estas duas microalgas comerciais apresentaram morfologias características das espécies e não foi observada contaminação com outros microrganismos.

Com relação ao aspecto visual das biomassas liofilizadas, foram observadas diferenças significativas entre as microalgas, como a coloração diferencial verde-azulada, certamente decorrente dos diferentes pigmentos presentes nas espécies, como clorofilas e ficocianinas, conforme observado na Figura 11.

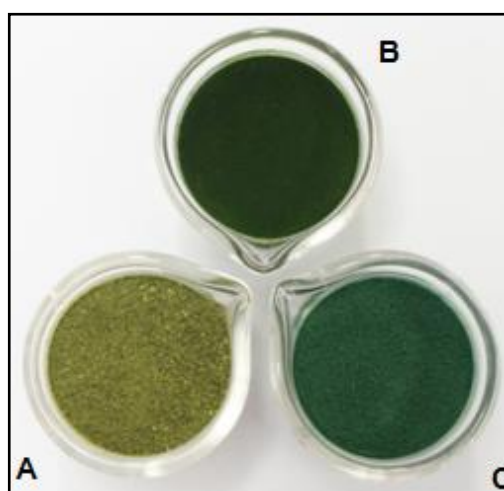


Figura 11 – Fotografia das biomassas liofilizadas de mescla Devons (A), *Chlorella vulgaris* (B) e *Spirulina platensis* (C).

Composição Centesimal

Através de análises físico-químicas foi possível determinar a composição centesimal das três diferentes microalgas, apresentada no gráfico da Figura 12. Todas elas apresentaram proteína como componente majoritário, seguida de carboidratos, lipídeos e outros constituintes, como minerais e pigmentos. *S. platensis* mostra um valor proteico mais elevado, 1,4 e 1,6 vezes maior, quando comparado com a mescla Devons e *C. vulgaris*, respectivamente. Em relação aos lipídeos e

carboidratos, os valores são inversos, ou seja, em média 1,8 e 2,2 vezes menor, respectivamente. Portanto, estes dados mostram que a mescla Devons apresenta características bioquímicas mais próximas aos da espécie *C. vulgaris*, do que às de *S. platensis*, uma vez que o inóculo inicial foi realizado com *C. vulgaris*.

Matos (2012) obteve valores menores para a composição centesimal da biomassa de *C. vulgaris*: 25,04% de proteínas, 15,09% de carboidratos e 3,70% lipídeos, cultivada em meio concentrado de dessalinização. Para *S. platensis*, Donato *et al.*, (2010) encontraram valores de 59,65% de proteína, 11,7% de carboidratos e 3,29% de lipídeos, em meio de cultivo não informado, enquanto Huang (2006) obteve valores de 62,43% de proteína, 3,47% de carboidratos e 17,3% de lipídeos, utilizando meio de cultivo Zarrouk. Estas diferenças de valores da composição centesimal das microalgas reafirmam que as respostas metabólicas das microalgas são influenciadas pelo meio de cultivo utilizado e diversos outros fatores, como temperatura e pH.

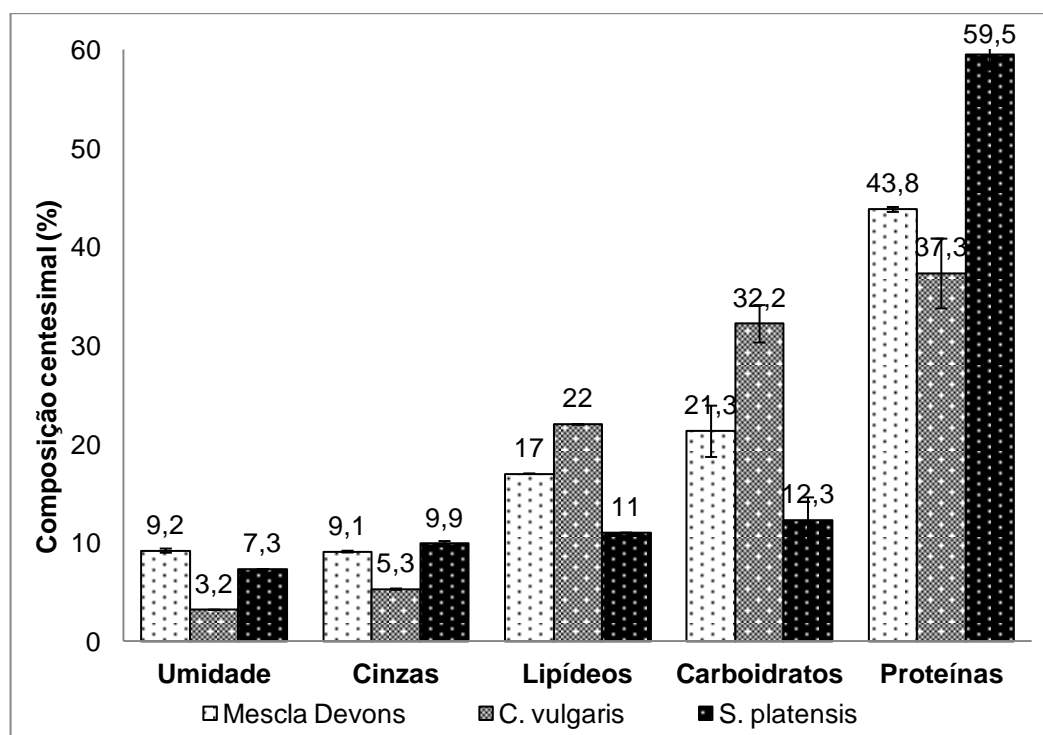


Figura 12 - Composição centesimal das biomassas de microalgas

Análise de Minerais

Na Tabela 5 está descrita a composição de metais da biomassa da mescla Devons, que foi realizada principalmente para análise do teor de alumínio, para avaliação do impacto da utilização do processo de eletroflotação para recuperação da biomassa.

Nota-se a extrema variabilidade na ocorrência de cátions de metais na biomassa, sendo alguns absolutamente essenciais para manutenção metabólica, como o Mg^{2+} , importante na estruturação de clorofilas (essenciais na captação da energia luminosa), formação de adenosina trifostato (ATP) para o armazenamento de energia e síntese de proteínas (incluindo os ácidos nucleicos) (CAKMAK & YAZICI, 2010). Já o Zn^{2+} , é responsável por manter a estrutura e a integridade da membrana e de controlar a permeabilidade da célula, e o Mo^{2+} apresenta papel significativo na fixação do nitrogênio (KIRKBY & RÖMHELD, 2007).

Porém, o teor de Al^{3+} , como esperado, apresentou valores muito elevados, provavelmente devido ao processo de eletroflotação que emprega eletrodos de alumínio. O valor determinado foi de $12767,43 \pm 1967,09 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo que a ingestão semanal tolerável de alumínio é de aproximadamente 7 mg.kg^{-1} de peso corpóreo (OMS, 1998). Portanto, outros meios de recuperação da biomassa do meio de cultivo devem ser avaliados, pois os altos níveis de alumínio podem trazer diversos malefícios à saúde, e estes valores são muito elevados considerando a finalidade da biomassa de microalgas para consumo humano.

Tabela 5 - Composição de metais da biomassa da mescla Devons

Analito	Concentração (mg.kg^{-1}) \pm limite de confiabilidade para $\mu=95\%$
Pb	$9,84 \pm 0,89$
Ba	$216,95 \pm 27,20$
Mo	$0,37 \pm 0,13$
Zn	$1004,44 \pm 132,67$
Cu	$17,04 \pm 5,85$
Ni	$1,64 \pm 0,25$
Co	$0,59 \pm 0,05$
Fe	$3787,81 \pm 369,63$
Mg	$2203,44 \pm 372,13$
Al	$12767,43 \pm 1967,09$
Ti	$39,76 \pm 10,30$
Cr	$45,76 \pm 12,93$
Mn	$183,71 \pm 42,42$

TRANSESTERIFICAÇÃO ALCALINA METÍLICA DOS ÓLEOS BRUTOS DAS BIOMASSAS

Os extratos para análise de lipídeos totais de microalgas, após remoção dos solventes residuais (clorofórmio e metanol), se caracterizam pela concentração dos pigmentos, e a intensa coloração verde muito escura antecipa um grau de dificuldade se o objeto do processamento subsequente é a preparação de ésteres, como pode se observar na Figura 13.

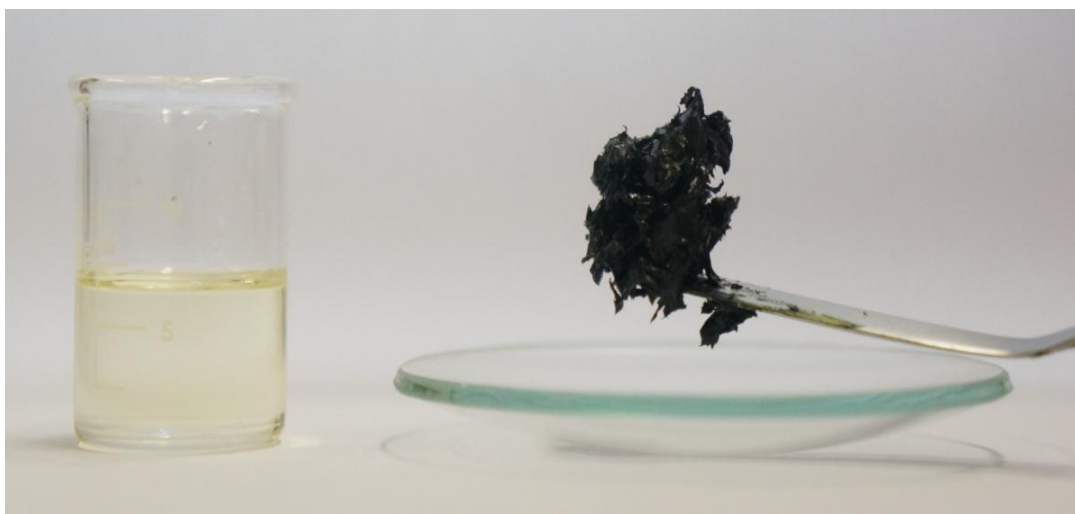


Figura 13 – Comparação entre extrato lipídico vegetal, à esquerda e extrato lipídico de microalgas, à direita

Durante a preparação experimental, as amostras foram misturadas com sílica gel 60 e se pode perceber na Figura 14, a maior variação do padrão qualitativo das clorofilas e ficobilinas (caso da *S. platensis*) das cepas de microalgas quando se examina os extratos lipídicos totais homogeneizados.

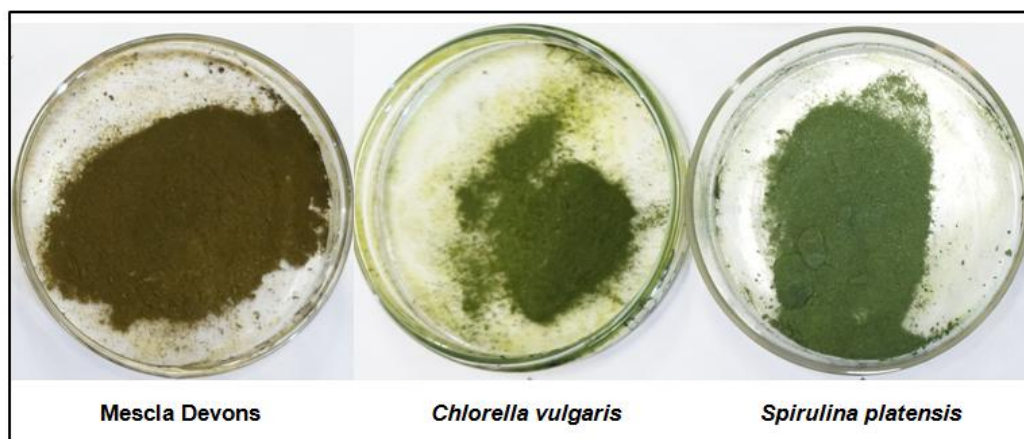


Figura 14 - Aspecto visual dos óleos transesterificados de microalgas mesclados com sílica gel 60 (1:2)

Foram obtidos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) a partir da transesterificação alcalina dos lipídeos das microalgas em catálise mediada por metóxido de sódio e na presença de excesso de metanol. Na etapa de purificação em colunas cromatográficas, foram separadas as frações clorofiladas, retidas na fase estacionária e as frações purificadas contendo os carotenoides, que podem ser visualizadas na Figura 15.

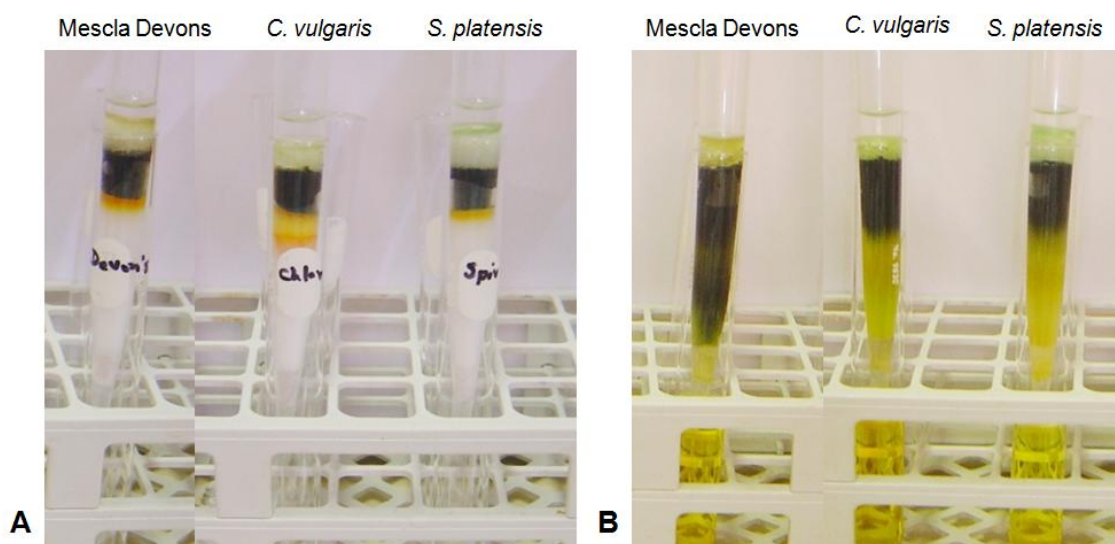


Figura 15 – Purificação dos EMAGs de microalgas através de mini-colunas contendo sílica gel. Frações clorofiladas retidas na fase estacionária (A) e frações purificadas (B).

A Figura 16 apresenta os espectros comparativos, indicando que o β -caroteno, como nota-se pela ocorrência tríplice de picos máximos de absorção na faixa do visível, contribui com substancial parcela da cor amarela extraída e purificada a partir das microalgas. A partir destes espectros foi calculada a concentração ($\mu\text{g/mL}$) de β -caroteno nos eluatos normalizados a partir de uma curva analítica ($R^2= 0,9918$ e $y=0,0409x$) (Figura 44 do Apêndice), sendo superior para *C. vulgaris* (168,22), seguido da mescla Devons (94,87) e por último para *S. platensis* (31,32). A partir destes dados foram realizados cálculos para a quantificação de β -caroteno em relação à biomassa seca das microalgas ($\text{mg } \beta\text{-caroteno.g}^{-1}$ biomassa seca), *C. vulgaris* apresentou $1,82 \text{ mg.g}^{-1}$, mescla Devons $0,81 \text{ mg.g}^{-1}$ e *S. platensis* $0,18 \text{ mg.g}^{-1}$.

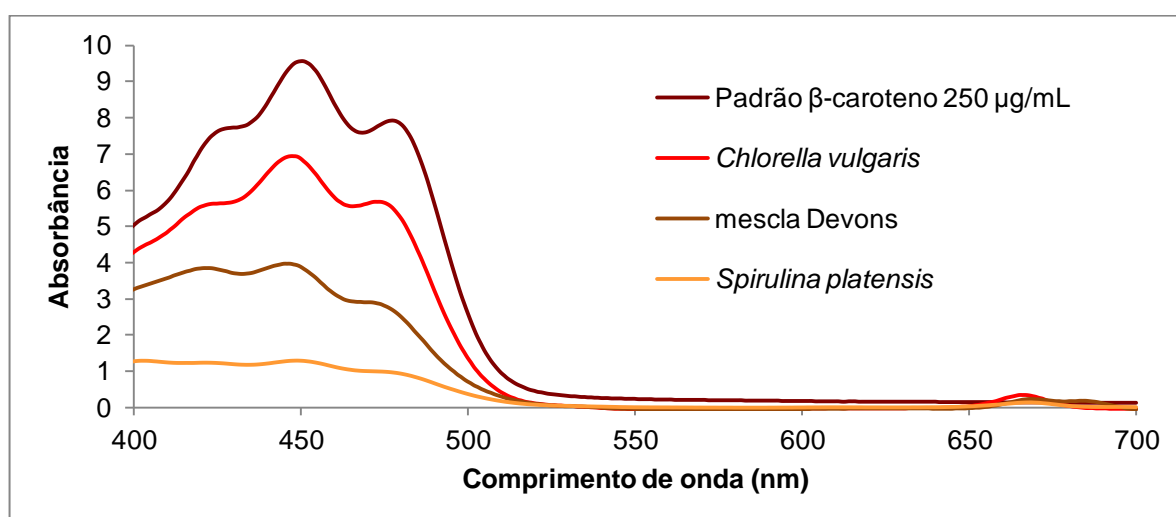


Figura 16 - Perfil de carotenóides das microalgas em espectrofotômetro

Na Figura 17 estão mostrados os perfis de clorofila e carotenoides das microalgas, sob foco de dar um destino mais amplo a toda biomassa de microalgas. Mais uma vez, foi possível observar a presença dos carotenoides oxigenados ($R_f=0,30$), além de β -caroteno (BC; $R_f = 0,90$) em *C. vulgaris* e mescla Devons, conforme a placa da esquerda (A). Para a mescla Devons, foi confeccionada outra cromatoplaça (B) com variação de solvente.

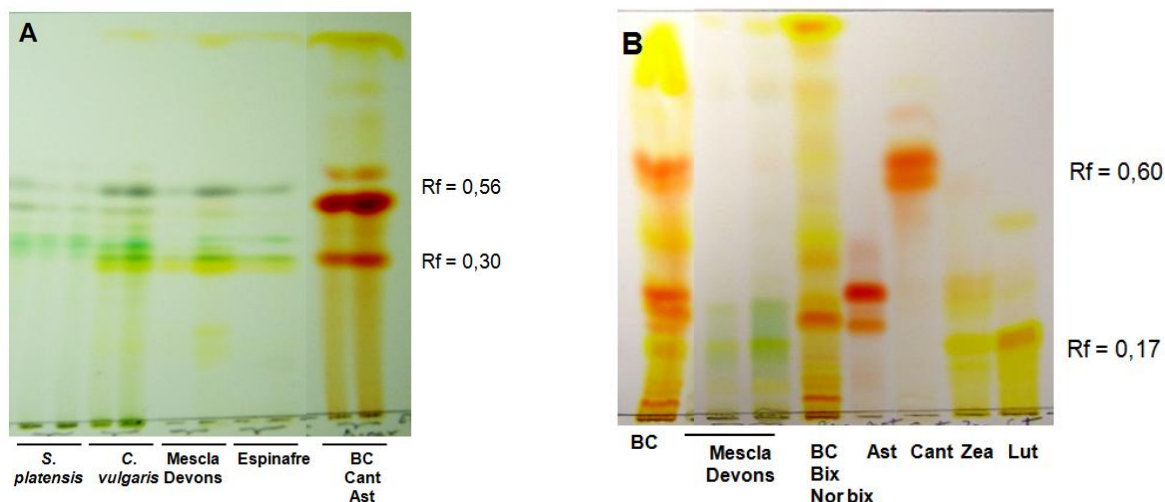


Figura 17 - Perfil cromatográfico de clorofilas e carotenoides das microalgas

Nota: Fase móvel: (A) hexano:acetona (7:3) e (B) benzeno:acetato de etila:acetona (85:8:7). Padrões: **Rf = 0,56** - (BC) β -caroteno; **Rf = 0,60** - (Can) cantaxantina; **Rf = 0,30** - (Ast) Astaxantina; (Bix) Bixina; (Nor bix) nor-bixina; (Zea) Zeaxantina; (Lut) Luteína.

Uma análise mais refinada da contribuição diferencial dos pigmentos após adsorção dos lipídeos totais e seus ésteres derivados em mini-colunas de sílica gel homogeneizada com 10% do peso com CaSO_4 pode ser vista nas CCDs da Figura 18. A placa da esquerda (A) ilustra o perfil revelado com anisaldeído e a da direita (B) com visualização em câmara de UV em 365 nm. Foram aplicadas amostras de óleo bruto e os respectivos EMAGs (bruto e pré-purificado). As clorofilas ressaltam com o tom vermelho enquanto os carotenoides surgem como manchas azuladas. Percebe-se que o meio reacional fortemente alcalino (determinado pelo metóxido de sódio para a transesterificação) não altera significativamente o perfil qualitativo das clorofilas. Esta particularidade se reveste de extrema importância quando se tem em mente o uso de ésteres de microalgas como biodiesel, pois seguramente um produto tão fortemente pigmentado não teria a aprovação das normas da ANP (Agência Nacional do Petróleo). Por exemplo, a presença de altas concentrações de clorofila significa a presença de Mg^{2+} , a qual deve ser devidamente controlada, pois pode degradar o combustível e causar danos ao motor e aos catalisadores automotivos, sendo que o valor máximo permitido pela ANP é de 5 mg.kg^{-1} de Mg^{+2} e Ca^{+2} (ZEZZA, 2011).

Como do ponto de vista econômico é inviável empregar sílica gel para despigmentar biodieseis de microalgas, soluções alternativas devem ser implementadas, como a adsorção dos pigmentos em carvão ativo que já tem

demonstrado bons resultados (CAVALCANTI, 2014). Um dos fatores que poderia justificar o uso de sílica gel no processamento de óleos de microalgas seria o enriquecimento de outro grupo de pigmentos, e.g., os carotenoides.

Nas cromatoplasmas representadas pela Figura 18, também é possível notar os lipídeos nativos das microalgas ($R_f = 0,38$) majoritários e também a formação dos respectivos EMAGs ($R_f = 0,76$) em relação aos triacilglicerídeos (TAGs) de menor migração ($R_f = 0,67$).

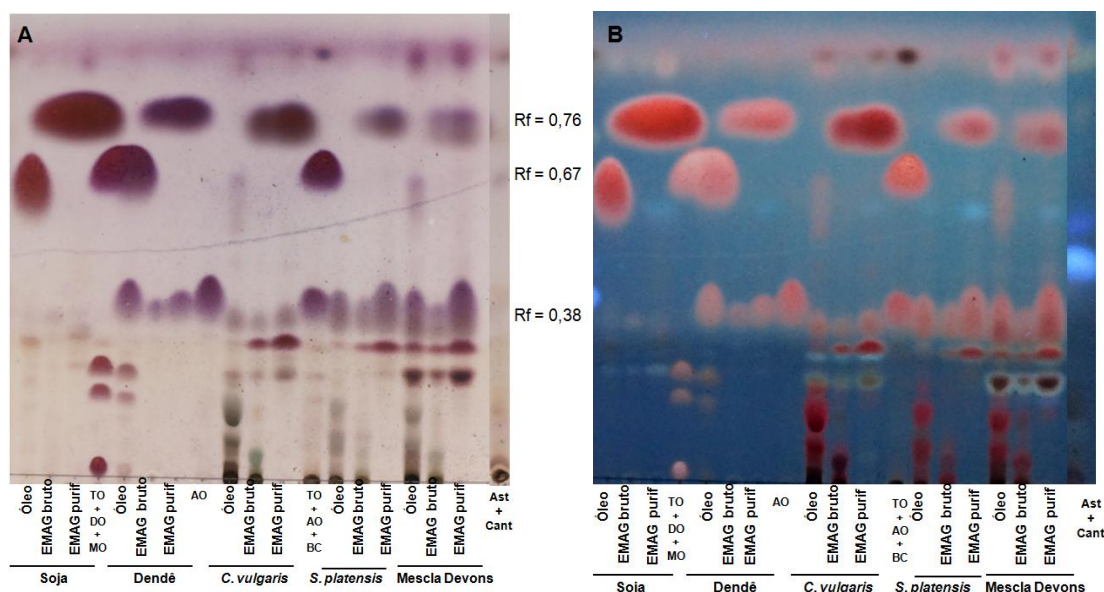


Figura 18 - Perfil cromatográfico em camada delgada dos EMAGs das microalgas

Nota: Fase móvel: Hexano:éter etílico:acetona (24:6:0,5). Padrões: (Can) Cantaxantina, (Ast) Astaxantina, (BC) β -caroteno, (AO) ácido oléico, (MO) monoleína, (DO) dioléina, (TO) trioléina. $R_f = 0,38$ – lipídeos, $R_f = 0,67$ - triacilglicerídeos (TAGs), $R_f = 0,76$ – EMAGs.

As amostras purificadas dos lipídeos foram também submetidas à análise por CG para os ésteres metílicos de ácido graxo (EMAGs) (Tabela 6). As amostras de soja e dendê foram analisadas como forma de se obter uma análise comparativa com as microalgas, visto que ambas são mais bem retratadas na literatura e já utilizadas na produção de biodiesel, principalmente a soja. Os resultados para os EMAGs, tanto de soja, quanto dendê (palma) mostraram diferença em relação aos encontrados para as microalgas, porém, equivalência muito satisfatória em confronto com dados da literatura. Na soja confirmou-se a dominância do linoleato de metila (53%) seguido de oleato de metila (26%) e para o dendê, a predominância de oleato e palmitato de metila, respectivamente em 43% e 40% (CHOWDURY, 2007).

Tabela 6 - Composição percentual de ésteres metílicos de ácidos graxos das amostras transesterificadas determinada por cromatografia gasosa

EMAG		Soja	Dendê	Mescla Devons	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. platensis</i>
C12	Laureato (dodecanoato)	-	0,60	-	-	-
C14	Miristato (tetradecanoato)	0,07	0,90	0,69	0,30	0,88
C15	Pentadecanoato	-	-	0,22	-	1,13
C16	Palmitato (hexadecanoato)	11,14	39,64	57,42	54,71	21,95
C16:1	Palmitoleato (hexadecenoato)	0,10	0,14	4,56	5,14	2,01
C17	Heptadecanoato	0,08	0,13	-	0,41	7,12
C17:1	Heptadecenoato	0,06	-	-	0,83	2,33
C18	Estearato(octadecanoato)	2,87	5,05	1,67	2,17	1,33
C18:1	Oleato(octadecenoato)	26,25	42,76	3,58	5,80	21,70
C18:2	Linoleato (octadecadienoato)	52,93	9,72	10,31	16,07	6,88
C18:3 (todos)	Linolenato(octadecatrienoato)	5,30	0,34	21,25	13,62	14,07
C20	Araquidato (eicosanoato)	0,34	0,34	0,08	0,20	0,34
C20:1	Gadolenoato (eicosenoato)	0,24	0,16	0,09	-	1,17
Desconhecido		-	-		-	2,87
Desconhecido		-	-		-	11,35
C22	Behenato (docosanoato)	0,39	-	0,12	-	0,71
C22:1	Cetolenico (docosaneato)	0,04	-	-	-	2,51
C24	Lignocerato (tetracosanoato)	0,20	0,24	-	-	1,67
Total EMAGs saturados		15,09	46,90	60,20	57,78	35,12
Total EMAGs insaturados		84,91	53,10	39,80	41,46	50,67

A análise dos EMAGs para as microalgas estão representadas nas Figuras 48 e 49 do Apêndice. A microalga *C. vulgaris* mostrou uma dominância do EMAG saturado palmitato de metila, parcialmente compensada pelos ésteres metílicos insaturados ($16 + 13 + 6 + 5 = 40\%$, no total) respectivamente para linoleato, linolenato, oleato e palmitoleato. Não se encontrou concordância de tal composição com as literaturas consultadas, aliás, bastante heterogêneas (OTLES, 2001; PETKOV, 2007; ALWAYZY, 2014). Estas discrepâncias podem decorrer desde as condições de cultivo bem como das diferentes espécies ali analisadas. O exame microscópico direto das células da mescla Devons indicou a convivência de vários tipos de microalgas, embora *C. vulgaris* tenha sido inicialmente inoculada. Coerentemente, a série de EMAGs desta mescla apresentou coerência com os dados obtidos da microalga comercial de *C. vulgaris*, com clara dominância de palmitato (57%) e linolenatos por 21% e menores teores de oleato (C18:1) e palmitoleato (C16:1) de metila.

Já o perfil encontrado para os EMAGs de *S. platensis*, pelo menos em termos qualitativos, não se afasta tanto dos dados da literatura (OTLES, 2001), pois as dominâncias correspondem, em ambos casos, à serie palmitato, oleato, linoleato, linolenato, com a curiosidade que foi detectado alguma incidência de EMAGs mais raros, ou seja, de número impar de carbono (caso dos C17) mas que não excederiam 10% do total.

PRÉ-TRATAMENTOS DAS BIOMASSAS

As biomassas celulares *in natura* das microalgas comerciais de *C. vulgaris* e *S. platensis* foram submetidas ao ataque enzimático com celulasas industriais (produto Cellic 2-C, da Novozymes) pelo período de 2h, 4h e 22h. Nos períodos de 2h e 4h de incubação enzimática não foi observada nenhuma alteração nas estruturas das microalgas. Após 22h de contato com as enzimas, pode-se observar o rompimento da parede celular da *S. platensis* e a liberação de protoplastos, como indicado pelas setas na Figura 19. Este experimento mostrou que a *C. vulgaris* é resistente à hidrólise enzimática, enquanto *S. platensis* é mais sensível. Embora *S. platensis* tenha demonstrado pequeno grau de hidrólise, o resultado não foi satisfatório.

Portanto, a estratégia de obtenção de oligossacarídeos a partir dos polissacarídeos nativos através de despolimerização enzimática parcial foi descartada.

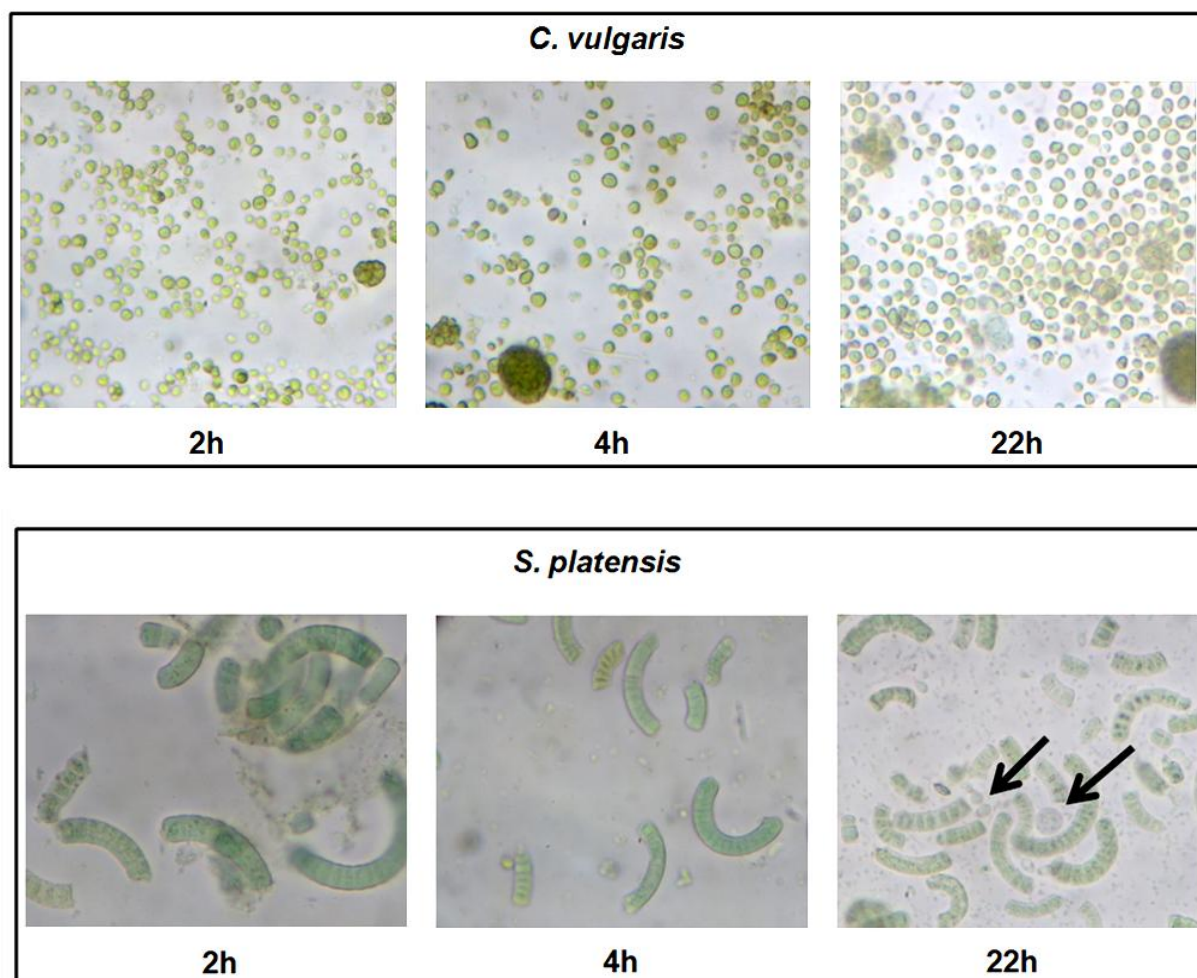


Figura 19 - Tratamento enzimático com hemicelulase e celulasas das biomassas comerciais

Nota: As setas indicam os protoplastos de *S. platensis*, mostrando a ocorrência de pequeno grau de hidrólise nesta microalga.

O pré-tratamento utilizando o detergente SDS foi escolhido em função de sua capacidade de solubilização de membranas celulares (lipídeos estruturais) bem como de proteínas e ácidos nucleicos. As Figuras 20 e 21 ilustram a eficiência deste detergente para a remoção destes componentes, bem como pigmentos como clorofilas (região de 400 nm) e ficobilinas (entre 600 e 700 nm).

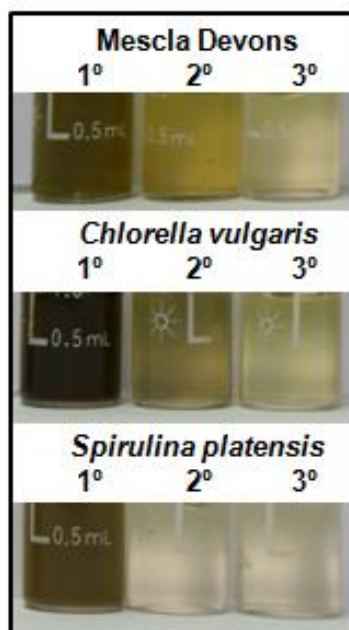


Figura 20 – Fotografia dos sobrenadantes das biomassas tratadas sequencialmente com SDS (três extrações)

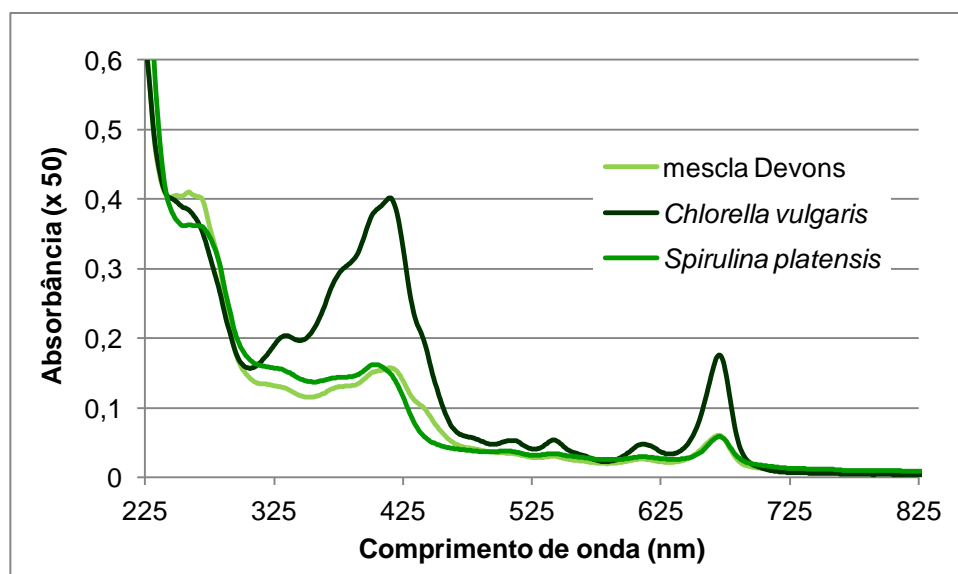


Figura 21 - Espectro de varredura em UV-Vis do primeiro sobrenadante do tratamento com SDS.

Nota: Todas as amostras foram diluídas 50 vezes.

Os sobrenadantes da centrifugação, lípidos, após convenientes diluições foram quantificados e os valores expressos em termos de proteínas conforme ilustrado na Figura 22. Nota-se que uma primeira extração (desde que a massa de detergente usado seja superior àquela de proteína a ser extraída) é de extrema

eficiência, pois removeu quantidade de proteína superior em relação as duas extrações subsequentes (entre 77 e 84 %), ou seja, 3,3 vezes para a mescla Devons, 3,8 para *C. Vulgaris* e de 6,4 para *S. platensis*.

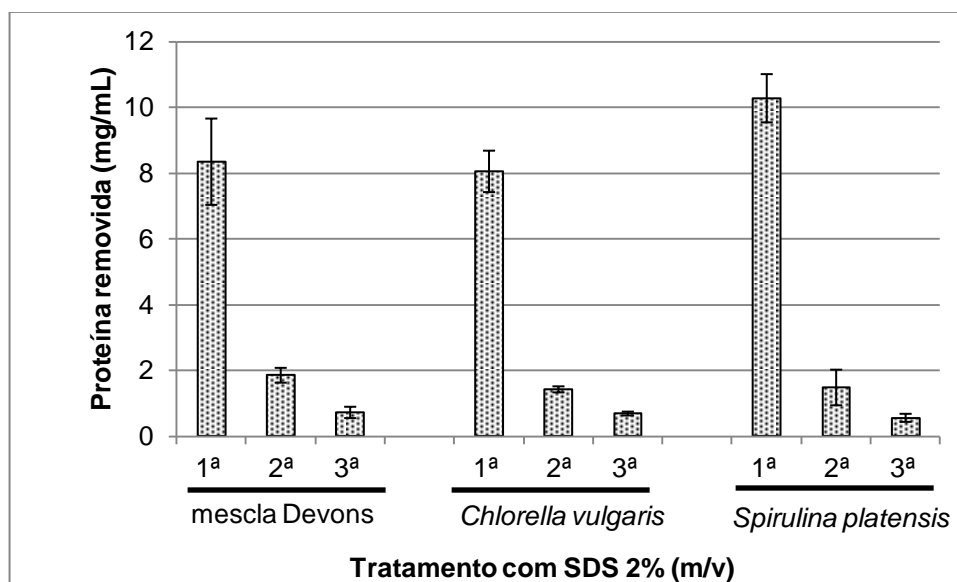


Figura 22 – Remoção de proteína pelo tratamento com SDS 2 % (m/v)

O material removido na primeira extração pode ser resgatado através de uma precipitação com cinco volumes de etanol, representando assim a fração polimérica, conforme pode ser visualizado na Figura 23.

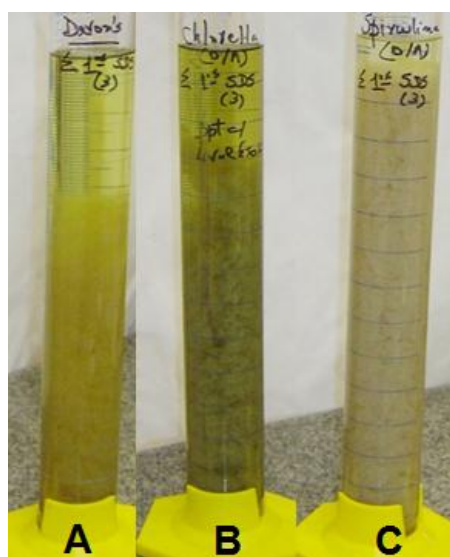


Figura 23 – Precipitação com etanol do sobrenadante da primeira extração com SDS. (A) Mescla Devons, (B) *C. vulgaris* e (C) *S. platensis*

Na Tabela 7 estão descritas as porcentagens de biomassa residual para os diferentes pré-tratamentos. Observa-se que a deslipidificação remove menor porcentagem de componentes (média total de 16 %) em comparação com o tratamento com SDS (média total de 47 %), uma vez que a extração com organossolventes (clorofórmio e metanol) é mais seletiva para a extração de lipídeos e possíveis glicolipídeos, além dos pigmentos. A extração com SDS remove proteínas e ácidos nucleicos, pois é um detergente aniônico que se liga às proteínas por interações hidrofóbicas, rompendo a maioria das ligações não covalentes, a uma razão de 1,4 g de SDS para cada g de proteína, aproximadamente uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos (DUNN, 1993), além de ser eficiente na solubilização de membranas biológicas (HELENIUS & SIMONS, 1975), que apresenta em sua estrutura carboidratos e lipídeos. Neste tratamento, observa-se que a remoção foi muito mais intensa em *S. platensis* em comparação com as duas microalgas comerciais, ou seja, entre 1,4 e 1,8 vezes mais eficiente. Este resultado está coerente com as quantidades de proteína presentes em cada microalga, sendo superior para *S. platensis*. Assim como no processo de precipitação com etanol, que recupera parte dos resíduos poliméricos removidos na extração com SDS, esta mesma microalga apresentou maior recuperação de biomassa em relação às outras duas.

Tabela 7 - Biomassa residual (%) após diferentes pré-tratamentos

Microalga	Biomassa residual (%)		
	Deslipidificação	Tratamento com SDS	Precipitação com etanol do sobrenadante do SDS
Mescla Devons	81,51 ± 0,62	55,33 ± 2,08	11,85
<i>Chlorella vulgaris</i>	80,86 ± 0,97	66,00 ± 3,61	15,81
<i>Spirulina platensis</i>	85,75 ± 0,63	37,00 ± 2,65	28,99

Nota: Como a precipitação com etanol foi realizada com a junção da triplicata da primeira extração com SDS não foi possível calcular o desvio padrão.

Inicialmente, os substratos - células nativas integrais (*in natura*), as mesmas após deslipidificação ou após tratamento com SDS e finalmente o resíduo polimérico (sobrenadante do SDS precipitado com etanol), foram submetidas a uma

desconstrução hidrolítica com TFA 2 mol.L⁻¹ durante 30 e 60 min a 100 °C, para avaliar os perfis dos desdobramento da massa polissacarídica. O TFA apesar de ser um ácido forte, é preservador dos açúcares livres liberados, pois causa menos danos aos monômeros liberados durante a hidrólise (GARNA *et al.*, 2006). As CCDs dos hidrolisados aparecem na Figura 24. Dentre as quatro amostras, a mescla Devons, possivelmente por conta da heterogeneidade de microalgas, apresentou o perfil hidrolítico com menor quantidade de açúcares, ou seja, apenas glucose e/ou galactose e menor incidência de oligossacarídeos cromatograficamente menos resolvidos. Perfis distintos e mais diferenciados foram marcas dos hidrolisados das outras duas microalgas: a) *S. platensis* aportou uma série homóloga de oligossacarídeos bem definida; b) *C. vulgaris* gerou majoritariamente glucose, sobretudo nas amostras *in natura* e deslipidificada. Na resolução cromatográfica, também pode ser percebida a presença de ramnose e xilose.

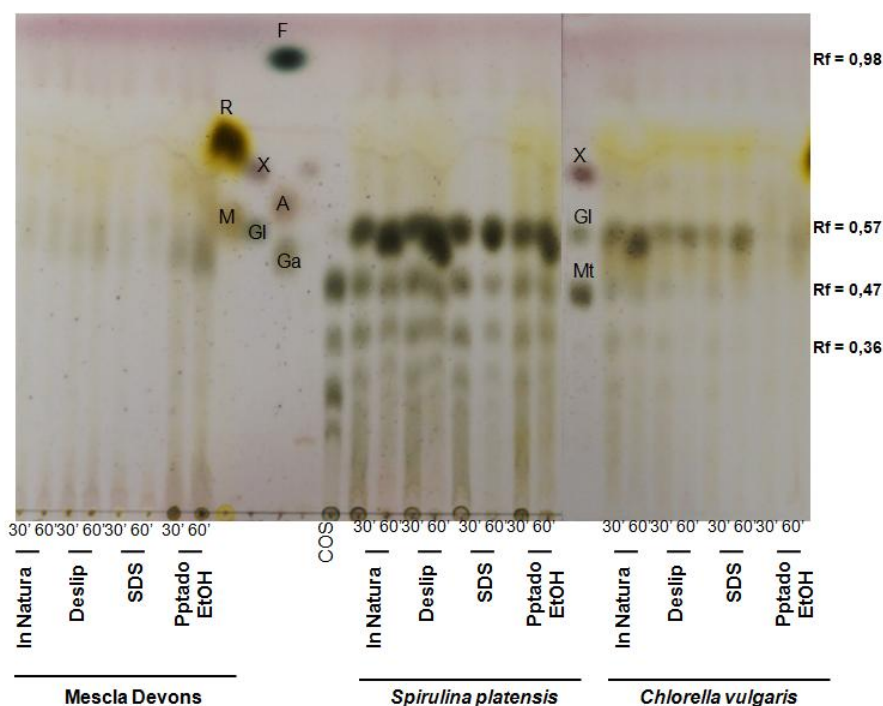


Figura 24 - Perfil das hidrólises com ácido trifluoroacético das biomassas com diferentes pré-tratamentos

Nota: Fase móvel: acetonitrila:isopropanol:água (15:3:5). Tempos de hidrólise: (30') 30 minutos, (60') 60 minutos; Padrões: **Rf = 0,57** - (Gl) glucose, **Rf = 0,47** - (Mt) maltose, **Rf = 0,36** - (Mtt) maltotriose, (R) ramnose, (M) manose, (X) xilose, (A) arabinose (Ga) galactose, (COS) celo-oligossacarídeos, **Rf = 0,98** - (F) furfural.

O experimento subjacente foi a comparação entre a eficiência de um pré-tratamento ácido moderado (fosfórico) efetuado tanto na biomassa integral nativa comparativamente com os outros tratamentos preliminares nestas mesmas biomassas (e.g., deslipidificação e conversão a paredes celulares purificadas, neste caso, como resíduo das sequenciais extrações com o detergente SDS).

OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ATRAVÉS DE HIDRÓLISE FOSFÓRICA

Hidrólise comparativa das biomassas com diferentes pré-tratamentos

Com foco na produção de oligossacarídeos prebióticos os mesmos tipos de amostras utilizadas na hidrólise anterior com TFA (células integrais *in natura*, deslipidificadas, paredes residuais do tratamento com SDS e resíduo polimérico) foram hidrolisadas com ácido fosfórico termopressurizado a 4,5 atm variando-se o pH efetivo de hidrólise, ou seja amostras previamente equilibradas / tituladas até cada pH exatamente desejado.

Na Figura 25 podem ser observadas as diferenças da quantidade de ácido fosfórico necessário para obtenção do efetivo pH 2,0 nas biomassas com os diferentes pré-tratamentos, sendo que todas as amostras apresentaram valores superiores quando comparados com a água, ou seja, de 4,8 a 25 vezes maior, indicando que a composição das biomassas interfere na capacidade acidificadora da solução (efeito tamponante da fração proteica, majoritária em qualquer microalga). As biomassas deslipidificadas foram as que apresentaram maiores valores de ácido necessário quando as microalgas são comparadas entre si. De modo geral, a mescla Devons necessitou de maior quantidade de ácido, sobretudo para as biomassas deslipidificada e tratada com SDS, que necessitaram de 594,40 e 557,25 mmol.L⁻¹ respectivamente. Estes resultados indicam que aqueles possíveis compostos que mais interferem na capacidade de acidificação fosfórica estão predominantemente concentrados nestas duas amostras, uma vez que a comparação está normalizada para a mesma proporção de biomassa: ácido fosfórico (0,1:1 m:v).

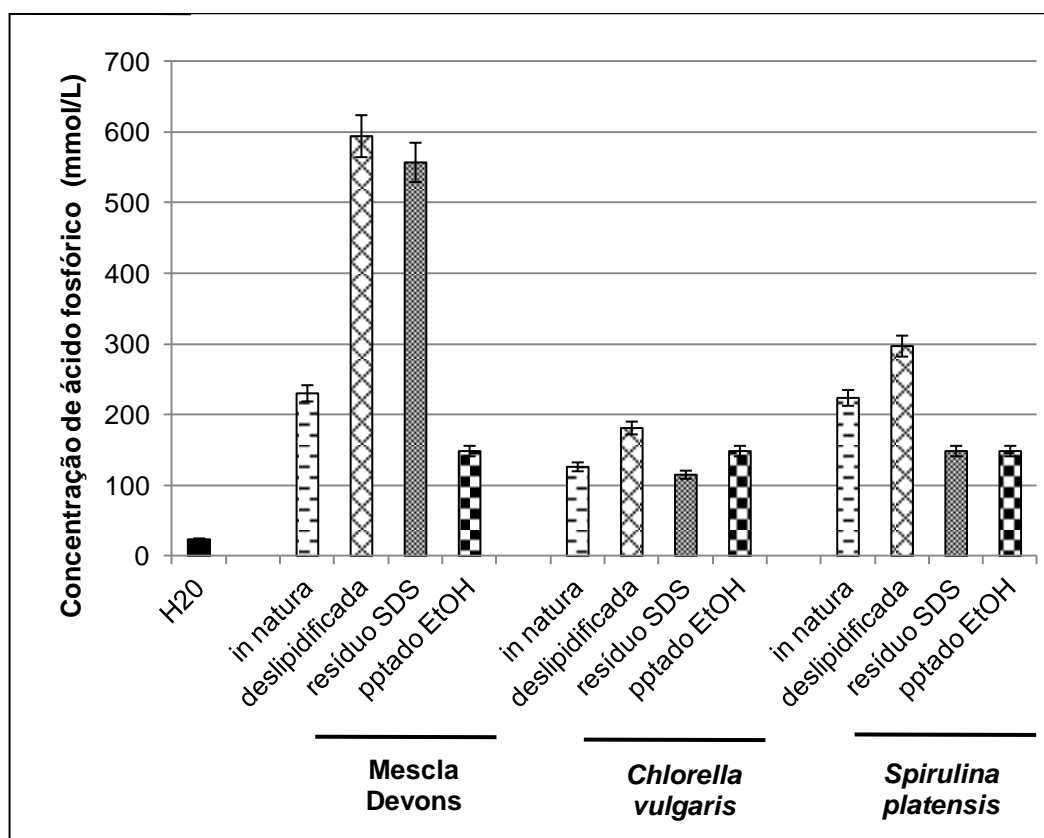


Figura 25 - Concentração de ácido fosfórico necessário para obter efetivamente o pH de 2 para as diferentes microalgas e pré-tratamentos das biomassas

Nota: Barra de erros de 5% para todas as amostras

Na Figura 26 estão representados os pHs antes e após a hidrólise a 4,5 atm dos diferentes pré-tratamentos das biomassas. A solvólise reduziu o pH de todas as amostras, indicando que o tratamento com água quente e pressurizada (4,5 atm = 156 °C), altera a estrutura das biomassas e consequentemente dos componentes que contribuem para os valores de pH. Esta é uma situação constante quando se solvolyza materiais L(h)Cs (e.g. bagaço de cana), pois ocorre liberação de ácido acético livre, a partir dos grupos acetil termolábeis originalmente ligados a algumas hidroxilas, que catalisa a hidrólise da hemicelulose e sua solubilização em água, embora apenas 5 % da hemicelulose passa a atuar como catalisador ácido (GOMES, 1985). No caso das microalgas também ocorreu abaixamento do pH inicial como consequência da simples termopressurização ou mesmo devido a composição heterogênea da biomassa que contem parede celular e carboidratos de reserva. A redução foi mais significativa para as biomassas deslipidificadas da mescla Devons

e *S. platensis*, ou seja, redução de 1,45 e 1,43 unidades de pH, respectivamente. Para as amostras do precipitado com etanol (amostra proveniente do sobrenadante do tratamento com SDS), a redução foi mais relevante nas amostras de *C. vulgaris* e *S. platensis*, com valores de 1,41 e 1,25, respectivamente. Porém, para as amostras *in natura*, esta alteração foi menos significativa, pois variou de 0,28 a 0,49 unidades de pH.

Já para as hidrólises com ácido fosfórico a pH 2, de maneira geral houve aumento no pH, sobretudo nas amostras dos precipitados com etanol (0,83 a 0,92 unidades de pH) e com exceção das amostras deslipidificada e tratada com SDS da mescla Devons, onde a redução foi de 0,24 e 0,37 unidades de pH. Isto pode ser explicado pelo fato que foram as duas amostras que necessitaram de maiores quantidades de ácido fosfórico para o pH efetivo de 2 (> 550 mmol/L), sugerindo que os compostos que estavam contribuindo para a resistência da acidificação foram provavelmente hidrolisados nestas amostras, portanto, deixando o ácido fosfórico mais efetivo para a acidificação. Como este aumento de pH (medido na pós-hidrólise) foi generalizado, parte da carga de H_3PO_4 pode ter sido neutralizada pelo único componente com capacidade tamponante na biomassa integral de microalgas, qual seja a fração dominante proteica. Este efeito menos notável, quando se compara com o diferencial visto nas paredes celulares purificadas via SDS, confirma esta explicação.

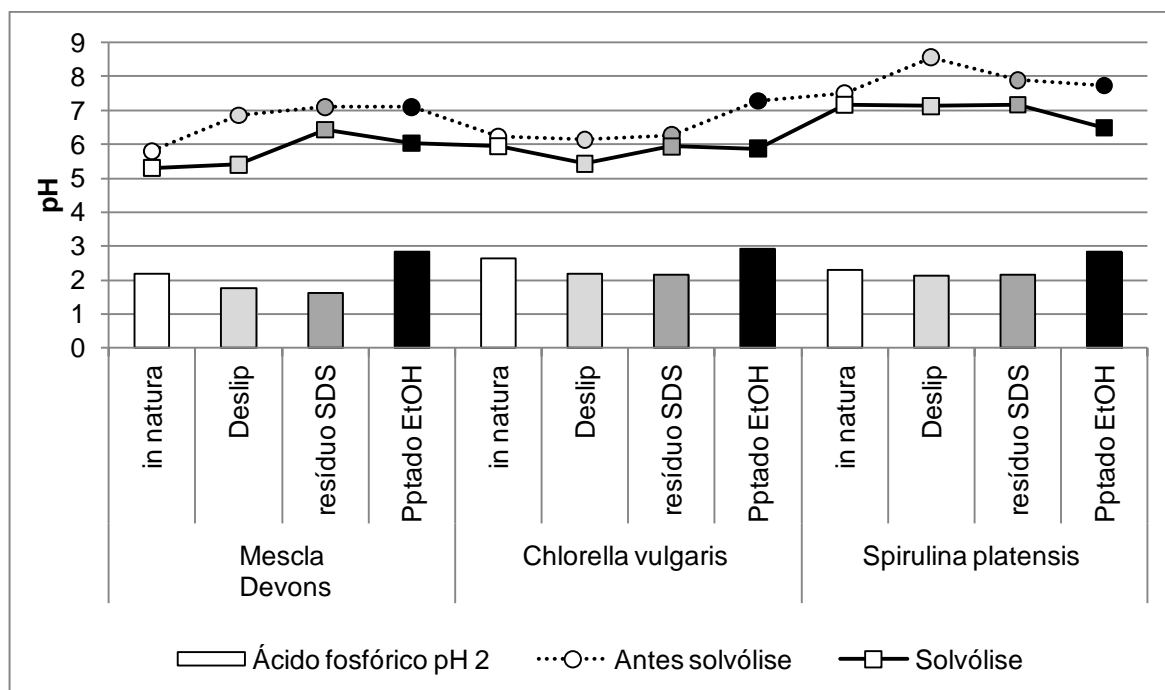


Figura 26 – pH antes e após hidrólise em termorreator a 4,5 atm dos diferentes pré-tratamentos das biomassas

A Figura 27 mostra o perfil de açúcares totais e redutores para os hidrolisados das biomassas provenientes de diferentes tratamentos a 4,5 atm. A mescla Devons apresentou maiores hidrólises de carboidratos nas amostras com ácido fosfórico (pH 2), tanto na biomassa *in natura*, quanto no precipitado com etanol.

A microalga *C. vulgaris* apresentou valores maiores e muito similares de hidrólise para as biomassas tratadas com SDS, deslipidificada e quando comparadas com a biomassa precipitada com etanol. Contrariamente, *S. platensis* apresentou os maiores valores de hidrólise para o precipitado com etanol em comparação com os outros tratamentos.

Os teores de carboidratos (carboidratos totais >> carboidratos redutores) sugerem que a pressão solvolítica pode estar removendo alguma forma de carboidrato polimérico mais hidrossolúvel ainda em sua forma integral, como amido, amilopectina e glicogênio, três ocorrências que ocorrerem em microalgas quando a relação carbono/nitrogênio é muito elevada no ambiente de cultivo, e tais polímeros são biossintetizados intracelularmente, restando a eficiência de processo secretório dos mesmos ser controlada por outros fatores (CHAKRABORTYL, 2012). Além disso, pode ocorrer a remoção do polissacarídeo β -1,3 glucana presente nas microalgas.

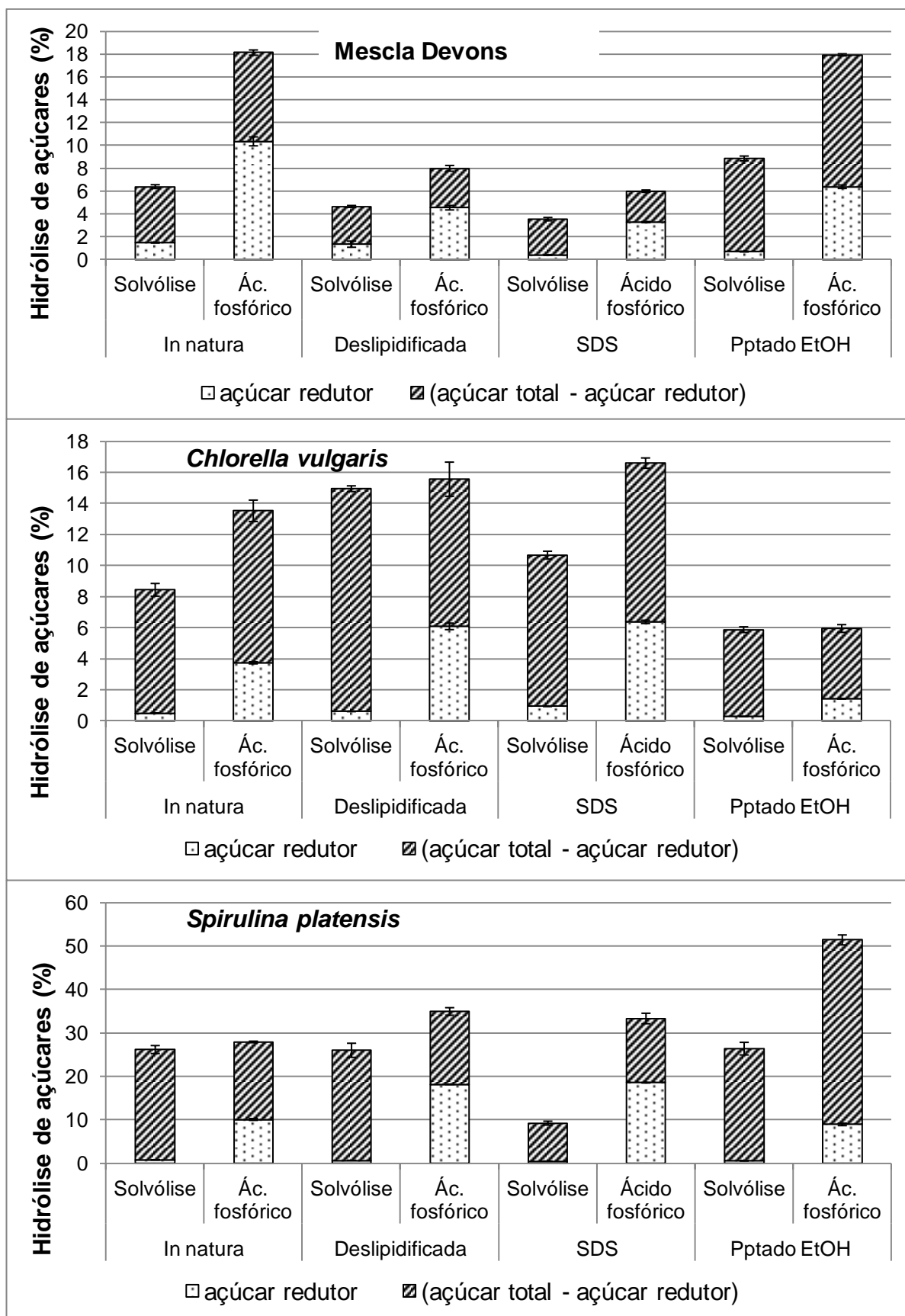


Figura 27—Porcentagem de açúcares totais e redutores dos hidrolisados das biomassas com diferentes pré-tratamentos

A Figura 28 exibe os resultados analisados por CCD obtidos e a Figura 29 a densitometria da placa. Mescla Devons e *C. vulgaris* apresentaram perfis similares, embora mescla Devons com menos componentes de hidrólise. Foi identificada, majoritariamente, a presença de glucose, seguida de ramnose, e em menores proporções xilose, galactose e arabinose, os mais comumente encontrados no gênero *Chlorella* (BEILKE, 2012). *S. platensis* também apresentou perfil com valores mais altos de glucose, e em menores proporções de ramnose, manose, xilose e galactose, como descrito por outros autores (SANCHEZ *et al.*, 2003; HENRIKSON, 2009). *S. platensis* exibiu perfis mais diferenciados em termos tanto qualitativos quanto semi-quantitativos.

Portanto, não se fazem necessários quaisquer pré-tratamentos (deslipidificação ou desproteíntização) para que as hidrólises levem ao resultado esperado. Isto aponta, então, para um fator de economicidade significativo, já que a massa residual (não hidrolizada e/ou não solubilizada), pode se prestar a outros fins biotecnológicos (e.g., formulação de rações animais mais digeríveis) ou mesmo o produto global obtido (hidrolizado + biomassa residual) ser utilizado em conjunto em formulações alimentícias.

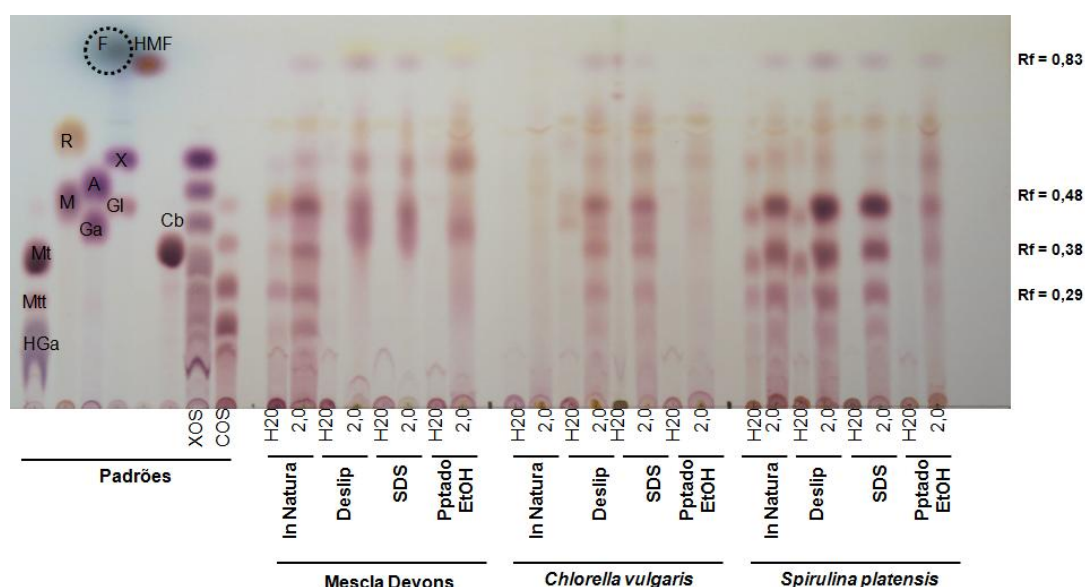


Figura 28–Perfil cromatográfico comparativo entre os hidrolisados de biomassa com diferentes pré-tratamentos.

Nota: Fase móvel: acetonitrila:isopropanol:água (15:3:5); Revelador: orcinol sulfúrico; Padrões: (HGa) ácido galacturônico, (Mtt) maltose, (Mt) maltotriose, (R) ramnose, (M) manose, (A) arabinose, (Ga) galactose, (X) xilose, **Rf = 0,48** - (Gl) glucose, **Rf = 0,38** - (Cb) celobiose, **Rf = 0,29** - celotriose, (XOS) xilo-oligossacarídeos, (COS) celo-oligossacarídeos, (F) furfural, **Rf = 0,83** - (HMF) hidroximetilfurfural.

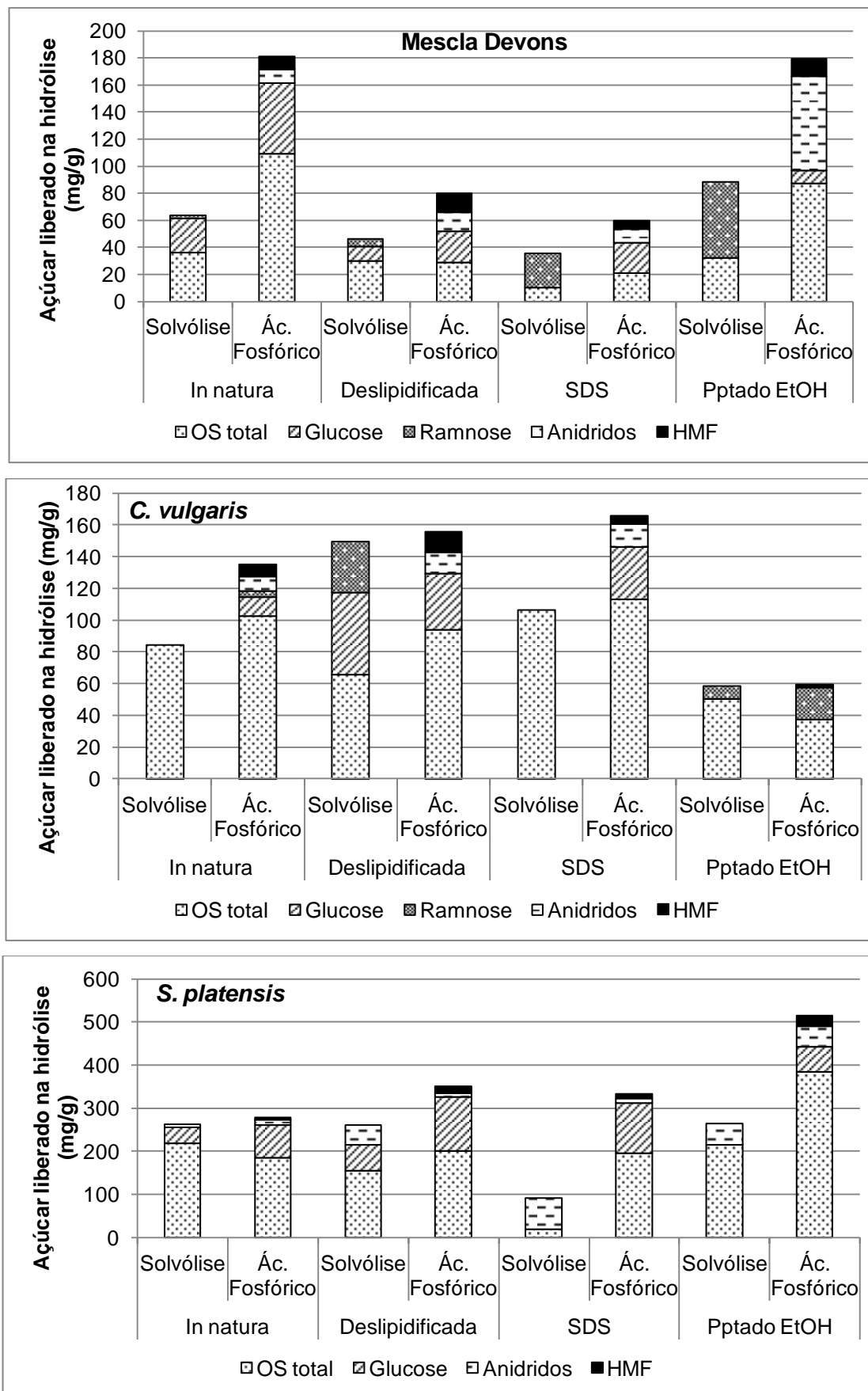


Figura 29 - Perfil dos açúcares liberados na hidrólise com as biomassas pré-tratadas

Como os cromatogramas em camada delgada para os açúcares redutores simples e oligossacarídeos antes ilustrados mostram claramente que a hidrólise fosfórica otimizada pode levar a hidrolisados enriquecidos em oligossacarídeos, estes potencialmente são aptos a atuar como prebióticos nutracêuticos.

Na Figura 30 estão mostrados os resultados do experimento enzimático para análise da origem dos açúcares das microalgas, que indicaram que a enzima α -amilase não se mostrou ativa frente aos hidrolisados fosfóricos de microalgas. Já a combinação das enzimas β -1,3 glucanases (endo e exo) desdobrou os oligossacarídeos em monossacarídeo (glucose), sugerindo que grande parcela dos oligossacarídeos da mescla Devons, *C. vulgaris* e *S. platensis* são proveniente de laminarina (β -1,3 glucana, podendo ser também β -1,6).

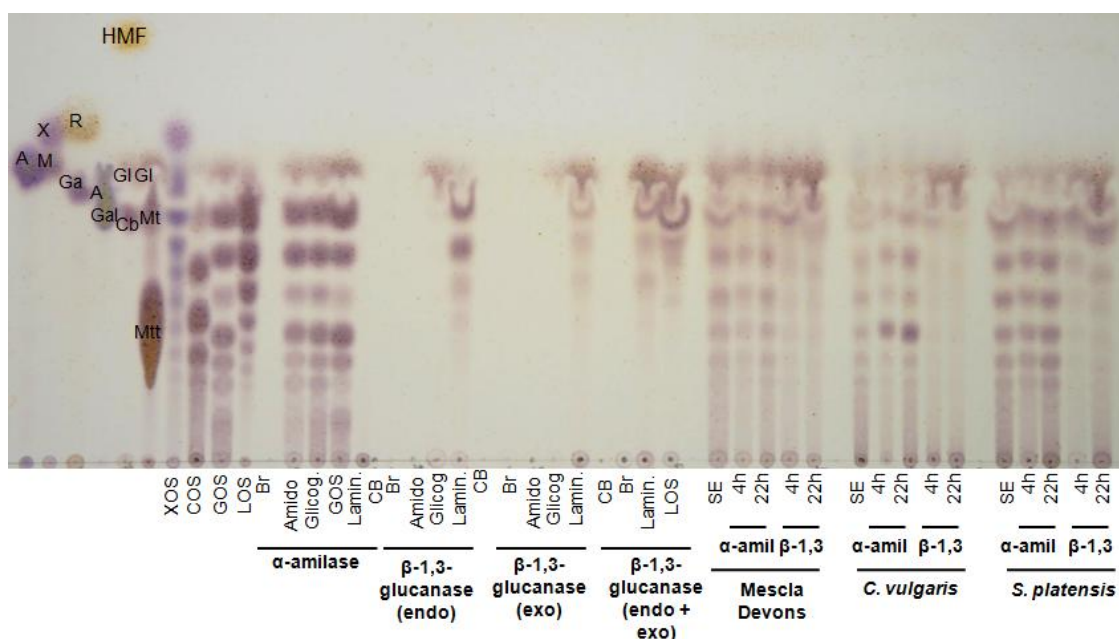


Figura 30 - Perfil em cromatografia em camada delgada do teste enzimático com os hidrolisados fosfóricos das biomassas *in natura*

Nota: Fase móvel: acetato de etila:ácido acético:água (2:2:1). Revelador: orcinol sulfúrico. (GI) glucose, (Mt) maltose, (Mtt) maltotriose; (R) ramnose, (A) arabinose, (Gal) galactose, (X) xilose, (R) ramnose, (COS) celo-oligossacarídeos, (XOS) xilo-oligossacarídeos (GOS) oligossacarídeos de glicogênio e (LOS) lamino-oligossacarídeos.

Na Figura 31 estão indicados os perfis das massas residuais e o teor de proteína presente nas biomassas não hidrolisadas. Foram calculadas as relações de perda de biomassa e de proteína em relação à biomassa sem nenhum pré-tratamento (*in natura*).

O tratamento de deslipidificação foi o que retirou a menor quantidade de proteína das biomassas em todas as amostras, visto que os solventes orgânicos são menos eficientes neste processo, sendo que esta relação em comparação com os controles foi de 1,8 para mescla Devons, 1,02 para *C. vulgaris* e 1,9 vezes para *S. platensis*. Comparando com a solvólise com a hidrólise ácida, Já nos tratamento com SDS e precipitado com etanol, as perdas de proteína na biomassa foram os mais elevados, visto que o SDS é um removedor de proteínas e ácidos nucleicos. Comparando os controles da biomassa tratada com SDS, a perda de proteína foi de 4,6, 1,5 e 6,2 vezes para mescla Devons, *C. vulgaris* e *S. platensis*, respectivamente.

Para todas as microalgas o maior valor encontrado foi nas amostras *in natura*, por não sofrerem interferência de nenhum tratamento inicial à hidrólise, e as perdas de proteína foram maiores para *S. platensis*, uma vez que é a microalga com maior teor inicial de proteína. Além disso, nota-se que a hidrólise ácida foi mais eficiente na remoção de proteínas das biomassas residuais, quando comparadas com a solvólise, isto indica sua maior capacidade desconstrutora dos constituintes das biomassas em comparação com as solvólises. Embora isso ocorra, nota-se que mesmo depois de hidrolisadas, as biomassas não perdem todas as suas propriedades, pois possuem em sua composição teores de proteínas, as quais podem ser aproveitadas para outros fins.

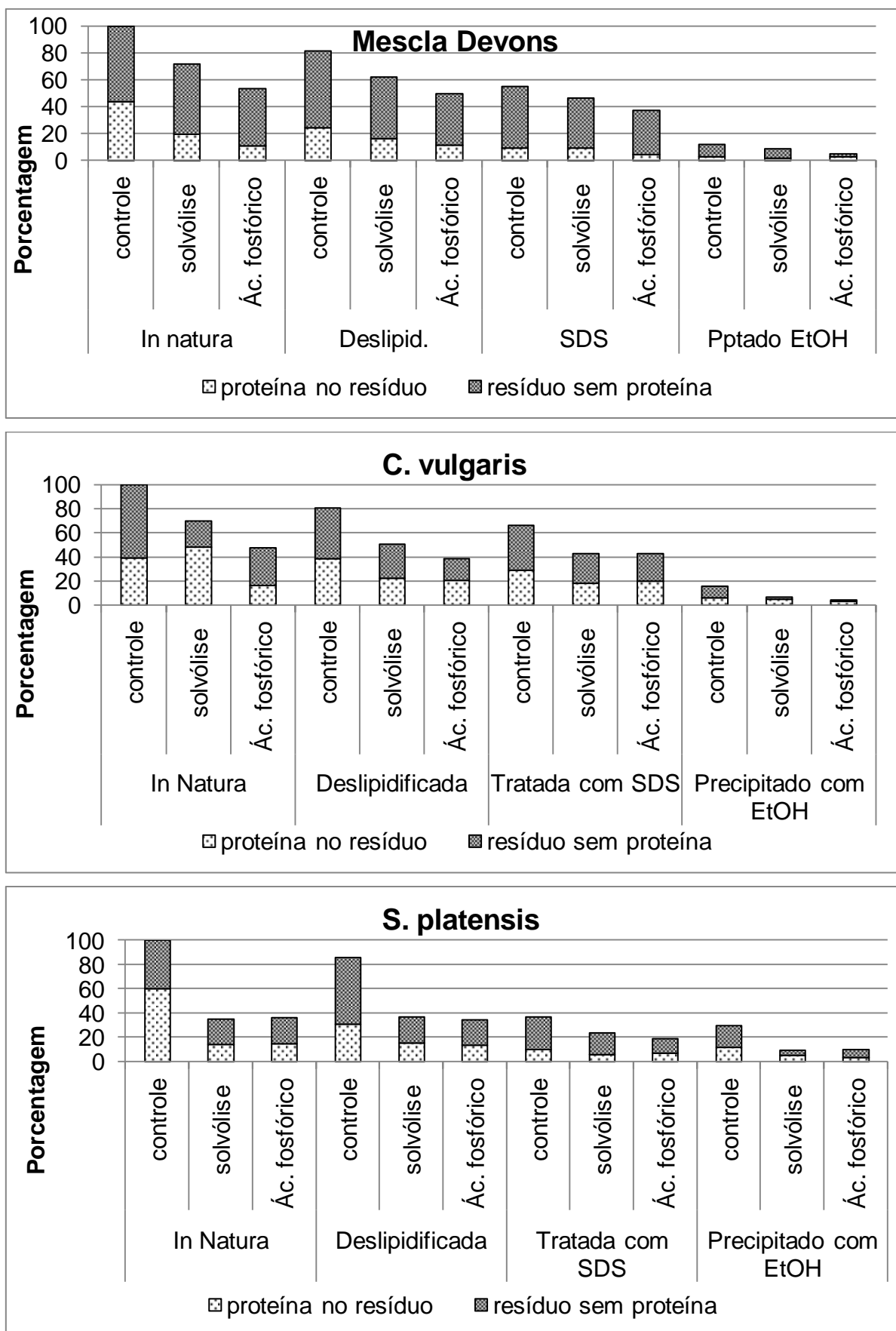


Figura 31 - Porcentagem de proteína nas biomassas residuais na hidrólise comparativa

Hidrólise das biomassas *in natura* através de planejamento fatorial

Pode-se observar através da Figura 32, o gradiente de coloração de límpido para escuro, à medida que aumenta a drasticidade do pH e da pressão atmosférica, exceto nos controles realizados com água para a microalga *S. platensis*, que apresentou coloração escura, havendo grande liberação de pigmentos em meio aquoso, uma vez que em meio contendo ácido fosfórico, a solução voltou a apresentar coloração límpida, mostrando seu poder de destruição do pigmento.

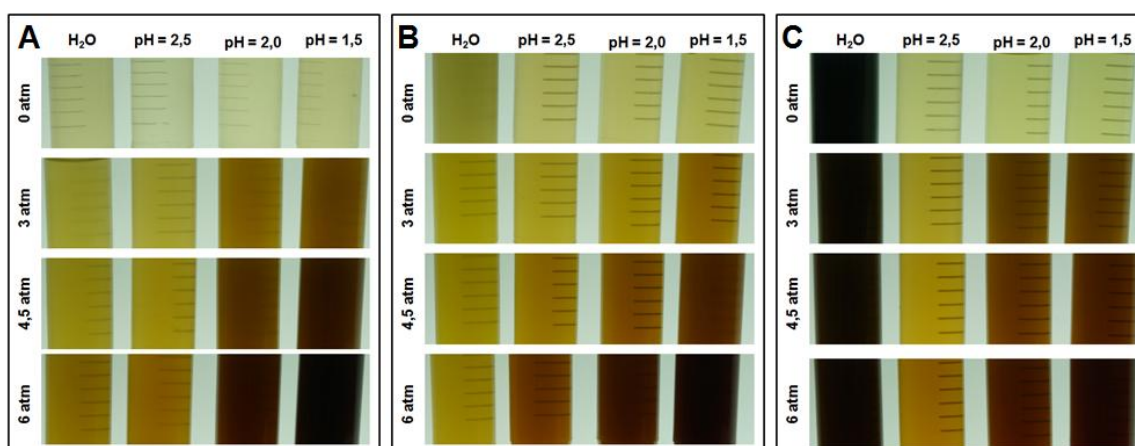


Figura 32 - Aspecto geral dos sobrenadantes dos hidrolisados de microalgas. (A) Mescla Devons; (B) *Chlorella vulgaris*; (C) *Spirulina platensis*.

Na Figura 33 está mostrada a variação do pH após as hidrólises nas amostras das biomassas *in natura* do planejamento fatorial. A solvólise mostrou redução do valor de pH em todas as condições de pressão atmosférica para as três biomassas, exceto na amostra de *S. platensis* que mostrou um aumento de pH em 3 atm. Já para os hidrolisados com ácido fosfórico, houve uma tendência de aumento das unidades de pH.

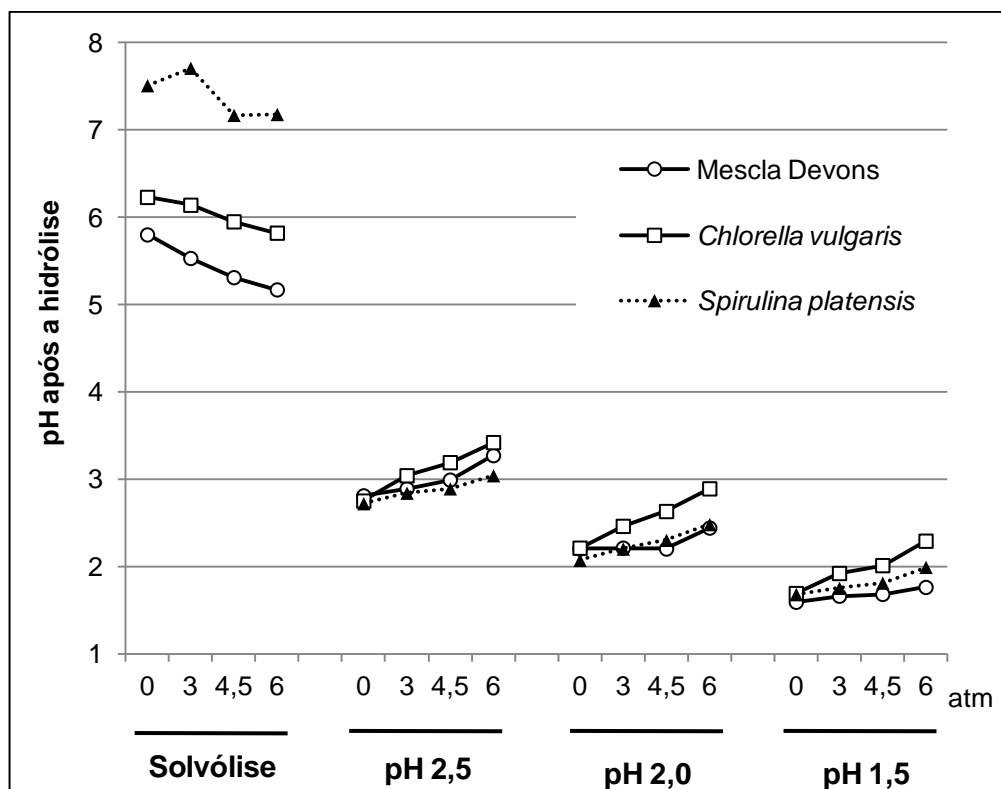


Figura 33 - pH após hidrólise das biomassas em termo-reator das amostras do planejamento fatorial

Na Figura 34 está mostrado o perfil de hidrólise dos carboidratos para as biomassas *in natura* do planejamento fatorial. Foi possível observar que todos os perfis analisados foram coerentes, uma vez que o percentual de açúcares totais foi sempre superior ao de redutores. Observa-se que as amostras controle, ou seja, sem a hidrólise em termo-reator, a porcentagem de açúcares liberados de maneira geral foi abaixo de 5 %, exceto para a amostra de *S. platensis* preparada apenas com água. Esta mesma amostra foi a que apresentou coloração mais escura conforme ilustrado anteriormente, o que pode ter interferido nas medições de açúcares, sobretudo no fenol sulfúrico. Esta mesma possível interferência de coloração das amostras preparadas com água da biomassa de *S. platensis*, pode ter ocorrido nas amostras termopressurizadas.

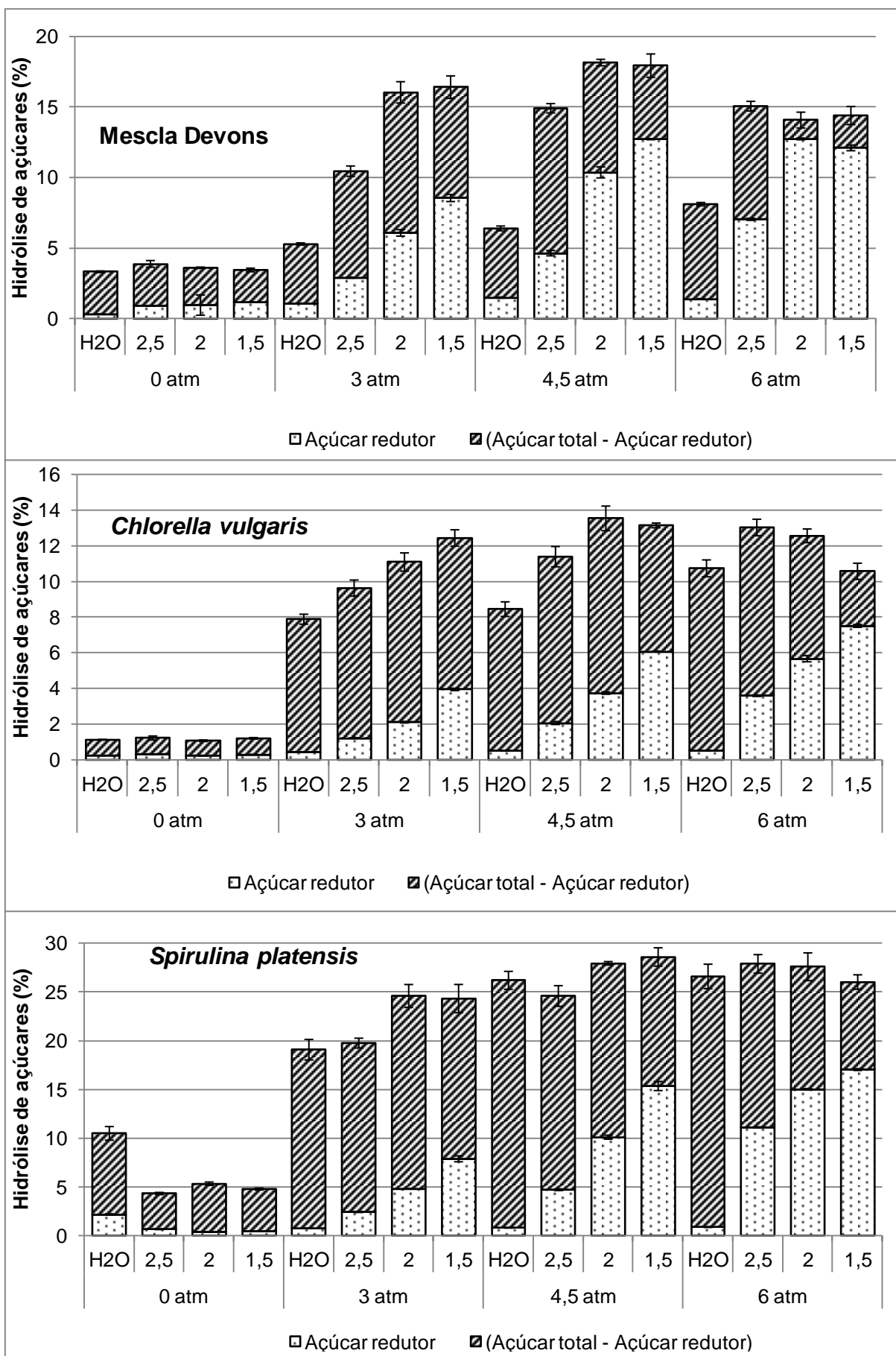


Figura 34 - Perfil de açúcares totais e redutores do planejamento fatorial

Também é possível visualizar que as hidrólises com a biomassa *in natura* de *S. platensis* foram superiores as demais, alcançando valores de até 28,58 % de hidrólise total, enquanto que para a mescla Devons e *C. vulgaris* estes valores máximos foram de 18,15 e 13,53 %, respectivamente. Além disso, com o aumento da pressão atmosférica, percebe-se que ocorre um leve declínio na porcentagem de açúcares totais, porém há um aumento no teor de açúcares redutores, indicando que nas condições mais drásticas de pressão e pH, ocorre uma diminuição do grau de polimerização dos carboidratos, uma vez que o método de DNS, mensura apenas a unidade redutora da molécula, ou seja, para o mesmo tipo de polissacarídeo, quanto maior for o seu grau de polimerização, menor será a mensuração de açúcares redutores e vice-versa.

Para obter um perfil de hidrólise dos carboidratos mais visual, foram realizadas análises de CCD, conforme Figura 35. É possível observar que ocorreu a formação de oligossacarídeos em todas as microalgas, que puderam ser observados nas placas com GP (Grau de Polimerização) de até cinco unidades. Porém, com o aumento da drasticidade (pH e pressão atmosférica), ocorre a liberação de açúcares livres majoritariamente na forma de glucose, bem como produtos de degradação como anidridros e HMF. Sobretudo nas amostras da solvólise da mescla Devons e *C. vulgaris*, foi possível perceber a presença de ramnose (açúcar livre).

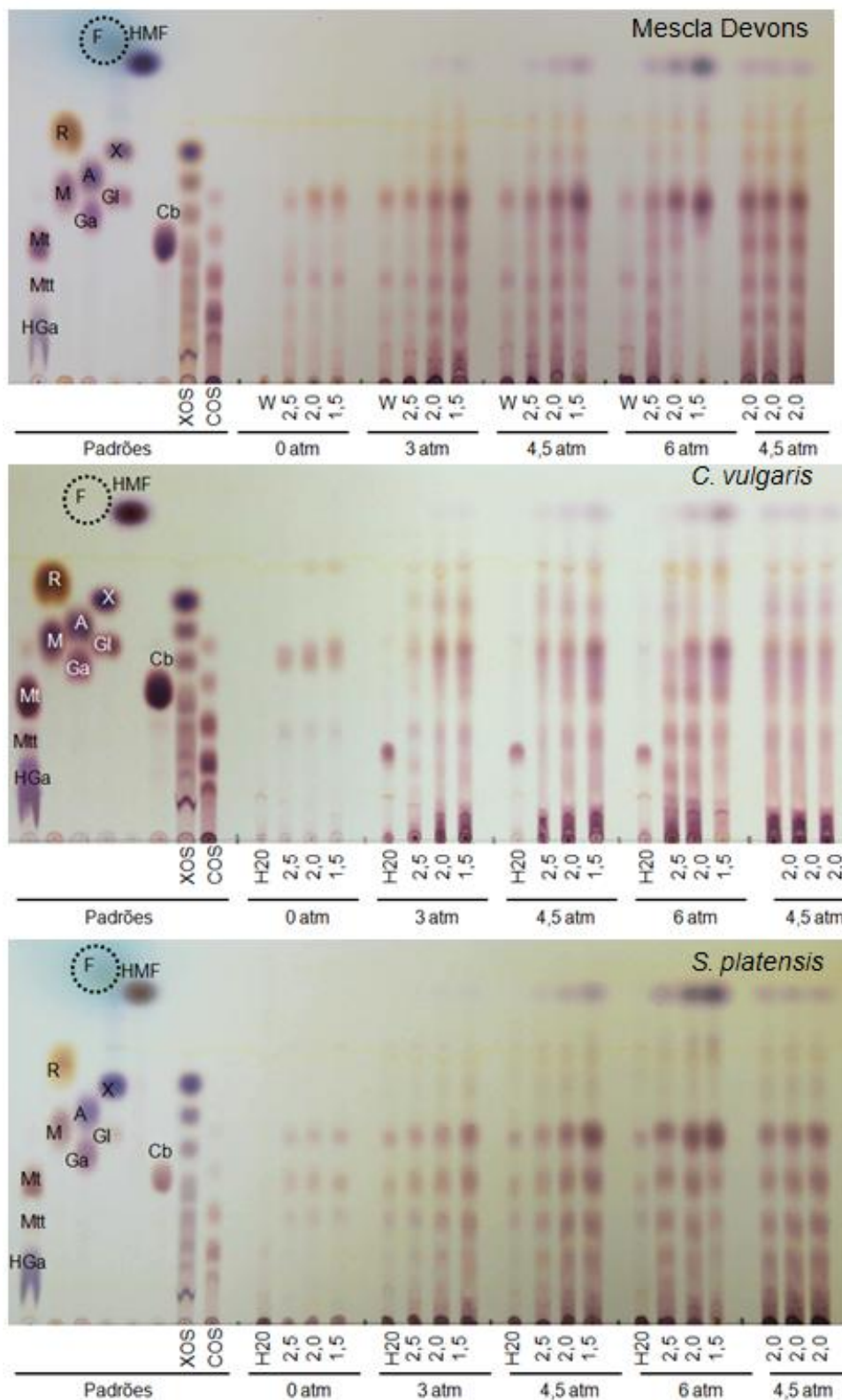


Figura 35 - CCD dos hidrolizados com ácido fosfórico das diferentes microalgas.

Nota: Fase móvel: acetoneitrila:isopropanol:água (15:3:5); Revelador: orcinol sulfúrico; Padrões: (HGa) ácido galacturônico, (Mt) maltose, (Mtt) Maltotriose, (R) ramnose, (M) manose, (A) arabinose, (Ga) galactose, (X) xilose, (Gl) glucose, (Cb) celobiose, (XOS) xilo-oligosacarídeos, (COS) celo-oligosacarídeos, (F) furfural, (HMF) hidroximetilfurfural.

Com o intuito de fazer uma análise semi-quantitativa dos resultados obtidos nas CCD_s foram realizadas densitometrias das amostras, utilizando um programa computacional capaz de traduzir a intensidade das manchas e suas áreas relativas em um perfil gráfico, permitindo então mensurar a proporção de cada componente, relacionando-os com os valores de açúcar total, expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, obtidos pelo fenol-sulfúrico. Estes resultados estão expressos na Figura 36, onde foi possível confirmar a presença de glucose livre e a formação dos produtos de degradação nas condições mais drásticas de hidrólise, como o hidroximetilfurfural, produto da desidratação de hexoses.

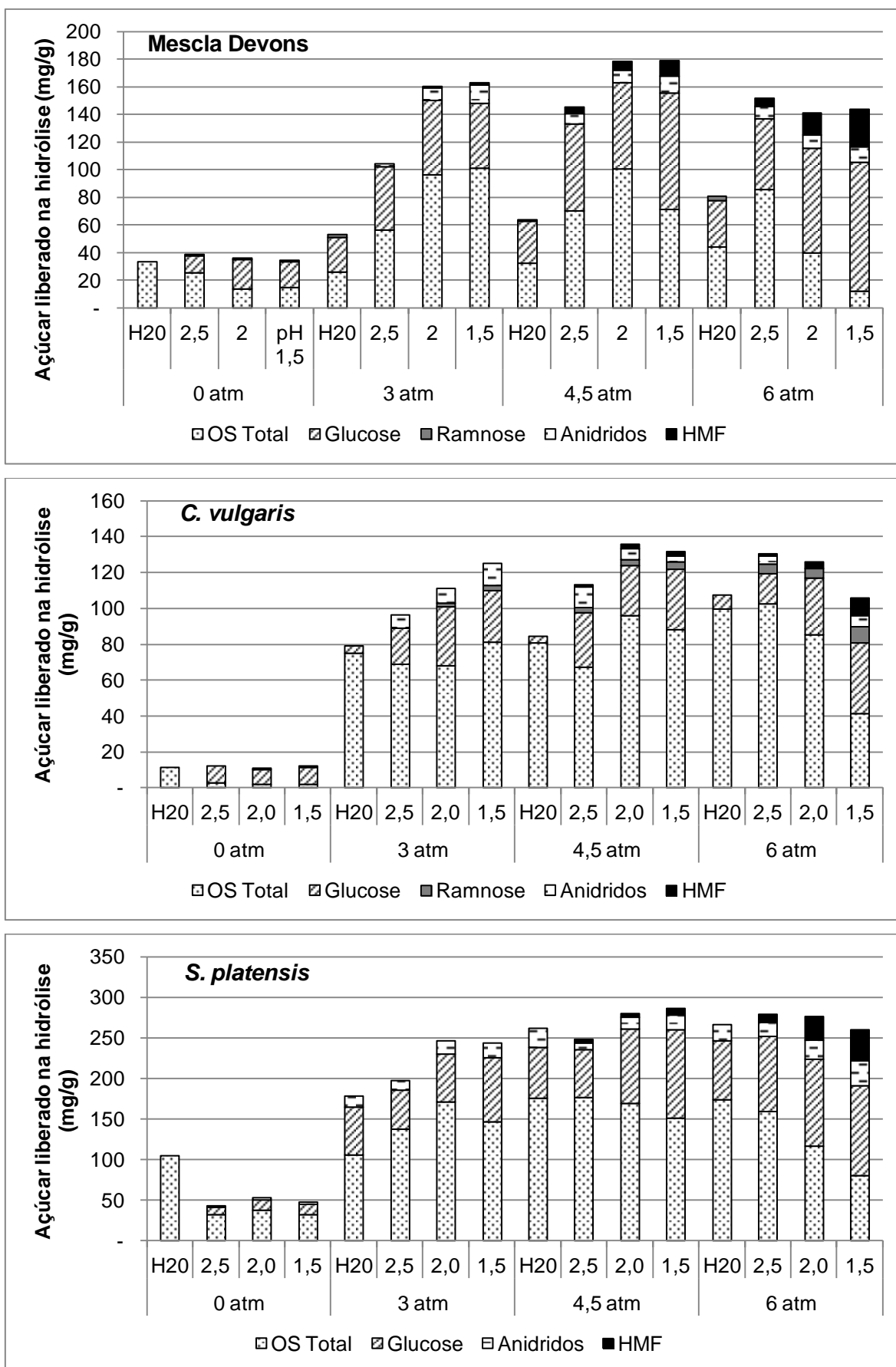


Figura 36 - Perfil dos açúcares liberados na hidrólise das biomassas *in natura*

A análise estatística do planejamento fatorial para a resposta produção de oligossacarídeos (mg.g^{-1}) mostrou que a mescla Devons foi ajustada em modelo misto (linear + quadrático) para todas as microalgas com coeficiente de determinação acima de 0,93 (R^2 e R-ajustado), conforme mostrado na Tabela 8.

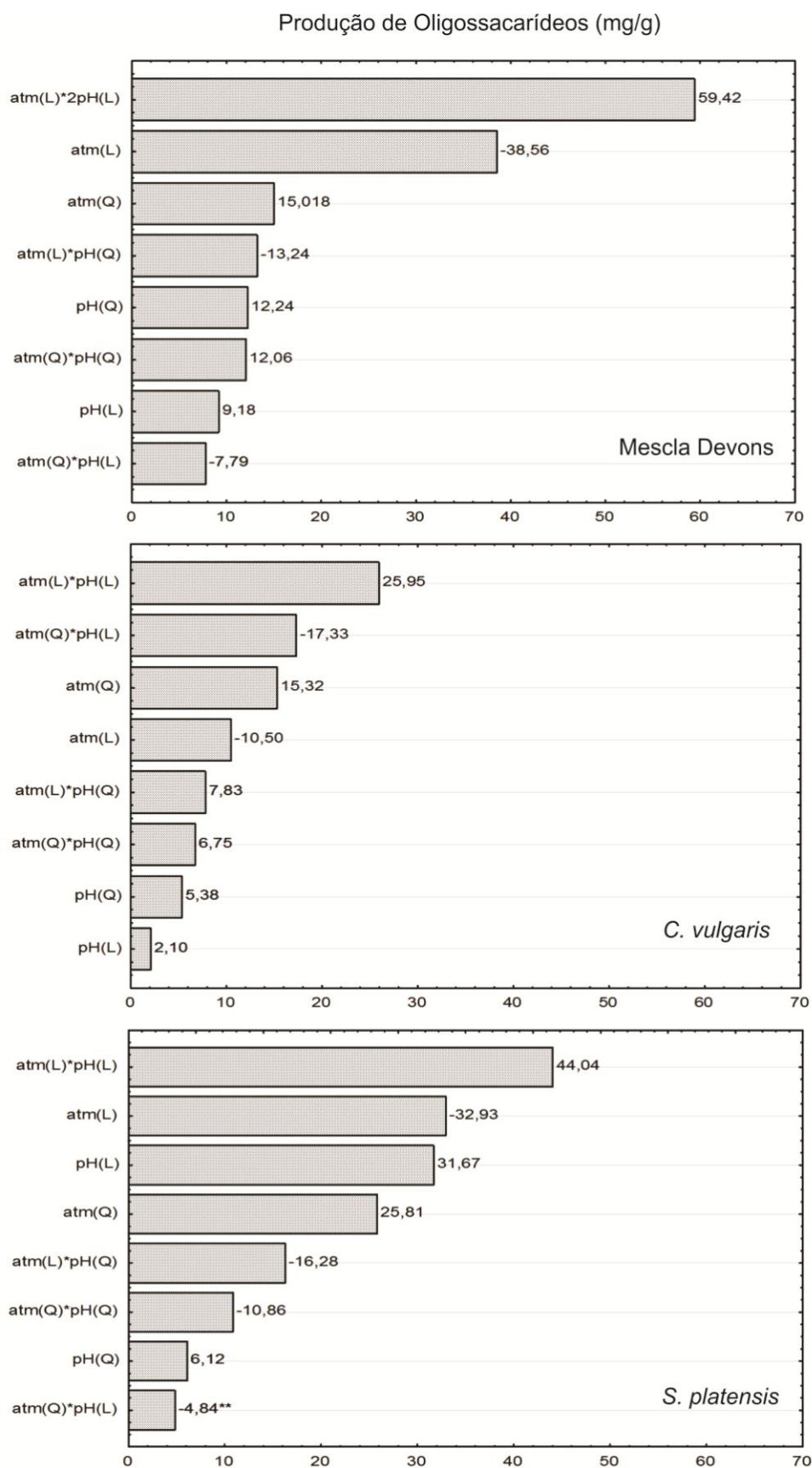
Tanto a ANOVA, quanto os efeitos, se mostraram significativos para a resposta produção de oligossacarídeos, com $p < 0,05$ em primeira e segunda ordem, exceto entre a interação quadrática da pressão atmosférica com a interação linear do pH para *S. platensis*.

Tabela 8 - Parâmetros obtidos estatisticamente para as respostas produção e pureza de oligossacarídeos

Microalga	Produção de oligossacarídeos (mg.g^{-1})			Pureza de oligossacarídeos (%)		
	Modelo	R^2	R-ajustado	Modelo	R^2	R-ajustado
Mescla Devons	Misto	0,9958	0,9944	Linear	0,8715	0,8582
<i>Chlorella vulgaris</i>	Misto	0,9860	0,9814	Misto	0,9798	0,9731
<i>Spirulina platensis</i>	Misto	0,9515	0,9353	Linear	0,9019	0,8918

A análise dos efeitos mostrou que a interação de segunda ordem entre as variáveis lineares de pH e pressão atmosférica foi a mais significativa para todas as microalgas, conforme mostrado na Figura 37. Esta interação significa que ao passar do nível (-) para o (+), ou seja, do pH 1,5 para 2,5 e de 3 para 6 atm, as respostas aumentam na ordem de 59,42, 25,95 e 44,04 mg.g^{-1} respectivamente para a mescla Devons, *C. vulgaris* e *S. platensis*. Analisando a variável pressão (atm) verifica-se que quanto mais severa, tende-se a reduzir a respostas para todas as microalgas, ou seja, ocorre maior formação de açúcares livres e produtos de degradação (HMF e anidridos). Já para a análise da variável linear de pH, observa-se que para a mescla Devons e *S. platensis*, houve aumento na produção de oligossacarídeos na ordem de 9,18 e 31,67 mg.g^{-1} , respectivamente, quando o pH variou de 1,5 para 2,5.

Com relação a análise estatística para a resposta pureza de oligossacarídeos (%) mostrou que mescla Devons e *S. platensis* se ajustaram em modelo linear, enquanto *C. vulgaris* ajustou-se em modelo misto, conforme mostrado na Tabela 8. Os coeficientes de determinação para esta resposta foram acima de 0,85 (R^2 e R-ajustado).



Estimativa de Efeitos

Figura 37 - Gráficos de Pareto para a resposta produção de oligossacarídeos (mg.g⁻¹)
 Nota: ** efeito não significativo

A análise dos efeitos para a resposta pureza de oligossacarídeos mostrou que a interação secundária (segunda ordem) entre as variáveis lineares de pressão atmosférica e pH foi a mais significativa para a mescla Devons e *C. vulgaris*, mostrando que ao passar do nível (-) para o (+), ou seja, de 3 para 6 atm e do pH 1,5 para 2,5, as purezas aumentam na ordem de 28,38 e 16,70 %, respectivamente, conforme Figura 38. Para a mescla Devons o segundo efeito mais significativo foi a pressão atmosférica, que reduz em 27,20 % a pureza de oligossacarídeos ao passar de 3 para 6 atm, uma vez que produz mais açúcares livres e produtos de degradação em pressões mais elevadas. A variável pH também foi significativa para a mescla, apresentando aumento na pureza na ordem de 15,97 % quando passa do pH 1,5 para 2,5, ou seja, quando o poder do ácido fosfórico fica mais brando. Para *C. vulgaris*, o segundo efeito mais significativo foi a interação entre variáveis quadrática para a pressão atmosférica e a linear de pH, onde apresentou redução na pureza de oligossacarídeos na ordem de 15,52 %. O terceiro efeito mais significativo para *C. vulgaris*, em que observou aumento de 12,56 % na pureza quando passou do pH 1,5 para 2,5. Os outros efeitos também se mostram significativos para esta microalga, porém em menor proporção.

Já para *S. platensis*, o efeito mais significativo foi a pressão atmosférica (primeira ordem), em que ao passar de 3 para 6 atm a pureza de oligossacarídeos diminui na ordem de 23,03 %. O segundo efeito mais significativo foi o pH, que ao passar de 1,5 para 2,5 aumenta a pureza em 18,13 %. A interação secundária entre pressão atmosférica e pH também foi significativa, embora em menor escala, ou seja, 8,51 % de aumento de pureza.

De modo geral, os ajustes obtidos, que foram na maioria dos casos mistos, ou seja, enquadramento nos modelos lineares e quadráticos pode ser explicado pelo fato que o programa computacional Statistica ao gerar os modelos, considera como níveis (-) e (+) os valores de pH igual 1,5 e 2,5, fazendo com que uma situação de acidez mais drástica (pH 1,5) seja considerada como menor nível e vice-versa. Sendo que de maneira geral, situações mais drásticas (pH mais ácido e pressão atmosférica maior), há uma tendência da formação de mais açúcares livres e produtos de degradação, fazendo com que a proporção tanto de produção, quanto de pureza de oligossacarídeos seja relativamente menor. Portanto, enquanto a estatística considera os níveis do menor para o maior, na prática a análise estatística estas variáveis estão em direções opostas.

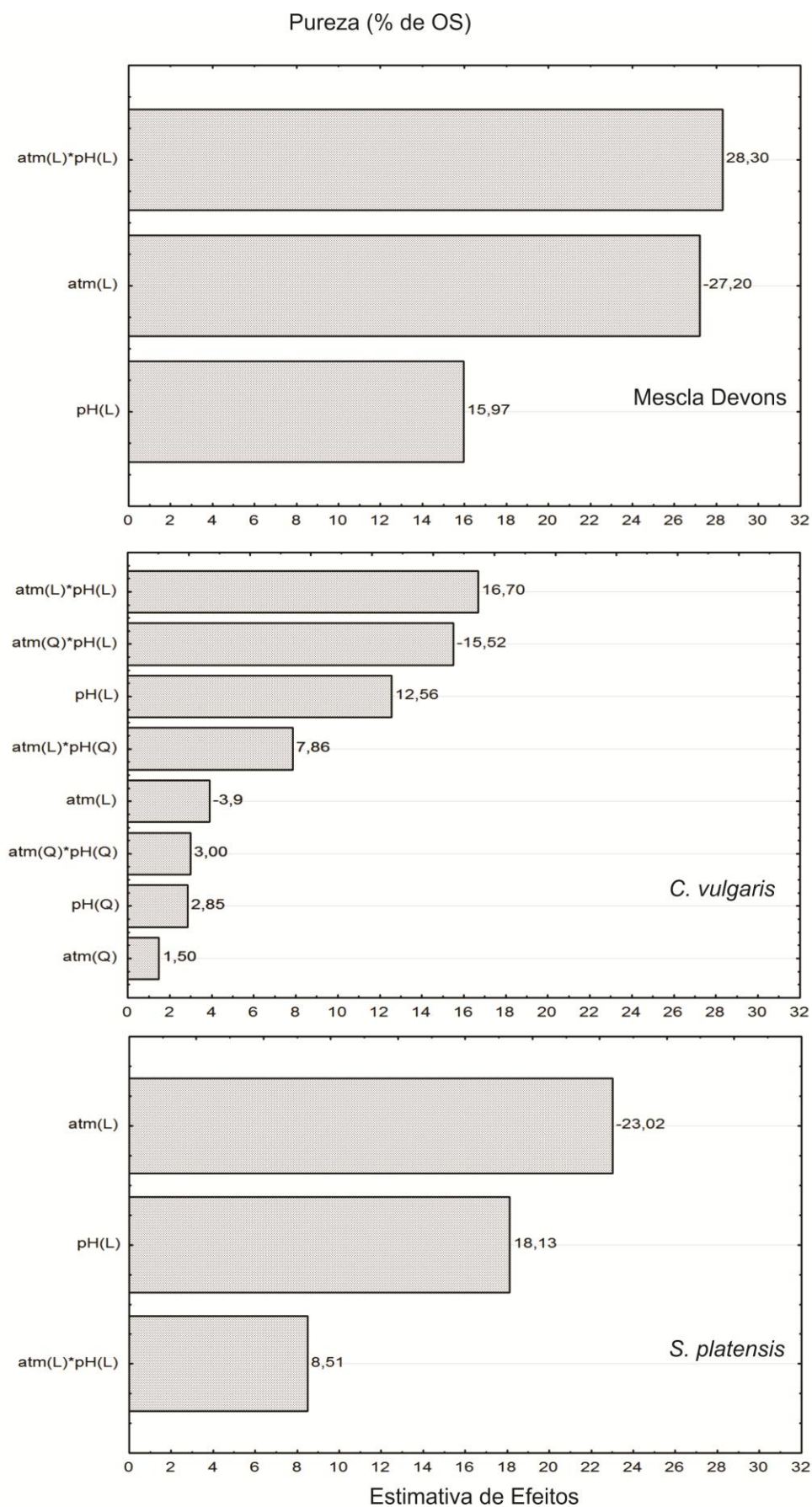


Figura 38 - Gráficos de Pareto para a resposta pureza de oligossacarídeos (%)

Na Figura 39 estão mostrados os gráficos de contorno para a produção e pureza de oligossacarídeos para todas as microalgas. As regiões do gráfico representadas pela cor verde indicam as regiões de interações entre as variáveis pressão (atm) e pH que promovem a menor produção e pureza de oligossacarídeos, enquanto as regiões em vermelho escuro são as consideradas mais favoráveis.

Observa-se regiões amplas em vermelho, que são favoráveis para a produção de oligossacarídeos (mg.g^{-1}), sendo que as combinações ideais de pH e pressão atmosférica seriam próximas a 1,8 e 3,5 atm, 1,7 e 4,2 atm e 2 e 3 atm, respectivamente para a mescla Devons, *C. vulgaris* e para *S. platensis*. Já para a pureza de oligossacarídeos (%), as regiões mais favoráveis são relativamente menores. As combinações ideais de pH e pressão atmosférica seriam próximos a 1,5 e 2,5 atm, 2,4 e 6,5 atm e 2,5 e 2,75 atm, respectivamente para a mescla Devons, *C. vulgaris* e *S. platensis*.

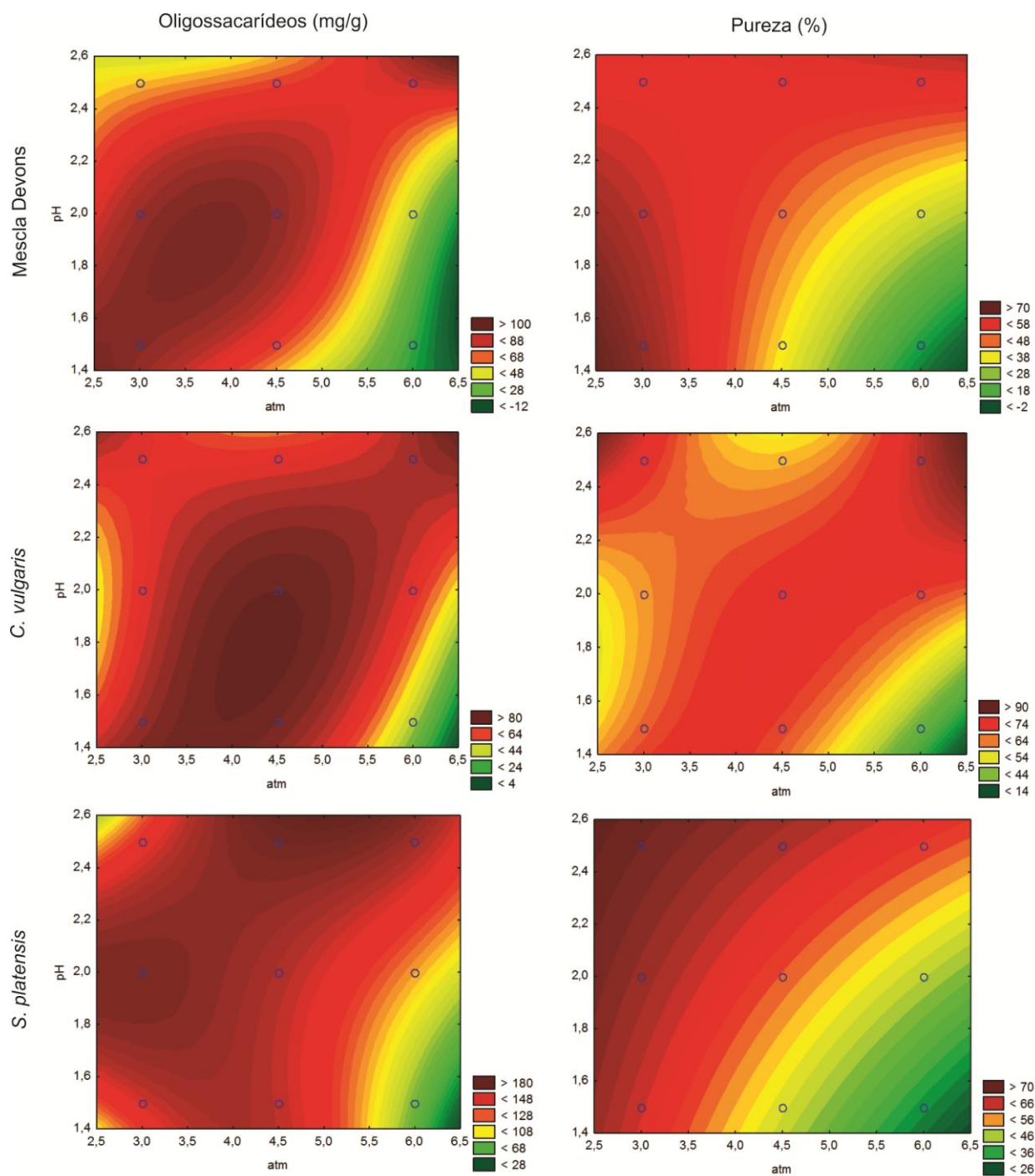


Figura 39 - Gráficos de contorno para as respostas produção e pureza de oligossacarídeos

CULTIVO DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS COM OS OLIGOSSACARÍDEOS

Os microrganismos *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* Shirota, foram cultivados em soluções preparadas com os oligossacarídeos prebióticos obtidos a partir das hidrólises termo-fosfóricas das biomassas *in natura* da mescla Devons, *C. vulgaris* e *S. platensis*.

A realização dos cultivos é justificada pelo fato dos oligossacarídeos prebióticos fornecerem carboidratos que as bactérias benéficas do cólon são capazes de fermentar (CUMMINGS, 2002), processo que tem inúmeros atributos. O principal resultado da fermentação dos oligossacarídeos no cólon é a que a biomassa bacteriana aumenta a massa fecal, contribuindo para o trânsito intestinal que gera benefício não somente para prevenir a constipação, mas também para reduzir o impacto da microbiota prejudicial associada à produção de componentes tóxicos nitrogenados, gás sulfídrico e compostos carcinogênicos e genotóxicos (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Para o preparo das soluções de oligossacarídeos para o meio de cultivo, foram utilizadas misturas dos sobrenadantes provenientes de diferentes condições de hidrólise (pH e atm), de forma a obter uma porcentagem similar de pureza de oligossacarídeos para cada microalga, levando em consideração a quantidade de oligossacarídeos total, bem como os produtos de degradação (anidridos e HMF), possibilitando, desta forma, realizar uma análise comparativa mais adequada para os três diferentes meios de cultivo.

O inóculo de células de cada microrganismo foi realizado a partir de um volume conhecido e igual para todos os meios de cultivo, que foi previamente calculado com base nas leituras realizadas em espectrofotômetro (660 nm), sendo equivalente a 1.10^7 células.mL⁻¹, para que desta forma houvesse um parâmetro comparativo no crescimento dos microrganismos. Porém, através do monitoramento da densidade celular, pode ser observado que a quantidade de células totais inoculada inicialmente não foi padronizada como o esperado, apresentando valores maiores para o microrganismo *Lactobacillus casei*, em meio contendo oligossacarídeos proveniente de *C. vulgaris* e para os dois microrganismos, em meio contendo oligossacarídeos de *S. platensis*.

Na Figura 40, pode ser observado crescimento celular dos microrganismos *B. animalis* e *L. casei* nos três diferentes meios de cultivos. O crescimento dobrou do dia 0 para o dia 1 em todos os cultivos, porém, a partir deste dia a ascensão de crescimento se deu de forma menos intensa até o sétimo dia, não havendo grandes variações para nenhum dos microrganismos.

Pode-se perceber que do dia 6 para o dia 9, houve um salto no número de células em todos os cultivos, onde os microrganismos atingiram os picos máximos de crescimento, sendo maior para os cultivos com os oligossacarídeos provenientes da mescla Devons, que apresentou taxa de crescimento em número de células 4, 5 e 5,1 vezes maior para o microrganismo *B. animalis* e *L. casei*, respectivamente. Nos outros dois meios de cultivo, estas taxas de crescimento não foram tão altas, sendo que no meio contendo oligossacarídeos de *C. vulgaris* aumentou 1,6 e 1,3 vezes para *B. animalis* e *L. casei*, respectivamente, e para o meio contendo oligossacarídeos de *S. platensis* aumentou 1,4 e 1,8 vezes para os mesmos microrganismos. Em contrapartida, a coleta realizada cinco dias após, revelou o declínio de células, decorrente da senescência e morte dos microrganismos, para todos os meios de cultivo, exceto para o microrganismo *B. animalis* em meio de *S. platensis*, que ainda manteve um pequeno crescimento.

Os valores de absorvância (relativos ao número de células totais) foram maiores para os microrganismos cultivados em meio com oligossacarídeos de *C. vulgaris*, seguido da mescla Devons, e em menor número para *S. platensis*. Porém, este aumento no número de células tanto de *L. casei*, quanto de *B. animalis* já é considerado o suficiente para trazer benefícios ao trato gastrointestinal.

Quando comparada a taxa de crescimento entre os dois microrganismos, não foi possível estabelecer qual apresentou maior crescimento em cada meio de cultivo específico, pois os valores foram muito similares, necessitando de análises estatísticas posteriores.

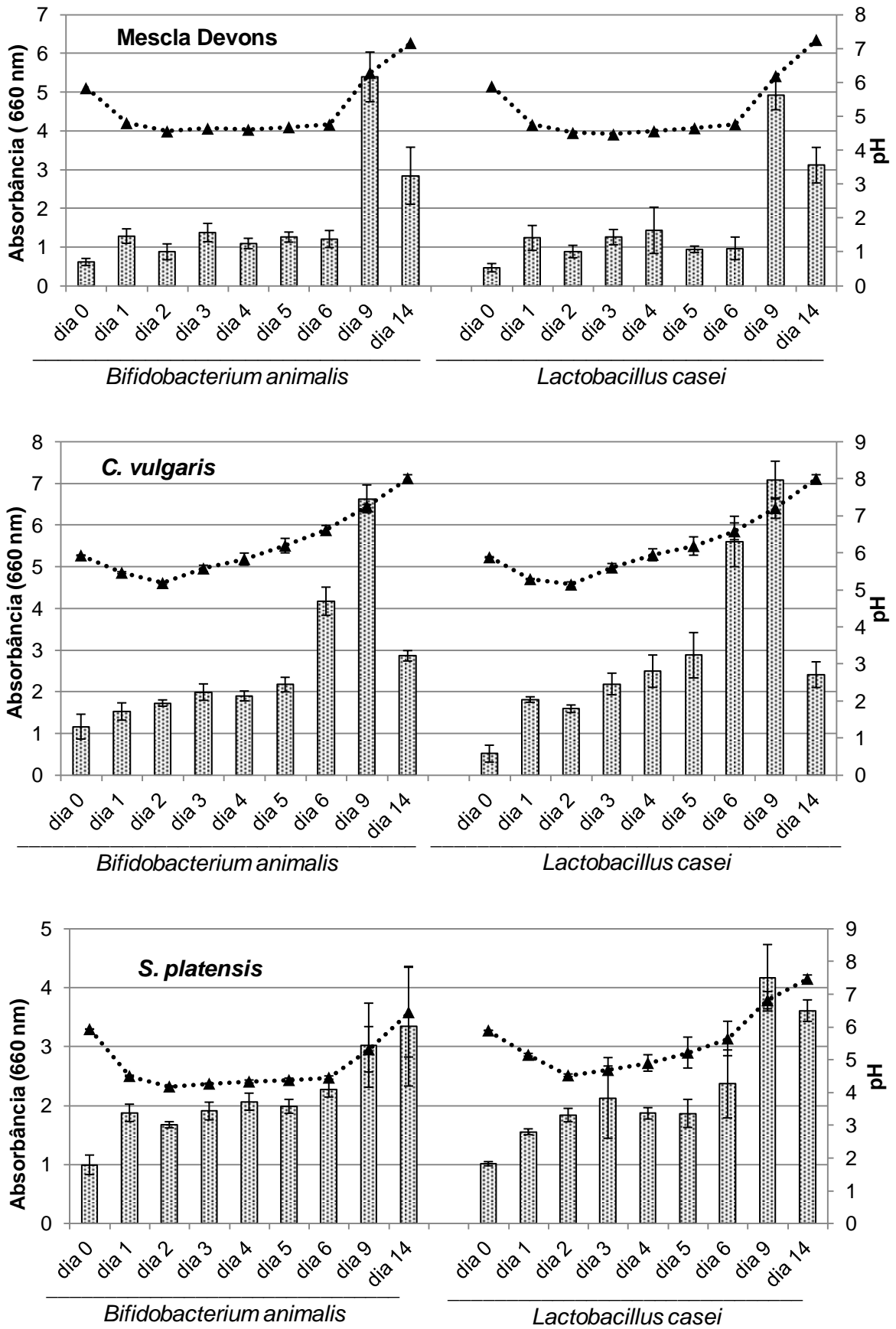


Figura 40 – Crescimento dos microrganismos probióticos cultivados em meio contendo oligossacarídeos de microalgas e variação de pH durante o cultivo

A avaliação da variação do pH também foi avaliada periodicamente, pois a fermentação bacteriana resulta na redução de pH no cólon intestinal, fato que dificulta o crescimento de certas bactérias patogênicas e fortalece o desenvolvimento de bifidobactéria, lactobacilos e outras bactérias produtoras de ácido lático (CARABIN, 1999).

Todos os valores de pH foram ajustados para 6,0 no início dos cultivos e logo no dia 1 houve redução destes valores, atingindo picos de menor pH entre os dias 1 e 3, e se mantendo constantes até o dia 6 nos cultivos utilizando a mescla Devons e *S. platensis* para o *B. animalis*, já para os cultivos utilizando meio de *C. vulgaris* e para o microrganismo *L. casei* em *S. platensis*, a partir do dia 3 os valores apresentaram aumentos lineares. Nos dias 9 e 14, pode-se observar que os valores de pH aumentaram consideravelmente, com média entre 6,5 e 8,0, conforme pode ser visualizado na Figura 40.

Para uma análise mais concreta dos resultados, foram realizadas análises por CLAE, pois a fermentação realizada por bactérias anaeróbicas do cólon, leva à produção de ácidos orgânicos, como ácido lático, ácidos graxos de cadeia curta e gases. Além de ácido lático, ácidos graxos de cadeia curta, como propiônico e butírico, também são produzidos pelas bactérias lácticas (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Quando absorvidos, esses ácidos graxos contribuem na proteção contra mudanças patológicas na mucosa do cólon. Além disso, uma concentração mais elevada de ácidos graxos de cadeia curta auxilia na manutenção de um pH apropriado no lúmen do cólon, crucial para a expressão de muitas enzimas bacterianas sobre compostos estranhos e sobre o metabolismo de carcinógenos no intestino (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

A Figura 41 mostra os perfis de CLAE dos cultivos de *B. animalis* e *L. casei* utilizando os oligossacarídeos da mescla Devons, *C. vulgaris* e *S. platensis* como fonte de carbono, onde estão somente mostrados os dias 0 e 3 de cultivo, embora cada conjunto tenha suas particularidades de consumo e produção de substâncias. Os dados foram comparados com o perfil dos padrões (Figura 50 do Apêndice).

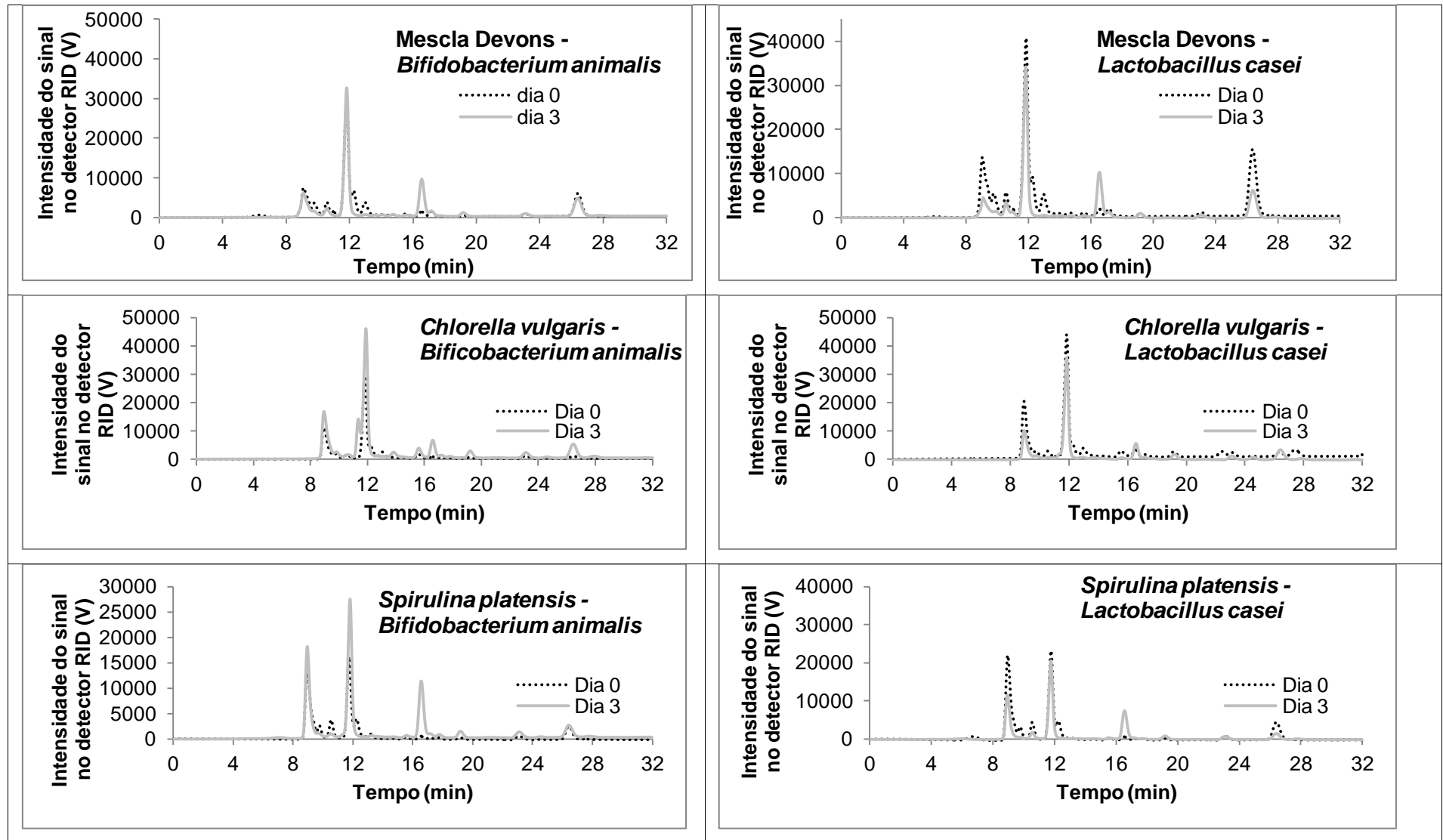


Figura 41 - Perfil de CLAE para os cultivos de *B. animalis* e *L. casei* utilizando os oligossacarídeos da mescla Devons, *C. vulgaris* e *S. platensis*

O primeiro conjunto de picos que eluem entre 8,5 e 10,2 correspondem aos oligossacarídeos detectáveis, e decrescem ao longo do período de cultivo por serem consumidos pelos microrganismos. Em alguns casos (e.g. *L. casei* e *B. animalis* com *S. platensis*), ocorre um leve aumento até o dia 2 e depois, onde atingem o pico máximo de concentração, provavelmente devido a clivagem de oligossacarídeos maiores que nos dias 0 e 1 estavam insolúveis na fase móvel, portanto não foram detectados na alíquota injetada.

Com relação à produção de ácido láctico no tempo de retenção de 16,5 minutos, observa-se que as maiores produções são no dia 2 para *B. animalis* (mescla Devons e *S. platensis*) e *L. casei* (*S. platensis*), dia 3 para ambos cultivos com *C. vulgaris* e dia 6 para *L. casei* com a mescla Devons. No caso do cultivo com de *B. animalis* e *L. casei* com *S. platensis*, as produções máximas de ácido láctico (dia 2) coincidem com a menores medidas de pH dos cultivos em ambos os experimentos, 4,17 e 4,51, respectivamente.

O pico que elui em 19,1 minutos corresponde ao ácido acético, atingindo concentração máxima no dia 6 para os cultivos de *B. animalis* e *L. casei* com a mescla Devons e *C. vulgaris*. Para o cultivo de *B. animalis* com *S. platensis* as concentrações máximas foram nos dias 2 e 6, e para *L. casei*, também com *S. platensis*, o pico máximo foi no dia 9.

Foram realizadas novas análises por CLAE para a quantificação mais precisa do ácido láctico e ácido acético produzidos no meio de cultivo realizado com os hidrolisados de *S. platensis*, visto que esta foi a microalga que apresentou os melhores resultados de hidrólise. Os cálculos foram realizados utilizando os valores obtidos da área de cada pico e das curvas de calibração do ácido láctico e ácido acético, conforme Figuras 51 e 52 do Apêndice, respectivamente, e os valores estão expressos em mg.mL^{-1} , na Figura 42.

A concentração de ácido láctico teve um aumento médio de cinco vezes do $t = 0$ para o $t = 2$, e as maiores concentrações observadas foram entre $t = 2$ e $t = 5$, havendo diminuição a partir deste dia, tanto para *L. casei*, quanto para *B. animalis*. Já a concentração de ácido acético foi maior que a de ácido láctico, e pode-se observar maior produção no cultivo de *B. animalis*, que atingiu seu pico no $t = 9$, com $6,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto que o pico no cultivo de *L. casei* foi no $t = 6$, atingindo $2,62 \text{ mg.mL}^{-1}$, ou seja, cerca de 2,3 vezes menos produção que o no cultivo de *B.*

animalis. No t=14, as concentrações de ácido láctico e ácido acético diminuíram, com valores menores que os iniciais (t = 0), para os dois microrganismos.

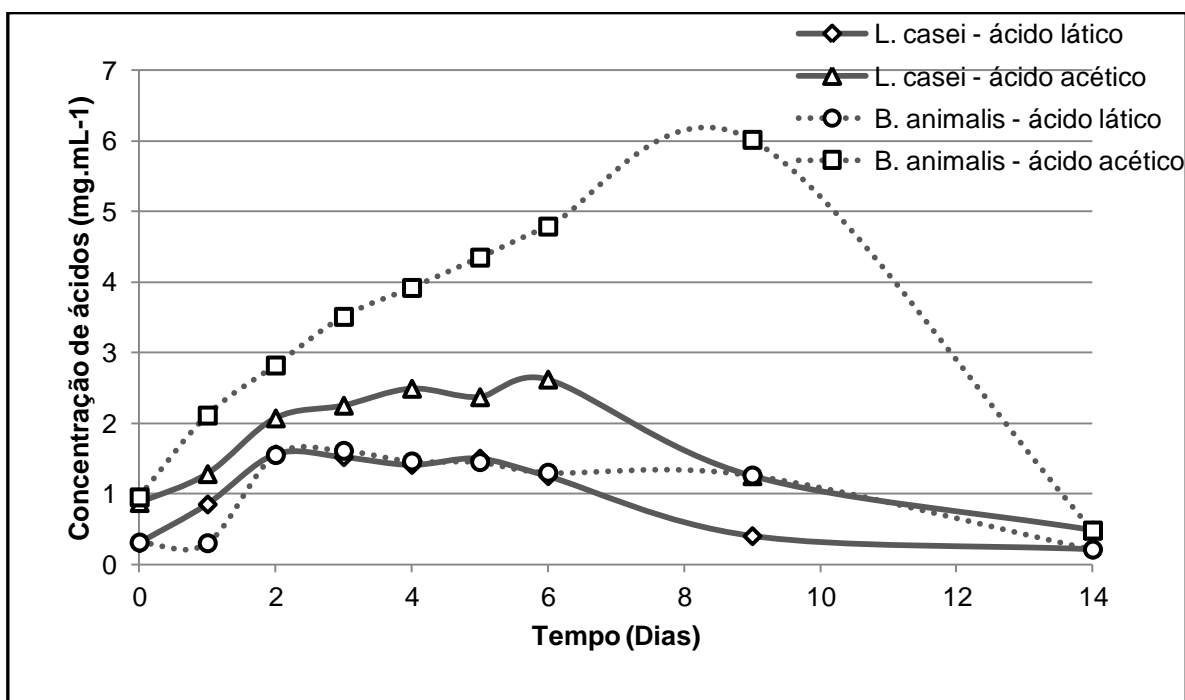


Figura 42 - Concentração de ácido láctico e ácido acético produzidos pelos microrganismos probióticos no meio de hidrolisado de *S. platensis*

Estes valores indicam que os microrganismos probióticos foram capazes de utilizar os oligossacarídeos presentes nos hidrolisados para seu crescimento e consequente produção de ácidos orgânicos.

Análises mais precisas também foram realizadas para a determinação dos oligossacarídeos presentes nos cultivos de *B. animalis* e *L. casei*, utilizando o hidrolisado de *S. platensis*, que estão representados na Figura 43, com base nos padrões mostrados na Figura 53 do Apêndice. Nota-se que os dois cultivos apresentaram similaridade nos perfis e concentração de oligossacarídeos, que com exceção do t = 1 para t = 3, onde foi observada diminuição na concentração, caracterizada pelo consumo destes oligossacarídeos pelos microrganismos, os outros dias de cultivo apresentaram aumento na concentração. Este fato pode ser explicado pelo fato de os oligossacarídeos presentes nos hidrolisados apresentarem alto GP, ou seja, possuírem cadeias longas de carboidratos, permitindo que os

microrganismos realizassem a clivagem destas ligações, liberando assim, carboidratos de GP menor, detectáveis pelo equipamento de CLAE.

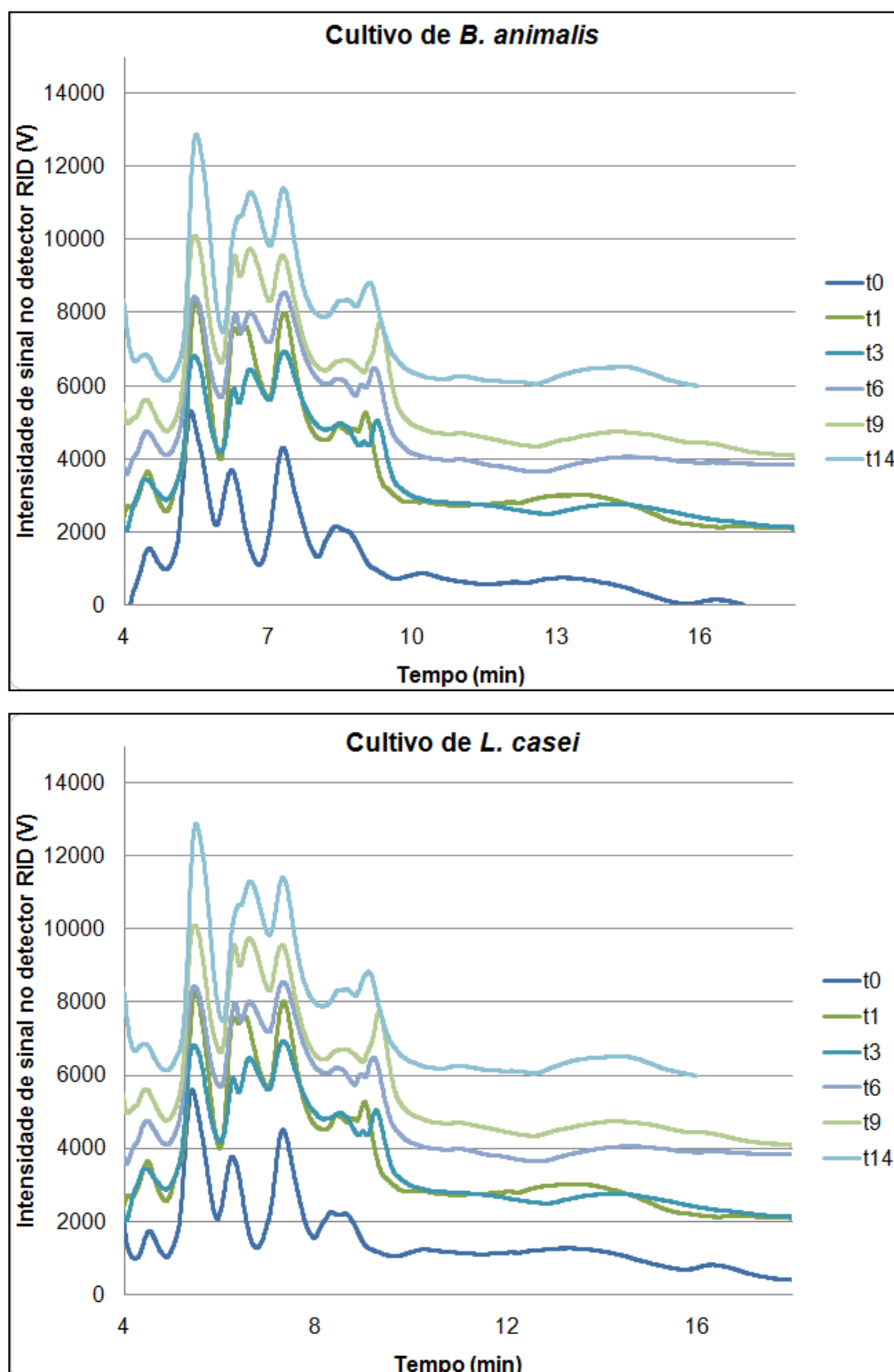


Figura 43 – Determinação por CLAE dos oligossacarídeos presentes nos hidrolisados de *S. platensis*

Portanto, este trabalho mostrou a viabilidade de utilizar a biomassa de microalgas para a obtenção de oligossacarídeos prebióticos, a partir da hidrólise fosfórica, assim como a biomassa residual do processo, que contém proteínas não hidrolisadas, produtos estes que podem ser utilizados em conjunto na composição de alimentos com benefícios nutricionais, oferecendo uma aplicação tecnológica ao subproduto formado durante a biomitigação de CO₂ e outros gases. Este trabalho também indicou a possibilidade de cultivo e utilização de outras espécies de microalgas, como *S. platensis*, no sistema de tratamento de efluentes gasosos da Churrascaria Devons de Curitiba, onde poderia ser avaliada a sua capacidade de biofixação de CO₂ a fim de utilizar a biomassa resultante deste processo como fonte de oligossacarídeos prebióticos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os oligossacarídeos prebióticos obtidos neste trabalho a partir da biomassa de microalgas utilizados no cultivo de microrganismos probióticos (*Bififobacterium animalis* e *Lactobacillus casei*) permitiram o crescimento destes microrganismos e formação de ácidos graxos de cadeia curta, comprovando sua atividade funcional, podendo trazer benefícios ao sistema digestivo animal ou humano, pois estimulam a microflora intestinal benéfica, podendo prevenir doenças.
- O processo de eletroflotação utilizado para recuperação da biomassa da mescla Devons libera alta quantidade de alumínio, devendo ser estudadas novas alternativas para este processo.
- As biomassas de microalgas que foram pré-tratadas demonstraram a alta eficiência do SDS em remover componentes poliméricos (e.g. ácidos nucleicos e proteínas) e ainda foram encontradas diferenças entre os perfis dos hidrolisados, demonstrando a heterogeneidade das amostras;
- A biomassa de *S. platensis* foi a que apresentou os melhores resultados de hidrólise em quantidade de açúcar liberado, seguida da biomassa de mescla Devons e *C. vulgaris*, tanto para as biomassas *in natura*, quanto para as pré-tratadas.
- A medida que a drasticidade do processo de hidrólise se intensifica (aumento de pH e pressão), a quantidade de açúcares liberados aumenta, porém aumenta também a quantidade de açúcares livres (principalmente a glucose), bem como os produtos de degradação (anidridos e HMF).
- A hidrólise termo-fosfórica mostrou-se eficiente para a utilização na produção de oligossacarídeos prebióticos, a partir da biomassa *in natura* da microalga produzida no sistema de tratamento de gases, e a biomassa residual do processo de hidrólise fosfórica, contendo proteínas não hidrolisadas, poderiam ser utilizadas na composição de alimentos com benefícios nutricionais, dando assim um destino adequado a este subproduto.

REFERÊNCIAS

- ALWAYZY, S. H., *et al.* Biofuels from the fresh water microalga *Chlorella vulgaris* (FMW-CV) for Diesel engines. **Energies** 7: 1829-1851, 2014.
- AMBROSI, M. A., *et al.* Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada** v. 29, n. 2: v. 29, n. 22, 2008.
- ANTELO, F. S., COSTA, J. A. V., *et al.* Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal** 41(1): 43-47, 2008.
- AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil.** . 2012.171 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BARROS, K. K. S. S., R. Uso de microalgas na alimentação humana e animal: tecnologia de produção e valor nutricional de concentrados algáceos obtidos em cultivo em massa. In: **Encontro de Iniciação Científica, XV.** Universidade Federal da Paraíba João Pessoa, PB, Anais eletrônicos... 37.2007.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** London, Blackwell Science: 312-351. 2004.
- BEILKE, F. **Análise estrutural de polissacarídeos de *Myrmecia biatorellae*, fotobionte de líquen *Lobaria linita*.** 2012. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.
- BENEMAN, J. R. Microalgae products and production: an overview. **Journal of Industrial Microbiology** v.31, n.5, 1990.
- BLIGH, E. G. D., W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** 37: 911-917, 1959.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology** v. 70, n. 1-3: 313-321, 1999.
- BRENNAN, L. O., P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and coproducts. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 14: 557-577, 2010.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 145(1): 79-99, 1991.

CAMERINI, F. V. **Fixação Biológica de Dióxido de Carbono por Spirulina (Arthrospira) platensis.** . 2008.f. Dissertação - FURG, Rio Grande, 2008.

CARABIN, I. G. F., W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology, New York** v.30: 268-282, 1999.

CARVALHO, W. C. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia.** Belo Horizonte:, Coopmed editora., 1994.

CAVALCANTI, V. F., *et al.* Cultivo da Microalga *Chlorella Vulgaris* em Fotobiorreator de Placas Planas e Produção de Ésteres por Transesterificação *In Situ*. **Revista Brasileira de Energias Renováveis** v. 3: 244- 254, 2014.

CAKMAK, I. & YAZICI, A. M. Magnésio – Um elemento esquecido na produção agrícola. **Informações Agronômicas** n.132, 2010.

CHAKRABORTYL, T. S., A.K.; PAL, R. Chemical characterization and the stress induced changes of the extracellular polysaccharide of the marine cyanobacterium, *Phormidium tenue*. **Journal of Algal Biomass Utilization.** v.3, n.1, 2012.

CHEN, C.-Y. E. A. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology** 102, n. 1: 71-81, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances** v. 25, n. 3: 294-306, 2007.

CHIU, S.-Y. E. A. The air-lift photobioreactors with flow patterning for high- density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. **Engineering in Life Sciences** v. 9, n. 3: 254-260, 2009.

CHOWDURY, K., ET AL. Studies on the Fatty Acids Composition of Edible Oils. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research** v. 42, n.3: 311:316, 2007.

CHU, S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. Methods and culture media. **Journal of Ecology** n.30: 284-325, 1942.

CONVERTI, A. E. A. 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: Process Intensification** v. 48, n. 6: 1146-1151, 2009.

COPLIN, L. G. **Sustainable Development of Algal Biofuels in the United States**. Washington, The National Academies Press, 2012.

CORDEIRO, R. A. G., V.M; CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M. Effect of proteins from seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamaouroux on the growth of human pathogen yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49 (6): 915-992, 2006.

COSTA, J. A. V. R., E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil dos ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutíssima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 17, n. 4: 429-436, 2006.

CUMMINGS, J. H. M., G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, Wallingford Gastrointestinal effects of prebiotics.: 145-151, 2002.

DAWSON, R. M. C., ELLIOTT, D. C., *et al.* **Data for Biochemical Research**. New York, Oxford University Press, 1986.

DE-BASHAN, L. E. B., Y. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer. **Water Research** 38: 222–4246, 2004.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy** v. 88, n. 10: 3473-3480, 2011.

DERNER, R. B. E. A. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural** v. 36, n. 6: 1959-1967, 2006.

DONATO, N. R. *et al.* Uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos submetidos à dieta de restrição protéica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** v. 69, n. 1, 2010.

DUARTE, I. C. S. **e Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales)**. 2001.148 f. Dissertação - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

DUBOIS, M. G., K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v.28, n.3: 350-356, 1956.

DUNN, M. J. **Gel Electrophoresis of Proteins**. Abingdon Oxford, United Kingdom: BIOS Scientific Publishers Ltda, 1993.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology** 80: 1–14, 2008.

FONTANA, J. D. **Biodiesel: para leitores de 9 a 90 anos**. Curitiba, PR, UFPR, 2011a.

FONTANA, J. D., CORREA, J. B. C., DUARTE, J. H. Aqueous phosphoric acid hydrolysis of hemicelluloses from sugarcane and sorghum bagasses. **Biotechnology and Bioengineering Symposium** v.14: 175-186, 1984b.

FONTANA, J. D., GRZYBOWSKI, A., TIBONI, M., PASSOS, M. Fructo-Oligosaccharide Production from Inulin Through Partial Citric or Phosphoric Acid Hydrolyses. **Journal of Medicinal Food** v.14, n.11: 1425–1430, 2011c.

FONTANA, J. D., MITCHELL, D. A., *et al.* Starch depolymerization with diluted phosphoric acid and application of the hydrolysate in astaxanthin fermentation. **Food Technology and Biotechnology** 46(3): 305-310, 2008d.

FONTANA, J. D., ZAGONEL, G., *et al.* Simple TLC-screening of acylglycerol levels in biodiesel as an alternative to GC determination. **Journal of Chromatographic Science** 47, 2009e.

GAO, K. and AL, H. Relationship of Growth and Photosynthesis with Colony size in an edible Cyanobacterium, *Nostoc* (Cyanophyceae). **Journal of Phycology** 40(3): 523-526, 2004.

GARNA, H.; MABON, N.; NOTT, K.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. **Food Chemistry** v. 96, p. 477-484, 2006.

GARRIDO, I. M. Microalgae immobilization: current techniques and uses. **Bioresource Technology** 99: 3949 – 3964, 2008.

GOMES, R. J. H. C. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***, 1985. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade de Campinas, Campinas, 1985.

GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**., Ames, Iowa: Blackwell Publishing.: 97–115. 2004.

GUALTIERI, P. B., L. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**., CRC Press, 2006.

HALL, D. O. R., K. K. **Fotossíntese**. São Paulo: EPU, 1980.

HELENIUS, A., SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochimica et Biophysica Acta** v.415 p.29-79, 1975.

HENRIKSON, R. **Earth food Spirulina**. 6 ed. California: Ronore Enterprises, 187p., 2009.

HO, S.-H., CHEN, C.-Y., LEE, D.-J., CHANG, J.-S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – a review. **Biotechnology Advances** v.29. n.2: 189–198, 2011.

HO, S.-H., CHEN, C.-Y., LEE, D.-J., CHANG, J.-S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock **Bioresource Technology** 135: 191-198, 2013.

HOLLOWAY, T., FIORE, A., AND GALANTER HASTINGS, M. Intercontinental Transport of Air Pollution: Will emerging science lead to a new hemispheric treaty? **Environmental Science and Technology** v.37: 4535–4542, 2003.

HUANG, Z. *et al.* Chemical composition and selenium distribution in selenium enriched *Spirulina platensis* biomass. **Chemistry of Natural Compounds** v. 42, n. 6, p. 632-640, 2006.

HUNTLEY, M. E. R., D.G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change** v.12, n. 4: 573–608, 2007.

IAL, I. A. L. - **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Sao Paulo, SP: 1018.2005.

JONES, C. S., MAYFIELD, S.P. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. **Current Opinion in Biotechnology**., 2012.

KIRKBY, E. A. & RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: Funções, absorção e mobilidade. **Informações Agrônomicas** nº118, 2007.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association, Chicago** v.101: 229-241, 2001.

KRIENITZ, L. H., E. H.; HEPPELLE, D.; HUSS, V. A. R. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella*(Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Phycologia**, 2004.

KUMAR, K., DASGUPTA, C.N., NAYAK, B., LINDBLAD, P., DAS. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**. 102: 4945–4953, 2011.

LEE, Y. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology** 13: 307–315, 2001.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 2005.

LOBO, E. A. E. A. Use of epilithic diatoms as bioindicator from lotic systems in southern Brazil, with special emphasis on eutrophication. **Acta Limnológica Brasiliensia** 16(1): 25-40, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos, RiMa, 2006.

MATA, T. M. M., A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 14, n. 1: 217-232, 2010.

MATOS, A. P. **Potencialidades de *Chorella vulgaris* cultivada em meio à base de concentrado de dessalinização**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MBARI. "Botryoglossum Photosynthetic Pigments". Acesso em, 2014, from <http://www.mbari.org/staff/conn/botany/reds/daisy/pigments.htm>.

MICHELON, L. K. **Estudo de alternativa para separação de microalgas por eletroflotação**. 2013.64 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry** v. 31, n.3: p. 426-428, 1959.

MILLER, L. A. H. J. A. The micro-kjeldahl determination of the nitrogen content of amino acids and proteins. **Journal of Biological Chemistry**. 159: 373:383, 1945.

MORAIS, K. C. C. *et al.*, **Cultivo de microalgas com adição de glicerol em cultivos mixotróficos em fotobiorreatores para produção de biomassa com foco em biocombustíveis.** Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/andrebmariano/artigo-4-cultivo-de-microalga-com-adio-de-glicerol-em-cultivos-mixotrificados-em-fotobiorreatores-para-produo-de-biomassa-com-foc>> Acesso em set. de 2013.

MORAIS, K. C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos** 2012.f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais – PIPE). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2012.

MOREIRA, L. M., RODRIGUES, M. R., *et al.* Influência de diferentes sistemas de solvente água-etanol sobre as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila α . **Química Nova** 33(2): 258-262, 2012.

MUÑOZ, R., GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research** v.40: 2799 – 2815, 2006.

NPDEAS, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento – **Energia auto-sustentável.** Disponível em: < <http://npdeas.blogspot.com.br/>> Acesso em fev. 2014.

OLGUÍN, E. J., GALICIA, S., MERCADO, G., PÉREZ, T. J. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. **Journal of Applied Phycology** v.15: 249–257, 2003.

OMS, Organização Mundial de Saúde. **Elementos traço na nutrição e saúde humana.** Genebra. Roca: São Paulo, 1998.

OTLES, A. A. P., R. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. **Journal of AOAC INTERNATIONAL** v.84, n.6: 1708-1713, 2001.

PARK, J. B. K. C., R. J. E SHILTON, A. N. Bioresource Technology Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology** 102, n. 1: 35-42, 2011.

PETKOV, G. A. G., G. Which are fatty acids of the green algal *Chlorella*? . **Biochemical Systematics and Ecology** 35: 282-285, 2007.

PIRES, J. C. M. E. A. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 16: 3043 – 3053, 2012.

RAVEN, P. H. E. A. **Biologia vegetal**. . Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

RICHMOND, A. Cultivating Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels. Terrapin Bright Green, . **Handbook of microalgais culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford, Blackwell Science: 584. 2004.

RICO, A. O. **Otimização da Produção de Biomassa de Microalgas em Sistema Biológico de Tratamento de Gases de uma Churrascaria**. 2014.f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2014.

ROBERFROID, M. B. Functional food concept and irs application to prebiotics. . **Digestive and Liver Disease** v.34, n.2: p.S105-S110, 2002.

RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. 2011.f. Dissertação - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

RYAN, C. Cultivating Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels. **Terrapin Bright Green, LLC e NRDC.**, 2009.

SÁNCHEZ, M., BERNAL-CASTILLO, J., ROZO, C. *et al.* *Spirulina (Arthrospira)*: an edible microorganism. A review. **Universitas Scientiarum**, v.8, p. 7-24, 2003.

SCHEREZENMEIR, J. V., M. DE. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal Clinical Nutricional** v.73: p.361-364, 2001.

SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalgae. **Hydrobiologia** v. 512, n. 1(39-44), 2004.

SIALVE, B., BERNET, N., BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a 21 necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances** 27: 409-416, 2009.

SILVEIRA, S. T. B., J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, S. J.; KELIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology** v. 98: 1629-1634, 2007.

SIVAKUMAR, G. X., J; THOMPSON, R. W.; YANG, Y; RANDOL-SMITH, P.; WEATHERS P.J. Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. **Bioresource Technology**. 107: 1–9, 2012.

SPOLAORE, P., CASSAN, C. J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 101 (2): 87-96, 2006.

TAKAMATSU, A. A., SAKUMA, A. C., *et al.* Sistema biológico automatizado para eliminação de odor das emissões gasosas de atividades comerciais poluidoras. Patente BR n. PI1003452-8, 13 de setembro de 2010. Brasil, 2010.

TECPAR. Desenvolvimento de fotobiorreatores para aproveitamento da emissão atmosférica proveniente de chaminé de churrascaria. Relatório final do projeto. Curitiba, Paraná, 2012.

TIBONI, M., GRZYBOWSKI, A., BALDO, G. R., DIAS JR., E. F., TANNER, R. D., KORNFIELD, J. A., FONTANA., J. D. Thermopressurized diluted phosphoric acid pretreatment of ligno(hemi)cellulose to make free sugars and nutraceutical oligosaccharides. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 41: 957–964, 2014.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford, Blackwell Science: 3-19. 2004.

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Departamento de Zootecnia. **Fisiologia de Plantas Forrageiras**. Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/1271167/>. Acesso em jul 2014.

VON ELBE, J. H. Colorantes. In: FENNEMA, O. W. **Química de los alimentos**. 2ª ed. Zaragoza: Wisconsin – Madison. Cap.10, p.782-799, 2000.

WALTER, A. **Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo**. . 2011.f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - UFPR, 2011.

XU, L. E. A. Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor. **Engineering in Life Sciences** v. 12, n. 2: 171 – 177, 2012.

ZEZZA, T. R. C. Desenvolvimento de eletrodos modificados para determinação de cálcio e magnésio em biodiesel. 2011. 94 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2011.

APÊNDICE

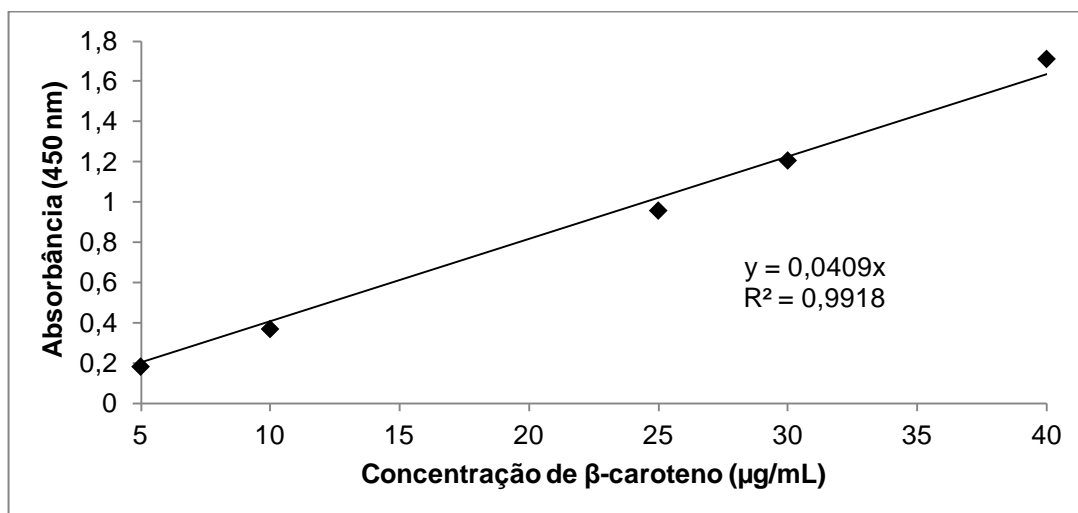
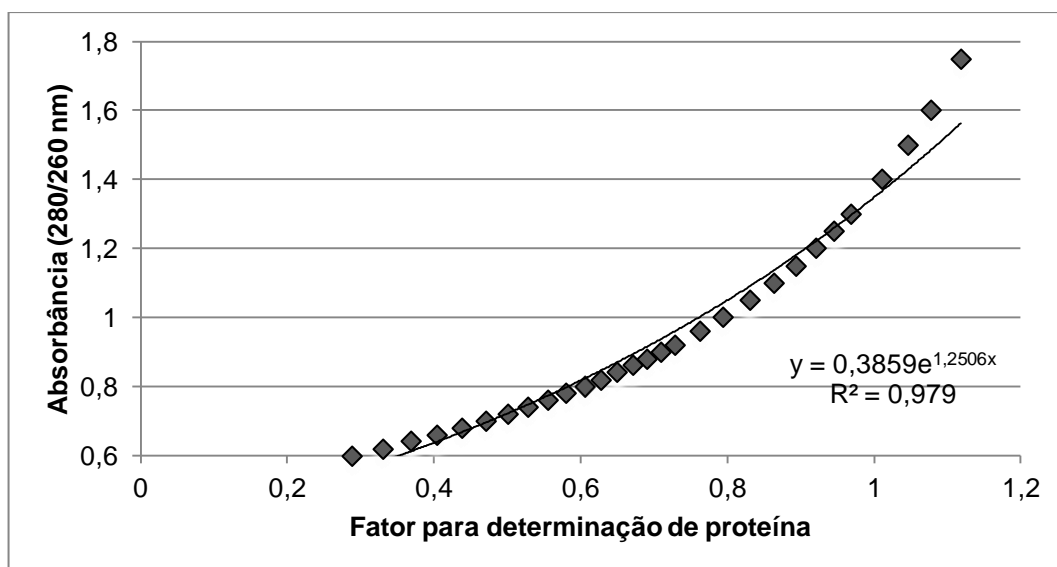
Figura 44 - Curva analítica para o β -caroteno

Figura 45 - Exponencial para determinação do fator de quantificação para proteína por espectrofotômetro

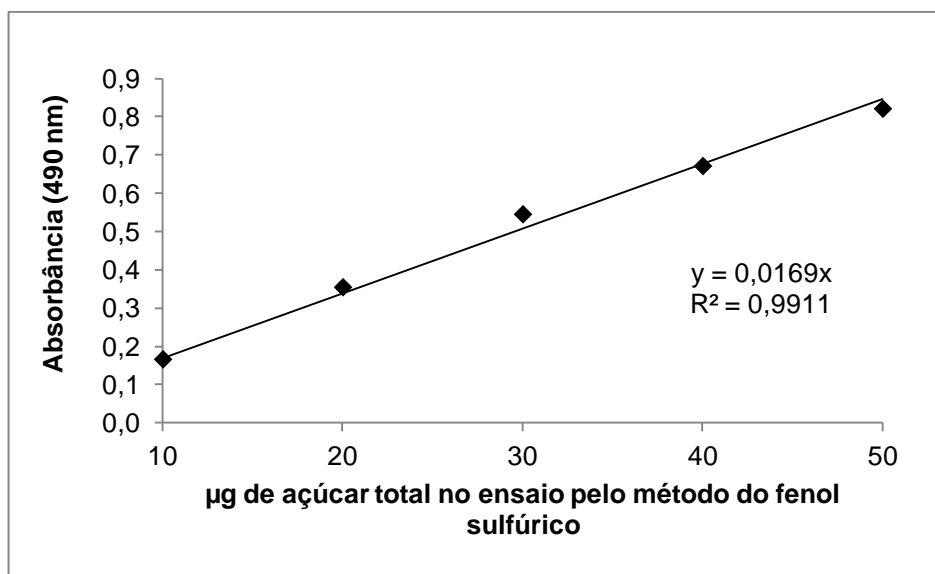


Figura 46 - Curva analítica para determinação de açúcares totais pelo método do fenol sulfúrico utilizando glucose como padrão

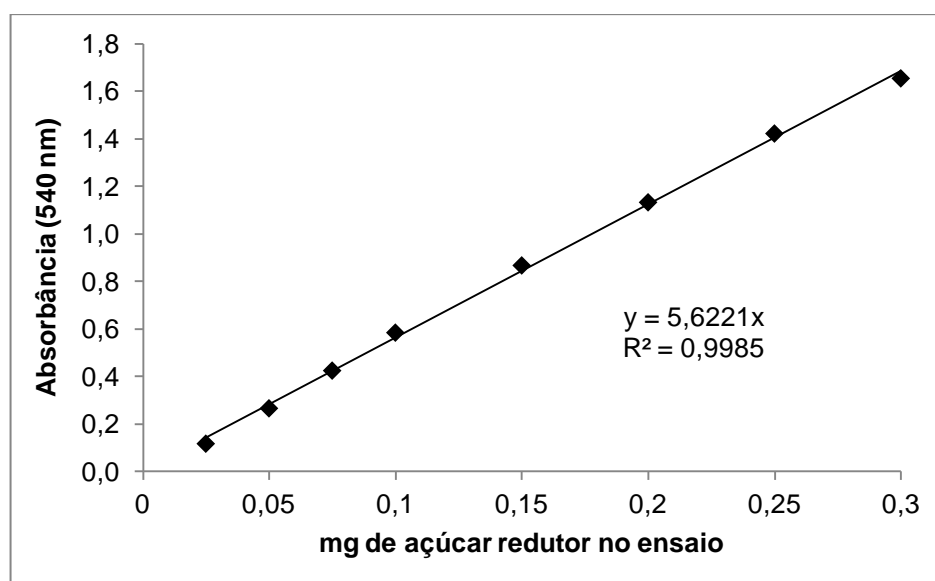


Figura 47 - Curva analítica para determinação de açúcares redutores pelo método do DNS utilizando glucose como padrão

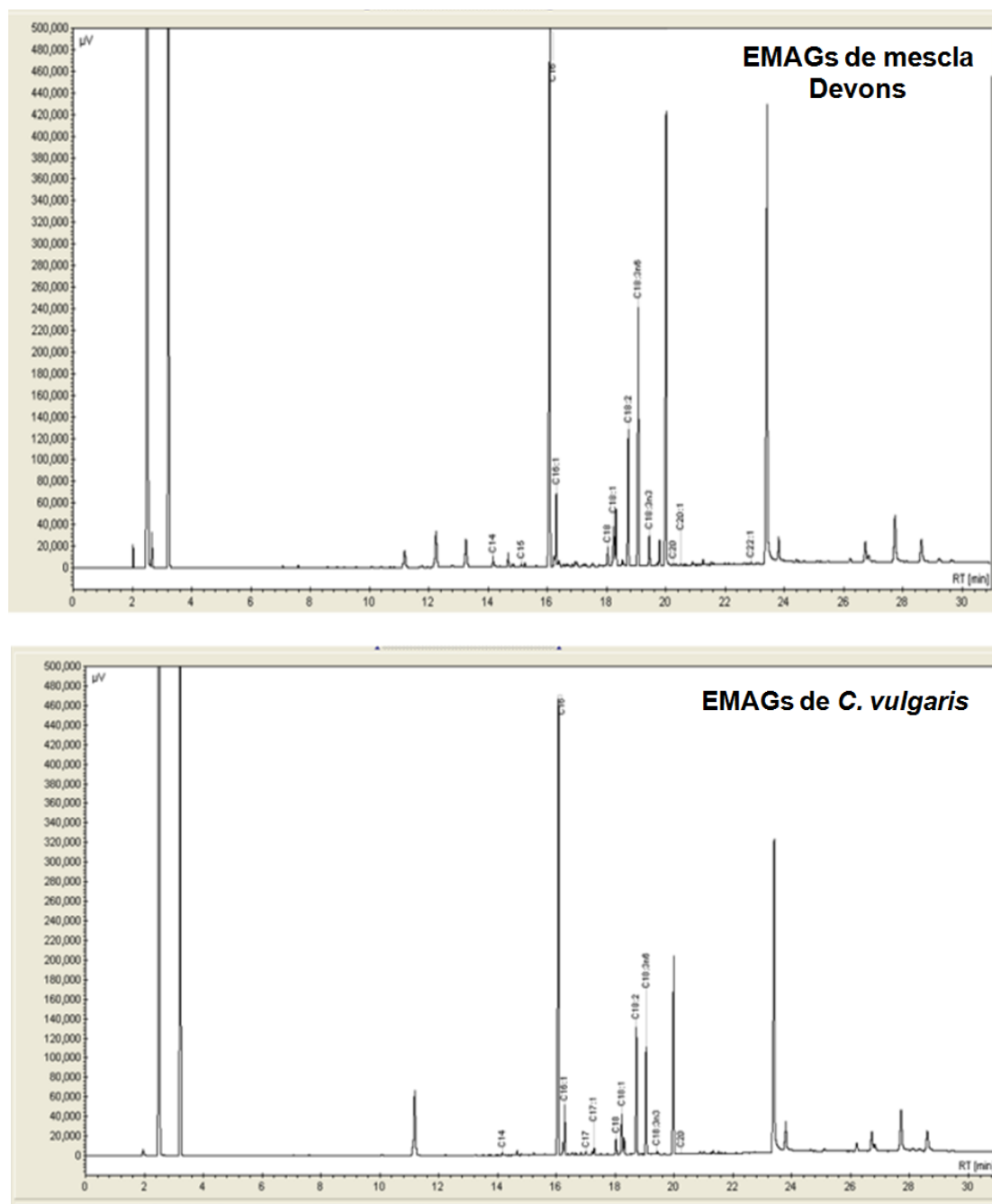


Figura 48 - Perfil em cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de mescla Devons e *Chlorella vulgaris*

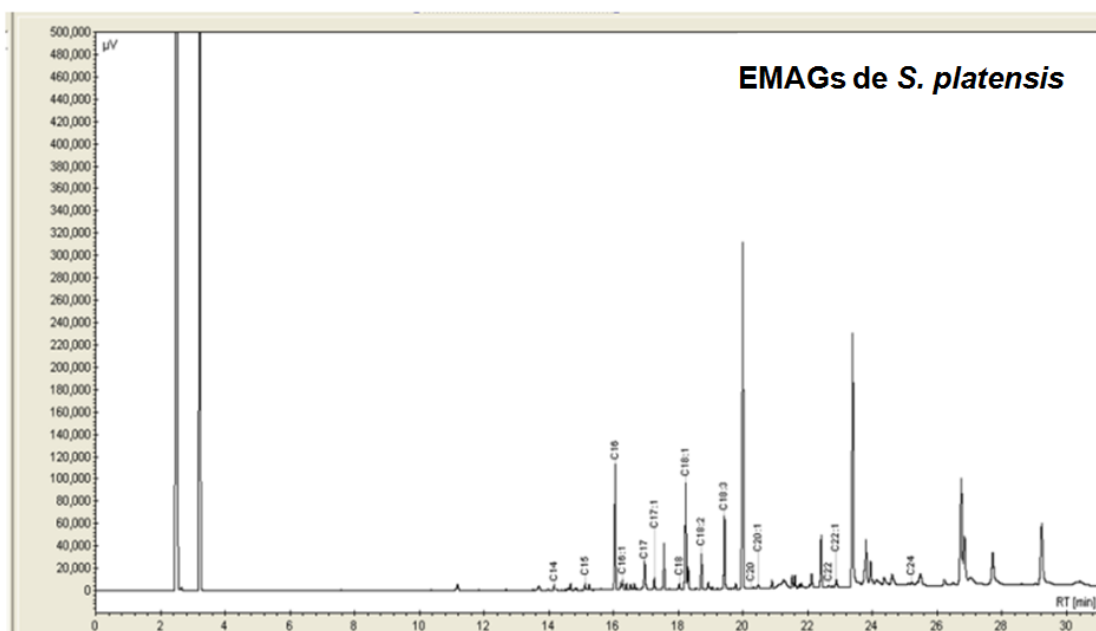


Figura 49 - Perfil em cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de *Spirulina platensis*

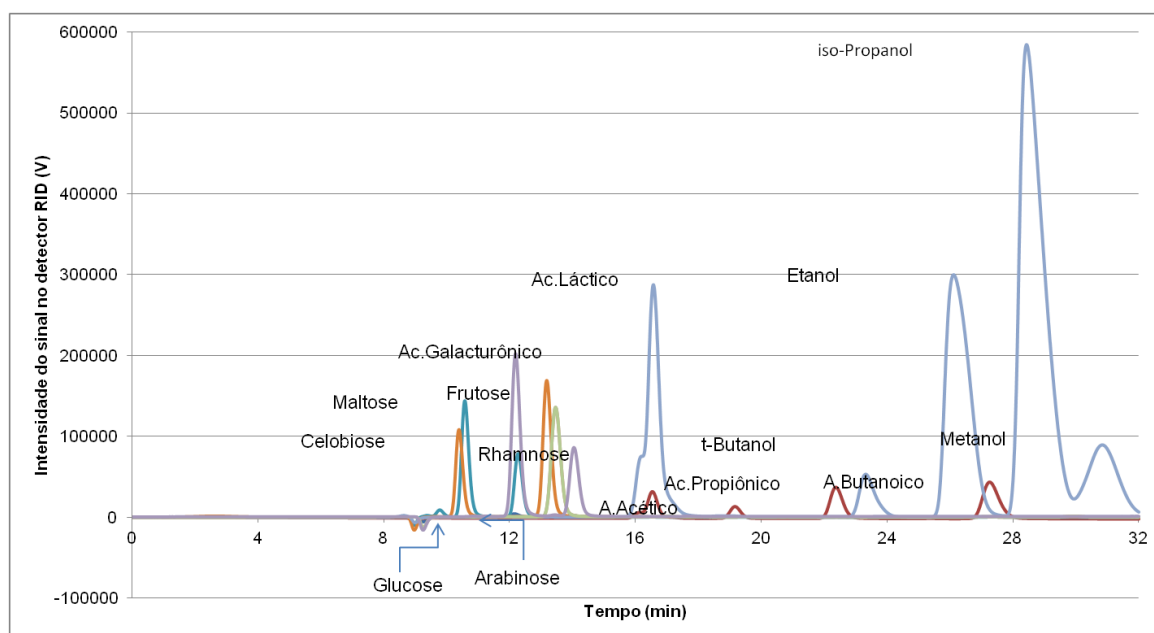


Figura 50 - CLAE dos padrões para as análises do cultivo

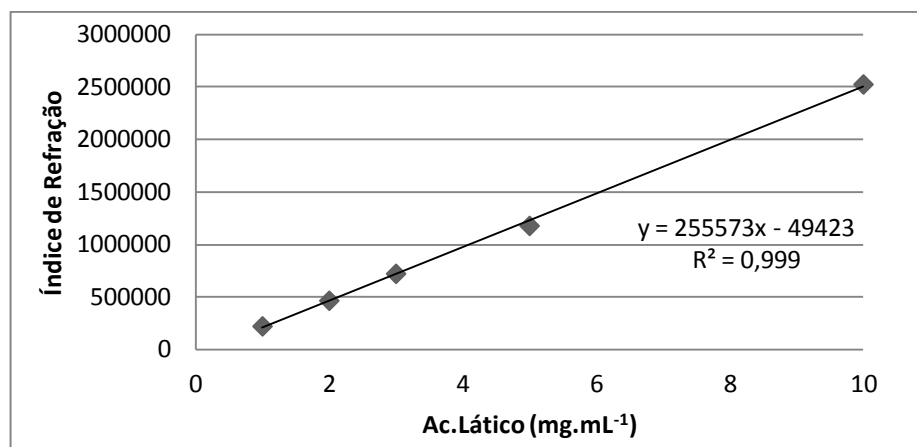


Figura 51 - Curva de calibração do ácido láctico

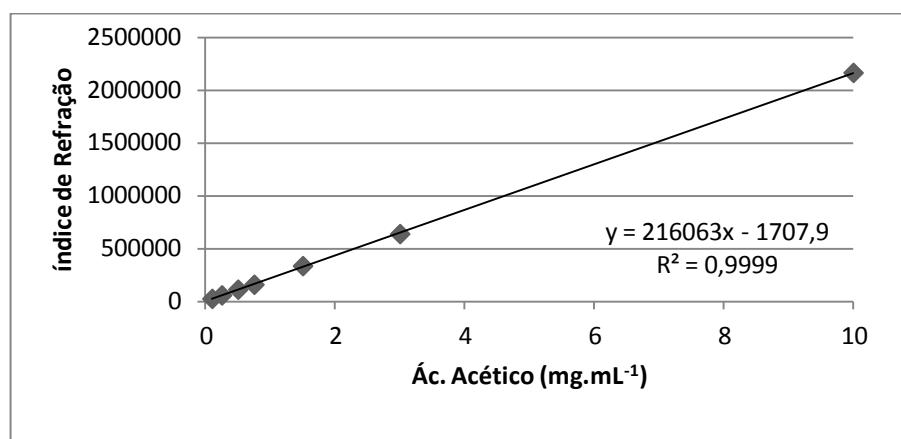


Figura 52 - Curva de calibração do ácido acético

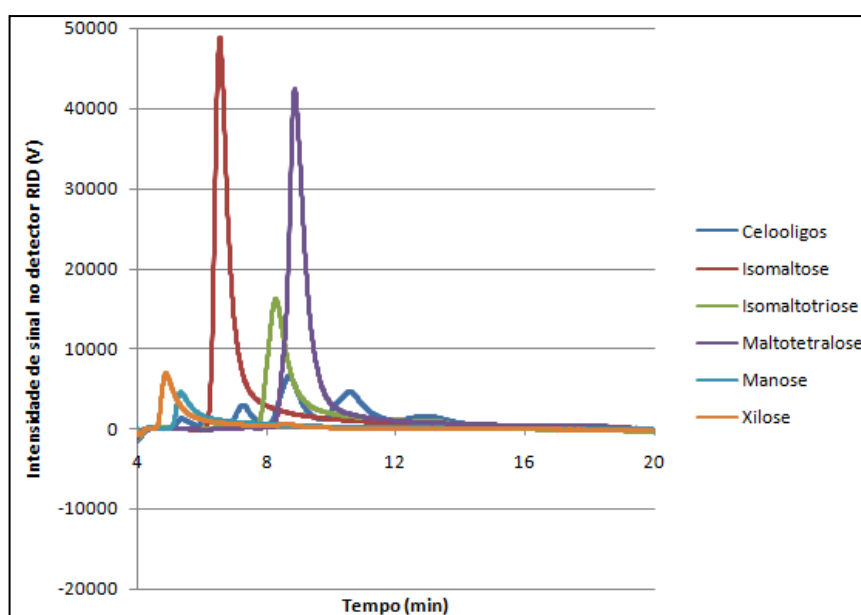


Figura 53 – CLAE dos padrões de oligossacarídeos