

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Aplicação de tecnologias emergentes na extração de compostos de interesse
a partir de microalgas**

- Tese de Doutorado -

Débora Pez Jaeschke

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Aplicação de tecnologias emergentes na extração de compostos de interesse
a partir microalgas**

Débora Pez Jaeschke

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora
em Engenharia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Giovana Domeneghini Mercali

Colaboração: Prof.^a Dr.^a Rosane Rech

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Jaeschke, Débora Pez
Aplicação de tecnologias emergentes na extração de
compostos de interesse a partir de microalgas / Débora
Pez Jaeschke. -- 2019.

165 f.

Orientadora: Ligia Damasceno Ferreira Marczak.

Coorientadora: Giovana Domeneghini Mercali.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química, Porto Alegre,
BR-RS, 2019.

1. ultrassom. 2. campo elétrico moderado. 3.
etanol. 4. campo elétrico pulsado. I. Marczak, Ligia
Damasceno Ferreira, orient. II. Mercali, Giovana
Domeneghini, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado *Aplicação de tecnologias emergentes na extração de compostos de interesse a partir de microalgas*, elaborada por Débora Pez Jaeschke, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Prof^a. Dr^a. Luciane Ferreira Trierweiler

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Ligia e Giovana, pelo apoio e incentivo recebidos ao longo deste trabalho e pelos ensinamentos, que levarei sempre comigo. Obrigada por serem, além de orientadoras, conselheiras e amigas.

Aos colegas e amigos do LATEPA, pela amizade, pelos bons momentos de convivência e pela contribuição com a elaboração desta tese durante as discussões de resultados.

Aos bolsistas de iniciação científica, Laura Loss Bergmann, Gustavo Gregory e Giorgio Rama pelo auxílio na execução dos experimentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS (PPGEQ) pela disponibilização da estrutura física para a execução deste trabalho.

Aos pesquisadores Christian Gusbeth e Wolfgang Frey e ao professor Georg Müller pelos ensinamentos e apoio durante o período do doutorado sanduíche.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

À minha família pelo apoio incondicional para seguir e alcançar os meus objetivos e por estarem sempre presentes.

Ao meu companheiro, Eduardo, pelo apoio emocional e por dividir todas as angústias e alegrias e estar sempre ao meu lado.

Resumo

Devido à crescente demanda por antioxidantes, corantes e compostos bioativos de origem natural, a busca por fontes naturais e renováveis ricas nesses compostos tem se intensificado e as microalgas se apresentam como fonte alternativa de compostos como lipídeos, pigmentos e proteínas. A etapa de extração desses compostos é, normalmente, demorada, sendo necessário, em alguns casos, o uso de solventes tóxicos, o que dificulta a aplicação dos produtos extraídos pela indústria. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar metodologias alternativas de extração de compostos de alto valor agregado a partir de microalgas. Os estudos realizados foram divididos em duas partes: extração de carotenoides e lipídeos da microalga *Heterochlorella luteoviridis* e extração de ficocianinas e proteínas da *Spirulina platensis*. Nos estudos realizados com a *H. luteoviridis*, avaliou-se as tecnologias de campo elétrico moderado (MEF) e ultrassom (US) como pré-tratamentos de extração, seguidos por uma etapa difusiva com etanol, que é considerado um solvente menos agressivo ao meio-ambiente, podendo ser produzido de maneira sustentável. Utilizando o US (40-80 % da intensidade) e etanol (60 – 75 %, v/v) foi possível extrair até 80 % dos carotenoides e 81 % dos lipídeos presentes na microalga. A aplicação de MEF influenciou a extração de carotenoides na faixa de temperatura de 30 – 50 °C, sendo possível extrair até 86 % da concentração total de carotenoides (em relação à extração exaustiva). Na segunda parte do presente trabalho, as tecnologias de campo elétrico pulsado (PEF), US e MEF foram avaliadas como pré-tratamentos de extração e os resultados foram comparados com a extração utilizando moinho de bolas, congelamento e descongelamento e vórtex com bolas de vidro. A aplicação de PEF resultou em extratos de maior pureza (menor concentração de clorofilas) quando comparado aos extratos obtidos com o moinho de bolas, sendo possível extrair quantidades equivalentes utilizando ambos os métodos (até $85,2 \pm 5,7 \text{ mg g}^{-1}$ e $48,4 \pm 4,4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ficocianinas e proteínas, respectivamente). A aplicação do US apresentou rendimentos altos de extração ($45,71 \text{ g g}^{-1}$ de ficocianinas e $44,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteínas), contudo, os extratos apresentaram alta concentração de clorofilas. Os efeitos do MEF foram avaliados em diferentes temperaturas e os resultados mostraram que a aplicação dessa tecnologia ($43 - 53 \text{ V cm}^{-1}$) não teve efeito na extração dos compostos. A desestruturação celular da *Spirulina platensis* ocorre entre 45 e 50 °C, sendo possível extrair até $25,02 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$ de proteínas na temperatura de 50 °C.

Palavras-chave: ultrassom; campo elétrico moderado; etanol; campo elétrico pulsado.

Abstract

The demand for natural antioxidants, dyes and bioactive compounds for food and pharmaceutical applications have been increasing. In this context, microalgae are considered alternative sources of lipids, pigments, proteins and carbohydrates. Conventional extraction methods are normally time consuming and, in some cases, require organic toxic solvents, which are harmful to the environment and represent a contamination risk on food processing. Therefore, the present work aimed to develop alternative extraction methodologies for high value-added compounds from microalgae. This study was divided in two parts: the extraction of lipids and carotenoids from *Heterochlorella luteoviridis* and the extraction of phycocyanins and proteins from *Spirulina platensis*. In the first part, ultrasound (US) and moderate electric field (MEF) were evaluated as pre-treatment extraction technologies followed by a diffusive step with ethanol. The results showed that it was possible to extract 80 % of carotenoids and 81 % of lipids using US (40 – 80 % of intensity) and ethanol (60 – 75 %, v/v). MEF application influenced carotenoids extraction at 30 – 50 °C, extracting up to 86 % of carotenoids. In the second part of the present work, pulsed electric field (PEF), US and MEF were evaluated during a pre-treatment and the results were compared to bead milling, freezing and thawing and vortex with glass beads. PEF resulted in high purity extracts (less chlorophyll concentration) if compared to the extracts obtained with bead milling. Using PEF it was possible to extract the same amount of proteins and phycocyanins that were obtained with bead milling ($85.2 \pm 5.7 \text{ mg g}^{-1}$ and $48.4 \pm 4.4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ of phycocyanins and proteins, respectively). US application resulted in high extraction yields (45.7 g g^{-1} of phycocyanins and $44.2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ of proteins). However, the extracts presented high chlorophyll concentration. MEF effects were evaluated at different temperature conditions and MEF ($43 - 53 \text{ V cm}^{-1}$) did not influence the extraction yield. At 50 °C it was possible to extract up to $25.02 \pm 0.3 \text{ mg}$ of proteins g^{-1} due to cell destruction promoted by temperature effect.

Keywords: ultrasound; moderate electric field; ethanol; pulsed electric field.

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Microscopia das células da <i>H. luteoviridis</i> | 23 |
| Figura 2. Microscopia das células da <i>A. platensis</i> | 24 |
| Figura 3. Principais ácidos graxos sintetizados por microalgas do gênero <i>Chlorella</i> | 26 |
| Figura 4. Estrutura molecular das clorofilas. | 28 |
| Figura 5. Principais carotenoides encontrados em microalgas. | 29 |
| Figura 6. Estrutura molecular das ficocianinas. | 30 |
| Figura 7. Representação de dois hexâmeros, mostrando a localização de cromóforos em diversos pontos da estrutura. | 31 |
| Figura 8. Fenômeno de cavitação, resultante da passagem das ondas de ultrassom em meio líquido. | 38 |
| Figura 9. Esquema de uma célula sofrendo eletroporação reversível e irreversível. | 43 |
| Figura 10. Pré-inóculos realizados previamente ao cultivo nos fotobiorreatores. | 50 |
| Figura 11. Fotobiorreatores durante um cultivo de microalgas. | 50 |
| Figura 12. Curva de calibração para análise de lipídeos pelo método SPV. | 53 |
| Figura 13. Equipamento experimental utilizado para a realização dos experimentos de extração: a) pré-tratamento e b) etapa difusiva. | 54 |
| Figura 14. Esquema das etapas dos experimentos de extração realizados com o ultrassom. | 55 |
| Figura 15. Fotografia do equipamento de MEF usado nos experimentos de cinética de extração de carotenoides. | 59 |
| Figura 16. Esquematização dos experimentos de cinética de extração de carotenoides realizados. | 60 |
| Figura 17. Inóculos preparados para a realização dos experimentos de extração. | 95 |
| Figura 18. Célula utilizada para os tratamentos com PEF. | 97 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19. Aparato experimental utilizado nos experimentos de extração com PEF. | 97 |
| Figura 20. Microscopia das células da <i>A. platensis</i> após tratamento no moinho de bolas. | 99 |
| Figura 21. Moinho de bolas utilizado nos experimentos de extração. | 99 |
| Figura 22. Curva padrão de albumina bovina utilizada para o cálculo da concentração de proteínas nos extratos. | 101 |
| Figura 23. Cultivos a) mantidos na câmara de crescimento e b) após 7 dias. | 103 |
| Figura 24. Amostras previamente à extração com vórtex. | 105 |
| Figura 25. Aparato experimental utilizado nos experimentos de extração com o ultrassom: a) banho de resfriamento, b) banho de aquecimento, c) agitador magnético, d) célula de extração, e) sonda de ultrassom, f) gerador de potência, g) painel de mangueiras. | 106 |

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

| | |
|-----------------------|--|
| <i>A</i> | área dos eletrodos (m ²) |
| <i>d</i> | diâmetro (cm) |
| <i>L</i> | distância entre os eletrodos (m) |
| <i>m</i> | massa (g) |
| <i>m/v</i> | massa/volume |
| <i>MEF</i> | campo elétrico moderado, do inglês <i>moderate electric field</i> |
| <i>MEV</i> | microscopia eletrônica de varredura |
| <i>PC</i> | ficocianinas |
| <i>PCBs</i> | bifenilas policlorados, do inglês <i>polychlorinated biphenils</i> |
| <i>PEF</i> | campo elétrico pulsado, do inglês <i>pulsed electric field</i> |
| <i>PBPs</i> | ficobiliproteínas, do inglês <i>phycobiliproteins</i> |
| <i>PUFAs</i> | ácidos graxos poli-insaturados, do inglês <i>polyunsaturated fatty acids</i> |
| <i>Q</i> | calor total transferido à amostra (<i>J</i>) |
| <i>R</i> | resistência elétrica (Ω) |
| <i>R</i> ² | coeficiente de determinação |
| σ | condutividade elétrica (S m ⁻¹) |
| τ | tempo de duração de um pulso elétrico (s) |
| <i>t</i> | tempo |
| <i>T</i> | temperatura (°C) |
| <i>TAGs</i> | triacilgliceróis |
| <i>U</i> | tensão (V) |
| <i>US</i> | ultrassom |
| <i>V</i> | volume (mL) |
| <i>v/v</i> | volume/volume |
| <i>W</i> | energia específica por pulso |

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 1 - Introdução | 15 |
| Capítulo 2 - Objetivos | 18 |
| 2.1. <i>Objetivo geral</i> | <i>18</i> |
| 2.2. <i>Objetivos específicos.....</i> | <i>18</i> |
| Capítulo 3 - Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica | 21 |
| 3.1 <i>Microalgas</i> | <i>21</i> |
| 3.1.1 Classificação e importância | 21 |
| 3.1.2 Principais compostos sintetizados por microalgas..... | 24 |
| 3.2 <i>Extração de compostos intracelulares.....</i> | <i>33</i> |
| 3.2.1 Processos convencionais de extração sólido-líquido | 33 |
| 3.2.2 Processos alternativos de extração | 37 |
| Capítulo 4 – Extração de compostos intracelulares da microalga <i>Heterochlorella luteoviridis</i> | 49 |
| 4.1 <i>Materiais e métodos.....</i> | <i>49</i> |
| 4.1.1 Cultivo de microalgas | 49 |
| 4.1.2 Extração exaustiva de carotenoides | 51 |
| 4.1.3 Extração exaustiva de lipídeos | 52 |
| 4.1.4 Extração de lipídeos e carotenoides utilizando ultrassom e etanol..... | 54 |
| 4.1.5 Análise dos extratos | 56 |
| 4.1.6 Análises de microscopia eletrônica de transmissão | 58 |
| 4.1.7 Cinética de extração de carotenoides usando campo elétrico moderado | 58 |
| 4.1.8 Análise de carotenoides totais e do perfil de carotenoides nos extratos | 61 |
| 4.2 <i>Artigo 1</i> | <i>61</i> |
| 4.2.1 Introduction..... | 62 |
| 4.2.2 Materials and methods | 63 |
| 4.2.3 Results and discussion | 66 |
| 4.2.4 Conclusions..... | 73 |
| 4.3 <i>Artigo 2</i> | <i>78</i> |
| 4.3.1 Introduction..... | 79 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2 Materials and methods..... | 80 |
| 4.2.3 Results and discussion..... | 83 |
| 4.3.4 Conclusion..... | 91 |
| Capítulo 5 – Extração de compostos intracelulares da <i>Arthrospira platensis</i> | 94 |
| 5.1 Materiais e métodos..... | 94 |
| 5.1.1 Experimentos de extração utilizando PEF..... | 94 |
| 5.2.1 Experimentos de extração utilizando MEF | 102 |
| 5.2 Artigo 3..... | 109 |
| 5.2.1 Introduction | 109 |
| 5.2.1 Materials and methods..... | 111 |
| 5.2.3 Results and discussion..... | 115 |
| 5.2.4 Conclusion..... | 122 |
| 5.3 Artigo 4..... | 128 |
| Capítulo 6 – Considerações finais | 129 |
| Referências bibliográficas..... | 133 |

Capítulo 1 - Introdução

As estratégias globais com relação à redução das emissões de dióxido de carbono e à busca por fontes renováveis de energia vêm motivando a comunidade científica a identificar novas opções sustentáveis e economicamente viáveis como solução para os problemas energéticos discutidos atualmente. Acredita-se que esses objetivos serão atingidos através do desenvolvimento de tecnologias sustentáveis de bioenergia e mitigação de gases atmosféricos. Nesse sentido, as microalgas se apresentam como uma promissora matéria-prima renovável para um grande número de produtos de química fina, nutracêuticos, alimentação animal e cosméticos. A principal vantagem das microalgas é a simplicidade da realização dos cultivos, associada a uma alta eficiência energética; quando cultivadas de maneira autotrófica, necessitam apenas luz, uma fonte de carbono (CO₂) e alguns nutrientes (nitrogênio, fósforo e metais traço) para o crescimento.

Dentre os compostos sintetizados por microalgas, pode-se destacar os pigmentos, como carotenoides e ficocianinas, os ácidos graxos e as proteínas. O consumo de antioxidantes como carotenoides e ficocianinas através da alimentação pode estar relacionado com a diminuição do risco de câncer, esclerose e outras doenças degenerativas; a ingestão de ácidos graxos dos tipos ω -6 e ω -3, por sua vez, pode estar relacionada com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares e do sistema nervoso central e as proteínas de origem microbiológica e vegetal estão sendo cada vez mais procuradas como alternativa às proteínas de origem animal.

Contudo, os métodos de extração dos compostos apolares de interesse, carotenoides e lipídeos, são baseados no uso de solventes orgânicos tóxicos e de origem não renovável, como hexano, clorofórmio, éter de petróleo e éter etílico. O uso desses solventes dificulta ou, até mesmo, limita a aplicação do produto final pela indústria, sendo necessárias, na maioria das vezes, etapas de eliminação completa do solvente e purificação do produto. As ficocianinas e as

proteínas são compostos mais polares, solúveis em água. Entretanto, a baixa purificação dos extratos obtidos é um problema dos métodos comumente usados para a extração.

Nesse contexto, estudos envolvendo tecnologias emergentes vêm sendo realizados com o objetivo de substituir ou diminuir o uso dos solventes tradicionalmente empregados e melhorar a qualidade dos produtos obtidos. As tecnologias de ultrassom, campo elétrico pulsado e campo elétrico moderado vêm sendo avaliadas como alternativas para a extração de compostos intracelulares de microalgas, sendo consideradas tecnologias menos agressivas, que podem contribuir para a minimização do gasto energético.

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo estudar tecnologias emergentes para a extração de lipídeos e carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis* e a extração de ficocianinas e proteínas da *Spirulina platensis*, comparando os resultados obtidos com métodos convencionais de extração. O presente trabalho está estruturado conforme descrito a seguir.

No Capítulo 2 são apresentados os objetivos, geral e específicos, do trabalho. No Capítulo 3 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a importância das microalgas, bem como sobre os principais compostos sintetizados por esses microrganismos e os métodos para a sua extração: convencionais e aqueles que usam as tecnologias de ultrassom e campo elétrico moderado como métodos de pré-tratamento.

O Capítulo 4 apresenta os estudos de extração da microalga *Heterochlorella luteoviridis*, abordando as metodologias de extração exaustivas de lipídeos e carotenoides e as metodologias de extração utilizando as tecnologias emergentes: pré-tratamentos com ultrassom e campo elétrico moderado. Também são apresentadas as metodologias empregadas para quantificação de carotenoides e lipídeos, e identificação dos carotenoides e ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nos extratos obtidos. Os resultados estão apresentados na forma de dois artigos científicos. O primeiro artigo é referente ao estudo do ultrassom como método de pré-tratamento de extração de lipídeos e carotenoides, e o segundo artigo aborda os efeitos do campo elétrico moderado e da temperatura na extração de carotenoides.

No Capítulo 5 são apresentados os estudos de extração de compostos da *Spirulina platensis*. Esses estudos estão relacionados com a extração de ficocianinas e proteínas utilizando campo elétrico pulsado, ultrassom, campo elétrico moderado, congelamento e descongelamento e vórtex com bolas de vidro. Os resultados são apresentados na forma de dois artigos científicos; o primeiro, relacionado à aplicação de campo elétrico pulsado e moinho de bolas e o segundo, à extração utilizando as demais metodologias.

No Capítulo 6 é apresentada uma comparação das tecnologias utilizadas no presente trabalho, apontando as principais vantagens e desvantagens de cada uma. Finalmente, o Capítulo 7 apresenta as principais conclusões do presente trabalho e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2 - Objetivos

2.1. *Objetivo geral*

Este trabalho de doutorado tem como objetivo geral avaliar métodos alternativos de extração de compostos de alto valor agregado a partir de microalgas.

2.2. *Objetivos específicos*

Considerando o objetivo geral apresentado acima, este trabalho tem como objetivos específicos:

- avaliar a tecnologia de ultrassom como método de pré-tratamento de extração de lipídeos e carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis*, identificando as melhores condições de operação do equipamento para a realização da extração;
- identificar as melhores condições de concentração de etanol durante uma etapa difusiva do processo de extração;
- avaliar o efeito do campo elétrico moderado e da temperatura na extração de carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis*, identificando as melhores condições de operação do equipamento para a realização da extração;
- comparar os resultados obtidos para as tecnologias de ultrassom e campo elétrico moderado com métodos convencionais de extração de carotenoides e lipídeos;
- avaliar a tecnologia de campo elétrico pulsado como método de extração de ficocianinas e proteínas da *Spirulina platensis*, identificando as melhores condições para a extração;
- avaliar a tecnologia de campo elétrico moderado como método de extração de ficocianinas e proteínas da *Spirulina platensis*, identificando as melhores condições para a extração;

- avaliar a tecnologia de ultrassom como método de extração de ficocianinas e proteínas da *Spirulina platensis*, identificando as melhores condições para a extração;
- comparar as tecnologias elétricas e o ultrassom com os métodos de extração convencionais: moinho de bolas e congelamento e descongelamento;
- identificar, a partir dos resultados obtidos, a tecnologia emergente mais promissora para a extração de cada um dos comostos avaliados;
- obter extratos ricos em carotenoides e lipídeos, a partir da *Heterochlorella luteoviridis*, sem a utilização de solventes orgânicos tóxicos.
- obter extratos purificados e ricos em ficocianinas e proteínas a partir da *Spirulina platensis*.

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre as microalgas e os principais compostos de interesse sintetizados por esses microrganismos. Além disso, são abordados aspectos relacionados aos processos de extração desses compostos: os métodos convencionais e a extração assistida pelas tecnologias de ultrassom, campo elétrico moderado e campo elétrico pulsado.

3.1 Microalgas

3.1.1 Classificação e importância

Microalgas são microrganismos unicelulares, comumente encontradas em águas doces e salgadas que podem crescer rapidamente e se adaptar a diferentes condições ambientais devido à simplicidade de sua estrutura celular. O grupo das microalgas, com número de espécies entre 200.000 a 800.000, compreende microrganismos eucarióticos e procarióticos (cianobactérias). Devido à estrutura celular simples, esses microrganismos são capazes de converter a energia solar de maneira rápida e eficiente, sendo responsáveis por metade da atividade fotossintética terrestre. A classificação dos diferentes grupos de algas ainda é controversa, mas classifica-se o grupo das algas, predominantemente, de acordo com a composição de pigmentos, o perfil dos compostos sintetizados por cada uma das espécies e características estruturais (Kim, 2015).

As microalgas são consideradas microrganismos de crescimento rápido, podendo realizar de uma a duas divisões celulares por dia. Além disso, esses microrganismos possuem potencial para geração de energia a partir de recursos renováveis e processos biotecnológicos, com produtividade maior do que grandes plantas, com baixo consumo de água e possibilidade de cultivo em terras não aráveis (Chew *et al.*, 2017).

A classificação taxonômica mais comumente utilizada diferencia as microalgas conforme a pigmentação da estrutura celular de cada filo: *Chlorophyta* (algas verdes),

Rhodophyta (algas vermelhas), *Cyanophyceae* (algas azuis) e *Pheophyceae* (algas marrons). A microalga *Heterochlorella luteoviridis*, estudada no presente trabalho, faz parte do filo *chlorophyta*, classe *Trebouxiophyceae* (mesmo filo e classe das microalgas do gênero *Chlorella*). Desde a descoberta da espécie *Chlorella vulgaris*, um grande número de espécies tem sido isoladas e, equivocadamente, inserido no gênero *Chlorella*, principalmente por similaridades morfológicas. Esse foi o caso da espécie primeiramente classificada como *Chlorella luteoviridis* que foi, recentemente, renomeada *Heterochlorella luteoviridis* (Champenois *et al.*, 2015). Na literatura são encontrados poucos estudos com relação à microalga *Heterochlorella luteoviridis* (ou *C. luteoviridis*). Portanto, neste trabalho frequentemente serão usados, a título de comparação, estudos relacionados a outras espécies do gênero *Chlorella*, devido à falta de informações da espécie em estudo.

Vale mencionar que a microalga *Heterochlorella luteoviridis* (até então *C. luteoviridis*), juntamente com as espécies *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris*, são listadas no *Novel Food Catalogue* (União Européia) como espécies que têm sido comercializadas e consumidas antes de 1997; na prática, isso significa que tanto as microalgas quanto os produtos que contém essas espécies de microalgas são considerados seguros e, portanto, não necessitam de regulamentação pelo *Novel Food Regulation* para a sua comercialização. Ainda, devido à falta de estudos relacionados com a *H. luteoviridis*, os dados de caracterização disponíveis são os encontrados no presente trabalho e em trabalhos do mesmo grupo de pesquisa. Essa microalga é capaz de sintetizar uma quantidade considerável de carotenoides ($1,2 - 3 \text{ mg g de biomassa}^{-1}$), principalmente luteína, que corresponde a 35-50 % do conteúdo total de carotenoides da microalga (Jaeschke *et al.*, 2016a; Diprat *et al.*, 2017). Segundo Diprat *et al.* (2017), a composição aproximada da *H. luteoviridis* é de: 41 % de carboidratos, 29 % de proteínas, 11 % de lipídeos e 14 % de cinzas.

Na Figura 1 é apresentada uma microscopia das células de *H. luteoviridis*; essas microalgas possuem estrutura cocóide, unicelular e não flagelada, e o diâmetro das células varia entre 10 e 20 μm . A estrutura celular externa é composta por membrana e parede celular, sendo que algumas espécies possuem duas paredes celulares. A parede celular das *Chlorellas* é composta principalmente por proteínas, lipídeos, α -celulose, hemicelulose e glucosamina (NORTHCOTE *et al.*, 1960).

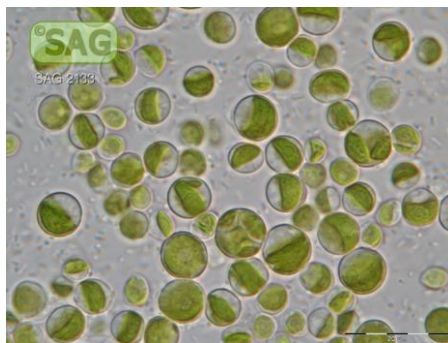


Figura 1. Microscopia das células da *H. luteoviridis*.

Fonte: SAG (*Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen*)

Além da *H. luteoviridis*, a cianobactéria *Arthrospira platensis*, popularmente conhecida como *Spirulina platensis*, também foi utilizada neste trabalho. As cianobactérias pertencem ao reino *Monera*, filo *Cyanophyta* e são uma das formas mais primitivas de vida terrestre. Sua estrutura é procariótica e, diferentemente dos outros grupos de bactérias, realizam fotossíntese. Assim, muitos autores consideram que esses microrganismos pertencem ao grupo das microalgas, sendo comumente chamadas de microalgas verde-azuladas (Kim, 2015). Essa consideração também será adotada no presente trabalho.

As microalgas do gênero *Spirulina* são filamentosas e reconhecidas pela organização das células em múltiplos tricomas cilíndricos, formando uma hélice espiral ao longo do comprimento do microrganismo. A reprodução acontece por divisão binária, sendo formados novos hormonia e dando início a novas células. No citoplasma das células, pode-se encontrar principalmente vacúolos e tilacoides (Ali and Saleh, 2012). A parede celular da *Spirulina* é análoga à das bactérias gram-positivas; a estrutura é composta por duas membranas, celular e citoplasmática, separadas por uma camada de peptidoglicanos e lipopolissacarídeos. A membrana celular contém proteínas covalentemente ligadas aos lipídeos, e a membrana citoplasmática é formada por lipoproteínas (Singh *et al.*, 2005). Na Figura 2 é apresentada uma microscopia das células de *A. platensis*.

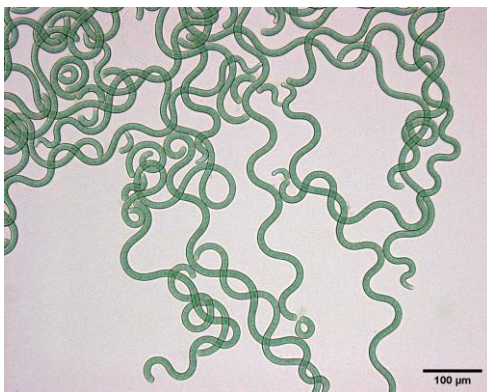


Figura 2. Microscopia das células da *A. platensis*.

Fonte: a autora.

Nos últimos anos, a *Spirulina* tem recebido atenção devido ao seu valor nutricional. Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*), a *Spirulina* é uma das melhores fontes de proteínas, além de ser citada pela NASA e pela *European Space Agency* como um dos principais alimentos a ser considerados para missões espaciais (Patel *et al.*, 2017; Soni *et al.*, 2017). Além disso, o perfil de aminoácidos da *Spirulina* chama a atenção, uma vez que essa cianobactéria é capaz de sintetizar todos os aminoácidos essenciais (Ovando *et al.*, 2018). A composição química das células de *Spirulina* é de 55-70 % de proteínas, 15 – 25 % de carboidratos, 5 – 18 % de lipídeos (Ali and Saleh, 2012; Pohndorf *et al.*, 2016), podendo ser variável em função da composição do meio de cultivo.

A seguir são apresentados com maiores detalhes os compostos de interesse sintetizados por microalgas que serão abordados no presente trabalho.

3.1.2 Principais compostos sintetizados por microalgas

Algumas espécies de microalgas acumulam compostos de alto valor agregado e de interesse tecnológico. Esses compostos podem ser consumidos através da ingestão direta da microalga, como realizado na aquacultura, e, recentemente, na alimentação humana. Além disso, pode-se realizar a extração dos compostos com o objetivo de aplicá-los como aditivos na indústria de alimentos ou farmacêutica, por exemplo (Richmond, 2004; Valverde *et al.*, 2016).

A concentração dos compostos nas células das microalgas varia conforme a espécie e as condições de cultivo (Valverde *et al.*, 2016). Nesta revisão bibliográfica, serão abordados maiores detalhes com relação aos lipídeos, aos pigmentos e às proteínas, compostos de estudo do presente trabalho.

Lipídeos

Os lipídeos são classificados como compostos insolúveis em água e solúveis na maioria dos solventes orgânicos. A classe dos lipídeos inclui os lipídeos neutros (triacilgliceróis - TAGs, esteróis e ácidos graxos livres) e polares (fosfolipídeos e glicolipídeos) (Fennema *et al.*, 2007; Akoh e Min, 2008). De maneira geral, as microalgas utilizam os lipídeos neutros como reserva de energia e os polares na formação das membranas plasmáticas.

A síntese de lipídeos polares e TAGs pode ocorrer nos cloroplastos ou no retículo endoplasmático, dependendo da espécie de microalga. Os lipídeos polares normalmente são acumulados nas membranas plasmáticas (do citoplasma, retículo endoplasmático, tilacóides, cloroplastos e mitocôndrias), enquanto que os TAGs são comumente armazenados nos plastídeos ou no citoplasma na forma de gotículas de lipídeos (Schüler *et al.*, 2017).

Além da produção de biodiesel, finalidade bastante estudada para os lipídeos (TAGs) sintetizados por microalgas, os ácidos graxos poli-insaturados, produzidos por algumas espécies de microalgas, são de grande interesse comercial para aplicação como aditivos alimentares. A maioria dos ácidos graxos encontrados em microalgas são saturados e monoinsaturados, sendo os poli-insaturados (PUFAs, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) normalmente encontrados em concentrações mais baixas.

As *Chlorellas* sintetizam normalmente os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Dentre esses, podemos destacar os ácidos graxos poli-insaturados do tipo ω -3 e ω -6 (ácidos linolênico e linoleico, respectivamente), considerados ácidos graxos essenciais, não sintetizados por espécies mamíferas (D'Alessandro e Antoniosi Filho, 2016; Chew *et al.*, 2017). Ainda, algumas microalgas são capazes de sintetizar e acumular os ácidos graxos eicosapentaenoico (C20:3, EPA) e docosaenoico (C22:6, DHA), considerados ácidos graxos importantes para atividades neuronais. Na Figura 3 são apresentadas as estruturas moleculares dos principais ácidos graxos sintetizados por microalgas do gênero *Chlorella*.

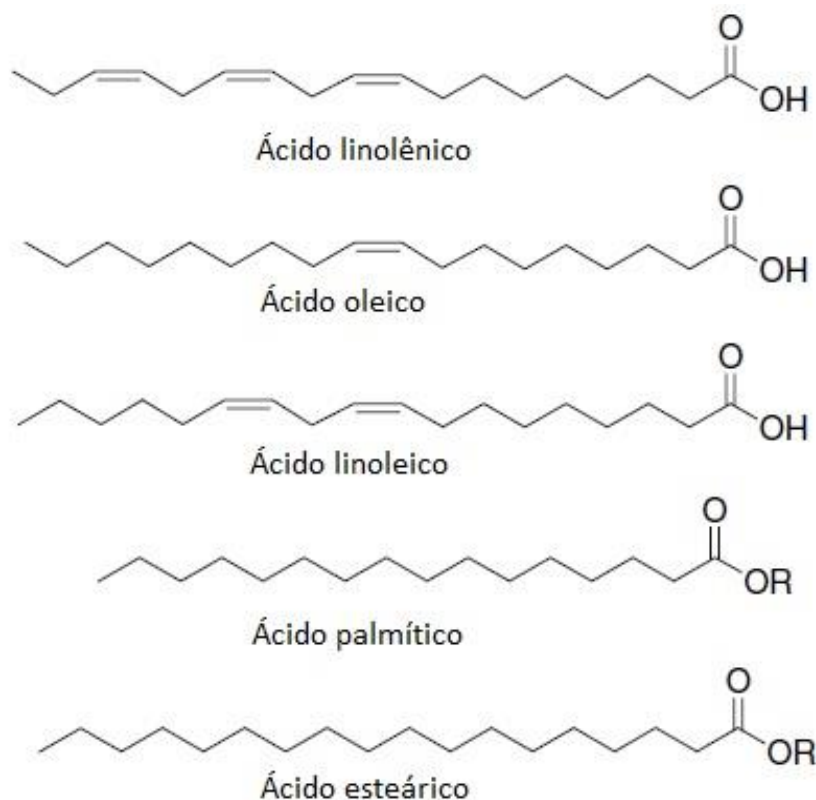


Figura 3. Principais ácidos graxos sintetizados por microalgas do gênero *Chlorella*.

Fonte: adaptado de Macías *et al.* (2007).

As microalgas são fonte primária de ácidos graxos ω -3 e ω -6 nos oceanos, sendo fonte vegana desses compostos. Além disso, plantas e animais marinhos são a principal fonte de ácidos graxos ω -3 disponível para o consumo humano, enquanto que os ácidos graxos do tipo ω -6 podem ser encontrados, principalmente, em vegetais. Foram encontrados diversos estudos que avaliam o perfil de ácidos graxos de diferentes microalgas. Praveenkumar *et al.* (2014) determinaram o perfil de ácidos graxos da microalga *Chlorella sp.* em diferentes condições de cultivo. Para todas as condições avaliadas, os ácidos graxos majoritários foram o ácido linoleico e o ácido palmítico, representando $21,1 \pm 5,7$ e $20,6 \pm 4,9$ % do conteúdo total de lipídeos, respectivamente. Ohse *et al.* (2015) avaliaram o perfil de ácidos graxos da microalga *Chlorella vulgaris*. Os ácidos graxos majoritários foram o ácido palmítico (C16:0, 21,17 %) e ácido linolenico (C18:2n6, 22,71 %); também foram identificados os ácidos esteárico (C18:0, 15,5 %), oleico (C18:1n9, 13,5 %) e linoleico (C18:3n3, 7,4 %).

Cianobactérias do gênero *Spirulina* apresentam concentração de lipídeos inferior ao sintetizado por *Chlorellas*. Normalmente, a concentração de lipídeos na *Spirulina* é da ordem

de 5 % a 18 % (Pohndorf *et al.*, 2016; de Jesus *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). No presente trabalho a extração de lipídeos será avaliada somente para a *H. luteoviridis*, motivo pelo qual essa revisão bibliográfica não apresenta mais detalhes sobre o perfil de ácidos graxos da *Spirulina platensis*.

Pigmentos

Os principais pigmentos encontrados nas microalgas do gênero *Chlorella* são as clorofilas (*a*, *b*, e *c*) e os carotenoides. As clorofilas são pigmentos apolares, de coloração verde, responsáveis pela conversão da energia solar em energia química durante a fotossíntese. A estrutura básica da clorofila é um anel porfirina, ligado a um grupo fitol e a um íon de magnésio, no centro da molécula (Figura 4). As clorofilas são pigmentos estáveis na natureza, mas quando extraídos de plantas, são sensíveis à presença da luz, calor, oxigênio, ácidos e algumas enzimas (Petrović *et al.*, 2017).

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis amplamente encontrados na natureza, sendo responsáveis pelas colorações amarela, laranja e vermelha de vegetais. A estrutura química das moléculas de carotenoides consiste em unidades de isopreno ligadas entre si, normalmente totalizando 40 carbonos, resultando em moléculas simétricas. A principal característica das moléculas de carotenoides é o sistema de duplas ligações conjugadas que possibilita o deslocamento dos elétrons π ao longo de toda a cadeia carbônica. Na Figura 5 são apresentadas as estruturas moleculares dos principais carotenoides encontrados em microalgas.

Os carotenoides são divididos em dois grupos: carotenos e xantofilas. As xantofilas possuem grupos hidroxila ou grupos cetona ligados à estrutura principal de carbonos, enquanto os carotenos possuem somente carbono e hidrogênio em sua estrutura. Nas plantas, alguns carotenoides, chamados de carotenoides primários, como a luteína, atuam como pigmentos auxiliares na fotossíntese e estão associados a componentes estruturais e funcionais do sistema fotossintético das células, sendo localizados nas membranas dos tilacoides. Esses compostos são capazes de transferir a energia absorvida para as clorofilas, aumentando o espectro de absorção de luz de algas e plantas. Os carotenoides secundários, como astaxantina e cantaxantina, desempenham papel de proteção oxidativa das células e são produzidos em maiores quantidades quando a célula se encontra em alguma situação de estresse. Nesses casos, esses pigmentos são acumulados, normalmente, junto com as gotículas de lipídeos, no citoplasma.

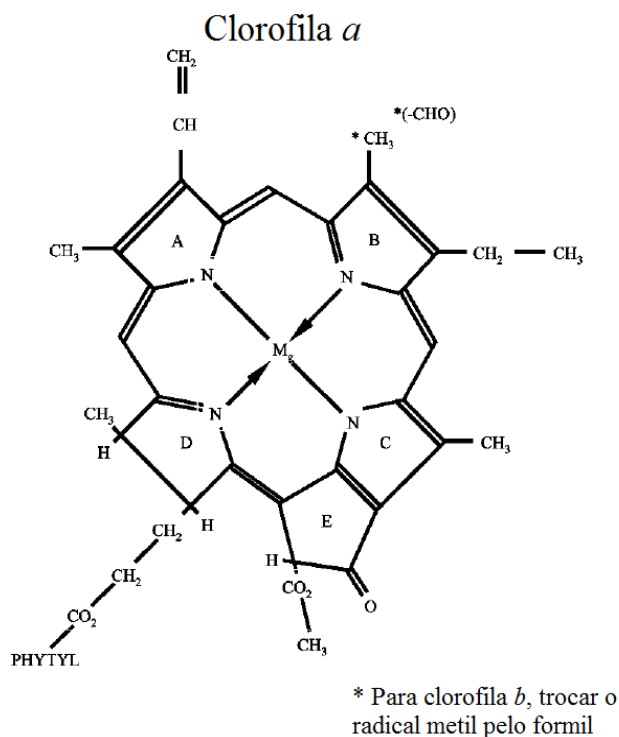


Figura 4. Estrutura molecular das clorofilas.

Fonte: adaptado de Humphrey (2006).

Durante o processo de envelhecimento natural de grandes plantas e microalgas, ocorrem mudanças no sistema fotossintético, incluindo a degradação de clorofilas e carotenoides primários. A degradação dos carotenoides, no entanto, ocorre em velocidades mais baixas do que a degradação das clorofilas. Nas microalgas, essas condições de degradação do sistema fotossintético também podem ocorrer em situações de alta luminosidade e, nesses casos, normalmente ocorre o aumento da síntese de carotenoides secundários, devido ao estresse oxidativo favorecido pela alta iluminação (Gross, 1991).

Devido à alta reatividade das moléculas de carotenoides com radicais livres, os carotenoides possuem função antioxidante, e muitos estudos relatam benefícios à saúde associados ao consumo desses pigmentos (Britton, 1995; Jomova and Valko, 2013). A luteína, carotenoide majoritário da microalga *Heterochlorella luteoviridis*, objeto de estudo deste trabalho, está relacionada com a diminuição dos riscos de desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares e doenças maculares (Gong and Bassi, 2016; Peng *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2017). Devido a esses efeitos benéficos, o interesse nos carotenoides para a aplicação em alimentos como aditivos alimentares, em medicamentos e cosméticos vem aumentando nos últimos anos. Na indústria de alimentos, umas das principais aplicações é o uso de carotenoides

como corantes, porém seu uso pode ser limitado devido à menor intensidade de cor e à menor estabilidade das moléculas extraídas de vegetais, além do custo mais elevado desse tipo de corante, quando comparado aos corantes sintéticos (Dufossé *et al.*, 2005).

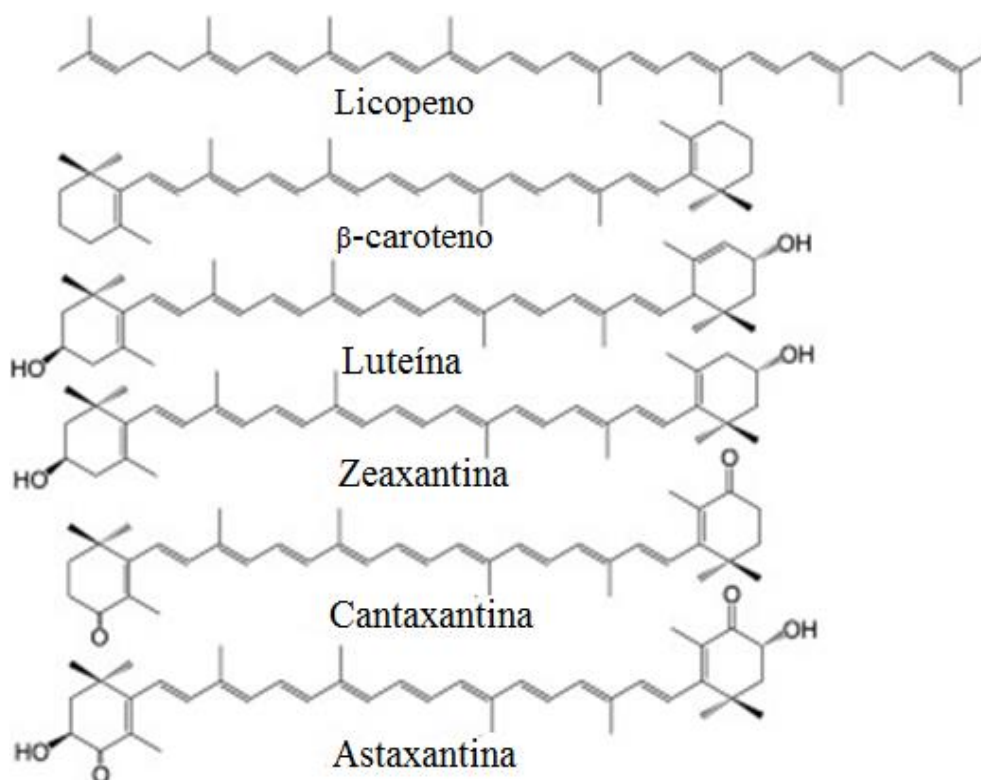


Figura 5. Principais carotenoides encontrados em microalgas.

Fonte: adaptado de Gong e Bassi (2016).

Os pigmentos encontrados nas cianobactérias são a clorofila *a* e as ficobiliproteínas (PBPs). As ficobiliproteínas são moléculas solúveis em água, formadas por proteínas e cromóforos, chamados de ficobilinas. De acordo com os picos de absorção máximos, as ficobiliproteínas podem ser classificadas como: ficoeritrinas (565-575 nm), ficoeritrocianinas (575 nm), ficocianinas (615-640 nm) e aloficocianinas (650-655 nm) (Sidler, 1994). As ficocianinas são as principais PBPs encontradas na *Spirulina* e são compostas por um grupo proteico e um tetrapírol de cadeia aberta (ficocianobilina) que contém o cromóforo responsável pela coloração azul dessas moléculas, como mostra a Figura 6. Nas cianobactérias, as PBPs estão associadas à superfície externa dos tilacoides, fazendo parte do sistema fotossintetizante II, transferindo a energia absorvida para a clorofila *a*.

As ficocianinas estão presentes em cianobactérias, algas vermelhas e *cryptomonas*. De acordo com a fonte de obtenção das ficocianinas elas são classificadas em três grupos: C-

ficocianinas, de cianobactérias, R-ficocianinas, de algas vermelhas (*rodophytas*) ou C-ficocianinas II, de *cryptomona*. Na *Spirulina*, as C-ficocianinas podem constituir até 30 % da massa dessa microalga (Fernández-Rojas *et al.*, 2014).

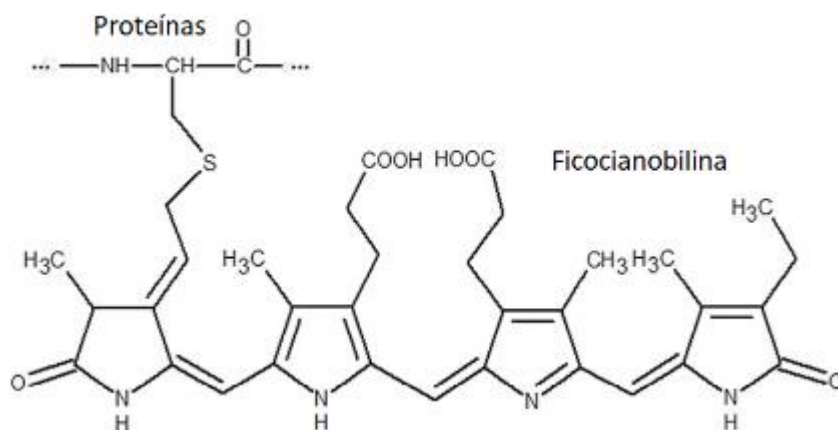


Figura 6. Estrutura molecular das ficocianinas.

Fonte: adaptado de Fernández-Rojas *et al.* (2014).

As PBPs são constituídas de duas subunidades diferentes, α e β , que se encontram em quantidades estequiométricas, formando o monômero $\alpha\beta$. Essas subunidades diferem entre si pelo número e sequência de aminoácidos e pelo cromóforo que se encontra ligado a essa estrutura; até três cromóforos podem estar ligados a um único peptídeo α ou β . As subunidades α e β possuem massa molecular que variam de 18 a 20 kDa e 19,5 a 21 kDa, respectivamente. As unidades base de todas as PBPs são os trímeros, $(\alpha\beta)_3$, que podem se unir formando hexâmeros $(\alpha\beta)_6$. Nas cianobactérias, os trímeros e hexâmeros são unidos em PBPs devido a ligações com peptídeos, chamados *linkers*. Os *linkers* não estão ligados aos cromóforos e constituem cerca de 10-20 % das proteínas das PBPs. O estado de agregação das PBPs depende da concentração, pH e concentração iônica do meio em que se encontram e afeta a posição e a intensidade do pico de máxima absorvância (Sidler, 1994). A Figura 7 apresenta a estrutura das PBPs, mostrando dois hexâmeros e cromóforos.

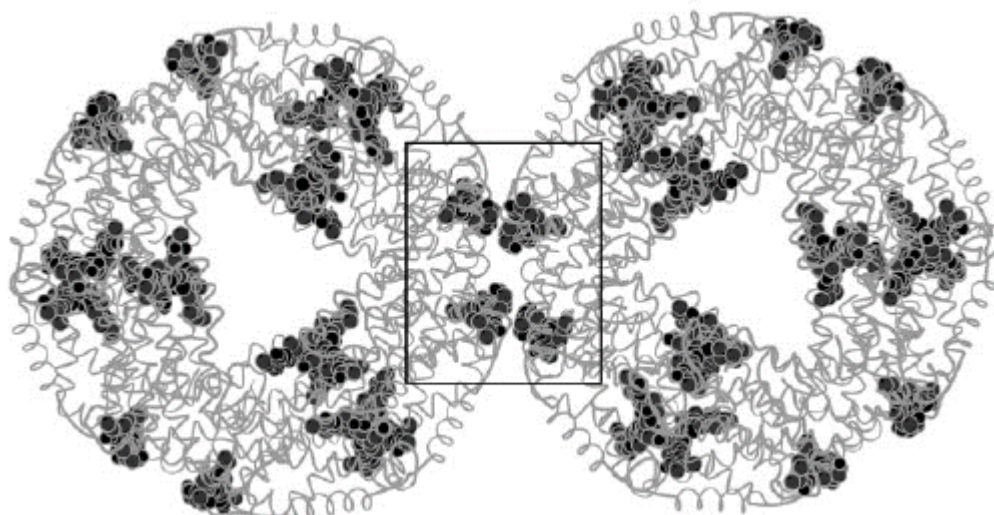


Figura 7. Representação de dois hexâmeros, mostrando a localização de cromóforos em diversos pontos da estrutura.

Fonte: adaptado de Padyana *et al.* (2001).

As C-ficocianinas são pigmentos azuis obtidos a partir de *Spirulina* que podem ser utilizadas como corante natural em alimentos, como em gomas, produtos lácteos e geleias. Além disso, esses compostos são considerados antioxidantes, uma vez que as ficocianinas apresentam reatividade contra espécies reativas de oxigênio ($\cdot\text{OH}$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, entre outros) e inibem a peroxidação lipídica. Essa propriedade se deve não somente às ficocinias, mas às proteínas que também reagem com radicais livres. Estudos *in vitro* demonstraram que as ficocianinas possuem propriedades anti-inflamatórias e antioxidante, prevenindo a oxidação de células neuronais, hepáticas, cardíacas e renais, além de efeito de redução da proliferação de células cancerígenas (Fernández-Rojas *et al.*, 2014). A concentração de ficocianinas na *Spirulina* pode variar de 50 a 200 mg g⁻¹ (Martínez *et al.*, 2017; İlter *et al.*, 2018; Manirafasha *et al.*, 2018).

Proteínas

As proteínas são polímeros formados por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. A cadeia linear de aminoácidos se conforma em uma estrutura tridimensional determinada pela sequência de aminoácidos na cadeia. Devido a interações intramoleculares, como pontes de hidrogênio, de enxofre e pontes salinas, a estrutura se dobra em uma estrutura secundária, como a α -hélice. Essas forças intramoleculares causam um compactamento da estrutura molecular ainda maior, formando uma estrutura terciária. Quando há mais de uma cadeia polipeptídica, a

interação entre as subunidades forma agregados mais complexos, formando uma estrutura quaternária.

As proteínas presentes na *Spirulina* possuem tamanho variando entre 25 e 10 kDa e a concentração desses compostos nas células pode chegar a 70 % (Soni *et al.*, 2017). Algumas espécies de *Chlorella*, por exemplo, também sintetizam quantidades consideráveis de proteínas. Contudo, no presente trabalho, somente a *Spirulina* será avaliada quanto à extração de proteínas.

Nas células vegetais e de microrganismos, as proteínas estão localizadas no citoplasma, nas membranas celulares e na forma de complexos proteicos. As microalgas e cianobactérias possuem em sua composição, principalmente, proteínas estruturais e enzimáticas, diferentemente de grandes plantas, que contém principalmente proteínas de reserva. Dessa forma, a classificação das proteínas em microrganismos é mais complexa do que nas plantas, apresentando maior heterogeneidade em termos de cargas, hidrofobicidade e complexação. Normalmente, as enzimas RuBisCo correspondem à maioria das proteínas solúveis em microrganismos e as proteínas não solúveis são proteínas de membranas celulares (Tamayo Tenorio *et al.*, 2018). Na *Spirulina*, as proteínas ligadas às ficocianinas compreendem normalmente de 20 a 30 % do total de proteínas (Fernández-Rojas *et al.*, 2014).

O interesse nas proteínas para utilização na indústria de alimentos depende de diversos fatores, como o valor nutricional e as propriedades tecnológicas e funcionais desses compostos. O valor nutricional das proteínas depende do perfil de aminoácidos e da biodisponibilidade, que está relacionada com a fração de compostos disponíveis para serem absorvidos por organismos e utilizados em diversas funções fisiológicas. Dentre os aminoácidos existentes, 9 são considerados essenciais para a saúde humana: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina; esses aminoácidos essenciais podem ser sintetizados pela *Spirulina* (Vernès *et al.*, 2019). As propriedades tecno-funcionais das proteínas estão relacionadas com as propriedades físico-químicas dessas moléculas e determinam a solubilidade, a capacidade de formação de espuma, propriedades emulsificantes e de formação de gel, entre outras (Soto-Sierra *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que a demanda atual de proteínas é estimada em 202 milhões de toneladas anuais e, com o aumento da população mundial, esse número aumenta a cada ano. Como a maior parte das proteínas consumidas atualmente é de origem animal, torna-se necessário buscar fontes alternativas desses compostos para o suprimento dessa crescente

demanda. Associado a esse fato, tem-se o aumento da procura por alimentos de origem sustentável, com propriedades nutracêuticas favoráveis e de origem vegana. Por esses motivos, as microalgas são consideradas fontes alternativas de proteínas. Contudo, para viabilizar a utilização de proteínas vegetais e microbiológicas pela indústria, é necessário o desenvolvimento de tecnologia, tanto de extração quanto para a avaliação das propriedades dos compostos extraídos, uma vez que produtos proteicos devem ser investigados quanto à alergenidade, toxicidade, presença de *off-flavors* e compostos anti-nutricionais (Pojić *et al.*, 2018).

No caso das microalgas, a ingestão de proteínas e outros compostos intracelulares pode ser realizada pelo consumo direto da biomassa *in natura*. Essa é a forma mais popular de consumo e é realizada desde a antiguidade. Contudo, a presença de parede celular, principalmente a parede celulósica, reduz a digestibilidade da biomassa e diminui a biodisponibilidade dos compostos. Por outro lado, quando se encontram no interior das células, os compostos intracelulares são menos susceptíveis a reações de degradação e outras mudanças estruturais (Pojić *et al.*, 2018). Dessa forma, a extração dos compostos é necessária para facilitar a absorção pelo organismo humano e deve ser realizada de maneira adequada para que as moléculas não sofram mudanças em sua estrutura. Para tanto, é necessário o desenvolvimento e a avaliação de métodos de extração adequados.

3.2 Extração de compostos intracelulares

3.2.1 Processos convencionais de extração sólido-líquido

Durante o processo de extração, um ou mais compostos são transferidos a partir do material biológico para o solvente. Esse processo ocorre devido à diferença de potencial químico entre o soluto dissolvido no solvente e o soluto na matriz biológica (Lebovka *et al.*, 2011). A primeira etapa do processo de extração sólido-líquido é a transferência do soluto da fase líquida para a superfície do sólido. Posteriormente, ocorre a difusão do soluto na matriz sólida, ocorrendo o contato com o solvente, solubilizando-o. Em seguida, a solução deve migrar do interior do sólido para a superfície externa; essa etapa é governada pela difusão molecular e, normalmente, é a etapa mais lenta de um processo de extração. Após atingir a superfície do sólido, a solução migra para o meio de extração.

Os principais fatores que influenciam a extração sólido-líquido são a temperatura do processo, o tamanho das partículas sólidas, a difusividade mássica do solvente no sólido, a

afinidade química do solvente com o soluto, a razão sólido-solvente e a vazão de solvente em processos contínuos. Os processos de extração podem ocorrer em um único ou em múltiplos estágios. O solvente pode entrar em contato com o sólido em paralelo, modo em que ambas as correntes possuem o mesmo sentido, em modo contra-corrente, modo em que, como o próprio nome diz, as correntes percolam o sistema em sentidos contrários, ou em modo de corrente cruzada, em que em cada estágio o sólido entra em contato com solvente puro (Geankoplis, 2003). A seguir serão apresentadas algumas particularidades na extração dos compostos avaliados no presente trabalho.

Os lipídeos, de maneira geral, são extraídos com solventes apolares, como clorofórmio e hexano. Contudo, se a amostra apresentar além de lipídeos neutros, lipídeos mais polares, como fosfolipídeos, deve-se utilizar uma mistura de solventes para que esses lipídeos também possam ser extraídos. Nesse caso, normalmente são utilizados álcoois, como por exemplo, o metanol. Ao utilizar solventes mais polares, também ocorre a desestabilização da membrana celular, através da interação do solvente com os fosfolipídeos, o que facilita a extração dos lipídeos presentes no interior das células (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016). Os métodos mais utilizados para extração de lipídeos de amostras sólidas baseiam-se no contato da amostra com solvente sob agitação, como o método de Bligh & Dyer (Bligh and Dyer, 1959), ou no fluxo de solvente intermitente através da amostra, como no método de Soxhlet.

Os métodos de extração de carotenoides podem ser realizados com diversos solventes orgânicos. A escolha do solvente vai depender do perfil de carotenoides e das características de cada amostra. Os carotenos são extraídos com solventes mais apolares, como éter de petróleo, hexano e clorofórmio. As xantofilas, por outro lado, possuem mais afinidade química com os solventes mais polares, como álcoois. Como mencionado, solventes mais polares auxiliam também na desestabilização da membrana celular, o que facilita a extração. Normalmente, a extração de carotenoides de amostras sólidas é realizada pela maceração da amostra em contato com o solvente (Gross, 1991; Rodriguez-Amaya, 2001).

De maneira geral, para microalgas do gênero *Chlorella*, normalmente métodos que utilizam solventes mais polares ou uma combinação de solventes polares e apolares são mais efetivos para extrair tanto lipídeos como carotenoides. Métodos para extração de lipídeos que utilizam solventes muito apolares não são considerados efetivos, nesse caso, devido à baixa interação química do solvente com a membrana celular. Para a extração de carotenoides, além

da interação com a membrana, deve-se considerar a predominância das xantofilas, que possuem maior afinidade química com solventes mais polares.

A extração de proteínas e ficociannas da *Spirulina* não necessita a utilização de solventes orgânicos, uma vez que esses compostos são hidrossolúveis. Contudo, os métodos de rompimento celular normalmente empregados apresentam baixa especificidade, uma vez que os extratos apresentam alta concentração de detritos celulares, além de outros compostos normalmente indesejados, como clorofila. Os principais métodos atualmente utilizados são o congelamento e descongelamento das células e moinho de bolas (Vali Aftari *et al.*, 2015; İter *et al.*, 2018). Assim, após a extração dos compostos, ainda são necessárias etapas de purificação para eliminar resíduos celulares, o que resulta em um maior gasto energético e no encarecimento do processo.

O método de congelamento e descongelamento é comumente utilizado em laboratório para destriar células de cianobactérias e extração de compostos intracelulares. Pelo congelamento do fluido intracelular ocorre um aumento do volume (dilatação) da estrutura celular devido à formação de cristais de gelo e, durante o descongelamento, ocorre a contração da célula. Esses processos promovem mudanças nas condições de pressão exercida sobre a membrana celular e choque osmótico, devido a possíveis mudanças de concentração de eletrólitos em certas regiões, além de destruição física da estrutura celular pelos cristais de gelo, provocando a danificação da célula (Roquebert and Bury, 1993).

O moinho de bolas é um homogeneizador, desenvolvido para redução do tamanho de partículas e é comumente utilizado para romper células de microalgas (Doucha and Lívanský, 2008; Postma *et al.*, 2015). A destruição das células é promovida pelo choque a altas velocidades com pequenas bolas que podem ser de diferentes materiais (mais comumente, vidro). Nesse caso, os parâmetros que mais influenciam o rompimento de células são a velocidade de agitação (ou frequência) e a concentração de biomassa (Doucha and Lívanský, 2008). Apesar de essa técnica ser bastante utilizada para rompimento de células de microalga, para a *Spirulina*, não foram encontrados muitos estudos que a avaliaram como método de extração. Alguns pesquisadores realizaram uma simulação dos efeitos do moinho de bolas utilizando pérolas de vidro em combinação com outro método que proporciona a agitação do meio. Moraes *et al.* (2011) avaliaram o banho de ultrassom em presença de pérolas de vidro para o rompimento celular e extração de ficocininas. Os autores verificaram que houve a destruição celular, uma vez que foi possível extrair 43.7 mg g⁻¹ de ficocianinas. O moinho de

bolas possui como principal desvantagem o elevado gasto energético quando utilizado em larga escala, além de provocar o superaquecimento da matéria-prima, se operado durante tempos longos. Por outro lado, com esse método pode-se processar quantidades elevadas de biomassa e a eficiência de rompimento celular normalmente é alta (Phong *et al.*, 2018).

Além de métodos mecânicos de rompimento celular, como os supracitados, pode-se utilizar métodos químicos, como hidrólise ácida e básica, e métodos enzimáticos. Também é possível utilizar uma combinação de métodos mecânicos e químicos para o rompimento das células (Ovando *et al.*, 2018). Como as proteínas e ficocianinas são compostos polares e os métodos mecânicos podem ser utilizados para destruir a estrutura celular sem a presença de solventes, métodos químicos têm sido cada vez menos estudados para a extração de compostos da *Spirulina*. Por esse motivo, no presente trabalho, optou-se por avaliar os métodos mecânicos de extração, que foram apresentados mais detalhadamente nesta revisão bibliográfica.

Os métodos mecânicos convencionais de extração, apesar de apresentarem alto rendimento, apresentam problemas com relação à geração de resíduos tóxicos, principalmente para lipídeos e carotenoides, e necessidade de purificação do composto extraído. Por isso, a utilização de compostos sintetizados por microalgas ainda é restrita, e a busca por um método eficiente de extração é fundamental para viabilizar a aplicação na indústria. Dessa forma, se torna necessário o desenvolvimento de técnicas sustentáveis de extração, com a utilização de solventes alternativos, e a minimização da quantidade de solvente utilizado e do gasto energético envolvidos nesses processos (Esquivel-Hernández *et al.*, 2017a).

Uma das alternativas apresentadas na literatura é a utilização de pré-tratamentos de extração, para possibilitar a interação do solvente com os compostos a serem extraídos. Nesse contexto, tecnologias emergentes, como o ultrassom, campo elétrico moderado, campo elétrico pulsado e alta pressão hidrostática, têm sido avaliadas como pré-tratamento para a extração de diversos compostos de matrizes vegetais (Azmir *et al.*, 2013; Poojary *et al.*, 2016). A seguir, são apresentados maiores detalhes sobre as tecnologias de ultrassom, campo elétrico moderado (avaliadas no presente trabalho como métodos de pré-tratamento para a extração de lipídeos, carotenoides, proteínas e ficocianinas) e campo elétrico pulsado (utilizado para a extração de proteínas e ficocianinas).

3.2.2 Processos alternativos de extração

Ultrassom

A tecnologia de ultrassom consiste na aplicação de ondas mecânicas em frequências acima da audição humana, aproximadamente 20 kHz. Em líquidos, o principal efeito da propagação das ondas é o fenômeno de cavitação, ilustrado na Figura 8. As ondas de ultrassom se propagam através da matéria gerando zonas de compressão e rarefação, transmitindo a energia para as moléculas do meio. Em potência suficientemente alta, o ciclo de rarefação pode exceder as forças atrativas das moléculas do líquido, e bolhas de cavitação começam a se formar. O colapso dessas bolhas leva à formação de zonas locais de alta temperatura e pressão (podendo chegar a temperaturas da ordem de 5000 K e pressão de 1000 atm) com duração de tempo muito curta, implicando em altas taxas de aquecimento e resfriamento local ($> 10^9 \text{ K s}^{-1}$) (Sillanpää *et al.*, 2008; Soria and Villamiel, 2010).

Como consequência do fenômeno de cavitação e das zonas de temperatura e pressão locais intensas, acredita-se que pode haver a quebra da molécula de água, gerando e liberando radicais livres no meio de extração ($\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H} + \bullet\text{OH}$), que podem reagir e modificar outras moléculas presentes no meio reacional. Ainda, devido às mudanças de tamanho e colapso das bolhas de cavitação, ocorrem a formação de zonas de turbulências, associadas a microjatos de alta velocidade, que alteram as características do meio líquido. Devido a esses fenômenos, o ultrassom tem sido estudado como uma tecnologia alternativa para auxiliar nos processos de extração, homogeneização e emulsificação, desidratação, inativação de enzimas e microrganismos, entre outros.

Nos processos de extração, a tecnologia de ultrassom vem sendo usada como um método que possibilita a redução do uso de solventes e tempo de extração. Os efeitos mecânicos envolvidos com a aplicação da tecnologia podem acelerar a difusão de compostos intracelulares e permitir uma melhor penetração do solvente na matriz. Um mecanismo de ruptura celular das células de *Spirulina* submetidas ao ultrassom foi proposto por Vernès *et al.* (2019). Quando uma bolha de ultrassom implode numa região próxima à membrana celular, a membrana é danificada, principalmente pela redução da espessura. Quando a cavitação ocorre mais vezes no mesmo local, poros são criados e os filamentos fragilizados podem quebrar devido ao impacto das bolhas de cavitação, o que leva a formação de fragmentos de diferentes tamanhos.

A entrada subsequente de solvente leva a um aumento da pressão intracelular que, combinado com a cavitação, promove a ruptura dos filamentos e junções intercelulares.

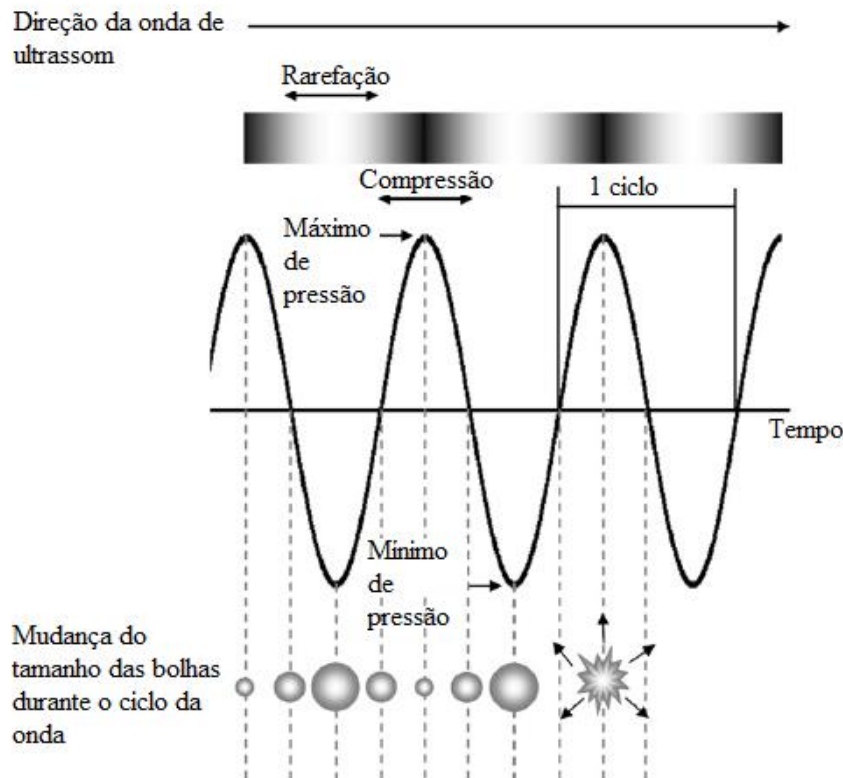


Figura 8. Fenômeno de cavitação, resultante da passagem das ondas de ultrassom em meio líquido.

Fonte: adaptado de Soria e Villamiel (2010).

Além disso, se o substrato estiver seco, as ondas de ultrassom podem facilitar a hidratação e provocar um aumento dos poros da membrana celular, facilitando a liberação de compostos. Assim, com a utilização do ultrassom, é possível realizar extrações em condições brandas de temperatura, proporcionando a manutenção de compostos bioativos termolábeis (Soria and Villamiel, 2010) e redução do consumo de energia. Em comparação com outras tecnologias emergentes, o interesse pelo ultrassom vem crescendo nas últimas décadas, principalmente, pelos custos mais baixos de investimento dessa tecnologia e pela redução da quantidade de solvente nos processos de extração, o que diminui a geração de resíduos (Tiwari, 2015).

Existem diversos estudos envolvendo a extração de lipídeos de microalgas assistida por ultrassom (Prabakaran and Ravindran, 2011; Ma *et al.*, 2014). A maioria dos estudos encontrados avalia a aplicação do ultrassom em presença dos solventes normalmente usados

para extração de lipídeos, como metanol, clorofórmio e hexano, sendo a aplicação do ultrassom com solventes menos agressivos ainda pouco abordada.

De maneira geral, a tecnologia de ultrassom aplicada em processos de extração apresenta efeitos positivos, com rendimentos superiores se comparada com métodos convencionais de extração. Prabakaran e Ravindran (2011) avaliaram diferentes métodos de extração de lipídeos das microalgas *Chlorella* spp., *Nostoc* sp. e *Tolypothrix* sp. Os autores testaram os métodos de autoclave, moinho de bolas, ultrassom, micro-ondas e choque osmótico (NaCl, 10 %), como métodos de pré-tratamento de extração, apenas com água como solvente. Após o pré-tratamento, a extração foi realizada de acordo com o método de Bligh & Dyer. Os pesquisadores concluíram que o pré-tratamento com ultrassom resultou em melhores rendimentos de extração, sendo que, para a microalga *Chlorella* spp., a concentração de lipídeos extraída foi de 20 %, enquanto que para o controle (sem o pré-tratamento) chegou-se ao valor de 8 %, aproximadamente.

Ma *et al.* (2014) avaliaram as tecnologias de micro-ondas e ultrassom como pré-tratamento na extração de lipídeos de microalgas. Os pré-tratamentos com ultrassom (200 W, 40 kHz) foram realizados em diferentes tempos (0-30 min) com água como solvente. Após o pré-tratamento, os lipídeos foram extraídos pelo método de Folch. O rendimento máximo (11,5 %) foi obtido após 20 min de pré-tratamento com ultrassom. Esse resultado foi considerado superior ao controle (sem aplicação de ultrassom como pré-tratamento), cujo rendimento foi de 8,3 %. Esse aumento na extração foi atribuído ao aumento da superfície de contato com o solvente, devido à quebra da matriz em fragmentos menores promovida pelo ultrassom.

Figueiredo *et al.* (2019) avaliaram a extração de lipídeos a partir da *Nannochloropsis oceanica* utilizando diferentes métodos de extração: convencionais, com diferentes combinações de solventes (clorofórmio/metanol, diclorometano/metanol, diclorometano/etanol e etanol), banho de ultrassom (30 min, 50 kHz, 1 W cm³) e sonda de ultrassom (8 min, 20 kHz, 3,6 W cm³). Após cada processo de extração, as amostras foram centrifugadas e a biomassa remanescente foi submetida ao mesmo processo, repetindo-se o mesmo processo 8 vezes para cada amostra. Todos os processos foram realizados com 50 mg de biomassa em 1 mL de etanol a 30 °C. Os melhores resultados foram obtidos com a combinação diclorometano/etanol (73 %). Os rendimentos mais baixos foram obtidos com etanol (42,4 %), e a combinação ultrassom

e etanol aumentou os rendimentos de extração (51,3 % com o banho de ultrassom e 60,3 % com a sonda de ultrassom).

A tecnologia de ultrassom também vem sendo estudada como método de pré-tratamento para a extração de compostos fenólicos e pigmentos a partir de microalgas (Deenu *et al.*, 2013; Parniakov *et al.*, 2015a). Deenu *et al.* (2013) avaliaram a extração de luteína da microalga *Chlorella vulgaris* usando etanol (90 %) e um pré-tratamento de extração que consistiu em uma combinação de tratamento enzimático e ultrassom. Os resultados indicaram maior rendimento de extração em presença de ultrassom (35 kHz, 56,6 W cm⁻²), sendo possível extrair até 3,16 ± 0,03 mg g⁻¹.

Parniakov *et al.* (2015a) estudaram a extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos e clorofilas da microalga *Nannochloropsis* spp.; foram avaliadas diferentes combinações de solventes: água, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), água/DMSO (50%) e água/etanol (25 – 50%), e os resultados foram comparados com os métodos de extração convencional. Os melhores rendimentos de extração foram obtidos quando o ultrassom foi utilizado como pré-tratamento (400 W, diâmetro da sonda não especificado) por 5 minutos com água/DMSO (50 %) e água/etanol (25 – 30%).

A avaliação da tecnologia de ultrassom na extração de compostos da *Spirulina* é recente, e os estudos encontrados mostram resultados positivos quanto aos rendimentos de extração (İlter *et al.*, 2018; Pan-utai and Iamtham, 2018; Tavanandi *et al.*, 2018; Vernès *et al.*, 2019). Pan-utai and Iamtham (2018) avaliaram o ultrassom utilizando biomassa desidratada convencionalmente e por liofilização. As extrações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 10 e 100 mM (pH 7,0) e em três concentrações de biomassa (1:50, 1:25, 1:15). O ultrassom foi avaliado em intensidade de 50 % (potência nominal do equipamento de 750 W) em pulsos de 60 s ligado e 30 s desligado, totalizando 5 min de tratamento. Os melhores rendimentos de extração (60 mg g⁻¹) foram obtidos na concentração de biomassa 1:15 utilizando tampão fosfato 0,01 M.

Tavanandi *et al.* (2018) avaliaram diferentes métodos para a extração de ficocianinas da *Spirulina platensis*: homogeneização com ultra-turrax, maceração, congelamento e descongelamento e ultrassom. Para avaliar a influência da intensidade do ultrassom (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 %) os autores fixaram o tempo de extração em 2 min e a concentração de biomassa em 1:8. Os melhores rendimentos de extração (49,8 mg g⁻¹) foram obtidos utilizando 50 % da intensidade do ultrassom. Posteriormente, os pesquisadores avaliaram o tempo de

aplicação do ultrassom (0, 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5 e 3 min) utilizando intensidade de 50 %. Nesse caso, utilizando concentração de biomassa 1:10, foi possível extrair 51,23 mg g⁻¹ após 1,5 min.

Vernès *et al.*(2019) avaliaram a extração de proteínas a partir da *Spirulina platensis* utilizando ultrassom (1000 W, 20 kHz) em modo de operação contínuo (15 mL h⁻¹). Os pesquisadores compararam os resultados obtidos com experimentos controle (sem a aplicação do US). Os maiores rendimentos de extração (28,42 ± 1,15 g 100 g⁻¹ de proteínas) foram obtidos após 6 minutos de aplicação do ultrassom. Os estudos encontrados na literatura relacionados com a extração de compostos da *Spirulina* não avaliam a qualidade dos extratos com relação a impurezas e extração de outros compostos concomitantemente aos compostos de interesse.

Campo elétrico moderado

O processo de campo elétrico moderado (MEF, do inglês *moderate electric field*) é caracterizado pela passagem de corrente elétrica alternada através de um material biológico, com intensidade de campo elétrico que pode variar de 1 a 1000 V cm⁻¹, com forma de onda arbitrável, com ou sem os efeitos do aquecimento ôhmico. Dependendo da intensidade do campo elétrico e da temperatura a que o material é submetido, é possível obter diversos efeitos, térmicos e não térmicos, nos materiais biológicos (Sensoy and Sastry, 2004).

Quando não há controle da temperatura, ocorre o aquecimento inerente da amostra devido ao efeito Joule. Nesses casos, esse processo é chamado de aquecimento ôhmico. Contudo, o interesse nessa tecnologia se dá, muitas vezes, devido aos efeitos não térmicos associados à passagem da corrente elétrica através de determinado material biológico. O principal fenômeno não térmico envolvido com a aplicação do MEF é a eletroporação ou eletropermeabilização. A aplicação do campo elétrico induz uma mudança na diferença de potencial natural da membrana celular; quando essa diferença de potencial atinge determinado valor crítico (E_c), pode ocorrer perda da permeabilidade da membrana celular, fenômeno conhecido como eletroporação. O grau de eletroporação, que pode ser reversível ou irreversível, depende principalmente da diferença de potencial transmembrana, mas também varia dependendo do material submetido ao campo elétrico, do tamanho e concentração das células ao longo do material (Eugène Vorobiev, 2008). A Figura 9 apresenta um esquema da eletroporação reversível e irreversível em uma célula. Esses efeitos não térmicos são muito relevantes em processos que envolvem a transferência de massa, como extração, secagem e processos fermentativos (Eugène Vorobiev, 2008).

Diversos autores propuseram modelos teóricos para descrever o fenômeno da eletroporação. Dentre esses modelos, o mais aceito é o modelo de poro aquoso transiente: poros hidrofílicos são formados na camada fosfolipídica da membrana celular quando a célula é exposta à aplicação de um campo elétrico; a aplicação do campo elétrico induz uma diferença de potencial transmembrana, fornecendo a energia livre necessária para o rearranjo dos fosfolipídeos, ocorrendo a formação dos poros (Weaver and Chizmadzhev, 1996). Entretanto, o fenômeno de eletroporação ainda não está completamente elucidado, observando-se discrepâncias entre os modelos propostos e resultados experimentais.

Apesar dessas discrepâncias, considera-se aceito os diferentes estágios da eletroporação: carregamento e polarização da membrana celular ($> 1 \mu\text{s}$); expansão e agregação de poros (nos primeiros $100 \mu\text{s}$); após o desligamento da corrente elétrica, ocorre o fechamento dos poros ou ressecamento da membrana celular (dependendo da intensidade da eletroporação) e efeitos de memória, que podem permanecer por segundos à horas (Lebovka *et al.*, 2011).

Dessa forma, quando ocorre a eletroporação irreversível, a membrana celular perde as funções de permeabilidade acarretando a morte celular. Na eletroporação reversível, a formação dos poros é temporária e acredita-se que os poros são mantidos durante a aplicação do campo elétrico ou até um tempo após a aplicação da corrente elétrica. A eletroporação reversível não é um fenômeno que está completamente elucidado, e o tempo de permeabilização e a dependência desse tempo com os parâmetros do campo elétrico ainda não são totalmente conhecidos. Contudo, sabe-se que, quanto maior a intensidade do campo elétrico (V cm^{-1}) e tempo de aplicação, maior a chance de ocorrer a eletroporação irreversível.

A tecnologia de MEF tem sido pouco estudada, apesar de alguns estudos terem observado aumento da permeabilidade celular em alimentos com a aplicação da tecnologia. Estudos relacionados à extração (Kulshrestha and Sastry, 2003; Sensoy and Sastry, 2004; Lebovka *et al.*, 2007; Ferreira-Santos *et al.*, 2019), secagem e desidratação osmótica (Lima and Sastry, 1999; Wang and Sastry, 2000; Simpson *et al.*, 2015), inativação de enzimas e microrganismos (Machado *et al.*, 2010; Somavat *et al.*, 2013; Brochier *et al.*, 2016, 2018) e durante o crescimento de microrganismos (Cho *et al.*, 1996; Loghavi *et al.*, 2008) têm sido conduzidos e demonstram o potencial dessa tecnologia para a aplicação em diferentes processos.

Com relação à extração de compostos, Sensoy e Sastry (2004) observaram um aumento na extração de compostos solúveis de folhas frescas de menta com a aplicação de MEF (200V,

50 Hz), se comparado com experimentos controle. Kulshrestha e Sastry (2003) avaliaram a extração de betalaína de beterraba assistida por MEF a 45 °C durante 3 min, com frequências variando de 0 a 5000 Hz e tensões de 0 (convencional) e 23,9 V cm⁻¹. Os autores concluíram que a extração aumentou com o aumento da tensão e com a diminuição da frequência. Em ambos os estudos, os pesquisadores observaram os efeitos do MEF apenas quando a matéria-prima intacta foi submetida à tecnologia.

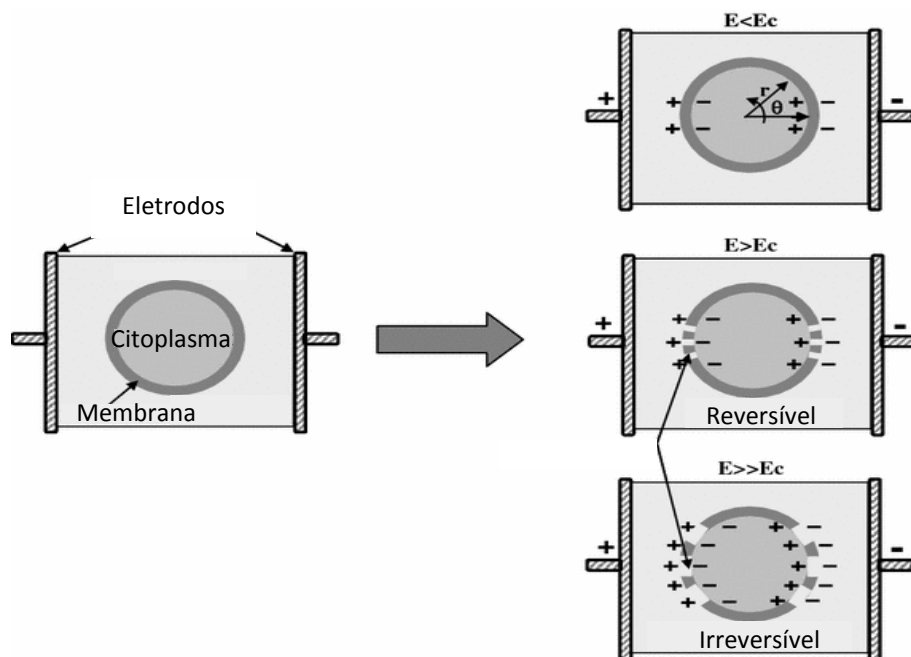


Figura 9. Esquema de uma célula sofrendo eletroporação reversível e irreversível.

Fonte: adaptado de: Donsi *et al.* (2010)

Kusnadi e Sastry (2012) estudaram os efeitos do campo elétrico moderado na difusão de sal através de alimentos (aipo, cogumelos e castanhas) em diferentes intensidades de campo elétrico (0,66, 1316 e 1842 V m⁻¹) e temperaturas (25, 50 e 80 °C). Os resultados mostraram que as difusividades mássicas aumentaram com o aumento da intensidade do campo elétrico e com a temperatura. Kulshrestha e Sastry (2010) verificaram mudanças de permeabilidade induzidas por MEF de tecidos vegetais (beterraba e batata) em diferentes frequências. Os pesquisadores demonstraram que, mesmo em tensões mais baixas, ocorreu aumento da difusão, sugerindo que mesmo condições mais brandas podem promover permeabilização dos tecidos vegetais.

Ferreira-Santos *et al.* (2019) avaliaram a extração de compostos fenólicos da casca de pinheiro (*Pinus pinaster*) via MEF (25 kHz, 1 -10 V). Previamente aos experimentos de extração, as cascas foram secas (40 °C) e moídas (granulometria de 1 – 1,6 mm). As extrações foram realizadas por 30 min a 83 °C utilizando 1,5 g de casca e 15 mL de solvente (água ou etanol (50 %, v/v)). Os resultados foram comparados com experimentos controle, realizados nas mesmas condições dos experimentos com MEF, porém sem a aplicação de corrente elétrica. Os autores observaram um aumento no rendimento de extração de 17 e 30 % utilizando água e etanol (50 %, v/v), respectivamente.

Os estudos de extração de compostos de microalgas utilizando tecnologias emergentes encontrados são, principalmente, envolvendo as tecnologias de ultrassom, micro-ondas e PEF; não foram encontrados estudos envolvendo a aplicação de MEF para esse propósito. Essa tecnologia já vem sendo estudada como pré-tratamento para a extração de lipídeos e carotenoides da microalga *Heterochlorella luteoviridis* pelo nosso grupo de pesquisa (Jaeschke *et al.*, 2016b). Nesse estudo prévio, foram avaliadas diferentes tensões (0-180 V), em presença de etanol em concentração fixa de 25 % (v/v), durante uma etapa de pré-tratamento de extração com duração de 10 minutos. Após o pré-tratamento, avaliou-se diferentes concentrações de etanol (25 – 75 %) em uma etapa difusiva. Todo o processo de extração foi realizado em temperatura controlada (até 35 °C). Os resultados mostraram que o pré-tratamento com MEF aumentou a extração de carotenoides, sendo observado aumento na extração com o aumento da tensão e da concentração de etanol. Para os lipídeos, por outro lado, não foram observados os mesmos efeitos: a extração foi influenciada somente pela concentração de etanol na etapa difusiva, observando-se um aumento da extração com o aumento da concentração de etanol. Os resultados foram comparados com os obtidos para a extração exaustiva, e os máximos rendimentos obtidos foram de 73 % ($1,21 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$) e 69 % ($12,20 \pm 0,12 \text{ g } 100 \text{ g de amostra}^{-1}$) para carotenoides e lipídeos, respectivamente.

Campo elétrico pulsado

A tecnologia de campo elétrico pulsado (PEF, do inglês *Pulsed Electric Field*) consiste na passagem de corrente elétrica na forma de pulsos de alta intensidade (da ordem de kV) e curta duração através de um material biológico, situado entre dois eletrodos. Esse processo pode resultar em danos físicos à membrana celular devido aos efeitos de eletroporação, bem como promover a geração interna de calor no material, conforme descrito anteriormente para o processo de campo elétrico moderado (Eugène Vorobiev, 2008).

Os principais parâmetros envolvidos durante a aplicação de PEF são: duração do pulso elétrico (τ , de ns a ms), intensidade do campo elétrico (U , 0,1 a 50 kV cm⁻¹), frequência dos pulsos (f), tempo total de aplicação do campo elétrico (t) e energia específica por pulso (W , kJ kg pulso⁻¹). A energia específica por pulso pode ser calculada conforme a Equação 1, sendo m a massa de amostra tratada, I a corrente aplicada através da amostra e R a resistência elétrica, que pode ser calculada de acordo com a Equação 2. Na Equação 2, σ é a condutividade elétrica da amostra, L é a distância entre os eletrodos e A é a área dos eletrodos.

$$W = \frac{1}{m} \int_0^{\infty} \frac{U(t)^2}{R} dt = \frac{1}{m} \int_0^{\infty} U(t) \cdot I(t) dt \quad \text{Equação 1}$$

$$R = \frac{1}{\sigma} \frac{L}{A} \quad \text{Equação 2}$$

A energia total envolvida no processo pode ser calculada multiplicando-se W pelo número de pulsos (n) aplicados. Esse parâmetro fornece uma estimativa dos gastos energéticos envolvidos em processos em que o PEF é aplicado. Além desses parâmetros, considera-se que a temperatura é um parâmetro importante, uma vez que diversos estudos relacionam o aumento da temperatura com uma maior inativação microbiana ou grau de permeabilização celular. Essa sinergia PEF-temperatura é, possivelmente, devido a uma maior fluidez da membrana celular a altas temperaturas e, conseqüentemente, à redução da sua resistência mecânica (Raso *et al.*, 2016). Essa sinergia também é observada durante a aplicação de aquecimento ôhmico (Wang and Sastry, 2000, 2002).

Considera-se que a aplicação de pulsos de alta intensidade (μs – ms) em células biológicas pode causar eletroporação reversível ou irreversível (Chemat *et al.*, 2015). Além dos parâmetros elétricos, a eletroporação também depende das características das células que estão submetidas ao tratamento: tamanho, forma e orientação de acordo com o campo elétrico. Encontra-se na literatura uma estimativa da faixa de intensidade de campo elétrico necessária para promover a eletroporação: 0,5 a 1,5 kV cm⁻¹, de maneira reversível; 1 – 3 kV cm⁻¹, irreversível em células vegetais e animais; e 15 – 40 kV cm⁻¹, irreversível em microrganismos (Raso *et al.*, 2016).

A aplicação de pulsos de curta intensidade (ns) vem sendo estudada recentemente para induzir a eletroporação reversível e mudanças metabólicas em células, como por exemplo, para estimular o crescimento de microrganismos ou a síntese de compostos intracelulares (Bai *et al.*, 2017); como os pulsos são muito curtos, a hipótese é que não há tempo suficiente para aumentar a diferença de potencial da membrana externa, e as estruturas internas poderiam ser danificadas reversivelmente. Esses estudos são bem recentes, e a maioria das aplicações do PEF está relacionada com a eletroporação irreversível das células, como a pasteurização a frio de alimentos líquidos e a descontaminação de águas industriais (relacionadas com a inativação de microrganismos), e aos processos assistidos por PEF, como secagem, desidratação osmótica, extração, congelamento, entre outros.

A tecnologia de PEF é estudada desde 1940 para o processamento de alimentos e, atualmente, essa tecnologia é mais utilizada em tratamentos não-térmicos de alimentos líquidos, como sucos e lácteos. Como as temperaturas de processo são reduzidas, os produtos possuem uma qualidade superior aos tratados convencionalmente, mantendo características mais próximas do alimento *in natura* (Sitzmann *et al.*, 2016).

Mais recentemente, essa tecnologia tem sido utilizado para a extração de biocompostos de diferentes matrizes, vegetais e microbiológicas. Vários estudos demonstraram o potencial de aplicação da tecnologia para o rompimento da estrutura celular de diversas frutas e vegetais, resultando no aumento do rendimento de extração de sucos (Praporscic *et al.*, 2007; Timmermans *et al.*, 2014) e na extração de compostos intracelulares, como açúcar de beterraba sacarina (Loginova *et al.*, 2011b), polifenóis de sementes de gergelim e frutas cítricas (Sarkis *et al.*, 2015; El Kantar *et al.*, 2018), betalaínas de beterraba (Loginova *et al.*, 2011a), óleo de canola da colza (Zhang *et al.*, 2017), entre outros.

A extração de diferentes compostos intracelulares de microalgas assistida por PEF foi avaliada para diversas espécies (Parniakov *et al.*, 2015b; Carullo *et al.*, 2018; Geada *et al.*, 2018; Silve *et al.*, 2018). Carullo *et al.* (2018) avaliaram a extração de carboidratos e proteínas da *Chlorella vulgaris* usando PEF e *high pressure homogenization* (HPH). Os resultados mostraram que a aplicação de PEF promoveu a extração seletiva de compostos solúveis em água (36 % do total de carboidratos e 5 % do total de proteínas). A aplicação de HPH, por outro lado, resultou em maiores rendimentos de extração (42 % do total de carboidratos e 54 % do total de proteínas). Apesar de mais concentrados, os extratos obtidos com HPH apresentaram maior concentração de detritos celulares e clorofila.

Parniakov *et al.* (2015b) realizaram um pré-tratamento com PEF (20 kV cm⁻¹) da microalga *Nannochloropsis sp.* e depois submeteram as células à extração com solventes orgânicos (dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol). Para comparação dos resultados, nos experimentos controle, as extrações foram realizadas somente com os solventes. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com PEF possibilitou a extração de pigmentos (clorofilas e carotenoides) com a utilização de menor volume de solvente. Silve *et al.* (2018) também realizaram um pré-tratamento com PEF da microalga *Auxenochlorella protothecoides*, seguido de uma extração de lipídeos com uma mistura de água e solventes orgânicos (hexano e etanol). Os pesquisadores comparam os resultados com experimentos controle (aplicação de solvente, somente, sem a aplicação de PEF) e observaram um maior rendimento de extração com o pré-tratamento com PEF.

A extração de ficocianinas da *Arthrospira platensis* assistida por PEF foi avaliada recentemente (Martínez *et al.*, 2017). Os pesquisadores realizaram um pré-tratamento com PEF e uma etapa difusiva por 7 h. Foram avaliadas diferentes energias específicas (13,5 a 110,1 kJ kg⁻¹) e temperaturas (10, 25 e 40 °C) durante o tratamento com PEF. O maior rendimento de extração (151,94 ± 14,22 mg g⁻¹) foi obtido utilizando 110 J kg⁻¹ (25 kV cm⁻¹, 150 µs) a 40 °C após 5 h e 30 min de etapa difusiva.

Apesar de muitos estudos terem demonstrado o potencial dessa tecnologia para aplicação em processos de extração, ainda existem vários desafios para que essa tecnologia seja amplamente implementada em larga escala. Mesmo assim, em comparação com as outras tecnologias elétricas, a tecnologia de PEF é a mais aplicada e com maior número de estudos encontrados na literatura. As principais vantagens de sua aplicação em processos de extração estão relacionadas com a diminuição do uso de solventes e com a obtenção de um extrato mais purificado, evitando a extração de detritos celulares. Os custos desses equipamentos ainda são bastante elevados, principalmente, os que se referem aos geradores de potência. Acredita-se que, com o desenvolvimento da tecnologia, esses equipamentos terão custo mais baixo, viabilizando o uso do PEF em diversos processos. Além disso, é necessário o melhor entendimento dos efeitos do PEF na estrutura celular de diferentes microrganismos. Outro aspecto importante diz respeito ao fato de que as tecnologias elétricas podem ser consideradas ambientalmente amigáveis, uma vez que podem reduzir a geração de resíduos, tanto de solventes tóxicos quanto de águas de processo (Geada *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o presente trabalho se propõe a avaliar metodologias alternativas de extração de carotenoides e lipídeos a partir da microalga *Heterochlorella luteoviridis*, usando as tecnologias emergentes de ultrassom e MEF e etanol como solvente. Além disso, esse trabalho busca aplicar ultrassom e as tecnologias elétricas de MEF e PEF na extração de ficocianinas e proteínas da *Spirulina platensis*. Adicionalmente, pretende-se contribuir para a elucidação dos fenômenos envolvidos nos mecanismos de eletroporação durante a aplicação de MEF e PEF em microalgas.

Capítulo 4 – Extração de compostos intracelulares da microalga *Heterochlorella luteoviridis*

Este capítulo apresenta os estudos de extração realizados no presente trabalho: 1) avaliação da tecnologia de ultrassom como pré-tratamento de extração de carotenoides e lipídeos da microalga *Heterochlorella luteoviridis*; 2) efeito do campo elétrico moderado na cinética de extração de carotenoides da mesma microalga.

Primeiramente, são apresentadas as metodologias empregadas para o cultivo das microalgas, para realização dos processos de extração avaliados, bem como para as análises dos compostos extraídos. Os resultados desses estudos são apresentados na forma de dois artigos já publicados em revistas indexadas.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), localizado no Departamento de Engenharia Química da UFRGS, e no Laboratório de Bioengenharia (BioEng), localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Cultivo de microalgas

As cepas de microalgas utilizadas no presente trabalho foram doadas pelo Professor Sérgio Lourenço, do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas, do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, e mantidas em um banco de algas no Laboratório BioEng, no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Previamente à realização dos cultivos nos fotobiorreatores, as microalgas foram pré-inoculadas em mesa agitadora com aquecimento (*Oxylab*, Brasil) a 28 °C e 19 rpm. Para tanto, 24 mL do banco de algas foram adicionados a 240 mL de meio de cultivo em erlenmeyers. Durante o período de pré-inoculação, as amostras foram mantidas sob iluminação (64 W) com o auxílio de lâmpadas eletrônicas. A Figura 10 apresenta uma fotografia dos pré-inóculos.



Figura 10. Pré-inóculos realizados previamente ao cultivo nos fotobiorreatores.

Os fotobiorreatores utilizados no presente trabalho foram construídos em acrílico, com geometria de placa plana do tipo *air-lift*. Uma fotografia dos fotobiorreatores é apresentada na Figura 11. O projeto dos biorreatores foi desenvolvido em trabalho anterior realizado no laboratório BioEng e maiores detalhes podem ser encontrando em Kochem *et al.* (2014).



Figura 11. Fotobiorreatores durante um cultivo de microalgas.

As condições de cultivo foram definidas com base em estudos prévios realizados no laboratório BioEng. O meio de cultivo foi o f/2 (Guillard, 1975) com algumas modificações: a

concentração de nitrato de sódio utilizada foi aumentada para 300 mg L⁻¹ e foram adicionados diariamente os seguintes nutrientes aos biorreatores: 1 mL L⁻¹ de solução de fosfato (5 g L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O) e 1 mL L⁻¹ de solução de metais traço (9,8 mg L⁻¹ de CuSO₄·5H₂O, 22 mg L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O, 1 mg L⁻¹ de CoCl₂·6H₂O, 180 mg L⁻¹ de MnCl₂·4H₂O, 6,3 mg L⁻¹ de Na₂MoO₄·2H₂O, 4,36 g L⁻¹ de Na₂EDTA e 3,15 g L⁻¹ de FeCl₃·6H₂O). A temperatura utilizada foi de 28 °C, e a aeração foi realizada com ar comprimido (1 L min⁻¹).

Para obtenção da biomassa para extração via ultrassom, foi realizado um cultivo em modo semi-contínuo: no quarto dia de cultivo, metade do volume dos fotobiorreatores (1,2 L) foi coletado e centrifugado (*Hitachi*, CR 21GIII, 10.000 g, 10 °C, 10 min). Após esse procedimento, meio de cultivo foi adicionado novamente aos biorreatores num volume igual ao anteriormente retirado. Esse procedimento foi repetido a cada 48 h e foi realizado durante 40 dias, tempo necessário para a obtenção da biomassa necessária para realização dos experimentos de extração. Após cada coleta, realizou-se o congelamento da biomassa com nitrogênio líquido e posterior liofilização. Após liofilizada, as amostras coletadas durante todo o período de cultivo foram homogeneizadas e armazenadas em sacos plásticos em dessecador.

Para obtenção de biomassa para a extração usando campo elétrico moderado, foi realizado um novo cultivo, similarmente ao descrito para o cultivo anterior, com duração de 27 dias. Durante esse cultivo, a aeração foi realizada com uma mistura de ar comprimido (1 L min⁻¹) e gás carbônico (0,01 L min⁻¹), e foram realizadas coletas dos fotobiorreatores a cada três dias.

4.1.2 Extração exaustiva de carotenoides

A concentração total de carotenoides na microalga estudada foi determinada de acordo com Mandelli *et al.* (2012). Para realização da análise, foram usados 0,025 g de biomassa liofilizada, que foi macerada em contato com o solvente utilizando gral e pistilo. Primeiramente, as amostras foram hidratadas com aproximadamente 200 µL de água para facilitar a extração. Após a hidratação (aproximadamente 1 h), foram adicionados 2 mL de acetato de etila às amostras e realizou-se a maceração por aproximadamente 2 min. O solvente foi então coletado em tubo de ensaio, e a mesma quantidade de solvente foi adicionada às amostras. Esse procedimento foi repetido até que o solvente não apresentasse mais cor (aproximadamente 6 vezes). Posteriormente, o mesmo processo foi realizado com metanol. Após a obtenção do extrato, foi avaliada a presença de sólidos no mesmo, procedendo a filtração em caso positivo.

Após a obtenção do extrato, realizou-se a partição; para tanto, foram adicionados previamente em um funil de separação aproximadamente 30 mL de água destilada e 20 mL de éter de petróleo e éter etílico (1:1). Em seguida, o extrato foi sendo adicionado cuidadosamente e pelas paredes aos funis. Nessa etapa, deve-se ter o cuidado para não saturar o solvente a ponto de perder a amostra para a água. Após a adição da amostra, foram realizadas lavagens com água destilada para eliminação dos solventes de extração e manutenção dos carotenoides na fase éter. Posteriormente, realizou-se a saponificação das amostras, pela adição de solução de KOH em metanol (10%, m/v). Foram adicionados 20 mL dessa solução, e a reação foi mantida *overnight* (aproximadamente 17h). Essa etapa foi considerada necessária para a eliminação de interferentes da análise, como os lipídeos, clorofilas e ésteres de carotenoides. Após a saponificação, foram realizadas lavagens das amostras em funis de separação, da mesma maneira já descrita. Essas lavagens foram realizadas até a obtenção de pH neutro da água de lavagem.

A fase éter contendo os carotenoides foi coletada em erlenmeyer em presença de sulfato de potássio. Nessa etapa, a presença do sal foi importante para eliminar qualquer resíduo de água que tenha permanecido na amostra. Após essa etapa, as amostras foram transferidas para balões de fundo chato e rota- evaporadas (*Fisatom*, Model 450-5, Brazil). Depois da eliminação completa do solvente (éter etílico e éter de petróleo), os pigmentos foram ressuspendidos em volume conhecido de etanol para posterior leitura em espectrofotômetro. Nessa etapa foram realizadas lavagens com etanol do balão de fundo chato até que o solvente não mais apresentasse coloração. Para garantir a solubilização de todo o conteúdo de pigmentos utilizou-se um banho de ultrassom. Após a ressuspensão, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 445 nm (*PG Instruments Ltd.*, Model T80 UV-Vis, United Kingdom).

A absorvidade molar da luteína ($\epsilon = 2,550$) em etanol foi utilizada para o cálculo da concentração, e os resultados foram expressos em miligramas de luteína por grama de biomassa seca (mg g^{-1}). As extrações exaustivas de cada lote de biomassa foram realizadas em triplicata.

4.1.3 Extração exaustiva de lipídeos

A concentração total de lipídeos na biomassa foi determinada pelo método sulfo-fosfovanilina (SPV) (Mishra *et al.*, 2014). Esse método é baseado na reação do grupo carbonila, presente no reagente fosfo-vanilina, com íons carbono, provenientes da quebra das moléculas

de lipídeos. Essa reação resulta em um composto de coloração rosada, o que possibilita a análise em espectrofotômetro.

As extrações foram realizadas com 0,05 g de biomassa liofilizada hidratada com 100 µL de água destilada. Para tanto, ácido sulfúrico (2 mL) foi adicionado às amostras, mantendo-se sob aquecimento por 10 min. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por aproximadamente 5 min. Após o resfriamento das amostras, o reagente fosfo-vanilina, previamente preparado, foi adicionado as amostras. A reação ocorreu por 15 min no escuro, e, posteriormente, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro (*PG Instruments Ltd.*, Model T80 UV-Vis, United Kingdom) a 530 nm.

A concentração de lipídeos nas amostras foi determinada por curva de calibração com padrão de óleo de oliva (Sigma Aldrich, USA) em clorofórmio em concentrações variando de 0,4 a 2 mg L⁻¹. A curva de calibração foi realizada, primeiramente, preparando-se uma solução mãe (2 mg L⁻¹), e, a partir dessa solução, as demais concentrações foram preparadas com adição de clorofórmio. Foram utilizados 100 µL de solução padrão (nas diferentes concentrações) e procedeu-se a análise da mesma maneira como já descrito para as amostras. A Figura 12 apresenta uma curva de calibração obtida. Para cada nova solução do reagente fosfo-vanilina, uma nova curva de calibração, em duplicata, foi realizada.

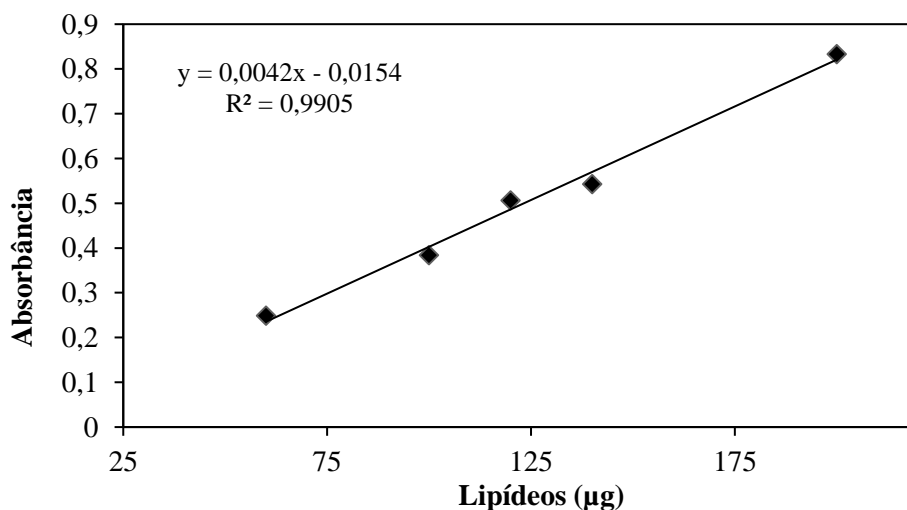


Figura 12. Curva de calibração para análise de lipídeos pelo método SPV.

Os resultados foram expressos em gramas de lipídeos por 100 gramas de biomassa seca (g 100 g⁻¹). As extrações exaustivas foram realizadas em triplicata.

4.1.4 Extração de lipídeos e carotenoides utilizando ultrassom e etanol

Os experimentos de extração consistiram em um pré-tratamento e uma etapa difusiva. A Figura 13 apresenta uma fotografia dos equipamentos utilizados em ambas as etapas.

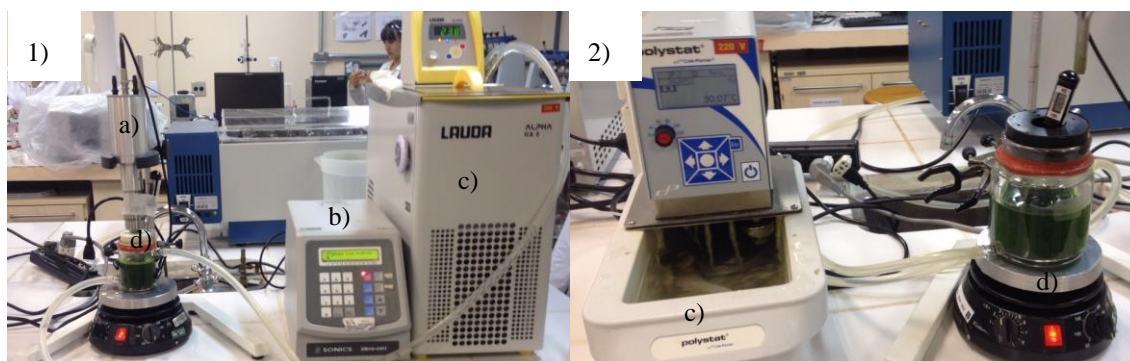


Figura 13. Equipamento experimental utilizado para a realização dos experimentos de extração durante o 1) pré-tratamento e a 2) etapa difusiva: a) sonda de ultrassom; b) gerador de potência; c) banho termostático; d) célula de extração.

O pré-tratamento foi realizado por 10 min usando uma concentração de etanol de 25 % (v/v) e intensidade do ultrassom (SONICS, *Vibra-Cell*, USA) variando de 0 a 100 % (50 W cm^{-2} , 20 kHz). Nesta etapa foi utilizada uma célula de Pyrex encamisada, com volume de 100 mL. Como a aplicação do ultrassom promoveu o aquecimento da amostra, a célula foi conectada a um banho termostático, através da camisa d'água, o que permitiu a manutenção da temperatura em valores de até $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Dessa forma, para a intensidade de 100 %, utilizou-se o banho termostático a $13 \text{ }^\circ\text{C}$ e para a intensidade de 50 %, a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Para os experimentos controle (0 % de intensidade do ultrassom), a célula foi conectada a um banho termostático a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo o procedimento de extração.

Após o pré-tratamento, as amostras foram transferidas para outra célula com volume de 300 mL, também encamisada e em Pyrex, para a realização da etapa difusiva. Assim, as amostras foram vertidas da célula utilizada durante o pré-tratamento para a célula da etapa difusiva, previamente conectada ao banho termostático ($30 \text{ }^\circ\text{C}$). Na etapa difusiva, com duração de 50 min, foram avaliadas diferentes concentrações de etanol (50 a 75 %, v/v). Para tanto, após a transferência das amostras para a célula foram adicionadas soluções de etanol para que a concentração final da solução estivesse de acordo com o experimento realizado (50 – 75 %, v/v). As soluções de etanol estavam à temperatura ambiente, portanto, houve uma pequena diminuição da temperatura da amostra nessa etapa. Esses efeitos de diminuição e temperatura

foram considerados negligenciáveis uma vez que essa variação ocorreu para todos os experimentos (controle e US). Durante todo o processo de extração, as amostras foram mantidas sob agitação com auxílio de um agitador magnético. A Figura 14 apresenta um esquema dos experimentos de extração realizados.

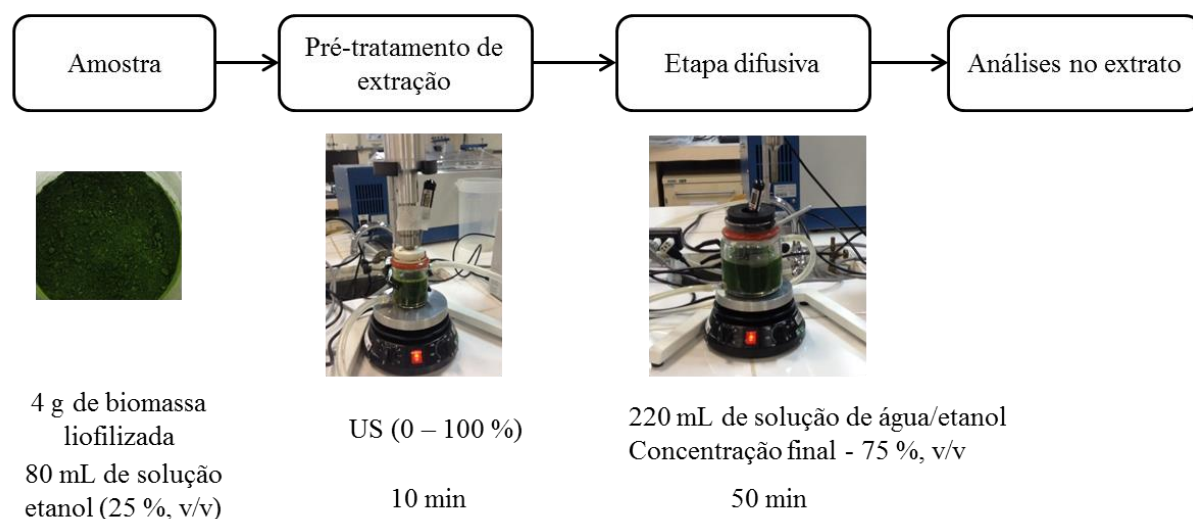


Figura 14. Esquema das etapas dos experimentos de extração realizados com o ultrassom.

Para a realização desse estudo, considerou-se que até 30 °C não há efeitos térmicos, e, por esse motivo, o perfil de temperatura dos experimentos com ultrassom e experimentos controle não foram igualados. Após o experimento de extração, as amostras foram imediatamente centrifugadas (10.000 g, 20 °C) e filtradas (*Allcrom*, PTFE, 0,45 µm). Depois de filtrados, os extratos foram analisados imediatamente quanto à concentração de carotenoides e, posteriormente, quanto à concentração de lipídeos. O procedimento realizado para cada uma dessas análises está descrito em detalhes a seguir.

Os experimentos de extração foram planejados levando-se em consideração a intensidade do ultrassom (0 – 100 %). Contudo, a intensidade expressa em porcentagem não é considerada adequada para comparação com outros estudos. Dessa forma, comumente expressa-se a energia fornecida à amostra pelo ultrassom em unidades de energia por tempo de processamento e área da sonda de ultrassom ($W\text{ cm}^{-2}$). A capacidade nominal do equipamento foi de 750 W. Porém, sabe-se que essa não é a energia real fornecida à amostra. Durante a execução dos experimentos é possível acompanhar na tela do equipamento a energia (W) fornecida à amostra para cada instante de tempo.

Além disso, é possível realizar uma estimativa dos gastos energéticos realizando-se experimentos em um calorímetro. Para tanto, coloca-se uma quantidade conhecida de amostra

no calorímetro e submete-se a amostra ao tratamento com ultrassom durante determinado período. Dessa forma, considerando-se que a amostra está em equilíbrio termodinâmico no início e no final do processo, calcula-se a energia transferida à amostra na forma de calor pela Equação 3, onde m é a massa de amostra (kg), C é a capacidade calorífica do líquido ($\text{J kg}^{-1}\text{C}^{-1}$) e ΔT é a diferença de temperatura no início e no final do processo. Esses experimentos foram realizados com água e resultaram em potência de 50 W cm^{-2} para a intensidade de 100 % do ultrassom e 23 W cm^{-2} para a intensidade de 50 %. Para a intensidade de 50 %, o valor obtido com o calorímetro foi bem próximo dos valores de potência lidos na tela do equipamento ($21 - 26 \text{ W cm}^{-2}$). Para a intensidade de 100 %, os valores lidos no equipamento variaram de 94 a 34 W cm^{-2} .

$$Q = mC\Delta T \quad \text{Equação 3}$$

Acredita-se que em intensidades mais altas o equipamento possui uma maior oscilação na energia fornecida à amostra. Os mesmos experimentos de calorimetria foram realizados em trabalho prévio (Zardo, 2018), e os resultados para 100 % da intensidade do ultrassom foram de 64 W cm^{-2} . Para a intensidade 50 %, o resultado foi similar (20 W cm^{-2}).

4.1.5 Análise dos extratos

Análises de carotenoides

Quantificação de carotenoides nos extratos

A concentração de carotenoides nos extratos foi determinada seguindo as recomendações de Rodriguez-Amaya (2001). Para tanto, 5 mL de extrato etanólico foram separados em frasco âmbar, e à amostra foi adicionado igual volume de solução de saponificação (KOH/metanol, 10 %, m/v). A partir dessa etapa, foi realizado o mesmo procedimento já descrito para a extração exaustiva: lavagem do extrato até pH neutro, coleta do extrato em presença de sulfato de potássio, evaporação do solvente em rota-evaporador, ressuspensão das amostras em etanol e leitura em espectrofotômetro.

Para cada experimento de extração, as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em miligramas de luteína por grama de biomassa seca (mg g^{-1}).

Determinação do perfil de carotenoides nos extratos

O perfil de carotenoides do extrato que apresentou o maior rendimento de extração (50 % de intensidade do ultrassom e 75 % de etanol), bem como do extrato obtido a partir extração exaustiva foram determinados. A metodologia utilizada foi baseada no trabalho descrito por Rodrigues et al. (2014). Foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida (*Waters*, Alliance e2695 Separations Module, USA) com detector UV-Vis e uma coluna C30 (YMC, 5 μm , 250 \times 4.6 mm id., *Waters*, Wilmington – DE, USA). A fase móvel utilizada foi metanol e éter metil-terc-butil (MTBE) com gradiente linear de 95:5 a 70:30 nos primeiros 30 min, de 70:30 a 50:50 nos 20 min subsequentes, e 50:50 nos últimos 15 min. Os cromatogramas foram analisados a 451 nm, e a identificação foi realizada de acordo com a ordem de eluição dos compostos na coluna C30, levando em consideração as características espectrais de cada pico, em comparação com os dados do padrão (*all-trans- β -carotene*, Sigma Aldrich, USA). A faixa de concentrações de solução padrão avaliada foi de 0,125 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Quantificação de lipídeos nos extratos

A concentração de lipídeos nos extratos etanólicos foi determinado de maneira similar ao descrito para a extração exaustiva, usando o método SPV (Mishra *et al.*, 2014). Nesse caso, para a realização da análise, 100 μL de extrato etanólico foram utilizados para a reação com o ácido sulfúrico. Posteriormente, foi realizado o mesmo procedimento já descrito para a extração exaustiva.

Para cada experimento de extração, as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em gramas de lipídeos por 100 grama de biomassa seca ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$).

Determinação do perfil de ácidos graxos nos extratos

O perfil de ácidos graxos foi determinado para o extrato de maior rendimento (50 % da intensidade do ultrassom e 75 % de etanol) e para o extrato obtido a partir da extração exaustiva de lipídeos. Os extratos foram submetidos ao método de Bligh & Dyer para possibilitar a transferência dos lipídeos para o clorofórmio.

O clorofórmio remanescente, contendo os lipídeos, foi evaporado com nitrogênio gasoso para realização da etapa de transesterificação (Joseph and Ackman, 1992). Para tanto, 1, 5 mL de solução de NaOH em metanol (0,5 N) foi adicionada as amostras, mantendo-se a

reação por 5 min em banho termostático a 100 °C. Após a transesterificação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e foram adicionados 2 mL de BF₃ (trifluoreto de boro). As amostras foram submetidas novamente a aquecimento (100 °C, 30 min) e, posteriormente, resfriadas. Após esse procedimento, adicionou-se 1 mL de iso-octano e 5 mL de solução de NaCl saturada (360 g L⁻¹) as amostras. Quando ocorreu a separação de fases, adicionou-se mais 1 mL de iso-octano. A fase com o iso-octano, contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos, foi transferida para outro tudo de ensaio, e o solvente foi removido com nitrogênio gasoso. As amostras foram acondicionadas em freezer a -18 °C até o momento da análise. Poucos minutos antes da injeção no cromatógrafo, as amostras foram ressuspendidas em solução de BHT (butil hidroxitolueno) em hexano. O sistema de cromatografia gasosa (*Shimadzu*, GC – 2010 Plus, Japan) utilizado possui uma coluna capilar de sílica fundida (*Shimadzu*, SBL 100, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de filme) e um detector FID (detector de ionização em chama). Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL min⁻¹. As temperaturas do detector e da câmara de injeção foram 260 e 240 °C, respectivamente. A rampa de temperatura utilizada na coluna foi de 50 °C no primeiro minuto, com aumento de 10 °C por min até atingir 250 °C. A identificação foi realizada pela comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos, previamente analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS).

4.1.6 Análises de microscopia eletrônica de transmissão

A microestrutura das células da microalga após o processo de extração na melhor condição (50 % de intensidade e 75 % da concentração de etanol, v/v), bem como das células que não sofreram qualquer tipo de tratamento (controle), foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Essa análise foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME – UFRGS), utilizando o microscópio *JEOL*, JEM 1200 ExII, USA. Previamente à disposição das amostras no microscópio, as células foram tratadas com uma solução de acetato de uranilo (2 % m/v), e citrato de chumbo foi utilizado como padrão negativo. As amostras foram dispersas em um *grid* de silicone, e as medidas no microscópio foram realizadas a 120 kV.

4.1.7 Cinética de extração de carotenoides usando campo elétrico moderado

O equipamento de MEF utilizado no presente trabalho é apresentado na Figura 15 consiste de: a) um variador de tensão de 0 a 220 V (*Sociedade Técnica Paulista LTDA*, Varivolt,

Brasil); b) um painel de controle conectado a um computador com software para monitoramento dos dados de corrente elétrica, tensão e temperatura; c) um estabilizador. Para o controle da temperatura foi usado um Pt-100 (*Novus*, Brasil) em aço inoxidável. Além do sistema de MEF, também foram utilizados: d) dois banhos termostáticos; e) um agitador magnético; f) célula de extração (as mesmas células descritas nos experimentos de ultrassom). Na Figura 15 é apresentada uma fotografia do sistema utilizado.

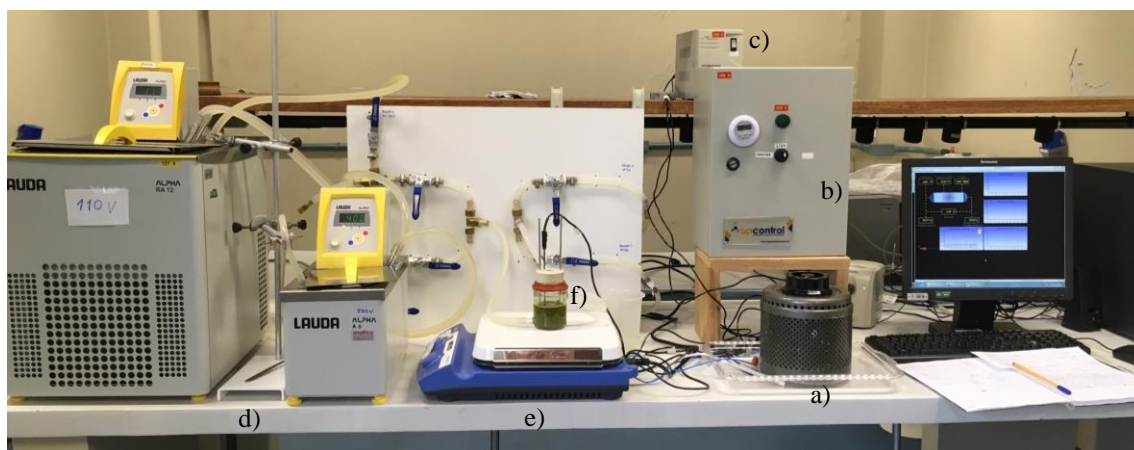


Figura 15. Fotografia do equipamento de MEF usado nos experimentos de cinética de extração de carotenoides.

Os experimentos de cinética de extração com MEF foram realizados em condições otimizadas determinadas em estudo prévio (Jaeschke *et al.*, 2016b): um pré-tratamento de 10 min com campo elétrico moderado (180 V) e uma concentração de etanol de 25 % (v/v), seguido de uma etapa difusiva de 50 min, usando 75 % de concentração de etanol (v/v). As extrações foram realizadas em quatro temperaturas diferentes: 30, 40, 50 e 60 °C. Para cada temperatura, foi realizado um experimento controle, sem aplicação do MEF. Uma representação esquemática dos experimentos pode ser visualizada na Figura 16.

Previamente à realização das extrações, a condutividade elétrica das amostras foi ajustada ($500 \mu\text{S cm}^{-1}$). Esse procedimento foi necessário devido à alta concentração salina do meio de cultivo utilizado. Para tanto, foram realizadas lavagens da biomassa liofilizada com água destilada. Essas lavagens foram realizadas por centrifugação da amostra e adição de água até que a condutividade elétrica fosse inferior ao valor desejado. Após, adicionou-se solução salina (NaCl , 4 g L^{-1}) para o ajuste da condutividade.

Para o pré-tratamento, 80 mL de solução de etanol (25 %, v/v) foram adicionados às amostras na célula de extração. Essa célula é encamisada, construída em Pyrex, e possui volume

útil de 100 mL. Os eletrodos utilizados foram de titânio, com geometria curvada, para acompanhar a geometria cilíndrica da célula de extração. Como os eletrodos possuíam geometria curva, a distância entre os eletrodos foi variável, de 4,5 a 5 cm. O controle de temperatura dos experimentos foi possível através da passagem de água pela camisa da célula, pela conexão com um banho termostático. Antes de iniciar a passagem da corrente elétrica, conectou-se à célula ao banho termostático de resfriamento e esperou-se até que a temperatura da amostra atingisse 6 °C. Após esse período, iniciou-se a utilização do campo elétrico, e esse instante foi considerado como o tempo zero do pré-tratamento. Foram coletadas amostras (15 mL) ao fim do pré-tratamento, que foram armazenadas em banho de gelo.

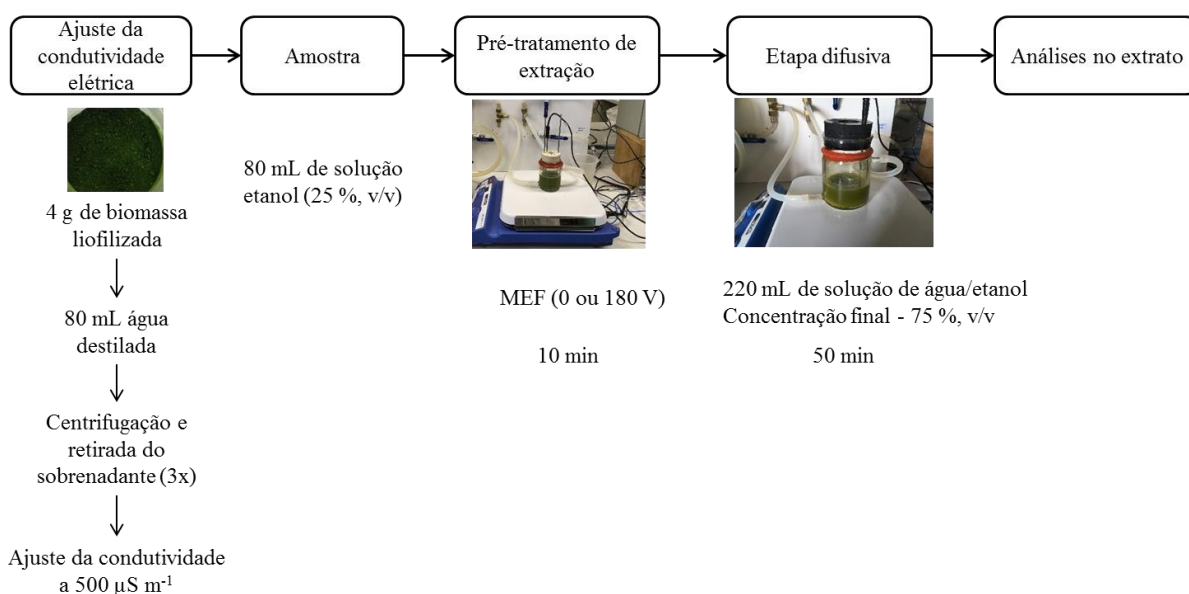


Figura 16. Esquematização dos experimentos de cinética de extração de carotenoides realizados.

Após os 10 min, as amostras foram transferidas para outra célula, de volume maior (300 mL), também encamisada e em Pyrex, para a realização da etapa difusiva. Durante essa etapa, a célula foi conectada a outro banho termostático, previamente ajustado à temperatura do experimento (30, 40, 50 ou 60 °C). Após a conexão com o banho termostático, adicionou-se etanol e água à amostra, de forma que a concentração final da amostra fosse 75 % (v/v). Esse instante foi considerado como o tempo zero da etapa difusiva. Foram coletadas amostras nos tempos 1, 5, 30, 40 e 50 min da etapa difusiva. Ao adicionar as soluções de etanol à amostra, houve uma diminuição da temperatura, visto que as soluções estavam à temperatura ambiente. Como essa variação ocorreu para todos os experimentos, esses efeitos foram considerados negligenciáveis. De forma similar ao realizado para o pré-tratamento, as amostras foram

armazenadas em banho de gelo, centrifugadas (10.000 g, 10 min, 20 °C, *Sigma*, 2-16KL, Alemanha) e filtradas (*Allcrom*, PTFE, 0,45 µm).

Para os experimentos controle, foi realizado procedimento similar. Esses experimentos foram realizados de maneira que o perfil de temperatura fosse similar ao obtido com a utilização do campo elétrico. Para tanto, durante o pré-tratamento, a célula de extração foi conectada a um banho termostático de aquecimento. Esse procedimento permitiu a avaliação dos efeitos do MEF (efeitos elétricos), excluindo os efeitos térmicos.

4.1.8 Análise de carotenoides totais e do perfil de carotenoides nos extratos

As análises de quantificação e determinação do perfil de carotenoides nos extratos foram realizadas conforme já descrito para os extratos obtidos após a extração utilizando ultrassom.

4.2 Artigo 1

Nesta seção é apresentado o primeiro artigo, publicado no periódico internacional *Bioresource Technology*. A publicação do artigo na presente tese de doutorado foi autorizada pela revista (licença número 4681360584406).

Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*

Abstract

The present work evaluated the use of ultrasound as a pre-treatment to lipid and carotenoid extraction from the microalgae *Heterochlorella luteoviridis*. The pre-treatment was performed in the presence of ethanol (25 %, v/v) with the ultrasound intensity varying from 0 to 100 % (435 kJ kg⁻¹). After the pre-treatment, a diffusive step was performed in order to evaluate different ethanol concentrations (50 – 75 %, v/v). The results regarding carotenoid extraction showed that there is an optimal extraction region: 40 – 80 % of ultrasound intensity and 60 – 75 % of ethanol concentration. The lipid extraction was not influenced by the ultrasound pre-treatment and increased with the increase of ethanol concentration.

Keywords: microalgae; pigments; fatty acids; ethanol.

4.2.1 Introduction

Microalgae are microorganisms easily adaptable to environmentally changing conditions, present high biomass productivity per unit area and their cultivation does not use arable land, not competing with food production. Once there is a growing demand for antioxidant, colorant and bioactive compounds obtained from natural sources, the carotenoids and the long chain polyunsaturated ω -3 fatty acids synthesized by microalgae have been attracting attention (Chisti, 2008; Ahmed *et al.*, 2014).

Although the conventional carotenoid and lipid extraction methods present good extraction yields, these methodologies use organic solvents, which can be toxic or inappropriate, depending on the product application. In contrast to these conventional methods, the extraction assisted by novel technologies, as ultrasound, pulsed electric field and moderate electric field, has called attention since these technologies are cleaner and lesser aggressive to the environment, with minimal use of toxic organic solvents (Roselló-Soto *et al.*, 2015).

Research on lipid extraction from microalgae assisted by ultrasound has been extensively reported (Araujo *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014; Natarajan *et al.*, 2014). However, most of these studies evaluate ultrasound technology combined with organic solvents, such as methanol, chloroform and hexane. There are few data in literature describing the use of less aggressive solvents in combination with ultrasound technology.

Recently, extraction of polyphenolic compounds and pigments assisted by ultrasound have been evaluated (Deenu *et al.*, 2013; Parniakov *et al.*, 2015). Lutein was extracted from *Chlorella vulgaris* using ethanol (90 %) as extraction solvent, as well as an enzyme/ultrasound combination during the pre-treatment (Deenu *et al.*, 2013). The highest lutein recovery ($3.16 \pm 0.03 \text{ mg g}^{-1}$) was achieved using frequency and ultrasound intensity of 35 kHz and 56.6 W cm^{-2} , respectively. The optimized values of temperature, time and solvent/solid ratio for lutein extraction were $37.7 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 h and 31 mL g^{-1} , respectively. Ultrasound-assisted extraction was also used to extract phenolic compounds and chlorophylls from *Nannochloropsis* spp (Parniakov *et al.*, 2015). The researchers evaluated water, ethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO) as extraction solvents as well as binary mixtures of water/DMSO (50 %) and water/ethanol (25 - 50 %). The results were compared with the conventional extraction method. The optimized extraction conditions were observed using the ultrasound pre-treatment (400 W, probe diameter not specified by the authors), for 5 min with the binary mixture of water/DMSO and water/ethanol at 25 - 30 %.

The aim of the present work was to evaluate the ultrasound technology in the presence of ethanol as a pre-treatment for carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* biomass. Furthermore, the influence of different ethanol concentrations was evaluated during a diffusive step.

4.2.2 Materials and methods

Materials

Heterochlorella luteoviridis cultivation was performed autotrophically in flat-plate airlift photobioreactors, under a semi-continuous mode, as described in more details by Jaeschke *et al.* (2016). HPLC-grade solvents - methanol, methyl tert-butyl ether and hexane - were obtained from *Vetec* (Duque de Caxias, Brazil). All standards used in the high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC) analyses were acquired from *Sigma Aldrich* (St. Louis, USA).

Ultrasound extraction experiments

The extraction experiments comprised a pre-treatment and a diffusive step. The pre-treatment was performed for 10 min using a fixed ethanol concentration of 25 % (v/v) and the ultrasound equipment (SONICS, *Vibra-Cell*, USA, probe diameter of 1.2 cm, 20 kHz) with intensity varying from 0 to 100 %, which corresponds to 50 W cm⁻² of dissipated power, 435 kJ kg⁻¹ of dissipated energy and 114 μm of amplitude. The dissipated energy was measured with a calorimeter and is quite inferior to the information provided by the equipment producer (664 W cm⁻², 5,940 kJ kg⁻¹). During this step, it was used 4 g of freeze-dried biomass and 80 mL of water/ethanol solution (25 %, v/v) in a 100 mL Pyrex[®] extraction cell with a water jacket connected to a water bath, which allowed to keep sample temperature lower than 30 °C. After the pre-treatment, samples were transferred to another vessel (Pyrex[®] cell with a water jacket) with water/ethanol solution to a final volume of 300 mL. During this diffusive step, performed for 50 min, ethanol concentration was evaluated from 50 to 75 % (v/v), and the temperature was kept at 30 °C.

Determination of carotenoid content of the extracts

The carotenoid content of the extracts was determined using the methodology described by Rodriguez-Amaya (2001). Aliquots of 5 mL of the ethanolic extract were used to perform the partition step, using ethylic and petroleum ether (1:1). After the partition, saponification and

washing step, samples were resuspended in ethanol and analyzed on a spectrophotometer at 445 nm (*PG Instruments Ltd.*, Model T80 UV-Vis, United Kingdom). The molar absorptivity of lutein in ethanol ($\epsilon = 2,550$) was used to calculate carotenoid concentration.

Determination of lipid content of the extracts

The lipid content of the extracts was analyzed using the sulfo-phospho-vanillin (SPV) method as described by Jaeschke *et al.* (2016). In this methodology, the lipid content of the samples is determined with a spectrophotometer (*PG Instruments Ltd.*, Model T80 UV-Vis, United Kingdom) using a olive oil standard calibration curve, with concentrations varying from 0.4 to 2.0 mg L⁻¹.

Exhaustive extractions

In order to obtain the total carotenoid and lipid content of the freeze-dried *Heterochlorella luteoviridis* biomass, exhaustive extractions were performed according to the following. The total carotenoid content of the biomass were determined using the methodology described by Mandelli *et al.* (2012). In this case, it was performed an exhaustive extraction using acetone and ethyl acetate. The maceration step was performed until no solvent color was observed. The results were expressed in milligrams of lutein per gram of dried biomass (mg g⁻¹). The total lipid content of the biomass was also determined using the aforementioned SPV methodology. The extraction was performed using 0.05 g of dry biomass, previously hydrated with 100 μ L of distilled water.

Carotenoid profile of the extract and the biomass

The carotenoid profile of the best extraction point (50 % of ultrasound intensity, 75 % of ethanol concentration) and of the freeze-dried microalgae cells (exhaustive extraction) were determined following the methodology described elsewhere Jaeschke *et al.* (2016). The chromatograms were analyzed at 451 nm. The identification was performed according to the elution order on C30 column and UV-Vis spectrum characteristics and by the injection of *all-trans- β -carotene* standard (0.125 – 15 μ g mL⁻¹).

Fatty acid methyl esters (FAMES) profile of the extract and the biomass

The sample corresponding to the best extraction point (50 % of ultrasound intensity, 75 % of ethanol concentration) and the freeze-dried microalgae cells were used to performed lipid extraction using the Bligh & Dyer methodology Bligh & Dyer (1959). The remaining

chloroform phase containing the lipids was dried using nitrogen gas in order to perform the transesterification step according to Joseph & Ackman (1992). After the transesterification, samples were analyzed by gas chromatography according to Jaeschke *et al.* (2016). The identification was performed comparing the retention times with those of the methyl ester standards, previously analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS).

Transmission electron microscopy

The microstructure of the biomass after the extraction process (50 % of ultrasound intensity, 75 % of ethanol concentration, v/v) and a non-treated biomass (control) were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) (*JEOL*, JEM 1200 ExII, USA). Samples were dispersed on a silicone *grid* and TEM observations were performed at 120 kV. Uranyl acetate solution (2 %, w/v) and lead citrate were used as a negatively stained standard.

Experimental design and statistical data analyses

A 3² factorial design with nine combinations was conducted to evaluate the effect of the ultrasound intensity (0 – 100 %) and ethanol concentration (50 - 75 %). All treatments were carried out in duplicate, and the analyses of each independent sample were carried out in triplicate. The results were analyzed using the software Statistica® (13.0, *Statsoft Inc.*, Tulsa, USA) and experimental data were fitted to the polynomial regression model showed in Equation 1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

where Y represents the carotenoid (mg g⁻¹) or lipid (g 100 g⁻¹) content, X_1 is the coded variable for ultrasound intensity (I), X_2 is the coded variable for ethanol concentration (C_{EtOH}), and β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} and β_{12} represent the equation coefficients. Variables X_1 and X_2 are defined as:

$$X_1 = \frac{I - 50}{50} , \quad (2)$$

$$X_2 = \frac{C_{EtOH} - 62.5}{12.5} \quad (3)$$

4.2.3 Results and discussion

Effects of ultrasound intensity and ethanol concentration

The effects of ultrasound intensity and ethanol concentration on lipid and carotenoid extraction are presented in Table 1. The models obtained are considered adequately for data representation (determination coefficient of 0.865 and 0.935 for carotenoids and lipids, respectively). Results showed that ultrasound intensity and ethanol concentration significantly influenced carotenoid extraction. Lipid extraction, on the other hand, was significantly influenced only by ethanol concentration.

Table 1. Regression coefficients for coded variables obtained for carotenoid and lipid extraction.

| Regression coefficients | Carotenoids | | Lipids | |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| | coefficient | <i>p</i> -value | coefficient | <i>p</i> -value |
| β_0 | 1.129 | < 0.001 | 109.378 | < 0.001 |
| $\beta_1 (I)$ | - | - | - | - |
| $\beta_2 (C_{EtOH})$ | 0.393 | < 0.001 | 30.996 | < 0.001 |
| $\beta_{11} (I^2)$ | -0.343 | 0.003 | - | - |
| $\beta_{22} (C_{EtOH}^2)$ | -0.368 | 0.002 | - | - |
| $\beta_{12} (I \times C_{EtOH})$ | 0.166 | 0.029 | - | - |
| R^2 | 0.865 | | 0.935 | |
| <i>p</i> -value | 1.4×10^{-5} | | 6.0×10^{-11} | |

Table 2 presents values of carotenoid and lipid concentration in the extracts and the extraction yield for all treatments. The best condition to extract carotenoid was found to be 50 % of ultrasound intensity and 75 % of ethanol concentration. Using this condition it was possible to extract up to 80 % of the total carotenoid content. The best lipid extraction yield (81

%) was obtained using 75 % of ethanol concentration with or without the application of the ultrasound.

Table 2. Carotenoid and lipid concentration on the extracts and the extraction yield after application of different ultrasound intensities and ethanol concentrations.*

| Ultrasound intensity (%) | C_{EtOH} (%) | Carotenoids | | Lipids | |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|
| | | Concentration (mg g ⁻¹) | Yield** (%) | Concentration (mg g ⁻¹) | Yield** (%) |
| 100 | 50.0 | 0.07 ± 0.00 ^e | 4 | 84.7 ± 2.5 ^d | 47 |
| 100 | 62.5 | 0.84 ± 0.02 ^c | 51 | 108.3 ± 0.3 ^c | 60 |
| 100 | 75.0 | 0.97 ± 0.09 ^c | 59 | 146.2 ± 3.9 ^b | 81 |
| 50 | 50.0 | 0.08 ± 0.00 ^e | 5 | 77.4 ± 0.6 ^d | 43 |
| 50 | 62.5 | 1.26 ± 0.05 ^b | 77 | 111.4 ± 3.7 ^c | 62 |
| 50 | 75.0 | 1.31 ± 0.04 ^b | 80 | 129.3 ± 8.9 ^{bc} | 71 |
| 0 | 50.0 | 0.26 ± 0.02 ^e | 16 | 72.3 ± 3.1 ^d | 40 |
| 0 | 62.5 | 0.61 ± 0.00 ^d | 37 | 109.8 ± 0.31 ^c | 61 |
| 0 | 75.0 | 0.49 ± 0.01 ^d | 30 | 144.9 ± 0.4 ^b | 80 |
| Exhaustive extraction | | 1.64 ± 0.13 ^a | - | 180.9 ± 6.4 ^a | - |

* mean ± standard deviation; means with the same lowercase letter in the same column do not have significant difference ($p > 0.05$).

**comparison with the exhaustive extraction.

The lipid extraction linearly increased with the increase of the ethanol concentration. This is explained by the interaction between the solvent and the cell phospholipid membrane due to its chemical affinity, destabilizing the cell structure (Patra *et al.*, 2006). The use of ultrasound as a pre-treatment to lipid extraction without the addition of organic solvents was evaluated by Ma *et al.*(2014). The experiments were performed using water as solvent in the pre-treatment and organic solvents in the diffusive step. According to the authors, ultrasound promoted the rupture of the microalgae cells in small fragments, increasing the surface area of the cells and, consequently, the extraction. In other studies, the integrity of different microalgae strains cells exposed to ultrasound was evaluated. Mendoza *et al.* (2015) studied several species

of microalgae submitted to 4 s of ultrasonic treatment (20 kHz, 40 % of amplitude), and compared the cells with control samples (non-sonicated). According to the authors, the rupture percentage of all species increased, in average, 8.6 % after the sonication treatment.

Some studies investigated the use of ethanol as lipid extraction solvent in comparison with other organic solvents (hexane, chloroform and methanol) (D’oca *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2015). Dos Santos *et al.* (2015) evaluated lipid extraction from *Chlorella vulgaris* at 25 °C using ultrasonic bath (40 kHz, 20 min). The best extraction result was obtained using a mixture of chloroform/methanol (19 % of lipids, dry biomass), while the extraction using ethanol provided 10 % of lipids. Different methods (soxhlet, ultrasonic bath and magnetic stirring) and solvents (chloroform, methanol, hexane and ethanol) of lipid extraction were studied by D’Oca *et al.* (2011). According to the authors, there was an increase on the extraction yield when polar solvents were used, indicating that the majority of lipids of the microalgae studied were polar.

When the organic solvent penetrates the cell membrane, it interacts with neutral lipids (non-polar) due to Van der Waals forces. Nevertheless, in some microalgae species, neutral lipids are linked with polar lipids (phospholipids and glycolipids) which, in turn, are associated to proteins via hydrogen bonds in the cell membrane (Dos Santos *et al.*, 2015). In these cases, only the presence of more polar solvents can interact efficiently with the lipids. In the present work, it is possible to infer that the presence of ethanol in a concentration of 75 % disabled the cellular structure, interacting effectively with the lipids, which are possibly associated to polar lipids and proteins in the cell membrane. This intense effect of ethanol on cell membrane may have surpassed the ultrasound effects, which were not significant for lipid extraction.

The carotenoid extraction increased with the increase of the ultrasound intensity and ethanol concentration until a maximum value of approximately 80 %. The combined effect of the two variables is marked in contour lines, comprising 60 - 75 % of ethanol concentration and 50 - 80 % of ultrasound intensity (Figure 1A – Supplementary Material).

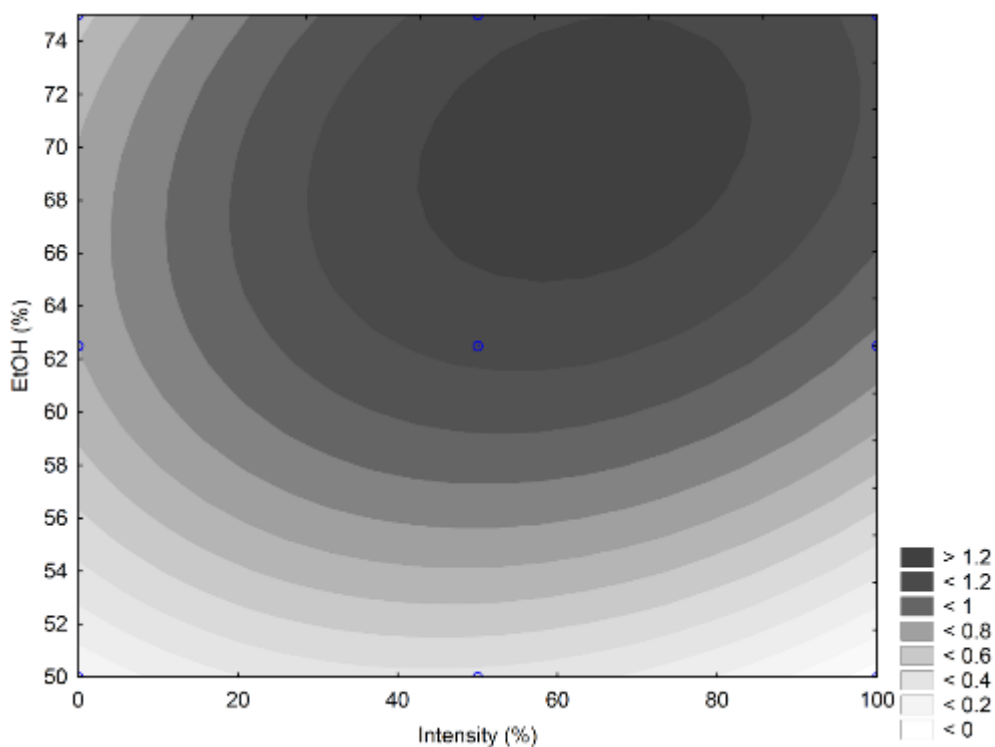


Figure 1A. Influence of different ethanol concentrations and ultrasound intensity on carotenoids extraction (mg g^{-1}).

Carotenoids are found in the cell chloroplasts, which are involved by two phospholipidic membranes; because of that, the ethanol itself was not effective to extract these compounds. Possibly, the pre-treatment with ultrasound promoted modifications on chloroplasts structure, releasing the internal material to the cytoplasm, allowing the interaction with ethanol. The microstructure of the cells after the extraction process (Figure 2A – Supplementary Material) highlights the findings aforementioned. It is possible to compare the microstructure of the cells before and after the extraction (50 % of ultrasound intensity, 75 % of ethanol concentration, v/v); the structure of the extracted biomass is damaged and the cells seems to no longer present a well-defined cell structure, evidencing that the extraction process applied in the present work physically destabilized the microalgae cells.

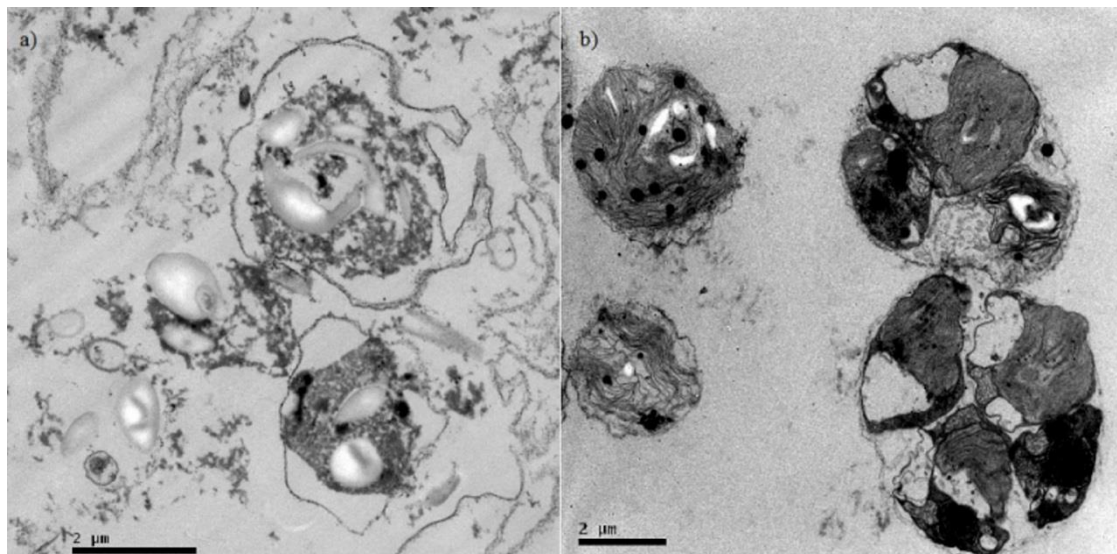


Figure 2A. Transmission electron microscopy of the *Heterochlorella luteoviridis* cells a) after the extraction process (50 % of ultrasound intensity, 75 % of ethanol concentration in the diffusive step, v/v); b) control (non-treated biomass).

It was observed a decrease of the extraction yield when the ultrasound intensity was closer to 100 %. This behavior may be explained by the formation and accumulation of radicals, such as OH^\bullet e H^\bullet , during the cavitation process. This phenomenon can lead to chain reactions, involving degradation products, that can react with antioxidant compounds, such as carotenoids, decreasing their concentration in the medium (Pingret *et al.*, 2013). Moreover, it is well known that the waves generated by ultrasound promote the formation and the collapse of bubbles that leads to a local intense heating, reaching temperatures up to 5,000 K (Sillanpää *et al.*, 2008). These hot spots can accelerate the chemical reactivity of the medium, accelerating the degradation process (Pingret *et al.*, 2013).

The results obtained in the present work are in agreement with those presented by Parniakov *et al.* (2015), who evaluated chlorophyll extraction assisted by ultrasound (0 to 400 W) from *Nannochloropsis* spp. using water as solvent. According to the authors, chlorophyll content decreased after 7.5 min at 400 W (probe diameter not specified). Otherwise, when lower ultrasound intensities were applied, the chlorophyll extraction was higher than the conventional extraction, being dependent of the extraction time (the yield increased with increasing time). As well as carotenoids, chlorophylls are oxygen reactive thermolables pigments found in the cell chloroplasts. As mentioned by the authors, these compounds may have been degraded under high power conditions and long extraction times.

The stability of β -carotene under ultrasound process was evaluated by Sun *et al.* (2010). The experiments were performed with all-*trans*- β -carotene standard with a frequency of 23 ± 2 kHz and intensities varying from 5 to 85 % (60.5 and 1028.9 W cm⁻²), respectively. The ultrasound treatment was performed during 10 min on pulsed mode (2 s on and 2 s off) with temperature control. The authors reported that the ultrasound intensity affected β -carotene concentration; the concentration of β -carotene in dichloromethane decreased, approximately 70 %, with the increase of ultrasound intensity from 60.5 to 302.5 W cm⁻². These results corroborate the ones found in the present work, evidencing that the ultrasound power intensity is a critical parameter that should be taken into account on carotenoid extraction and stability.

The use of moderate electric field (MEF) as a pre-treatment to the carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis*, using the same solvent concentrations in the pre-treatment and in the diffusive step, was previously evaluated by our research group (Jaeschke *et al.*, 2016). As both technologies (ultrasound and MEF) were applied under the same experimental conditions, comparisons between them are feasible. Lipid extraction was not influenced by any of the technologies. Carotenoid extraction, on the other hand, was influenced by both technologies with similar maximum extraction yields (73 % and 80 % for MEF and ultrasound, respectively).

Some studies were performed evaluating the effect of pulsed electric field (PEF) on carotenoids extraction from *Chorella vulgaris* (Luengo, Condón-Abanto, Álvarez, *et al.*, 2014; Luengo *et al.*, 2015). According to these authors, lutein extraction was influenced by the electric field strength, treatment time (pulse duration) and temperature. The authors pointed out that higher electric field strength are needed to electroporate the chloroplast structure, enhancing carotenoids extraction. These results evidenced the need of an additional energy for cell disintegration, letting the release of compounds in the medium and their effective interaction with the extraction solvent.

Carotenoid profile after exhaustive and ultrasound extraction

The carotenoid profiles of the extract corresponding to the best extraction condition (50 % of ultrasound intensity, 75 % of ethanol concentration, v/v) and after exhaustive extraction were evaluated (Figure 3A – Supplementary Material).

Heterochlorella luteoviridis carotenoid profile after exhaustive extraction was all-*trans*-lutein (48.0 %), all-*trans*-zeaxanthin (13.7 %), all-*trans*- β -carotene (10.4 %), all-

trans- α -carotene (7.9 %), *cis- β -carotene* (5.8 %), *cis-violaxanthin* (4.8 %), *all-trans-violaxanthin* (3.6 %) and *cis-lutein* (3.5 %). After the application of ultrasound, it was observed that *all-trans-lutein* and *all-trans-zeaxanthin* were mainly extracted; these carotenoids corresponded to 71.3 and 19.1 %, respectively, of the total carotenoids found in the extract. This result is attributed to the chemical affinity of these polar carotenoids to the extraction solvent. The nonpolar carotenoids identified after the exhaustive extraction were also identified in the ultrasound extracts but in lower concentrations (*β -carotene*, 4.5 % and *α -carotene*, 0.26 %).

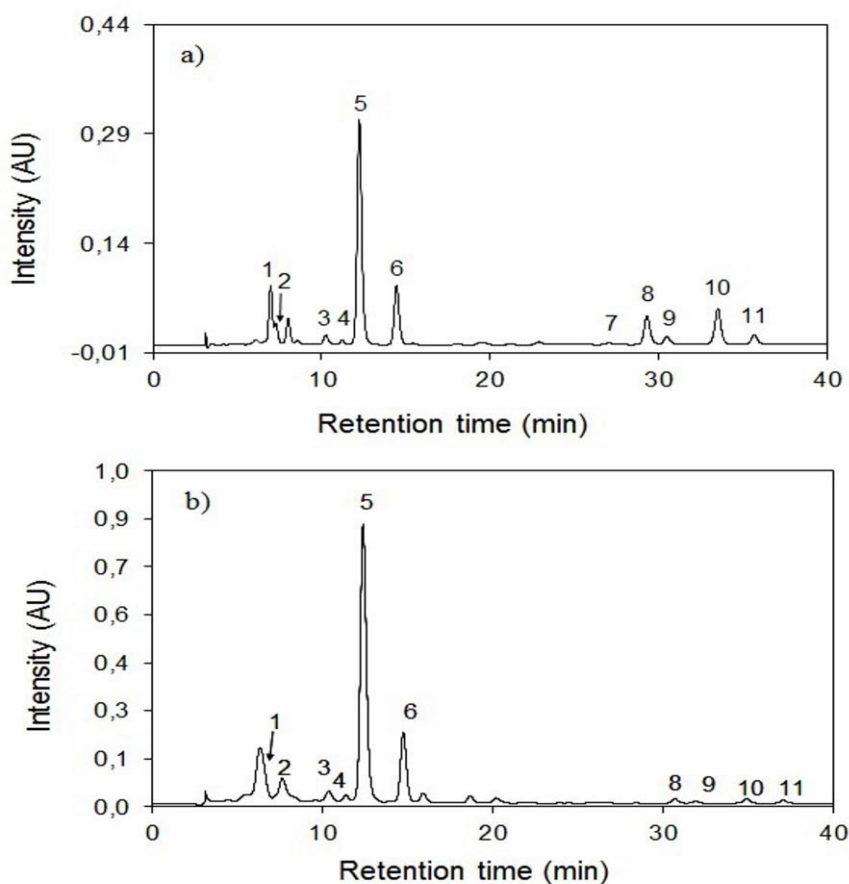


Figure 3A. Chromatograms of the carotenoid profile of the a) freeze-dried biomass after exhaustive extraction and b) ethanolic extract (50 % of ultrasound intensity, 75 % of ethanol). Identified carotenoids were all-trans-violaxanthin (1), cis-violaxanthin (2), 13-cis-lutein (3), 13'-cis-lutein (4), all-trans-lutein (5), all-trans-zeaxanthin (6), 15-cis- β -caroteno (7), all- trans- α -caroteno (8), 13-cis- β -caroteno (9), all-trans- β -carotene (10), 9-cis- β -caroteno (11).

Fatty acid methyl esters profile after exhaustive and ultrasound extraction

Fatty acid methyl esters (FAMES) profile of the extract with the best extraction yield and the one after the exhaustive extraction are presented in Figure 4A – Supplementary Material. After exhaustive extraction, the following FAME profile was identified: palmitic acid (C16:0, 35.0 %), linoleic acid (LA, C18:2n6, 26.0 %), α -linolenic acid (ALA, C18:3n3, 10.7 %), stearic acid (C18:0, 6.7 %) and oleic acid (C18:1n9, 5.9 %). Other FAMES were identified (behenic acid (C22:0), γ -linolenic acid (GLA, C18:3n6), lignoceric acid (C24:0), myristic acid (C14:0), miristoleic acid (C14:1), docosapentaenoic acid (C22:5n6)) in lower concentrations.

The FAMES profile of the ethanolic extract after ultrasonication was similar to the one found after the exhaustive extraction. The major FAME was also palmitic acid (40.1 %), followed by LA (24.7 %), ALA (9.8 %), oleic acid (5.7 %) and stearic acid (5.8 %). It is possible to observe that oxidation process did not occurred, once polyunsaturated fatty acids were identified also in the extracts with similar concentrations. Carotenoids act as an antioxidant by scavenging single oxygen, hydroxyl, and superoxide radicals, and by reacting with peroxy radicals ROO \cdot (Fennema, 2007). They probably reacted preferentially with the free radicals released in the medium, preserving the polyunsaturated fatty acids. This result is encouraging taking into account the importance of these long chain fatty acids, as aforementioned.

4.2.4 Conclusions

Ultrasound in the presence of ethanol, in adequate power intensities, can be used as an alternative technology to extract carotenoids from *Heterochlorella luteoviridis*. The best extraction yield (80 %) was obtained with 40-80 % of ultrasound intensity and 60-75 % of ethanol concentration. Lipid extraction was affected only by ethanol concentration (81 % of extraction yield with 75 % of ethanol). The ultrasound scale-up represents a major step on the development of new sustainable extraction technologies with reduced time and solvent. Detailed analysis of cost, safety, efficiency and reproducibility of the extraction needs to be taken into account for industrial applications.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) as a scholarship for the first

author and as the PNPD grant and the Microscopy and Microanalyses Center (CMM/UFRGS) for the use of the microscope.

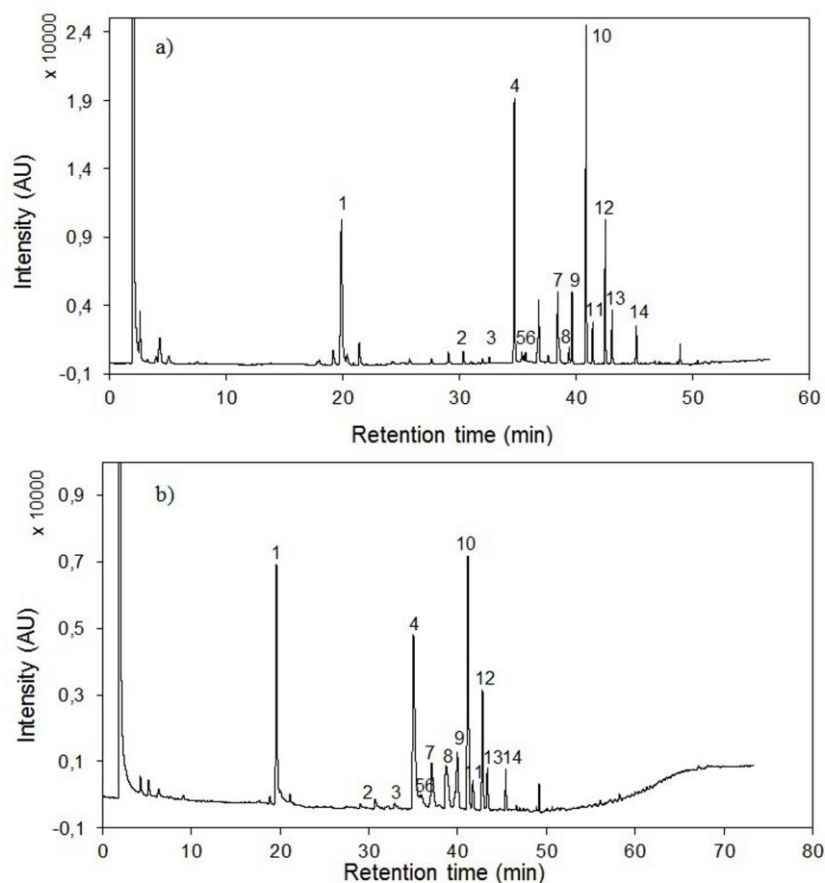


Figure 4A. Chromatograms of the the fatty acid profile of the a) biomass after exhaustive extraction and the b) ethanolic extract (50 % of ultrasound intensity, 75 % of ethanol). The identified FAMES were the standard (1), C:14 (2), C:14:1 (3), C16:0 (4), C:16:1n9 (5), C:16:1n7 (6), C:18:0 (7), C18:1n6c (8), C18:1n9c (9), C:18:2n6c (10), C18:3n6 (11), C18:3n3 (12), C:22:0 (13), C:24:0 (14).

References

- [1] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25(3) (2007) 294-306.
- [2] F. Ahmed, K. Fanning, M. Netzel, W. Turner, Y. Li, P.M. Schenk, Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters, *Food Chemistry* 165(0) (2014) 300-306.
- [3] A.C. Guedes, H.M. Amaro, F.X. Malcata, Microalgae as Sources of Carotenoids, *Marine Drugs* 9(4) (2011) 625-644.

- [4] D.A. Cooper, A.L. Eldridge, J.C. Peters, Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: A review of recent research, *Nutrition Reviews* 57(7) (1999) 201-214.
- [5] J.H. Lee, J.H. O'Keefe, C.J. Lavie, W.S. Harris, Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability, *Nat Rev Cardiol* 6(12) (2009) 753-758.
- [6] H.-P. Tsai, L.-T. Chuang, C.-N.N. Chen, Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis* sp. DS3, *Food Chemistry* 192 (2016) 682-690.
- [7] E. Roselló-Soto, C.M. Galanakis, M. Brnčić, V. Orlien, F.J. Trujillo, R. Mawson, K. Knoerzer, B.K. Tiwari, F.J. Barba, Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions, *Trends in Food Science & Technology* 42(2) (2015) 134-149.
- [8] A. Deenu, S. Naruenartwongsakul, S. Kim, Optimization and economic evaluation of ultrasound extraction of lutein from *Chlorella vulgaris*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 18(6) (2013) 1151-1162.
- [9] G.S. Araujo, L.J.B.L. Matos, J.O. Fernandes, S.J.M. Cartaxo, L.R.B. Gonçalves, F.A.N. Fernandes, W.R.L. Farias, Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method, *Ultrasonics Sonochemistry* 20(1) (2013) 95-98.
- [10] Y.-A. Ma, Y.-M. Cheng, J.-W. Huang, J.-F. Jen, Y.-S. Huang, C.-C. Yu, Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37(8) (2014) 1543-1549.
- [11] R. Natarajan, W.M.R. Ang, X. Chen, M. Voigtmann, R. Lau, Lipid releasing characteristics of microalgae species through continuous ultrasonication, *Bioresource Technology* 158 (2014) 7-11.
- [12] O. Parniakov, E. Apicella, M. Koubaa, F.J. Barba, N. Grimi, N. Lebovka, G. Pataro, G. Ferrari, E. Vorobiev, Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp, *Bioresource Technology* 198 (2015) 262-267.

- [13] L.H. Kochem, N.C. Da Fré, C. Redaelli, R. Rech, N.R. Marcílio, Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger, *Chemical Engineering & Technology* 37(1) (2014) 59-64.
- [14] R.L. Guillard, Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in: W. Smith, M. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Springer US1975, pp. 29-60.
- [15] D.B. Rodriguez-Amaya, *A guide to carotenoid analysis in foods*, ILSI Press, Washington DC, 2001.
- [16] F. Mandelli, F. Yamashita, J.L. Pereira, A.Z. Mercadante, Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design, *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (2012) 126-134.
- [17] S.K. Mishra, W.I. Suh, W. Farooq, M. Moon, A. Shrivastav, M.S. Park, J.-W. Yang, Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method, *Bioresource Technology* 155(0) (2014) 330-333.
- [18] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8) (1959) 911-917.
- [19] D.B. Rodrigues, C.R. Menezes, A.Z. Mercadante, E. Jacob-Lopes, L.Q. Zepka, Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*, *Food Research International* 77, Part 2 (2015) 273-279.
- [20] J.D. Joseph, R.G. Ackman, Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study, *Journal of AOAC International* 75(3) (1992) 488-506.
- [21] M. Patra, E. Salonen, E. Terama, I. Vattulainen, R. Faller, B.W. Lee, J. Holopainen, M. Karttunen, Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers, *Biophysical Journal* 90(4) (2006) 1121-1135.
- [22] H. Mendoza, L. Carmona, P. Assunção, K. Freijanes, A. de la Jara, E. Portillo, A. Torres, Variation in lipid extractability by solvent in microalgae. Additional criterion for selecting species and strains for biofuel production from microalgae, *Bioresource Technology* 197 (2015) 369-374.
- [23] J.M. Greenly, J.W. Tester, Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae, *Bioresource Technology* 184 (2015) 276-279.

- [24] R.R. dos Santos, D.M. Moreira, C.N. Kunigami, D.A.G. Aranda, C.M.L.L. Teixeira, Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass, *Ultrasonics Sonochemistry* 22 (2015) 95-99.
- [25] M.G.M. D'Oca, C.V. Viêgas, J.S. Lemões, E.K. Miyasaki, J.A. Morón-Villarreyes, E.G. Primel, P.C. Abreu, Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*, *Biomass and Bioenergy* 35(4) (2011) 1533-1538.
- [26] D. Pingret, A.-S. Fabiano-Tixier, F. Chemat, Degradation during application of ultrasound in food processing: A review, *Food Control* 31(2) (2013) 593-606.
- [27] M. Sillanpää, T.-D. Pham, R.A. Shrestha, *Ultrasound Technology in Green Chemistry*, 2008.
- [28] Y. Sun, G. Ma, X. Ye, Y. Kakuda, R. Meng, Stability of all-trans- β -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds, *Ultrasonics Sonochemistry* 17(4) (2010) 654-661.

4.3 Artigo 2

Nesta seção é apresentado o segundo artigo, publicado no periódico internacional *International Journal of Food Science and Technology*. A publicação do artigo na presente tese de doutorado foi autorizada pela revista (licença número 4680860483580).

The effect of temperature and moderate electric field pre-treatment on carotenoid extraction from *Heterochlorella luteoviridis*

Abstract

Moderate electric field (MEF) was evaluated as a pre-treatment (0 – 180 V) to carotenoid extraction at four different temperatures (30, 40, 50 and 60 °C) followed by a extraction step using ethanol/water as solvent (75 % of ethanol, v/v). During the extraction step, samples were collected at 1, 5, 30, 40 and 50 min. Results showed that MEF allowed higher carotenoid concentration at the beginning of the extraction step at 30, 40 and 50 °C, leading to better extraction results along the extraction time. A different behavior was observed at 60 °C probably due to the thermal effects on the cell and to carotenoids thermal degradation. The highest extraction yield, 86 % of the total carotenoid content (compared to exhaustive extraction), was achieved at both 40 and 50 °C with the MEF pre-treatment, indicating that a high extraction yield can be obtained even at relatively low temperatures (40 °C).

Keywords: microalgae; ethanol; moderate electric field; thermal effects; nonthermal effects; reversible electroporation; xanthophylls.

4.3.1 Introduction

Microalgae are considered alternative microorganisms to energy generation and to the synthesis of high value added compounds, such as carotenoids (Gerardo *et al.*, 2015). These natural pigments are well known as antioxidants and have been used as colorants and additives in the food and cosmetic industries (Saini and Keum, 2018).

The microalgae *Heterochlorella luteoviridis* is listed in the *Novel Food Catalogue* and has been in the food market before 1997, being considered safe for consumption (Champenois *et al.*, 2015). Nevertheless, few studies can be found in the literature regarding this microalgae. *H. luteoviridis* synthesized a considerable amount of carotenoids (1.2 – 3 mg g of biomass⁻¹), mainly lutein, which corresponds to 35-50 % of the total carotenoid amount. (Jaeschke *et al.*, 2016a; Diprat *et al.*, 2017).

However, the use of microalgae biomass for pigment extraction is still limited since the conventional carotenoid extraction methods require organic toxic solvents, which are harmful to the environment and represent a risk of contamination in food processing (Heffernan *et al.*, 2016). In this context, green extraction techniques have been studied in order to reduce the energy consumption and to allow the use of alternative non-toxic and renewable solvents. The technologies of ultrasound, pulsed electric field (PEF), moderate electric field (MEF), supercritical fluid extraction (SFE), microwave assisted extraction (MAE) and pressurized liquid extraction (PEL) have been studied for the extraction of carotenoids and other valuable compounds from microalgae (Zhu *et al.*, 2016; Esquivel-Hernández *et al.*, 2017b; Rocha *et al.*, 2018).

Among these technologies, the electrical techniques of PEF and MEF have been proposed as alternative methods for the disruption of the cell structure. PEF has been evaluated to enhance the extraction of different compounds from various biological matrices and is considered a promising technology to increase cell membrane permeability to ions and molecules (Rocha *et al.*, 2018). MEF also appears as a prospective technology, but few studies evaluated its use on extraction processes and, as far as we know, it is still not used on industrial scale processes. Moreover, studies evaluating carotenoid extraction using this technology are limited. Early studies reported that MEF can increase the permeability of cell membrane, increasing the mass transfer on food matrices and, therefore, enhancing extraction processes (Kusnadi and Sastry, 2012).

In a previous work, MEF has been studied by our research group as a pre-treatment for carotenoid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* (Jaeschke *et al.*, 2016a); MEF was applied as pre-treatment using voltages of 0-180 V in the presence of ethanol (25 %, v/v), followed by a extraction step (without MEF) in which different ethanol concentrations were evaluated (25 – 75 %, v/v). This study was performed at 30 °C and using a fixed extraction time (10 min of pre-treatment and 50 min of extraction). The results indicated that the extraction yield increased with the increase of the applied voltage and ethanol concentration. Among the parameters that affect the extraction yield, temperature and time are also important variables and, therefore, they were considered in the present work. In addition, it is important to highlight the lack of information in the literature regarding MEF application on extraction of internal compounds from biomaterials, focusing on the elucidation of MEF extraction mechanisms, the electroporation phenomenon and the combined effect of MEF and temperature on electroporation.

In view of that, the present study evaluated carotenoid extraction kinetics from the microalgae *H. luteoviridis*. MEF was applied as a pre-treatment using the best condition found in the previous study (180 V and ethanol concentration of 25 % (v/v), followed by an extraction step performed with ethanol solution (75 %, v/v)) at temperatures varying from 30 to 60 °C. Ethanol was chosen because it is a green solvent and has chemical affinity with xanthophylls, the majority fraction of *H. luteoviridis* carotenoids.

4.3.2 Materials and methods

Materials

Microalgae cultivation was performed autotrophically in airlift photobioreactors using a modified f/2 cultivation medium, as described in more details elsewhere (Jaeschke *et al.*, 2016a). For that, 240 mL of inoculums were previously cultivated in a shaker (25 °C, 19 rpm) for 7 days. The inoculum represented 10 % of the total volume of the bioreactors in the beginning of the cultivation. The sterile (PTFE, 0.45 µm) airflow rate was 1 L min⁻¹ of compressed air and 0.01 L min⁻¹ of carbon dioxide. The cultivation was performed for 27 days and half of the bioreactors volume was removed every three days and centrifuged (*Hitachi*, CR 21GIII, 10,000 g, 10 °C, 10 min). After centrifugation, microalgae cells were frozen with liquid nitrogen, freeze-dried (*LIOTOP*, Model L101, Brazil) and homogenized with mortar and pestle.

The solvents used for HPLC analyses (methanol and methyl tert-butyl ether) were purchased from *Vetec* (Duque de Caxias, Brazil) and the all-*trans*- β -carotene standard was obtained from *Sigma Aldrich* (St. Louis, USA).

Extraction experiments

Extraction assisted by moderate electric field

Carotenoid extraction was evaluated in four temperatures (30, 40, 50 and 60 °C), and the experiments were performed in two steps: a pre-treatment for 10 min, in which MEF was applied to the sample, followed by an extraction step of 50 min.

Before the extraction process, 4 g of the freeze-dried biomass were washed with distilled water, and the electrical conductivity was adjusted to 500 $\mu\text{S m}^{-1}$ with a salt solution (NaCl, 4 g L⁻¹). This step was needed to set up the electrical conductivity of the suspension in a manner that both, the temperature and the electrical parameters, could be controlled. A detailed description of the washing step and the apparatus used during the extraction procedure can be found in a previous work (Jaeschke *et al.*, 2016a).

For the pre-treatment, the previously washed biomass was added to 80 mL of a 25 % ethanol solution (v/v) in a Pyrex extraction cell (100 mL of working volume), containing a water jacket and titanium curved electrodes, (3.5 cm of height), to conform the extraction cell dimensions. During the pre-treatment, an electric field of 180 V and 60 Hz was applied to the sample; as the passage of electrical current promotes heating by Joule effect, a water bath with cold water was connected to the water jacket of cell. This procedure allowed temperature control during the pre-treatment, maintaining the maximum measured temperature equal or below the temperature of the experiment (30, 40, 50 or 60 °C). After 10 min of the pre-treatment, 15 mL of sample were withdrawn and stored in an ice bath for further analysis.

After the pre-treatment, the sample was transferred to another Pyrex extraction cell (300 mL of working volume) also containing a water jacket. To the cell, it was added a 75 % ethanol solution to a final solution volume of 220 mL. The cell was connected to a water bath set at the experiment temperature (30, 40, 50 or 60 °C), and samples were withdrawn after 1, 5, 30, 40 and 50 min of the extraction step. During both steps, sample was mixed using a magnetic stirred plate (*IKA C-MAG*, Model HS 10, Brazil). After extraction, the collected samples were centrifuged (4757 g, 20 °C, 10 min, *Cientec*, Model CT 5000R, Brazil), filtered (*Allcrom*, PTFE, 0.45 μm) and stored in dark at 8 °C for further analyses.

Control experiments

For control experiments, the same procedure that was carried out for MEF extraction experiments were performed, but without voltage application during the pre-treatment. It is important to highlight that these experiments were performed with the same temperature profile that MEF experiments; for this, the extraction cell was connected to a water bath with hot water to provide the same heating rate of the electric field. This procedure allows the evaluation of the electric field effect on the extraction process.

Exhaustive extractions

Exhaustive extractions of the biomass were performed to compare the results with the methodology developed in the present work. The carotenoid content found for this analysis was considered the total carotenoid content of the sample (mg g^{-1}). The extraction was performed using ethyl acetate and methanol under maceration, as described by Mandelli *et al.* (2012). This procedure was performed until no color was observed in the solvent (5 to 6 times).

Determination of carotenoid content

Quantification of carotenoids in the ethanolic extracts

Carotenoid analyses were performed according to Rodriguez-Amaya (Rodriguez-Amaya and Rodriguez-Amaya, 2001), using the filtered supernatants (ethanolic extracts). For this, 2 mL of ethanolic extracts were added to 2 mL of saponification solution (10 g KOH in 100 mL of methanol) overnight. After saponification, samples were washed and the purified ether phase was dried and resuspended in ethanol, according to the methodology described elsewhere (Jaeschke *et al.*, 2017).

The carotenoid concentration (C_{Ct}) in the extracts was determined according to Equation (1), where Abs is the absorbance, v_1 is the volume of ethanol used to resuspend the sample before spectrophotometry analyses (mL), ϵ is the molar absorptivity of lutein in ethanol ($\epsilon = 2,550$), m_1 is the mass of biomass used to perform the extraction experiment (g), F is the factor of mass loss at each sample withdrawal, V is the total volume of the extraction medium in the moment that each sample was collected (mL) and v_2 is the volume of ethanolic extract used to perform the analyses. The result was expressed in milligrams of lutein per gram of sample (mg g^{-1}).

$$C_{Ct}(\text{mg g}^{-1}) = \frac{Abs \cdot v_1 \cdot 10000}{\epsilon \cdot \frac{m_1}{F}} \cdot \frac{V}{v_2} \quad (1)$$

Quantification of carotenoids after exhaustive extraction

After the exhaustive extraction, the extract was transferred to ether phase (partition step) using petroleum and ethylic ether (1:1). The ether phase was collected and saponification solution (10 g KOH in 100 mL of methanol) was added to the samples overnight. Samples were whashed until neutral pH, and the same experimental procedure described earlier for the ethanolic extracts was performed.

Determination of carotenoid profile

The carotenoid profile was determined for samples collected after 50 min of the extraction step (MEF and control experiments) and for samples submitted to exhaustive extraction. These analyses were performed to evaluate possible changes on carotenoid profile with the increase of the extraction temperature and the application of MEF. For this, after the measurement on the spectrophotometer, samples were dried using a centrifugal vacuum concentrator (*Labconco*, CentriVap, USA) and kept at -18 °C under nitrogen atmosphere until the analysis. Right before the HPLC analysis, each sample was resuspended in 1 mL of methanol/methyl tert-butyl ether solution (1:1) according to Rodrigues *et al.* (2014) with some modifications. The details of the HPLC equipment, chromatographic parameters and the modified methodology can be found elsewhere (Jaeschke *et al.*, 2016a).

Experimental design and statistical data analyses

All MEF and control experiments were performed in duplicate. Exhaustive extraction and carotenoids analyses on the extracts were performed in triplicate. Statistical significance was determined by ANOVA and Tukey test (5 % of confidence level) using Statistica® (13.0, *Statsoft Inc.*, Tulsa, USA).

4.2.3 Results and discussion

MEF and temperature influence on the extraction yield

The analysis of the extracts collected after the pre-treatment (180 V, 25 % of ethanol, v/v) showed that carotenoid extraction did not occur in this step since the carotenoid content were below the quantification limit of the analysis. The extraction occurred only in the extraction step, when a higher ethanol concentration (75 %, v/v) was added to the medium.

Carotenoid concentration and the extraction yield after the extraction step for MEF pre-treated and control samples at 30, 40, 50 and 60 °C, as well as the result of the exhaustive extraction, are shown in Table 1. Compared to the control samples, the extraction yield increased when MEF was applied as a pre-treatment at 30, 40 and 50 °C, yielding up to 86 % at 50 °C. This result may be attributed to the electroporation phenomenon caused by the passage of alternate electrical current through microalgae cells during MEF application.

The electroporation mechanism is not completely elucidated. However, studies indicate that the magnitude of the permeabilization during PEF treatments depends on the electric field intensity and on the length and number of pulses applied (Saulis and Saulė, 2012). On the other hand, when the electric field is less intensive, as those applied during MEF processes, the permeability of cells can be increased without compromising the cells viability, which is known as reversible electroporation (Sensoy and Sastry, 2004). Nevertheless, little is known regarding the pores formation phenomenon and the kinetics of pores resealing during MEF application. MEF process is characterized by the application of electric fields from 1 to 1000 V cm⁻¹ with arbitrary wave form (Sensoy and Sastry, 2004), applied for longer periods of time (of the order of minutes) if compared to PEF. The implications of this phenomenon over the extraction time will be discussed in more details in Section 3.2.

At 60 °C, the application of MEF pre-treatment did not affect carotenoid extraction probably because the thermal effect was predominant at high temperatures, causing cell membrane disorganization; thus, the non-thermal effects may be hidden by the intense thermal effect on cell structure. Furthermore, the extraction yield of both conditions evaluated at 60 °C (MEF treated and non-treated samples) decreased compared to the results obtained at 50 °C. This result is possible attributed to carotenoid degradation, which will be discussed in Section 3.2.

The results obtained in the present work are in agreement with other studies in which PEF was evaluated for extraction (Luengo *et al.*, 2015; Postma *et al.*, 2016). Postma *et al.* (2016) studied the extraction of water soluble components (ions, carbohydrates and proteins) from *Chlorella vulgaris* using a combination of PEF (20 kV cm⁻¹) and temperature (25 – 65 °C). The researchers reported that, in the range of 25 to 55 °C, ions were not spontaneous released from the cell into the medium, and when PEF was applied, the electrical conductivity of the medium increased. At a higher temperature (65 °C), the researchers also observed that

the release of compounds was similar between PEF and control; according to the authors, the thermal effect caused cell breakdown, masking the PEF effect.

Table 1. Carotenoid content of the extracts and the extraction yield after the extraction step for MEF pre-treated and non-treated (control) samples.

| Temperature (°C) | Treatment | Carotenoid concentration ($\mu\text{g g of sample}^{-1}$)* | Yield (%)** |
|-----------------------|-----------|---|--------------|
| 30 | MEF | 1031 ± 8^c | 60 ± 0.5 |
| | Control | 807 ± 31^d | 47 ± 1.8 |
| 40 | MEF | 1431 ± 41^b | 84 ± 2.4 |
| | Control | 733 ± 27^d | 43 ± 1.6 |
| 50 | MEF | 1474 ± 58^b | 86 ± 3.4 |
| | Control | 1164 ± 8^c | 68 ± 0.5 |
| 60 | MEF | 722 ± 22^d | 42 ± 1.3 |
| | Control | 665 ± 13^d | 39 ± 0.8 |
| Exhaustive extraction | | 1706 ± 0^a | - |

*mean \pm standard deviation; means with the same lowercase letter in the same column do not have significant difference ($p > 0.05$).

**comparison with the exhaustive extraction.

Luengo *et al.* (Luengo *et al.*, 2015) studied lutein extraction from *Chlorella vulgaris* between 10 and 40 °C using PEF (10 – 25 kV cm⁻¹). According to these authors, the permeabilization degree is higher at higher temperatures, facilitating the extraction, which is in agreement with the results obtained in the present work. At the evaluated temperatures, the authors did not observe degradation effects, similarly to the results reported in the present study.

In this work, among control experiments, the maximum yield of carotenoid extraction was observed at 50 °C and the results at 30, 40 and 60 °C did not presented statistical difference

($p > 0.05$) among them. These results are possibly related to the opposite temperature effects on carotenoid extraction: degradation and diffusion improvement (Saini and Keum, 2018), which will be discussed in Section 3.2. It is important to point out that extraction yield at 30 °C in MEF pre-treated samples is similar to the extraction yield at 50 °C without MEF treatment (control), meaning that the process can be carried out using lower temperature, thus promoting energy savings. Moreover, when MEF was applied, the extraction yields at 40 and 50 °C did not present statistical difference ($p < 0.05$), indicating that maximum extraction can be achieved using a relatively low temperature (40 °C).

MEF and temperature effect on the extraction step

The kinetics of carotenoid releasing over time is presented in Figure 1. A typical extraction curve is characterized by two steps: a fast, also called washing step, and a slow extraction step, or diffusive step. These two steps can be identified in Figure 1. During the washing step, the cell structure is destabilized due to the penetration of the solvent in the matrix; in this step, the cytoplasm of the cells is directly exposed to the solvent and the compounds are carried to the extraction medium (Chan *et al.*, 2014).

The MEF pre-treatment is expected to intensify the washing step due to modifications on the structure of the matrix. In the present work, this behavior was observed at 30, 40 and 50 °C (concentration at 1 min of the extraction step) and corroborates the hypothesis previously discussed: MEF promoted the permeabilization of microalgae cells and, when ethanol (75 %, v/v) was added to the medium, carotenoids were easily extracted.

It is important to point out that the gain in the extraction yield with MEF application was observed in the first minute of extraction. After this point, the increase in carotenoid concentration over time was similar (parallel curves) for control and MEF-treated samples (for all temperatures), indicating that the MEF effects were no longer observed. This result evidences that a reversible electroporation had possibly occurred and the pores started to reseal after the MEF treatment.

These results are in agreement with the mechanism of pores reseal proposed by Saulis *et al.* (1991). The researchers suggested that depending on the pulse parameters and on the biological material exposed to the electric field, after the application of electric field there may be three stages of cell reseal: i) a fast decrease in pore size (< 1s); ii) a slow decrease in pore size (min); iii) complete pore closure (more than 10 min). Considering this mechanism of pore

reseal in the present work, after the MEF application some pores have possibly slowly decreased in size during the first minute, facilitating carotenoids diffusion. After, pores may not be completely closed, but as carotenoids are relatively large molecules (molecular size of lutein is approximately 568 Da), their diffusion was limited. In addition, in microalgae, carotenoids are commonly linked to fatty acids forming more complex, large and non-polar structures which also could hamper the diffusion process (Lin, 2015). A typical extraction curve tends to achieve an equilibrium concentration; however this equilibrium was not observed in our results (Figure 1). Curves of 30, 40 and 50 °C seem to present an exponential trend after the washing step. This behavior was more pronounced at temperatures of 40 and 50 °C and in MEF-treated samples.

This exponential trend of the extraction curve can not be described by Fick's law, which predicts an asymptotic behavior. Thus, a mathematical modeling using an analytical solution of Fick's Second Law could not be performed. Other possibility to describe the behavior of the extraction curves were the non-Fickian models. These models are also based on Fick's Law and differ from the previous one by a change on diffusional exponent (n); in Fick's Law, n is equal to 0.5 and non-Fickian diffusion is defined by n greater than 0.5 (Ritger and Peppas, 1987). Other alternative models to predict the extraction are also based on Fick's Law (first order kinetic model, Peleg's model, mass transfer model), so a mathematical approach for the extraction behavior was not possible.

It can be speculated that at the beginning of the extraction step, microalgae cells are agglomerated forming heterogeneous micro-clusters of unknown diameters. These clusters were being dismantled along the extraction time and temperature, promoting an increase of the contact area of the cells with the solvent and, consequently, increasing carotenoid extraction. At 60 °C, this increase is observed until 30 min of the extraction step, followed by a decrease of the carotenoid concentration, which can be explained by the carotenoid thermal degradation.

Thus, the increase of the extraction temperature promotes opposite effects: high temperature contributes to the increase of the extraction yield but also contributes to the increase of the degradation rates. This hypothesis is evidenced observing the carotenoid concentration at the end of the washing step (1 min) at the different temperatures evaluated (Figure 1). At 30 °C it was obtained the highest carotenoid extraction at the end of the washing step, and the concentration in this point seems to decrease with increasing temperature. Probably, the degradation began during the pre-treatment (control and with MEF) for the extraction

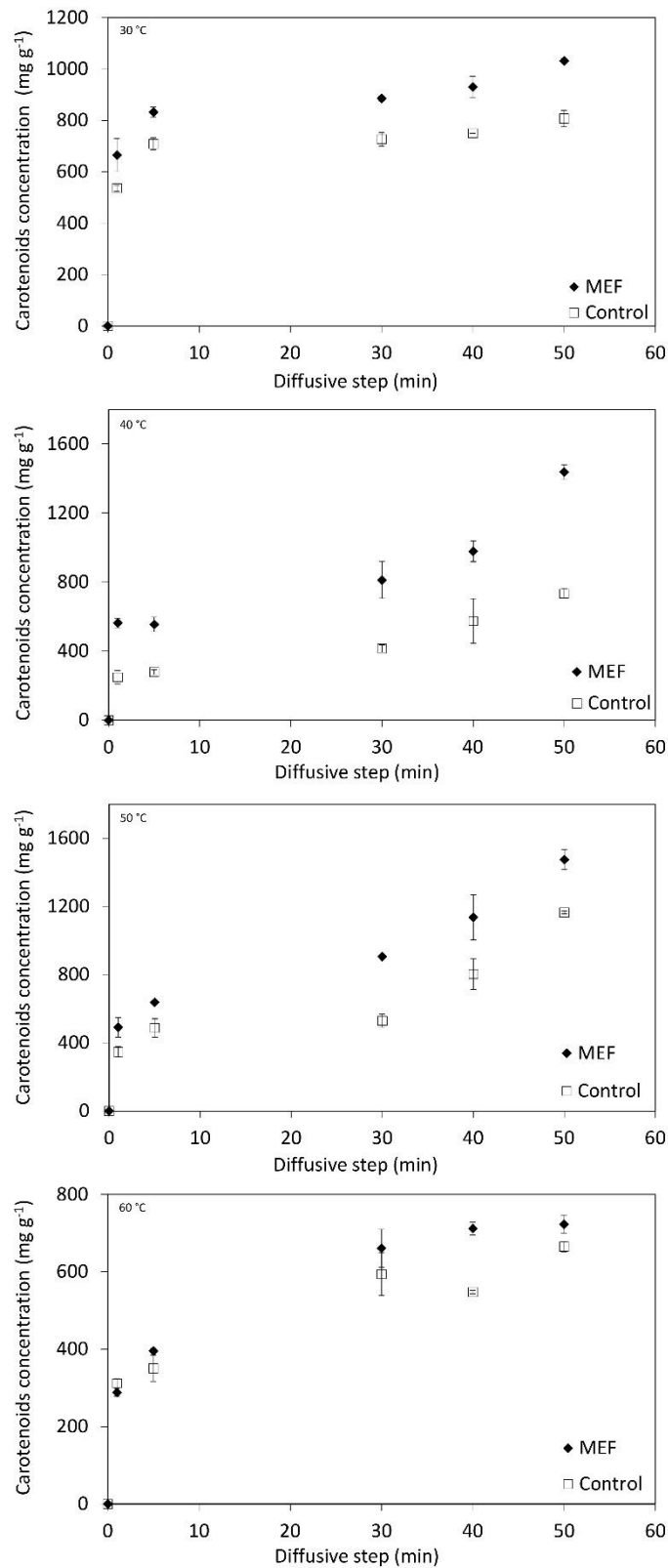


Figure 1. Carotenoids content of *Heterochlorella luteoviridis* the extracts over time for MEF pre-treated and non-treated samples at 30, 40, 50 and 60 °C.

experiments performed above 40°C, resulting in a decrease of the initial carotenoid concentration in the diffusive step. This effect of the temperature on the extraction and degradation rates can also be confirmed analyzing the results obtained for control samples: the carotenoid concentration in the end of the extraction step at 30, 40 and 60 °C did not present statistical difference (as mentioned in section 3.1). This may be assigned to this antagonist effect of the temperature: increasing temperature increases extraction as well as carotenoid degradation, and the net effect, therefore, is null. On the other hand, at 50 °C an increase in the extraction yield could be observed possible because the temperature effect on the extraction rate was higher than the its effect on the degradation rate.

Carotenoids are well-known thermolabile pigments that can be oxidized or isomerized above 40 °C. These degradation reactions promote loss of color and decrease of antioxidant activity, and depend not only on the temperature but also on the medium composition (presence of oxygen, metals, another antioxidant compounds) and light exposure (Rodriguez-Amaya and Rodriguez-Amaya, 2001; Fennema, 2007). In the present work, the presence of other antioxidant compounds, such as chlorophyll and long chain fatty acids, associated with the absence of light during the extraction experiments and the high lutein stability (*H. luteoviridis* major carotenoid) in ethanol, may explain the maintenance of carotenoid activity until 50 °C. Thus, oxidation may have occurred more intensively at 60 °C. A similar behavior regarding carotenoids extraction was observed in seaweed using PEF (Zhu *et al.*, 2017). The authors also obtained a highest carotenoid content at 50 °C, and the lowest content at 60 °C was attributed to the degradation. As carotenoids can be isomerized during extraction at high temperatures, the carotenoid profile of the extracts was determined. These results are presented in section 3.3.

As we pointed out previously, the gain in the extraction yield promoted by the pre-treatment was observed in the first minute of the extraction step. This increase could promote the reduce of the energy involved in the extraction process, one of the green extraction principles. At 40 °C, for example, the carotenoid amount obtained in the extracts was similar at 5 and 40 min of the extraction step, for MEF and control samples, respectively. Something similar could also be observed at 50 °C: the same amount was obtained at 5 and 40 min, for MEF and control samples, respectively.

MEF and temperature effect on carotenoid profile

Carotenoid profiles of the extracts at 30, 40, 50 and 60 °C after the extraction step were evaluated and are presented as Supplementary Information (Figure S1). Carotenoid profile was

not affected by temperature and MEF pre-treatment. All extracts presented all-*trans*-lutein ($0.35 \pm 0.02 - 1.05 \pm 0.05$ mg g of biomass⁻¹, 52.3 - 61.3 %), all-*trans*-zeaxanthin ($0.14 \pm 0.01 - 0.40 \pm 0.04$ mg g of biomass⁻¹, 21.4 - 25.2 %) and other carotenoids in minor quantities, such as all-*trans*-violaxanthin ($0.17 \pm 0.01 - 0.20 \pm 0.03$ mg g of biomass⁻¹, 10 - 12 %), *cis*-violaxanthin (less than 6 %) and 13'-*cis*-lutein (less than 5 %).

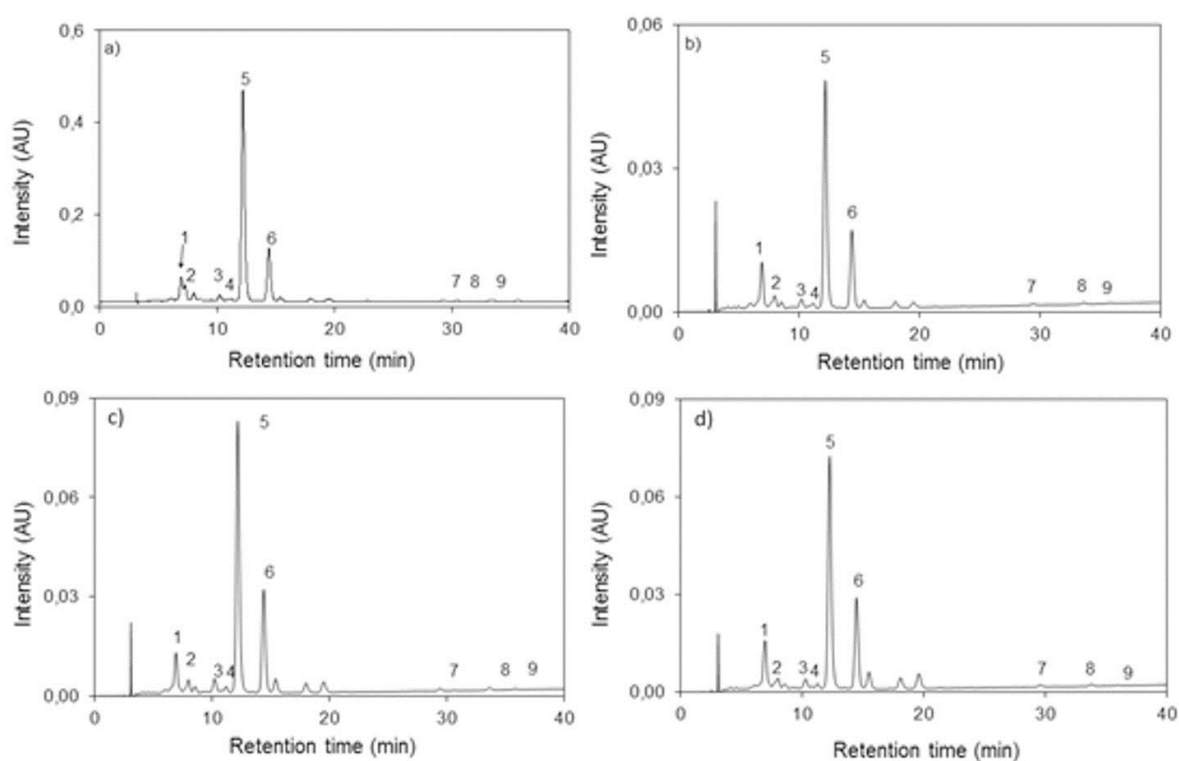


Figure S1. Carotenoid profile of *Heterochlorella luteoviridis* extracts pre-treated with MEF at a) 30 °C, b) 40 °C, c) 50 °C and d) 60 °C. Identified carotenoids: all-*trans*-violaxanthin (1), *cis*-violaxanthin (2), 13-*cis*-lutein (3), 13'-*cis*-lutein (4), all-*trans*-lutein (5), all-*trans*-zeaxanthin (6), all-*trans*- α -carotene (7), 13-*cis*- β -carotene (8) and all-*trans*- β -carotene (9).

The sample obtained by the exhaustive extraction presented a carotenoid profile with all-*trans*-lutein (0.84 ± 0.05 mg g of biomass⁻¹, 49.0 %), all-*trans*-zeaxanthin (0.23 ± 0.02 mg g of biomass⁻¹, 14.0 %), all-*trans*- β -carotene (0.17 ± 0.02 mg g of biomass⁻¹, 10.4 %), all-*trans*- α -carotene (0.13 ± 0.00 mg g of biomass⁻¹, 7.7 %), *cis*- β -carotene (0.09 ± 0.00 mg g of biomass⁻¹, 5.8 %), *cis*-violaxanthin (0.08 ± 0.01 mg g of biomass⁻¹, 4.8 %), all-*trans*-violaxanthin (0.06 ± 0.01 mg g of biomass⁻¹, 3.6 %), *cis*-lutein (0.06 ± 0.00 mg g of biomass⁻¹, 3.6 %) and other carotenoids in lower concentrations.

As reported in a previous study (Jaeschke *et al.*, 2016a), carotenoid profile of the extracts were qualitatively similar to the one obtained after the exhaustive extraction; the major

difference was a higher concentration of more polar carotenoids in the extracts due to their chemical affinity with ethanol. It is important to mention that, even at higher temperatures (> 50 °C), it was not possible to extract the non-polar carotenoids, α - and β -carotenes, with ethanol and the pre-treatment with MEF. The use of others green solvents with different polarities could improve the extraction of the non-polar fraction.

4.3.4 Conclusion

MEF pre-treatment promoted the intensification of the extraction leading to higher carotenoid extraction yields at 30, 40 and 50 °C (comparison with the control experiments), extracting up to 86 % of total carotenoids at 40 and 50 °C. This result indicates that, with the MEF pre-treatment, the extraction process can be performed using a relatively low temperature (40 °C). The intensification on the extraction promoted by MEF was probably due to cells electroporation, observed in the first minute of the extraction step. The temperature increase promoted different effects: the increase of the extraction yield and the increase of carotenoid degradation (observed mainly at 60 °C). The development of new models are needed to properly explain these results, since the Fick's Law was not suitable to represent experimental data.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from FAPERGS (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul*), CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*) and CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*).

References

- Champenois, J., Marfaing, H. & Pierre, R. (2015). Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology*, 27, 1845–1851.
- Chan, C.-H., Yusoff, R. & Ngoh, G.-C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 1169–1186.
- Diprat, A.B., Menegol, T., Boelter, J.F., Zmozinski, A., Rodrigues Vale, M.G., Rodrigues, E. & Rech, R. (2017). Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3463–3468.
- Esquivel-Hernández, D.A., Ibarra-Garza, I.P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez,

- S.P., Rostro-Alanis, M. de J., Alemán-Nava, G.S., García-Pérez, J.S. & Parra-Saldívar, R. (2017). Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11, 215–231.
- Fennema, O.R. (2007). *Fennema's Food Chemistry*. 4th edn.
- Gerardo, M.L., Hende, S. Van Den, Vervaeren, H., Coward, T. & Skill, S.C. (2015). Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Research*, 11, 248–262.
- Heffernan, N., Smyth, T.J., FitzGerald, R.J., Vila-Soler, A., Mendiola, J., Ibáñez, E. & Brunton, N.P. (2016). Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, Part B, 221–228.
- Jaeschke, D.P., Menegol, T., Rech, R., Mercali, G.D. & Marczak, L.D.F. (2016). Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. *Process Biochemistry*, 51.
- Jaeschke, D.P., Rech, R., Marczak, L.D.F. & Mercali, G.D. (2017). Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresource Technology*, 224, 753–757.
- Kusnadi, C. & Sastry, S.K. (2012). Effect of moderate electric fields on salt diffusion into vegetable tissue. *Journal of Food Engineering*, 110, 329–336.
- Lin, J.-H. (2015). Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 421–428.
- Luengo, E., Martínez, J.M., Bordetas, A., Álvarez, I. & Raso, J. (2015). Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 15–22.
- Mandelli, F., Yamashita, F., Pereira, J.L. & Mercadante, A.Z. (2012). Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 126–134.
- Postma, P.R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., Olivieri, G. & Ferrari, G. (2016). Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field–temperature treatment. *Bioresource Technology*, 203, 80–88.
- Ritger, P.L. & Peppas, N.A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5, 23–36.
- Rocha, C.M.R., Genisheva, Z., Ferreira-Santos, P., Rodrigues, R., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. & Pereira, R.N. (2018). Electric field-based technologies for valorization of bioresources. *Bioresource Technology*, 254, 325–339.
- Rodrigues, D.B., Flores, É.M.M., Barin, J.S., Mercadante, A.Z., Jacob-Lopes, E. & Zepka, L.Q. (2014). Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, 65, Part B, 144–148.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington DC: ILSI Press.
- Saini, R.K. & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent

- developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103.
- Saulis, G. & Saulė, R. (2012). Size of the pores created by an electric pulse: Microsecond vs millisecond pulses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818, 3032–3039.
- Saulis, G., Venslauskas, M.S. & Naktinis, J. (1991). Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 321, 1–13.
- Sensoy, I. & Sastry, S.K. (2004). Extraction Using Moderate Electric Fields. *Journal of Food Science*, 69, FEP7-FEP13.
- Zhu, Z., He, J., Liu, G., Barba, F.J., Koubaa, M., Ding, L., Bals, O., Grimi, N. & Vorobiev, E. (2016). Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 1–9.
- Zhu, Z., Wu, Q., Di, X., Li, S., Barba, F.J., Koubaa, M., Roohinejad, S., Xiong, X. & He, J. (2017). Multistage recovery process of seaweed pigments: Investigation of ultrasound assisted extraction and ultra-filtration performances. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 40–47.

Capítulo 5 – Extração de compostos intracelulares da *Arthrospira platensis*

Neste capítulo são apresentados os estudos relacionados com a extração de ficocianinas e proteínas da cianobactéria *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). Esses estudos envolvem a aplicação das tecnologias elétricas de campo elétrico pulsado (PEF), campo elétrico moderado (MEF), ultrassom (US) e métodos de extração convencionais. Para tanto, são apresentadas as metodologias empregadas para o cultivo da microalga, bem como as metodologias utilizadas nos experimentos de extração e avaliação da concentração dos compostos de interesse nos extratos.

Os experimentos de extração utilizando PEF foram realizados no Laboratório do grupo *Bioelectrics*, localizado no *Institut für Hochleistungsimpuls und Microwellentechnik* (IHM), no *Karlsruher Institut für Technologie* (KIT), em Karlsruhe, na Alemanha. Os experimentos de extração utilizando MEF e US foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), localizado no Departamento de Engenharia Química da UFRGS. Os experimentos de US, congelamento e descongelamento e vórtex com bolas de vidro foram realizados em parceria com a aluna Moema Lamb Scheffler em seu trabalho de conclusão de curso.

5.1 Materiais e métodos

5.1.1 Experimentos de extração utilizando PEF

Inóculos para manutenção da microalga

A cepa SAG 29.11 da microalga *Arthrospira platensis* foi adquirida do banco de microalgas da Universidade de Göttingen (SAG, *Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen*). Para manutenção dos cultivos, foram realizados inóculos a cada 14 dias utilizando o meio de cultivo *Zarrouk* (Zarrouk, 1966), contendo os seguintes nutrientes: NaHCO₃, 13,61

g L^{-1} ; Na_2CO_3 , $4,03 \text{ g L}^{-1}$; K_2HPO_4 , $0,5 \text{ g L}^{-1}$; NaNO_3 , $2,5 \text{ g L}^{-1}$, K_2SO_4 , $1,0 \text{ g L}^{-1}$, NaCl , $1,0 \text{ g L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,2 \text{ g L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,04 \text{ g L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,01 \text{ g L}^{-1}$, EDTA, $0,03 \text{ g L}^{-1}$ e 5 mL L^{-1} de uma solução de micronutrientes, modificada com relação ao meio original. A solução de nutrientes era composta de: EDTA, 5 g L^{-1} , H_3BO_3 , $1,14 \text{ g L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $2,2 \text{ g L}^{-1}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ g L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ g L}^{-1}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,16 \text{ g L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0,16 \text{ g L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,11 \text{ g L}^{-1}$.

Para a realização dos inóculos, padronizou-se uma densidade óptica inicial ($\text{OD}_{680\text{nm}}$) de 0.2 ± 0.1 utilizando-se um volume de 400 mL. Para tanto, utilizou-se em torno de 50 mL do inóculo anterior e 350 mL de meio de cultivo. Os inóculos foram mantidos em um *shaker* com agitação de 125 rpm (NeoLab, DOS-10L, Germany) em uma cabine termostática (AquaLytic, Germany) ($25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, $30 \text{ } \mu\text{mols}^{-2}\text{s}^{-2}$). Na Figura 17 é apresentada uma fotografia dos inóculos no interior da cabine termostática.

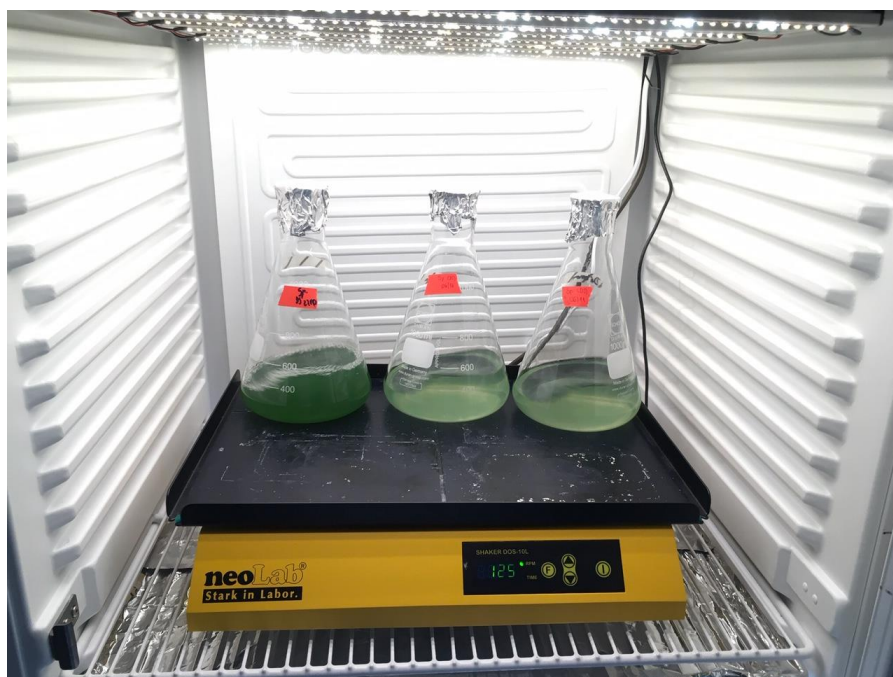


Figura 17. Inóculos preparados para a realização dos experimentos de extração.

Inóculos para os experimentos de extração

De maneira similar ao procedimento descrito para a manutenção das microalgas, foram realizados inóculos com o objetivo de avaliar a extração de ficocianinas e proteínas a partir da biomassa da *Arthrospira platensis*. Para tanto, utilizou-se erlenmeyes de 1 L, com 200 mL de meio de cultivo e 50 mL de inóculo prévio. Os experimentos de extração foram realizados com células de 7-8 dias de cultivo.

Preparo da suspensão de extração

Previamente à realização da extração, os cultivos de microalga foram centrifugados (Thermo Scientific, Biofuge Primo, Germany) (10 000 g, 10 min), e, após a centrifugação, o meio de cultivo foi descartado. Ao *pellet* remanescente foi adicionado tampão de sódio-fosfato (pH 7,2). O volume de tampão utilizado foi igual ao volume de meio de cultivo descartado (250 mL). Após, ajustou-se a condutividade elétrica da suspensão para $1,75 \pm 0,02$ mS cm⁻¹ com tampão fosfato-salino comercial. Esse ajuste da condutividade elétrica foi necessário para que fosse possível ajustar a energia aplicada durante a aplicação do campo elétrico pulsado. Posteriormente, a suspensão preparada foi dividida em erlenmeyers (45 mL em cada frasco) para o tratamento com PEF. Parte da suspensão foi reservada para análise da concentração de biomassa na suspensão e para a extração utilizando o moinho de bolas.

Análise da concentração de biomassa na suspensão (massa seca)

Para determinar a massa de microalgas presentes nas suspensões utilizadas nos experimentos de extração, realizou-se análises de massa seca. Para tanto, 10 mL de suspensão foram filtrados a vácuo em papel filtro (*Whatman*, 8 µm) previamente seco e pesado. A biomassa remanescente no filtro foi lavada com água destilada para remoção de sais que poderiam estar depositados junto à biomassa. Para cada amostra foram realizadas três lavagens com 10 mL de água. Antes e após a filtração, o papel filtro foi apoiado em cápsulas de alumínio. Após a filtração, os filtros foram mantidos em estufa *overnight* (85 °C). No dia seguinte, os filtros foram pesados e pela diferença de massa, determinou-se a concentração de células nas suspensões preparadas para a extração. Essa concentração variou de 0,7 a 1,2 g de biomassa L de suspensão⁻¹.

Tratamento com campo elétrico pulsado

O tratamento com PEF foi realizado num sistema contínuo, que consistiu em uma célula de tratamento conectada em uma das extremidades a uma bomba peristáltica e, na outra extremidade, a um frasco receptor. À bomba peristáltica conectou-se a suspensão a ser tratada com PEF. A célula de tratamento foi construída no laboratório, em policarbonato e geometria cilíndrica (diâmetro de 60 mm, espessura de mm), conforme Figura 18. Durante os tratamentos, o fluido percorreu o orifício presente no centro da célula e os dois eletrodos (aço inoxidável, 60 mm) foram encaixados na célula. A célula e os eletrodos foram mantidos em um suporte (tipo prensa), onde os eletrodos foram prensados, possibilitando o fechamento do sistema. O gerador

de pulsos foi conectado a um dos eletrodos. Esse gerador foi construído no laboratório e consiste em um gerador de pulsos de linha, sendo os cabos de linha carregados com um resistor e a energia transmitida para um capacitor por um centelhador pressurizado a gás. A duração dos pulsos foi ajustada de acordo com o comprimento dos cabos de força. Na Figura 19 é apresentada uma fotografia do aparato experimental utilizado durante os tratamentos. Mais detalhes sobre o gerador de pulsos e o sistema de PEF podem ser encontrados em Frey *et al.*, 2013.



Figura 18. Célula utilizada para os tratamentos com PEF.



Figura 19. Aparato experimental utilizado nos experimentos de extração com PEF.

No presente trabalho, a extração de compostos foi avaliada em três níveis energias: 28, 56 e 112 J mL⁻¹. Para tanto, foi utilizado fluxo de amostra de 3 mL min⁻¹, pulsos de forma quadrada com duração de 1 µs e intensidade de campo elétrico de 40 kV cm⁻¹. Para obter diferentes energias, variou-se a frequência de 2 a 6 Hz. Paralelamente ao tratamento com o campo elétrico pulsado, experimentos controle foram realizados. Para tanto, uma célula, idêntica à utilizada nos experimentos com PEF, foi conectada a bomba peristáltica e à um frasco receptor, de forma similar ao realizado com a aplicação de campo elétrico pulsado.

Durante os experimentos com PEF, a temperatura da suspensão foi medida na saída da célula de tratamento com um termômetro (VWR International, Qtemp 500, Germany). Quando a maior energia foi utilizada, a máxima temperatura observada foi de 42 °C. Temperaturas maiores do que 35 °C foram observadas nos minutos finais do tratamento (últimos 5 minutos, aproximadamente) devido ao acúmulo de energia no sistema. Para verificar um possível efeito térmico, experimentos controle foram realizados (controle térmico). Para tanto, erlenmeyers contendo a suspensão de microalgas foram mantidos a 42 ± 2 °C por 15 min em um banho de água.

Etapa difusiva

Após os tratamentos (PEF, controle por bombeamento e controle térmico), as suspensões foram mantidas em *shaker* (80 rpm, 25 °C, escuro) por 6 h. Dessa forma, foram coletadas amostras durante os seguintes tempos de incubação: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 6 h. As amostras foram coletadas em todos do tipo *ependorf* e imediatamente centrifugadas (12,300 g, 20 min, 10 °C). Os extratos obtidos (sobrenadante) foram analisados quanto à concentração de ficocininas e proteínas e quanto à atividade antioxidante contra o radical ABTS[•]. Os *pellets* obtidos foram analisados quanto à integridade das células em microscópio óptico (Zeiss, Axioplan 2, Germany).

Extração com moinho de bolas

O rompimento das células utilizando o moinho de bolas foi considerado como controle positivo, uma vez que se observou a desintegração das células após tratamento. Uma microscopia das células de *A. platensis* após 4 ciclos de 15 s utilizando 60 Hz de frequência é apresentada na Figura 20. Para realização desses tratamentos, 1 mL de suspensão de microalgas foi acondicionado em todos do tipo *ependorf* (2mL), juntamente com bolas de vidro com diâmetro de 0,25 a 0,5 mm (Carl Roth, Alemanha). Os tubos foram posicionados no moinho de

bolas (Retsch, MM 400, Alemanha) e mantidos por aproximadamente 1 min (4 ciclos de 15 s, 60 Hz). Na Figura 21 é apresentada uma fotografia do moinho de bolas. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas (12,300 g, 20 min, 10 °C) e o sobrenadante (extrato) foi analisado quanto à concentração de ficocininas, proteínas e atividade antioxidante contra o radical ABTS*. O *pellet* remanescente foi analisado em microscópio óptico (Zeiss, Axioplan 2, Germany).

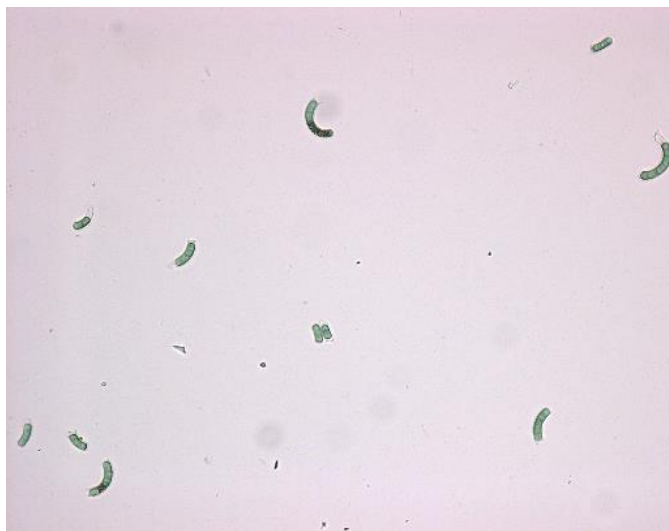


Figura 20. Microscopia das células da *A. platensis* após tratamento no moinho de bolas.

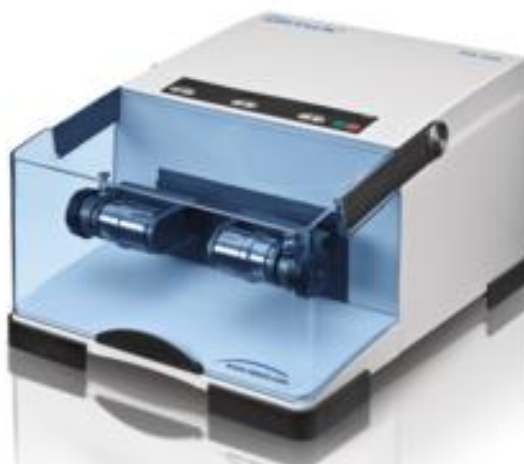


Figura 21. Moinho de bolas utilizado nos experimentos de extração.

Fonte: fabricante.

Análises dos extratos

Espectro de absorção dos extratos

Com o objetivo de verificar o perfil de absorção dos extratos, foram realizadas varreduras (270 - 800 nm) em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Genesys 10S, Germany), utilizando cubetas de quartzo.

Concentração de ficocianinas

A concentração de ficocininas nos extratos foi determinada de acordo com Boussiba e Richmond (1979), com algumas modificações. Para tanto, 0,5 mL de extrato foram adicionados a 1,5 mL de uma solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄, 50 %, m/v). As amostras foram, então, centrifugadas (12.300 g, 30 min, 10 °C) e o sobrenadante, removido. O pellet azul foi então ressuspendido em tampão sódio-fosfato (pH 7,2), e a absorção dessa suspensão foi avaliada em espectrofotômetro (270-800 nm) usando cubetas de quartzo. A concentração de ficocininas foi calculada de acordo com a Equação 4 (Bennett and Bogorad, 1973; Yoshikawa and Belay, 2008) e a Equação 5, onde A_{620nm} e A_{652nm} são a absorbância a 620 e a 652nm, respectivamente, e $C_{suspensão}$ é a concentração de biomassa nas suspensões utilizadas para os experimentos de extração.

$$PC \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{620nm} - 0,474 * A_{652nm}}{5,34} \quad \text{Equação 4}$$

$$PC \text{ (mg g de biomassa}^{-1}\text{)} = \frac{PC \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}}{C_{suspensão} \text{ (g mL}^{-1}\text{)}} \quad \text{Equação 5}$$

Concentração de proteínas

A concentração de proteínas nos extratos foi determinada pela método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para tanto, utilizou-se um kit de determinação de proteínas (BioRad, DC™, Germany). As análises foram realizadas com 25 µL de extrato, que foram misturados a 125 µL do reagente A (tartarato de cobre em meio básico). À essa mistura, adicionou-se 1 mL do reagente B (reagente de Folin-Ciocalteu). As amostras foram incubadas no escuro e à temperatura ambiente por 30 min. Após esse período, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 750 nm. A concentração de proteínas foi calculada pela comparação com uma curva padrão realizada com albumina bovina (BSA, Sigma Aldrich, Germany). Para o

preparo da curva padrão, foi realizada uma solução-mãe de albumina bovina de 2 mg mL⁻¹ e, a partir dessa solução, foram realizadas diversas diluições até a concentração de 0,2 mg mL⁻¹. Essas soluções foram submetidas ao mesmo procedimento já descrito para os extratos. A Figura 22 apresenta a curva padrão utilizada.

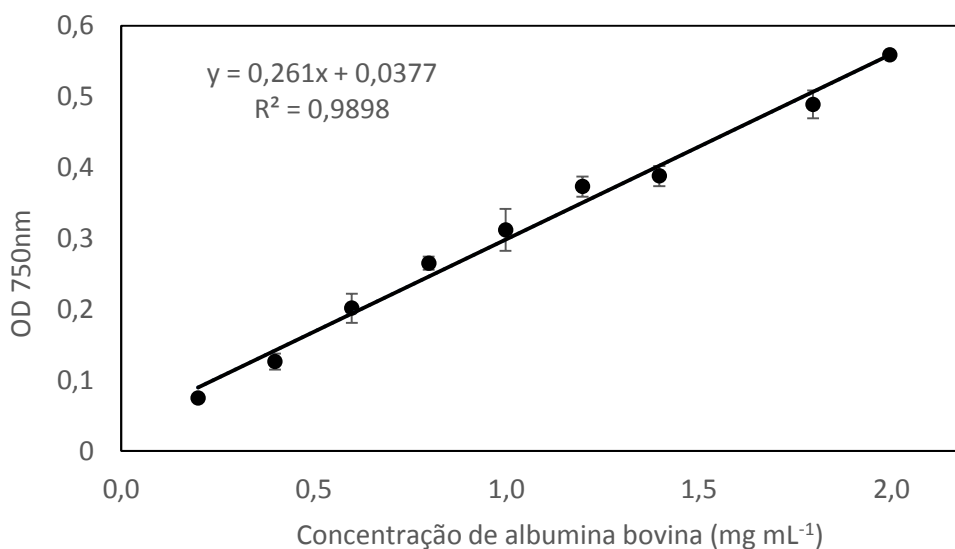


Figura 22. Curva padrão de albumina bovina utilizada para o cálculo da concentração de proteínas nos extratos.

Atividade antioxidante contra o radical ABTS*

A capacidade antioxidante dos extratos contra o radical ABTS* foi determinada de acordo com Re *et al.* (Re *et al.*, 1999). Previamente à análise, foi preparada uma solução estoque de ABTS* em água (7 mM). À essa solução, foi adicionada uma segunda solução, de persulfato de sódio (2,45 mM) e a reação ocorreu por 16 h. A análise foi realizada utilizando 50 µL de extrato e 1,95 mL da solução de ABTS*. As amostras foram analisadas em espectrofômetro a 620 nm entre 1 e 6 min após a adição do ABTS*. O cálculo da capacidade antioxidante foi realizado com base em curva padrão de trolox. O preparo da curva foi realizado com soluções de trolox em água (0 – 25 mg L⁻¹), e essas soluções padrão foram submetidas ao mesmo procedimento já descrito para os extratos. Os resultados foram expressados em µM de trolox equivalente por grama de biomassa (µM TE g⁻¹).

Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Foram feitas análises de eletroforese para verificar o perfil qualitativo de proteínas dos extratos. Os extratos obtidos foram tratados a 98 °C por 15 min em presença de tampão Tris

para desnaturação das proteínas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10.000 g, 5 min). Os géis de separação foram preparados com 12 % de poliacrilamida, de acordo com Cleveland *et al.* (1977). Assim, utilizou-se 10 % (v/v) de tampão de corrida (1,5 M de Tris e 0,4 % (m/v) de SDS), 40 % (v/v) de acrilamida (30 % m/v) diluído 4 vezes e 35 % (v/v) de água para preparar o gel. O gel de empilhamento (4 %) foi preparado com 50 % (v/v) de tampão, 13,4 % (v/v) de acrilamida (30 % m/v) e 36,6 % (v/v) de água. Após a secagem do gel, a cuba foi preenchida com o tampão de corrida. As amostras foram então adicionadas ao gel de empilhamento. Para a detecção das proteínas, após a corrida, os géis foram submergidos em uma solução do corante *Coomassie Brilliant Blue R-250* (BioRad, Germany) *overnight*. A solução de corante foi preparada com 0,1 % de corante (m/v) em metanol, água e ácido acético glacial na proporção 45:45:10.

Análise estatística

Os experimentos foram realizados, pelo menos, em triplicata. Para cada suspensão preparada, foram realizados 4 tratamentos com PEF no mesmo dia. Assim, foi possível avaliar duas energias diferentes, em duplicata. A média das duplicatas de cada dia foi considerada para o valor final. As análises foram realizadas em triplicata para cada extrato. Os dados foram avaliados utilizando testes de ANOVA e Tukey (nível de confiança de 95 %). Essas análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica® (13.0, Dell Inc., Tulsa, USA).

5.2.1 Experimentos de extração utilizando MEF

O preparo das amostras foi realizado de maneira similar ao descrito para os experimentos de PEF, com algumas modificações, conforme explicado a seguir.

Inóculos para os experimentos de extração

A cepa SAG 29.11 da microalga *Arthrospira platensis* foi mantida em meio de cultivo *Zarrouk* modificado (Aiba and Ogawa, 1977), conforme descrito em detalhes na subseção 5.1.1. Os cultivos foram preparados com 10 mL de inóculo anterior e 90 mL de meio de cultivo em erlenmeyers de 250 mL sob agitação constante (150 rpm) com iluminação ($38 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e temperatura (25 °C) controladas. Após 7 dias de cultivo, realizou-se os experimentos de extração. Dessa forma, a cada 7 dias, parte dos cultivos era utilizada para os experimentos de extração e parte para a preparação dos inóculos, que seriam utilizados nos experimentos da semana seguinte, de maneira a amenizar a heterogeneidade das amostras. A Figura 23 apresenta

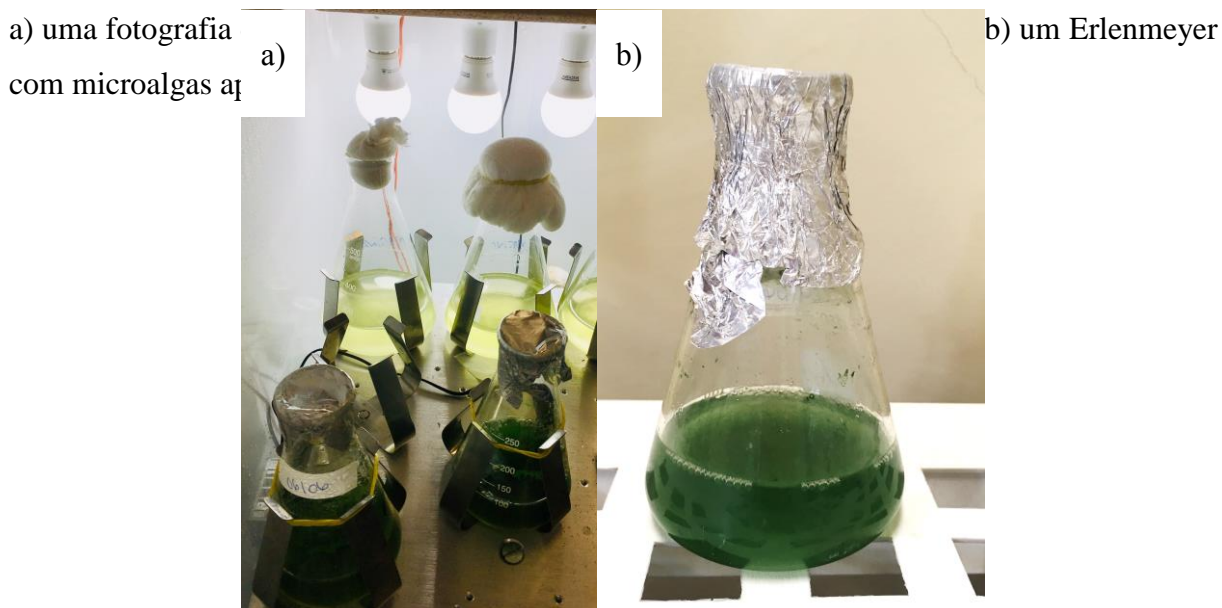


Figura 23. Cultivos a) mantidos na câmara de crescimento e b) após 7 dias.

Preparo da suspensão de extração

Para o preparo da suspensão de extração, os cultivos foram centrifugados (12.000 g, 10 min) e o meio de cultivo (sobrenadante) foi removido. À biomassa foi adicionado tampão sódio-fosfato (pH 7,2). O volume de tampão adicionado foi o mesmo volume de meio de cultivo que foi retirado. Após, ajustou-se a condutividade elétrica da suspensão para $600 \pm 0,05 \text{ mS cm}^{-1}$. Normalmente, a condutividade das amostras apresentava valores superiores ao desejado. Dessa forma, foi necessário adicionar meio de cultivo (de 10 a 30 mL) para ajustar a condutividade. O ajuste da condutividade elétrica foi necessário para controlar a temperatura durante os experimentos de extração com MEF. Para cada dia diferente de experimentos, diferentes suspensões foram preparadas. O objetivo foi avaliar a extração de biomassa fresca, o que seria mais próximo de um processo em grande escala. Parte das suspensões foi reservada para análise da concentração de biomassa (g L^{-1}), conforme descrito a seguir.

Análise da concentração de biomassa na suspensão (massa seca)

Para determinar a massa de microalgas presentes nas suspensões utilizadas nos experimentos de extração realizou-se análises de massa seca. Para tanto, 10 mL de suspensão foram adicionados a capsulas de alumínio previamente secas ($105 \text{ }^\circ\text{C}$, 3 h) e pesadas. As

amostras foram colocadas em estufa a 60 °C até que, visivelmente, boa parte da água havia evaporado. Esse procedimento foi adotado para evitar a evaporação de maneira rápida da água, o que poderia ocasionar respingos e perda de amostra. Após, as amostras permaneceram a 105 °C *overnight* e, posteriormente, as cápsulas contendo a biomassa foram pesadas.

Experimentos de extração com as tecnologias convencionais

Congelamento e descongelamento

O congelamento das amostras foi realizado no freezer (-24 °C) e ultrafreezer (-43 °C). Para tanto, 2 mL de suspensão de extração foram submetidos ao congelamento por 22 h. Posteriormente, essas amostras foram mantidas a temperatura ambiente (20 °C) por 2 h para o descongelamento e congeladas novamente por 22h. Esse procedimento foi repetido até totalizar 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Após os 3 ciclos, realizou-se a centrifugação das amostras (12.000 rpm, 20 min) e os extratos obtidos (sobrenadantes) foram separados para a realização das análises.

Extração via vórtex

Os experimentos de extração via vórtex foram realizados com o objetivo de simular a extração em moinho de bolas. Para tanto, 1,5 mL de extrato e 0,8 g de bolas de vidro (diâmetro médio de 2 mm) foram adicionados à tubos plásticos de 2 mL (Figura 24). As amostras foram submetidas à agitação em vórtex (Phoenix Luferco, AP56, Brasil) por 1, 2, 3, 4, 5, 15 e 30 min. Após os tratamentos, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf, Minispin, EUA, 10 min, 12.000 rpm) e os extratos foram separados para as análises. Com objetivo de centrifugar as amostras o mais rápido possível após os tratamentos com vórtex, cada tratamento foi realizado separadamente (um tubo para cada tempo de extração).



Figura 24. Amostras previamente à extração com vórtex.

Experimentos de extração com o ultrassom

O aparato experimental utilizado durante os experimentos de extração com o ultrassom (Figura 25) consistiu em um banho de resfriamento, um banho de aquecimento, um painel de mangueiras, um agitador magnético, uma célula de extração, a sonda de ultrassom e o gerador de potência. As extrações com o ultrassom foram realizadas em duas etapas: pré-tratamento e etapa difusiva. Durante o pré-tratamento, o ultrassom foi aplicado em diferentes intensidades (20 % (9 W cm^{-2}), 50 % (23 W cm^{-2}) e 80 % (39 W cm^{-2})) no modo pulso (pulsos de 30 s e pausa de 10 s), totalizando 5 min de tratamento com o ultrassom ativo. Durante o pré-tratamento, as suspensões de extração foram mantidas em uma célula encamisada (5,5 cm de diâmetro interno, 10 cm de altura e camisa de 50 mm de espessura). Essa célula foi a mesma utilizada nos demais experimentos de ultrassom e MEF, descritos no Capítulo 4 do presente trabalho.

Como a aplicação do ultrassom promove o aquecimento da amostra devido ao fenômeno de cavitação, foi necessário conectar a célula a um banho de resfriamento. Dependendo da intensidade do ultrassom, diferentes temperaturas de resfriamento foram utilizadas: 20 °C para a intensidade de 20 %, 15 °C para 50 % e 5 °C a 80 %. Dessa forma, o banho de resfriamento foi mantido na temperatura do experimento previamente à sua realização e a temperatura máxima atingida pela suspensão foi de 25 °C. Esse procedimento foi realizado para evitar a utilização e temperaturas altas e garantir que uma possível destruição das células ocorra somente devido aos efeitos do ultrassom.

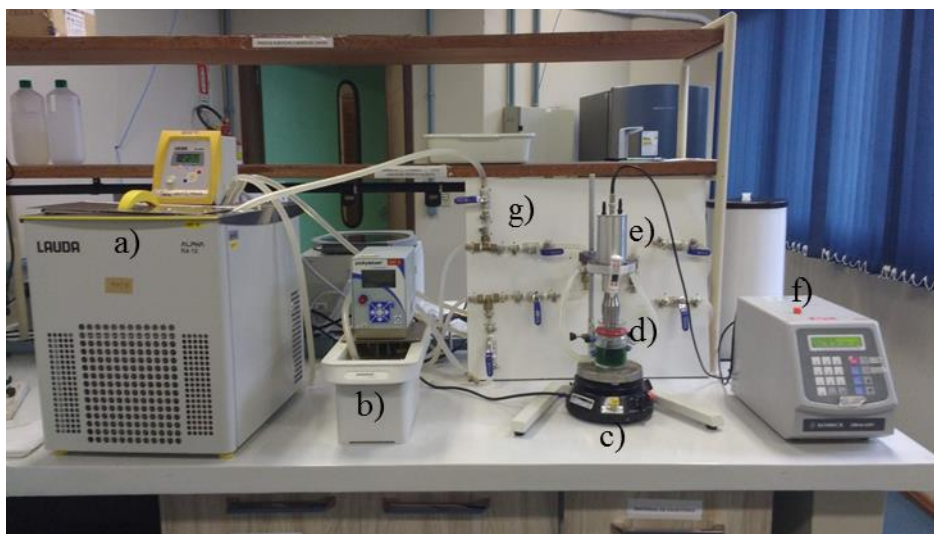


Figura 25. Aparato experimental utilizado nos experimentos de extração com o ultrassom: a) banho de resfriamento, b) banho de aquecimento, c) agitador magnético, d) célula de extração, e) sonda de ultrassom, f) gerador de potência, g) painel de mangueiras.

Após o pré-tratamento, a célula foi conectada a outro banho, previamente mantido a 25 °C. Essa conexão foi feita através de um painel de mangueiras construído em trabalho anterior realizado no LATEPA (Brochier, 2018). Esse painel permite a conexão de dois banhos simultaneamente ao painel e, através de válvulas de *by-pass* e entrada e a saída, é possível manter à célula conectada ao painel e selecionar o banho que estará conectado à camisa. Assim, as suspensões foram mantidas a 25 °C durante toda a etapa difusiva. Amostras (2 mL) foram coletadas em diversos momentos da etapa difusiva: 0, 5, 10, 15, 20 e 30 min. Além disso, experimentos controle (0 % de intensidade do ultrassom, 25 °C, 35 min) foram realizados de maneira similar aos tratamentos com ultrassom, porém sem ligar o equipamento. As amostras coletadas durante a etapa difusiva dos experimentos foram centrifugadas (12.000 rpm, 20 min), e os extratos foram separados para posterior análise.

Extração utilizando o campo elétrico moderado

O equipamento utilizado para a realização dos experimentos com MEF foi o mesmo descrito no Capítulo 4. Nesses experimentos foi utilizada a mesma célula de extração descrita para os experimentos de ultrassom e para o pré-tratamento dos experimentos descritos no Capítulo 4. Ainda, foi utilizado um painel de mangueiras para facilitar a troca do fluido da camisa, conforme descrito em detalhes para os experimentos usando o ultrassom no presente capítulo. Os experimentos de extração utilizando MEF consistiram em um pré-tratamento

(46 – 55 V cm⁻¹ ou 165 ± 5 V) e uma etapa difusiva, com duração de 4 h. Os pré-tratamentos foram avaliados em duas condições de temperatura, 45 ± 2 e 50 ± 2 °C, e durante 15 ou 20 min. Essas temperaturas e o tempo de tratamento foi definido com base em experimentos preliminares que demonstraram que em temperaturas e tempos inferiores não houve extração dos compostos.

Para a realização do pré-tratamento utilizou-se 50 mL da suspensão de extração e a célula foi conectada ao banho de aquecimento. Dessa forma, as amostras foram aquecidas até 43 °C (nos experimentos realizados a 45 °C) ou 48 °C (nos experimentos realizados a 50 °C) e, nesse momento, realizou-se a passagem de fluido de resfriamento na camisa da célula (solução de monoetilenoglicol e água, 50 % (v/v), mantido previamente a -18 °C), e iniciou-se a passagem de corrente elétrica através da suspensão. O resfriamento foi necessário para possibilitar a retirada de calor gerado na amostra pelo efeito Joule.

Após o pré-tratamento, as suspensões foram resfriadas até 26 ± 1 °C e dispostas em erlenmeyers, permanecendo sob agitação (150 rpm) sob o abrigo da luz por 4 h. Durante a etapa difusiva, foram coletadas amostras nos tempos: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3 e 4 h.

Varredura dos extratos

Para verificação da concentração de ficocianinas e do perfil de compostos extraídos, realizou-se varredura dos extratos em espectrofotômetro (PG Instruments, T80 UV-Vis, Reino Unido) em comprimentos de onda de 400 a 750 nm. A concentração de ficocianinas nos extratos foi calculada de acordo com a Equação 3 (Bennett and Bogorad, 1973; Yoshikawa and Belay, 2008) e a Equação 4, apresentadas previamente.

Concentração de proteínas

A concentração de proteínas nos extratos foi determinada pelo método de Lowry simplificado (Peterson, 1977). Nesse método as proteínas reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu e são reduzidas formando compostos de coloração azul. A principal desvantagem desse método é a não especificidade, uma vez que outros compostos antioxidantes podem reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu, acarretando a superestimação dos resultados. Mesmo assim, optou-se pela utilização desse método, uma vez que o método de Kjeldahl é demorado e o método de Bradford também não se mostrou adequado para a quantificação de proteínas nos extratos. Dessa forma, 400 µL de extrato (ou uma diluição do extrato em água) foram adicionados à 400 µL do reagente de Lowry e essas amostras foram mantidas no escuro por 15

min. Posteriormente, adicionou-se 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (0,4 N), e as amostras foram mantidas novamente no escuro por 45 min. Após o tempo de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 750 nm. A concentração de proteínas foi calculada pela comparação com uma curva padrão realizada com albumina bovina (BSA, Sigma Aldrich, Germany). Para o preparo da curva padrão, foi realizada uma solução-mãe de albumina bovina de 2 mg mL⁻¹ e, a partir dessa solução, foram realizadas diversas diluições até a concentração de 0,2 mg mL⁻¹. Essas soluções foram submetidas ao mesmo procedimento já descrito para os extratos. As análises foram realizadas em triplicata.

Para o preparo do reagente de Lowry foi necessário preparar, primeiramente, a solução CTC. Para tanto, 40 mL de sulfato de cobre a 0,5 % (m/v) foram misturados a 40 mL de tartarato de potássio a 1 % (m/v). A essa mistura, adicionou-se água até que o volume da solução final fosse 100 mL. Essa solução foi misturada com 100 mL de solução de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Portanto, o reagente de Lowry foi preparado com 10 mL da solução CTC, que foram misturados a 8 mL de hidróxido de sódio (1 N) e 12 mL de água. O reagente de Folin-Ciocalteu (2 N) foi diluído em água destilada para 0,4 N.

Quantificação de proteínas totais

Para determinar a concentração total de proteínas nas células, a suspensão de extração foi submetida ao método de Kjeldhal (Dickinson, 1958). Para tanto, 25 mL de suspensão foram centrifugados e a biomassa remanescente foi submetida à digestão com ácido sulfúrico em presença de uma mistura catalítica (sulfato de sódio e cobre, 10:1) por 2h e 400 °C. Como branco, foi utilizado o sobrenadante (tampão sódio-fosfato). Após a digestão, adicionou-se água e indicador de Tashiro às amostras e realizou-se a destilação em presença de NaOH. O gás formado durante a destilação (NH₃) foi coletado em Erlenmeyer com ácido bórico (4 %), indicador de Tashiro e água. Após a destilação, as amostras foram tituladas com ácido sulfúrico (0,1 N). A concentração de proteínas foi calculada utilizando a Equação 5, onde *K* é o fator de correção da solução de ácido sulfúrico, *V* é o volume de ácido sulfúrico utilizado na titulação, *F* é o fator de conversão de de nitrogênio (6,25) e *m* é a massa de amostra.

$$\text{Concentração de proteínas (\%)} = \frac{K \cdot V \cdot F}{m} \quad \text{Equação 5}$$

5.2 Artigo 3

Nesta seção é apresentado o terceiro artigo, publicado no periódico internacional *Bioresource Technology*. A publicação do artigo na presente tese de doutorado foi autorizada pela revista (licença número 4681360466657).

Extraction of valuable compounds from *Arthrospira platensis* using pulsed electric field treatment

Abstract

Pulsed electric field (PEF) treatment was evaluated for phycocyanin and proteins extraction from *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). PEF extractions were performed using different specific energies (28, 56 and 122 J·ml⁻¹ of suspension) and the results were compared to the extraction with bead milling. At highest PEF-treatment energies a damage of the cell morphology could be observed and the highest yields (up to 85.2 ± 5.7 mg g⁻¹ and 48.4 ± 4.4 g g⁻¹ of phycocyanins and proteins, respectively) could be obtained at 122 and 56 J·ml⁻¹. The yields increased with incubation time after PEF-treatment. The antioxidant capacity of the extracts obtained after PEF-treatment was higher than of those obtained after bead milling. PEF treatment is a promising technology to obtain blue-green antioxidant extracts from *A. platensis* in an environmentally friendly process.

Keywords: pulsed electric field; phycocyanin; protein; electroporation; cyanobacteria; pigments; antioxidant capacity.

5.2.1 Introduction

A. platensis is a well-known cyanobacteria due to its high micro and macronutrients synthesis capacity, especially proteins, which could reach up to 70 % of the total cell weight (Soni *et al.*, 2017). The interest about proteins from microalgae has been growing because of their high nutritional value, as these microorganisms synthesize proteins that contain many essential amino acids. *A. platensis* biomass can be used as food supplement, being considered by FDA as “one of the best protein sources” and granted as GRAS (Generally Recognized as Safe) (Soni *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018).

Phycocyanins, linked to the proteins, are the main pigment found in *A. platensis* and are characterized by a blue color. These pigments have shown to exhibit antioxidant activity, being associated to the decrease of the risk of degenerative, neuro and renal diseases (Fernández-Rojas *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2015; Raja *et al.*, 2015; Memije-Lazaro *et al.*, 2018). Phycocyanins are mostly used as color supplements in food and cosmetics and as a fluorescent marker for chemical and biological analyses (Fernández-Rojas *et al.*, 2014).

These pigments can be extracted from cyanobacteria by the disruption of the cells in aqueous media. The extraction efficiency depends mainly on the applied disruption method. In this regard, many extraction techniques have been studied for phycocyanins extraction: freezing and thawing, microwave, bead milling and ultrasound (Esquivel-Hernández *et al.*, 2017c; Papadaki *et al.*, 2017; İlter *et al.*, 2018). Among these methods, the most applied ones are bead milling and application of freezing/thawing cycles. The main disadvantage of these methods is the lack of specificity, as cell debris and other internal compounds are inevitably released into the extraction medium (İlter *et al.*, 2018).

Pulsed electric field (PEF) treatment is an physical technology that promotes the electroporation of the cells due to changes on the charge distribution along the cell's plasmamembrane, promoting the destabilization of the cell structure (Chen *et al.*, 2006). PEF has already been used for the extraction of different internal compounds from microalgae, as lipids, carotenoids, chlorophyll and proteins. Moreover, this technology is considered to be an environmental friendly, selective and mild cell disruption option for this purpose (Goettel *et al.*, 2013; Parniakov *et al.*, 2015b; Geada *et al.*, 2018; Silve *et al.*, 2018).

The extraction of phycocyanins assisted by PEF from *A. platensis* was recently evaluated for the first time (Martínez *et al.*, 2017), and the highest phycocyanin content was obtained using $110.1 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ($25 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$, $150 \text{ }\mu\text{s}$) at $40 \text{ }^\circ\text{C}$. As *A. platensis* has also a high potential for protein synthesis, the objective of the present work was to evaluate the PEF capability to selectively extract proteins and phycocyanins from *A. platensis*, aiming to obtain extracts with high antioxidant activity to be utilized in food and pharmaceutical industry.

5.2.1 Materials and methods

Cultivation conditions

A. platensis strain 21.99 was obtained from SAG (Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Germany) and was cultivated in modified Zarrouk medium (Aiba and Ogawa, 1977), which contained: NaHCO_3 ($13.61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Na_2CO_3 ($4.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), K_2HPO_4 ($0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), NaNO_3 ($2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), K_2SO_4 ($1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), NaCl ($1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), EDTA ($0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and $5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ of a micronutrient solution containing EDTA ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), H_3BO_3 ($1.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0.11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

The cultures were inoculated for 7-8 d in Erlenmeyer flasks (200 ml of medium and 50 ml of a previous inoculum) under constant agitation (150 rpm) in a thermostatic cabinet ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). The initial $\text{OD}_{680\text{nm}}$ of the cultures was 0.3 ± 0.05 . When the cells had reached the stationary phase (after 7-8 d of cultivation), the extraction experiments were performed.

Extraction experiments

Biomass preparation

Previous to the extraction experiments, the biomass was centrifuged (10,000 g, 10 min), and the supernatant was discarded. Sodium-phosphate buffer (pH 7.2) was then added to the biomass (in the same volume of the removed supernatant), and the electrical conductivity was adjusted to $1.75 \pm 0.02 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Then, 45 ml of the suspension were added to Erlenmeyer flasks, and the extraction treatments were performed.

Dry weight

The biomass concentration of the suspensions was determined by dry weight measurements. The suspensions (10 ml) were vacuum filtrated (Whatman, $8 \mu\text{m}$) and washed with distilled water (30 ml) to remove the salts. The dry pre-weighted filters were then placed in dry pre-weighted aluminum capsules overnight.

PEF pre-treatment

The suspensions in the Erlenmeyer flasks were connected to a peristaltic pump ($3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) and to two continuous flow treatment chambers; one of the chambers was connected to the PEF equipment, and the other one was used for the control experiments (pumping control, without the exposure to PEF treatment). The treatment chambers consist of a polycarbonate housing and two stainless steel electrodes (60 mm of diameter). Electrodes were placed in parallel inside the treatment chamber, separated by a 2 mm gap (Goettel *et al.*, 2013). PEF treatments were performed using a transmission line pulse generator with pulse amplitude of 8 kV, equivalent to an electric field of $40 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$. For that, the transmission line cables were charged using a charger resistor and the energy was transferred to the load by a gas insulated pressurized spark gap, resulting in a matched 50Ω load. The pulse duration was adjusted by the transmission line cable length. Details on the applied generator and measurement system are provided by Frey *et al.* (2013). Square pulses with a duration of $1 \mu\text{s}$ were used in all experiments. The frequency varied from 2 to 6 Hz, leading to applied specific treatment energies of 28, 56 and $112 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}$. The flow-rate was adjusted to $3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. The temperature was measured at the outlet of the treatment chamber using a thermometer (VWR International, Qtemp 500, Germany). The experiments were performed at room temperature ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) and, when the highest treatment energy was applied, the temperature of the samples increased up to a temperature of $T = 42^\circ\text{C}$. To verify a possible thermal effect on the extraction, a second control experiment (thermal control) was performed, in which the flasks containing the suspensions were kept for 15 min at $42 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ in a water bath.

Incubation period

After the pre-treatments (PEF application, pumping control and thermal control), the suspensions were kept on a shaker (80 rpm, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, dark) for 6 h. Samples were collected for further analysis after 0, 0.25, 0.50, 1, 2, 4 and 6 h of the incubation period and centrifuged ($12,300 \text{ g}$, 20 min, $10 \text{ }^\circ\text{C}$). The extracts obtained after the centrifugation (supernatant) were analyzed regarding the phycocyanin content, protein content and antioxidant capacity, as explained in details below. The remaining pellet was analyzed by an optical microscope for biomass integrity (Zeiss, Axioplan 2, Germany).

Extraction using bead milling

The same suspensions used for the PEF treatments, obtained after the biomass washing step (Section 2.2.1), were evaluated after cells disruption using the bead milling (Retsch, MM

400, Germany). For that, 1 ml of suspension was mixed with glass beads (0.25 – 0.5 mm of diameter) in 2 ml flasks, and the suspensions were submitted to 4 cycles of 25 s at 30 Hz of vibrational frequency. After this process, samples were centrifuged (12,300 g, 20 min, 10 °C), and the extract (supernatant) and the remaining pellet were analyzed using the same methodologies used for the PEF extracts, as explained in details as follows.

Analyses of the extracts

Absorption spectra

Before all subsequent analyses, the extracts were measured regarding its absorption spectra using a UV-spectrophotometer (Thermo Scientific, Genesys 10S, Germany). For that purpose, the extract was filled into quartz cuvettes and absorption was measured within a wavelength range of 270 to 800 nm.

Phycocyanin concentration

The phycocyanin (PC) concentration was determined according to Boussiba and Richmond (1979) with some modifications. A volume of 1.5 ml of ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) was added to 0.5 ml of the extracts. The samples were then centrifuged (12,300 g, 30 min, 10 °C), and the clear supernatant was removed. The blue pellet was resuspended in sodium phosphate buffer (pH 7.2) and absorption was determined by a spectrophotometer within 270 – 800 nm using quartz cuvettes. The PC concentration was calculated according to Equation 1 (Bennett and Bogorad, 1973; Yoshikawa and Belay, 2008) and Equation 2, in which $C_{extract}$ is the biomass concentration in the extracts, A_{620nm} and A_{652nm} are the absorbances at 620 and 652 nm, respectively.

$$PC \text{ (mg.ml}^{-1}\text{)} = \frac{A_{620nm} - 0.474 \cdot A_{652nm}}{5.34} \tag{Eq. 1}$$

$$PC \text{ (mg.g of biomass}^{-1}\text{)} = \frac{PC \text{ (}\frac{mg}{mL}\text{)}}{C_{extract} \text{ (}\frac{g}{mL}\text{)}} \tag{Eq. 2}$$

Protein concentration

The protein concentrations in the extracts were determined using the *BioRad DCTM* protein kit based on Lowry method (Lowry *et al.*, 1951). For that, 25 µl of the extracts were mixed with 125 µl of reagent A (alkaline copper tartrate). To this mixture, 1 ml of reagent B (Folin-Ciocalteu reagent) was added. The samples were incubated for 30 min in the dark. After incubation the absorbance was measured at 750 nm. The protein concentration was calculated based on a standard curve, performed with bovine albumin (BSA, Sigma Aldrich, Germany) in concentrations varying from 0.2 to 2 mg·ml⁻¹.

Antioxidant capacity

The antioxidant capacity of the extracts was determined using the ABTS[•] radical assay (Re *et al.*, 1999). For that, 50 µl of the extracts were added to 1.95 ml of ABTS[•] radical reagent (ABTS stock solution (7 mM in water) with 2.45 mM potassium persulfate after 16 h of reaction). The absorption of the samples was measured at 620 nm between 1 and 6 min after the reaction started. The antioxidant capacity was calculated based on a standard curve performed with Trolox (0 – 25 mg·l⁻¹), and the results were expressed in µM of Trolox equivalent per g of biomass (µM TE ml of extract g⁻¹).

Gel electrophoresis

The SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate – polyacramide gel eletrectrophoresis) was performed using a 12 % polyacramide gel (Cleveland *et al.*, 1977). The samples were pre-treated with a Tris buffer at 98 °C for 15 min. After the electrophoresis, the gels were stained (*Coomassie Brilliant Blue R-250*, BioRad), and the protein bands were identified using a marker (*Precision Plus Protein Standard Dual Color*, BioRad).

Statistical data analyses

All experiments were performed at least in triplicate. Statistical significance was determined by ANOVA and Tukey test (5 % of confidence level) using Statistica® (13.0, *Dell Inc.*, Tulsa, USA).

5.2.3 Results and discussion

PEF treatment and incubation step

Right after PEF treatments (time zero of the incubation step), proteins and phycocyanins were analyzed, but they were not quantifiable, indicating that these compounds were not extracted during the pre-treatments (Figure 1, 0 h). The extracts obtained from the control experiments (pumping and thermal control) along the incubation step (6 h), did not contain any detectable proteins or phycocyanins (results not shown), meaning that only pumping or thermal heating to 42 ± 2 °C for 15 min were not effective to disrupt the cells and to extract the internal compounds.

The phycocyanin and protein content of the extracts after PEF treatment over the incubation period are presented in Figure 1. The results showed that it was possible to extract the same amount of phycocyanins and proteins after 6 h of incubation using 56 and 112 J·ml⁻¹. For the highest treatment energy, the effect of PEF was observed in the first minutes of the incubation, once phycocyanins and proteins were detected in the extracts in the first 15 min, and the concentration of these compounds did not vary statistically after 30 min ($p < 0.05$). For the lowest treatment energy, on the other hand, it was not possible to extract the same contents. This lower energy was probably not sufficient to induce cell disintegration, remaining some of them undamaged. At higher energies, the application of PEF caused irreversible membrane permeabilization and, in addition, the whole cell structure started to collapse. For the highest energy, the most part of the cell structure was visibly damaged within the first minutes of the incubation step, resulting in the collapse of the cells and in the extraction of a great amount of proteins and phycocyanins. The impact of pretreatment on cell morphology showed that when 28 J·ml⁻¹ was applied, the visible damage on the cell structure was almost undetectable; for this energy, even after 6 h of incubation, some structure remained undamaged, which explains the low phycocyanin and protein extraction yield.

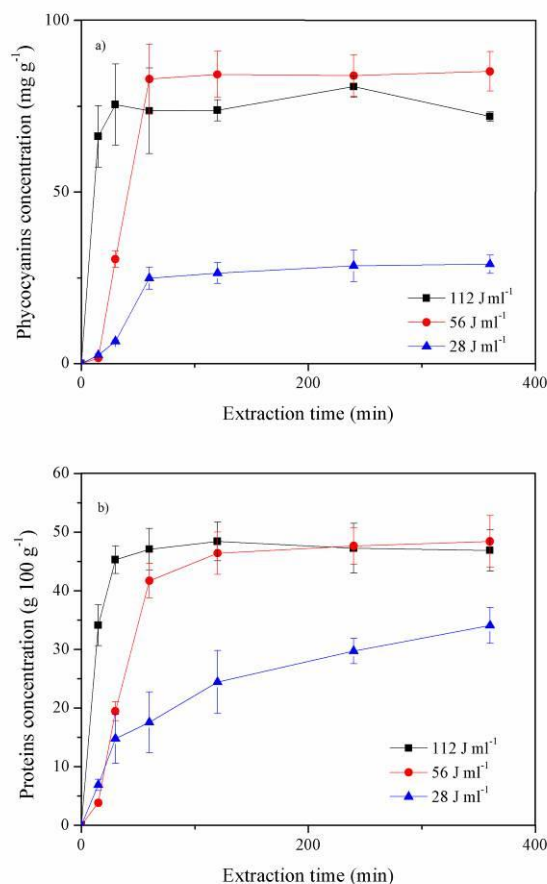


Figure 1. a) Phycocyanin and b) protein concentration in the extracts over the incubation step, after PEF treatment using 28, 56 and 112 J·ml⁻¹. The curves in the figure are only tendency lines.

As aforementioned, phycocyanins extraction from *A. platensis* using PEF was previously evaluated (Martínez *et al.*, 2017). These authors reported that phycocyanins were detected only after 150 min of incubation, which is not in agreement with the results obtained in the present work (phycocyanin extraction was observed after 15 min of incubation). The researches applied a similar range of energy (13 – 110 J·ml⁻¹) to the one tested in this study (28 – 112 J·ml⁻¹) but with lower electric field intensity (15 – 25 kV·cm⁻¹). In the present work, the applied specific energy varied by changing the frequency from 2 (28 J·ml⁻¹) to 6 Hz (112 J·ml⁻¹) and keeping the electric field strength (40 kV·cm⁻¹) and pulse duration (1 μs) constant. The higher extraction time reported by those authors most probably is due to the lower electric field applied, once the electroporation depends not only on the specific energy applied, but also on the electric field intensity and the pulse duration. PEF treatment is more intense with the increase of the electric field and the number of pulses (Asavasanti *et al.*, 2011; Mahnič-Kalamiza *et al.*, 2014). The same authors (Martínez *et al.*, 2017) also observed an increase in

the extraction yield of almost 50 % when the electric field was increased from 20 to 25 kV·cm⁻¹. The 40 kV·cm⁻¹ used in the present work probably caused a more intense electroporation, decreasing the incubation time required for extraction.

Other authors also observed a release of water soluble compounds in the first hour after PEF treatment (Goettel *et al.*, 2013; Parniakov *et al.*, 2015b; Carullo *et al.*, 2018). Carullo *et al.* (2018) observed a saturation level of the extraction of ionic compounds and carbohydrates after PEF treatment and 1 h of incubation of *Chlorella vulgaris*. Goettel *et al.* (2013) observed that almost 80 % of the ionic compounds were released in the first hour of the extraction after PEF treatment of *Auxenochlorella protothecoides*. Parniakov *et al.* (Parniakov *et al.*, 2015b) reported a saturation level after 1 h of incubation time for the extraction of proteins and pigments from *Nannochloropsis spp.* These results corroborate the well-known effect of PEF-assisted extraction which requires a certain time after the PEF treatment to allow diffusion of solvent and internal compounds without the disintegration of the whole cells.

The protein release after PEF treatment of different microalgae species has been evaluated (Goettel *et al.*, 2013; Lam *et al.*, 2017; Carullo *et al.*, 2018) and low extraction yields were obtained. The highest protein yield was obtained by Lam *et al.* (2017): up to 13% of the proteins from *Neochloris oleoabundans*, compared to extraction with bead milling. The discrepancy of those results from the ones obtained in the present work are probably due to differences on the cell wall composition. *A. platensis* cells are considered to be easily damaged due to the peptidoglycan cell wall. When a cell is permeabilized, the turgor pressure inside the cell may drop, leading to the expansion of gas vacuoles and to the rupture of the cell. This phenomenon is more possible in the case of a weak cell wall. The other microalgae cited above have a more robust cellulose cell wall, which explains the low protein extraction yield in this case.

The results of the antioxidant activity against ABTS[•] radical of the extracts obtained for the three evaluated energies are presented in Figure 2. It was possible to observe that the antioxidant capacity of the extracts using the highest energy did not vary significantly ($p < 0.05$) from 15 min to 6 h of incubation. For 56 J·ml⁻¹, on the other hand, the same antioxidant capacity ($p < 0.05$) was achieved after 1 h of incubation. For the lowest energy, the antioxidant capacity of the extracts was lower even after 6 h. These results corroborate those previously discussed, for protein and phycocyanins as well (Figure 1).

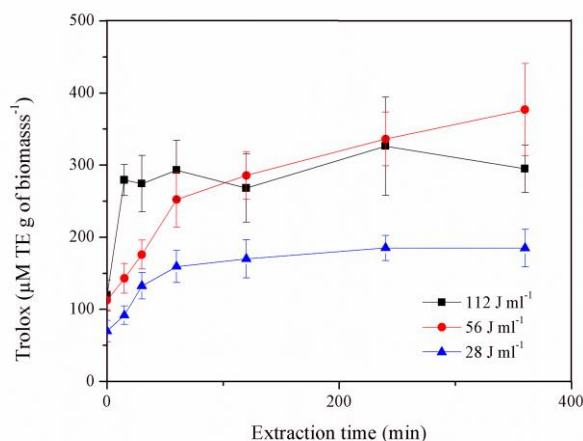


Figure 2. Antioxidant capacity against ABTS[•] radical of the extracts obtained after PEF (28, 56 and 112 J·ml⁻¹), during the incubation step. The curves in the figure are only tendency lines.

As aforementioned, phycocyanins are well-known as antioxidant compounds as well as proteins and amino acids; all of them presented antioxidant activity against ABTS[•] radical (Fernández-Rojas *et al.*, 2014; Sila and Bougatef, 2016; Wu *et al.*, 2016). Therefore, it is believed that the antioxidant activity of the extracts is due to the contribution of the phycocyanins and proteins. This hypothesis is corroborated observing the trend of the phycocyanins and proteins tendency lines, which present a similar behavior to the antioxidant activity ones. It is important to point out that other antioxidant compounds may be extracted in lower concentration (phenolic compounds, for instance), contributing to the antioxidant capacity. It is also possible to observe that antioxidant activity was detected since the beginning of the incubation step (time zero). This may be due to the release of small ions and molecules, as amino acids, that could contribute to the antioxidant activity of the extracts.

Park *et al.* (2018) also evaluated the antioxidant activity of *Spirulina* extracts. The authors found 108.3 ± 10.2 µmol Trolox equivalent g⁻¹. These values are lower than the ones reported in the present work probably because of the extraction methods differences (4 cycles of sonication for 30 min) and because of the higher phycocyanins amount in the extracts. *A. platensis* extracts contain high level of antioxidant activity compared to other vegetable antioxidant rich matrices, as strawberry (4-17 µmol Trolox equivalent g⁻¹ (Nowicka *et al.*, 2019)), mango pulp (34 µmol Trolox equivalent g⁻¹ (Hoyos-Arbeláez *et al.*, 2018)), spinach (1-9 µmol Trolox equivalent g⁻¹ (Grimalt *et al.*, 2018)) and cranberry (226-264 µmol Trolox equivalent g⁻¹ (Pappas and Schaich, 2009)).

PEF and bead milling

platensis cells were disrupted by bead milling, which was considered as a positive control, once the cells were completely damaged after this procedure. Table 1 presents a comparison of the extracts after bead milling and after PEF followed by 6 h of incubation. This table also shows the extraction yield, which was calculated considering bead milling as 100 % of concentration. As can be seen, for 56 and 112 J·ml⁻¹, the phycocyanin and protein content did not present statistical difference in comparison with the bead milling ($p < 0.05$). For the lowest energy, on the other hand, the extraction yield was statistically lower, as aforementioned. These results indicated that it was possible to extract the same amount of phycocyanins and proteins using PEF as a pre-treatment, compared to the conventional bead milling extraction method.

Many authors reported about phycocyanin concentrations in the cells, varying from 50 to 200 mg·g⁻¹ (Martínez *et al.*, 2017; İlter *et al.*, 2018; Manirafasha *et al.*, 2018), which is a little lower than the content found in the present work. However, it is also stated that phycocyanin content could reach up to 30 % of *A. platensis* cell dry weight, which is in agreement with the present results. Park *et al.* (2018) also found higher values (251.2 ± 11.2 mg·g⁻¹) for phycocyanin concentration in *A. platensis* biomass.

The antioxidant activity against ABTS[•] after the bead milling process was lower compared to the extracts obtained with PEF. It is suggested that PEF induced a programmed cell death mechanism that promoted cell apoptosis and lead to the digestion of the cells by enzymes. When bead milling was applied, enzymatic digestion possibly occurred but the enzymes were immediately released into the medium. In the case of PEF treatment, the enzymes remained in the cells, which probably lead to the hydrolysis of proteins. This enzymatic hydrolysis could reduce the protein size, liberating peptides into the medium. Because of steric effects, the peptides would react easier with ABTS[•] radical, compared to a reaction with the whole protein molecule. This hypothesis is corroborated by other studies that observed an increase of the antioxidant activity of *Spirulina* extracts after enzymatic hydrolysis (Metropolitana and Whitaker, 2015; Costa *et al.*, 2019). According to this studies, after the hydrolysis, the extracts presented a higher concentration of low molecular weight peptides, which increased the antioxidant potential of the extracts.

Table 1. Antioxidant activity against ABTS• radical and phycocyanin and protein concentration in the extracts after PEF (28 – 112 J·ml⁻¹) and 6 h of incubation step and after bead milling.

| | Energy (J mL ⁻¹) | Extracts after PEF and 6 h of incubation step* | Yield** | Bead milling* |
|--|---------------------------------|---|---------|-----------------------------|
| Phycocyanins (mg g of biomass ⁻¹) | 112 | 71.9 ± 1.36 ^a | 76% | |
| | 56 | 85.2 ± 5.7 ^a | 90% | 94.9 ± 6.0 ^a |
| | 28 | 28.9 ± 2.67 ^b | 67% | |
| Proteins (g 100 g of biomass ⁻¹) | 112 | 46.9 ± 3.5 ^a | 102% | |
| | 56 | 48.4 ± 4.4 ^a | 105% | 46.1 ± 4.4 ^a |
| | 28 | 34.1 ± 3.1 ^b | 74% | |
| Antioxidant activity against ABTS• (µM TE g of biomass ⁻¹) | 112 | 294.9 ± 32.6 ^{ab} | 136% | |
| | 56 | 326.3 ± 63.9 ^a | 150% | 216.95 ± 10.74 ^b |
| | 28 | 184.9 ± 26 ^b | 85% | |

* mean ± standard deviation; means with the same lowercase letter do not have significant difference (p > 0.05).

** The yield was calculated considering the bead milling results as 100 %.

Moreover, using bead milling, other internal compounds were more intensively extracted. This can be confirmed by the comparison of the spectrum of the extracts (Figure 3): the chlorophyll content after the bead milling was higher than that obtained with PEF (peaks at ~420-440 and 680 nm). When the cells were electroporated, cell debris and other non-soluble compounds (as chlorophylls) may be extracted in minor quantities, promoting the selective extraction of water soluble compounds. This selectivity was considered to be the main advantage of PEF, which was also observed by other researches (Martínez *et al.*, 2017; İlter *et al.*, 2018).

İlter *et al.* (İlter *et al.*, 2018) also reported a decrease of the antioxidant activity when high destructive disruption methods were applied (ultrasound and microwave). Additionally, these authors mentioned an increase in the green color of the extracts when using these methods, indicating that other compounds, as chlorophylls, were more intensively extracted.

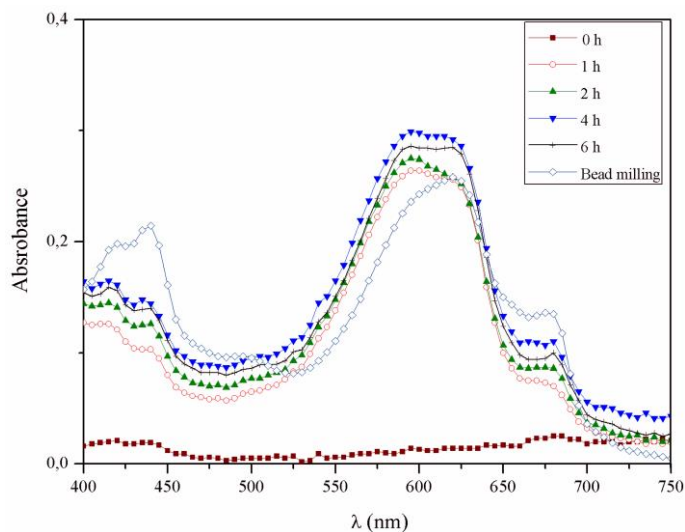


Figure 3. Absorption spectra of the extracts obtained after bead milling and after PEF treatment and incubation time of 0, 1, 2, 4 and 6 h.

Protein characterization by SDS-PAGE

The extracts were evaluated regarding the protein structure by SDS-PAGE (Figure 4). As can be seen, the protein profile was the same over the incubation time since the beginning of the extraction (15 – 30 min), which is in agreement with the hypothesis discussed previously regarding the collapse of the whole cell structure. The main bands in the gel are probably Ribulase (RuBisCO) (53.28 kDa) and C-phycoyanin β (18.09 kDa) and α (17.6 kDa) chains (Andersson and Backlund, 2008; Chaiklahan *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2018). The intensity and size of the phycoyanin protein chain bands confirm the high amount of phycoyanins extracted by PEF and bead milling.

Compared to the bead milling band (line h), PEF phycoyanin bands seem to be more separated, which also could be an indication of the quality of the extracts obtained with this extraction method; the less defined bands obtained for the bead milling suggests the presence of other proteins, while the more defined bands of the PEF extracts indicate a more purified extract. Lauceri *et al.* (2018) compared the SDS-PAGE of crude phycoyanin extracts from *A. platensis* with purified phycoyanins. The results found by these authors are in agreement to those found in the present work: a non-defined band was obtained for the crude extracts and a more defined one for the purified phycoyanins. Similar results were also obtained by Minkova *et al.* (2003), who analyzed *Spirulina fusiformis* extracts using SDS-PAGE and also observed well-defined bands with the purification of the extracts.

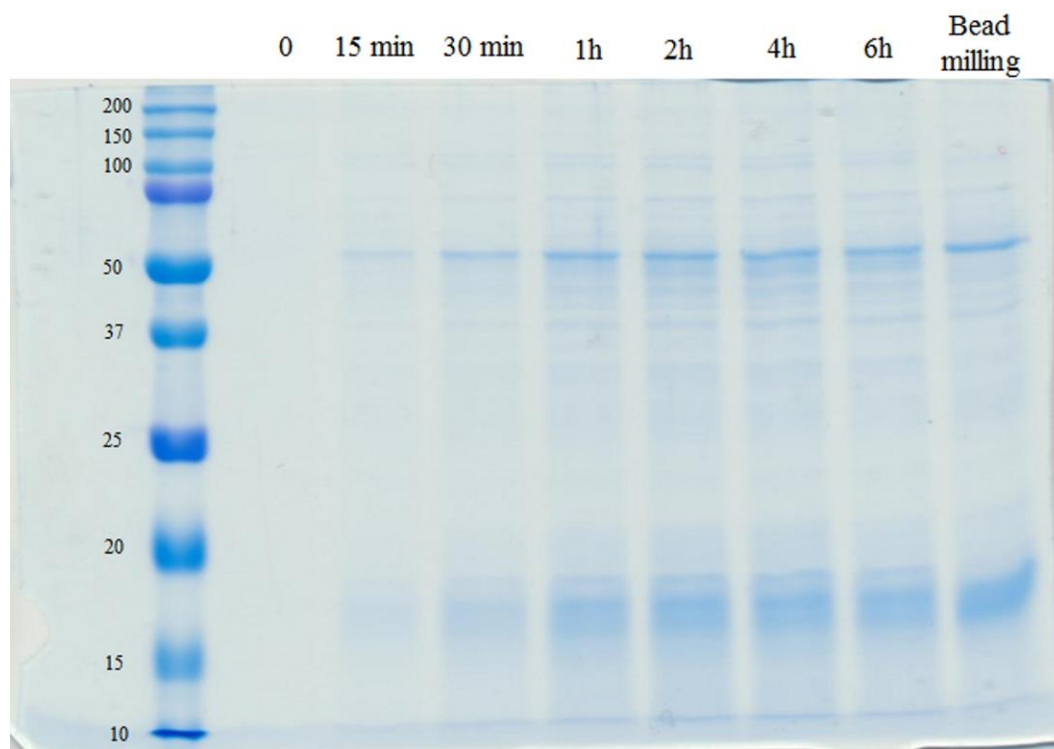


Figure 4. SDS-PAGE for the extracts after PEF treatment and during the incubation step after 0, 15, 30 min, 1, 2, 4 and 6 h; and after the bead milling.

5.2.4 Conclusion

PEF-treatment was evaluated for the extraction of proteins and phycocyanins from *A. platensis*. PEF allowed the extraction of the same amount of phycocyanins and proteins compared to bead milling, but the extracts obtained after PEF-treatment presented higher antioxidant values against ABTS•. The highest phycocyanin and protein extraction yield were obtained with 56 and 112 J mL⁻¹ after 30 min of incubation step. The cells electroporation promoted the collapse of the whole cell structure, once the same protein profile was detected since the beginning of the extraction. The main advantage of PEF-treatment was the selectivity of extraction of the compounds of interest, producing a more purified extract which could be used in the food and pharmaceutical industries without additional purification techniques.

Supplementary material

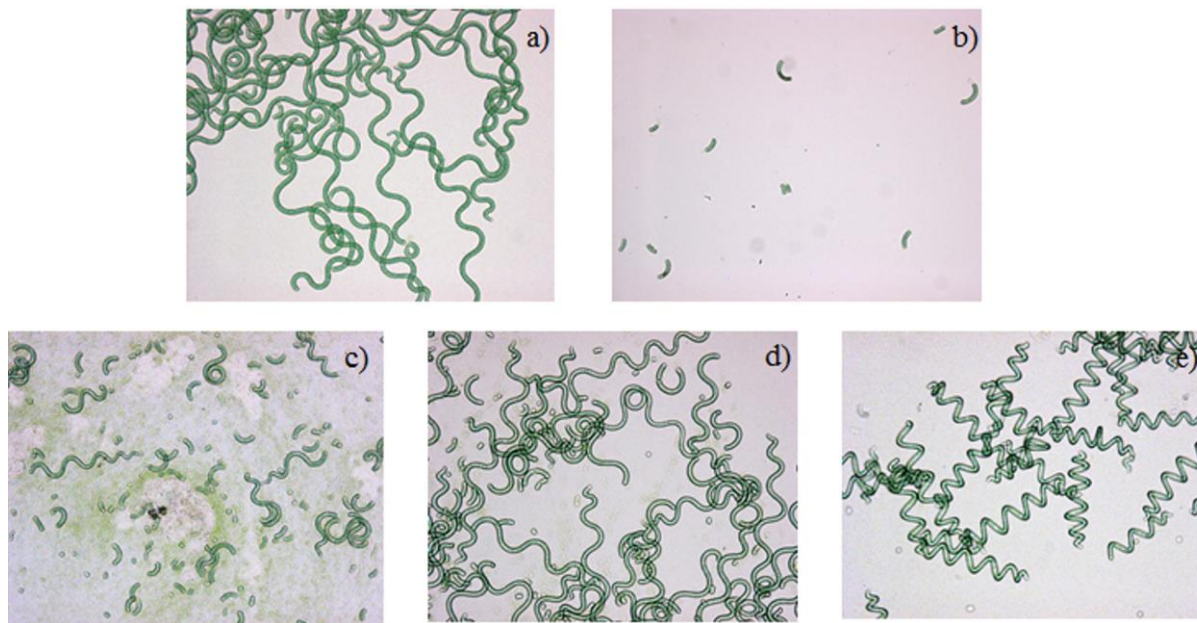


Figure S1. Bright light microscopies of *A. platensis* cells after different treatments: a) control; b) bead milling; 15 min after PEF using c) 112 J·ml⁻¹; d) 56 J·ml⁻¹ and e) 28 J·ml⁻¹.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*) as a PDSE scholarship for the first author.

References

1. Aiba, S., Ogawa, T., 1977. Assessment of Growth Yield of a Blue-green Alga, *Spirulina platensis*, in Axenic and Continuous Culture. *J. Gen. Microbiol.* 102, 179–182.
2. Andersson, I., Backlund, A., 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 275–291.
3. Asavasanti, S., Ristenpart, W., Stroeve, P., Barrett, D.M., 2011. Permeabilization of plant tissues by monopolar pulsed electric fields: effect of frequency. *J. Food Sci.* 76, E98-111.
4. Bennett, A., Bogorad, L., 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58, 419–35.

5. Boussiba, S., Richmond, A.E., 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 120, 155–159.
6. Carullo, D., Abera, B.D., Casazza, A.A., Donsì, F., Perego, P., Ferrari, G., Pataro, G., 2018. Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal Res.* 31, 60–69.
7. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., Bunnag, B., 2011. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresour. Technol.* 102, 7159–7164.
8. Chen, C., Smye, S.W., Robinson, M.P., Evans, J.A., 2006. Membrane electroporation theories: a review. *Med. Biol. Eng. Comput.* 44, 5–14.
9. Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K., 1971. Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252, 1102-1106.
10. Costa, A.M., Bueno, K.T.L., Rosa, A.P.C. da, Costa, J.A.V., 2019. The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina* sp. *LEB18. LWT* 99, 173–178.
11. Esquivel-Hernández, D.A., Rodríguez-Rodríguez, J., Rostro-Alanis, M., Cuéllar-Bermúdez, S.P., Mancera-Andrade, E.I., Núñez-Echevarría, J.E., García-Pérez, J.S., Chandra, R., Parra-Saldívar, R., 2017. Advancement of green process through microwave-assisted extraction of bioactive metabolites from *Arthrospira Platensis* and bioactivity evaluation. *Bioresour. Technol.* 224, 618–629.
12. Fan, X., Cui, Y., Zhang, R., Zhang, X., 2018. Purification and identification of anti-obesity peptides derived from *Spirulina platensis*. *J. Funct. Foods* 47, 350–360.
13. Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., Pedraza-Chaverri, J., 2014. Nutraceutical properties of phycocyanin. *J. Funct. Foods* 11, 375–392.
14. Frey, W., Gusbeth, C., Schwartz, T., 2013. Inactivation of *Pseudomonas putida* by Pulsed Electric Field Treatment: A Study on the Correlation of Treatment Parameters and Inactivation Efficiency in the Short-Pulse Range. *J. Membr. Biol.* 246, 769–781.
15. Geada, P., Rodrigues, R., Loureiro, L., Pereira, R., Fernandes, B., Teixeira, J.A., Vasconcelos, V., Vicente, A.A., 2018. Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology – Applications, techniques and future trends. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 94, 656–668.

16. Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., Frey, W., 2013. Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Res.* 2, 401–408.
17. Grimalt, M., Hernández, F., Legua, P., Almansa, M.S., Amorós, A., 2018. Physicochemical composition and antioxidant activity of three Spanish caper (*Capparis spinosa* L.) fruit cultivars in three stages of development. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 240, 509–515.
18. Hoyos-Arbeláez, J., Blandón-Naranjo, L., Vázquez, M., Contreras-Calderón, J., 2018. Antioxidant capacity of mango fruit (*Mangifera indica*). An electrochemical study as an approach to the spectrophotometric methods. *Food Chem.* 266, 435–440.
19. İter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., Kaymak-Ertekin, F., 2018. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *J. Food Compos. Anal.* 70, 78–88.
20. Lam, G.P. 't, Postma, P.R., Fernandes, D.A., Timmermans, R.A.H., Vermuë, M.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., Olivieri, G., 2017. Pulsed Electric Field for protein release of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*. *Algal Res.* 24, 181–187.
21. Lauceri, R., Chini Zittelli, G., Maserti, B., Torzillo, G., 2018. Purification of phycocyanin from *Arthrospira platensis* by hydrophobic interaction membrane chromatography. *Algal Res.* 35, 333–340.
22. Li, B., Gao, M.-H., Chu, X.-M., Teng, L., Lv, C.-Y., Yang, P., Yin, Q.-F., 2015. The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 749, 107–114.
23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–75.
24. Mahnič-Kalamiza, S., Vorobiev, E., Miklavčič, D., 2014. Electroporation in Food Processing and Biorefinery. *J. Membr. Biol.* 247, 1279–1304.
25. Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X., Jing, K., 2018. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresour. Technol.* 255, 293–301.

26. Martínez, J.M., Luengo, E., Saldaña, G., Álvarez, I., Raso, J., 2017. C-phycoerythrin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. *Food Res. Int.* 99, 1042–1047.
27. Memije-Lazaro, I.N., Blas-Valdivia, V., Franco-Colín, M., Cano-Europa, E., 2018. *Arthrospira maxima* (Spirulina) and C-phycoerythrin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. *J. Funct. Foods* 43, 37–43.
28. Metropolitana, U.A., Whitaker, S., 2015. Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) obtained by simulated gastrointestinal digestion. *Mexican J. Chem. Eng.* 14, 25–34.
29. Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E., Busheva, M.C., 2003. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. *J. Biotechnol.* 102, 55–59.
30. Nowicka, A., Kucharska, A.Z., Sokół-Łętowska, A., Fecka, I., 2019. Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria × ananassa* Duch. *Food Chem.* 270, 32–46.
31. Papadaki, S., Kyriakopoulou, K., Tzovenis, I., Krokida, M., 2017. Environmental impact of phycoerythrin recovery from *Spirulina platensis* cyanobacterium. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 44, 217–223.
32. Pappas, E., Schaich, K.M., 2009. Phytochemicals of Cranberries and Cranberry Products: Characterization, Potential Health Effects, and Processing Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 741–781.
33. Park, K.-H., Kim, J.-R.J.-Y., Choi, I., Kim, J.-R.J.-Y., Cho, K.-H., 2015. ω -6 (18:2) and ω -3 (18:3) fatty acids in reconstituted high-density lipoproteins show different functionality of anti-atherosclerotic properties and embryo toxicity. *J. Nutr. Biochem.* 26, 1613–1621.
34. Park, W., Kim, H.-J., Li, M., Lim, D., Kim, J., Kwak, S.-S., Kang, C.-M., Ferruzzi, M., Ahn, M.-J., Park, W.S., Kim, H.-J., Li, M., Lim, D.H., Kim, J., Kwak, S.-S., Kang, C.-M., Ferruzzi, M.G., Ahn, M.-J., 2018. Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycoerythrin, in *Spirulina* Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules* 23, 2065.
35. Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., Vorobiev, E., 2015. Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from

microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 79–85.

36. Patel, H.M., Rastogi, R.P., Trivedi, U., Madamwar, D., 2018. Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. *Algal Res.* 32, 372–383.

37. Raja, R., Hemaiswarya, S., Ganesan, V., Carvalho, I.S., 2015. Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 1–12.

38. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.

39. Sila, A., Bougatef, A., 2016. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *J. Funct. Foods* 21, 10–26.

40. Silve, A., Papachristou, I., Wüstner, R., Sträßner, R., Schirmer, M., Leber, K., Guo, B., Interrante, L., Posten, C., Frey, W., 2018. Extraction of lipids from wet microalga *Auxenochlorella protothecoides* using pulsed electric field treatment and ethanol-hexane blends. *Algal Res.* 29, 212–222.

41. Soni, R.A., Sudhakar, K., Rana, R.S., 2017. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 69, 157–171.

42. Wu, H.-L., Wang, G.-H., Xiang, W.-Z., Li, T., He, H., 2016. Stability and Antioxidant Activity of Food-Grade Phycocyanin Isolated from *Spirulina platensis*. *Int. J. Food Prop.* 19, 2349–2362.

43. Yoshikawa, N., Belay, A., 2008. Single-laboratory validation of a method for the determination of c-phycocyanin and allophycocyanin in *Spirulina* (*Arthrospira*) supplements and raw materials by spectrophotometry. *J. AOAC Int.* 91, 524–529.

5.3 Artigo 4

Nesta seção será apresentado o quarto artigo, referente aos estudos de extração de ficocianinas e proteínas da *Spirulina platensis* utilizando as tecnologias de ultrassom e MEF. Esse artigo foi omitido da versão para publicação parcial, uma vez que será encaminhado para publicação.

Capítulo 6 – Considerações finais

No presente trabalho foram avaliadas as tecnologias de US e MEF na extração de lipídeos e carotenoides a partir da microalga *Heterochlorella luteoviridis* e as tecnologias de MEF e PEF na extração de ficocianinas e proteínas da *Spirulina platensis*. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com outros estudos que avaliaram as tecnologias emergentes de US, MEF e PEF. Os efeitos do MEF e PEF estão relacionados com a eletroporação das células; a passagem de corrente elétrica através de um material biológico pode induzir o aumento do potencial transmembrana, promovendo a formação de poros e o aumento da transferência de massa. Os efeitos do US são mais intensos, promovendo a desintegração da estrutura celular. Dependendo da aplicação, MEF e PEF são consideradas tecnologias mais interessantes que o US, devido a seletividade de extração promovida pela formação de poros e liberação gradual dos compostos internos no meio de extração. O US, por outro lado, similarmente ao moinho de bolas, promove a desintegração celular de maneira mais rápida e intensa; nesse caso, a estrutura celular é mais danificada, liberando o conteúdo intracelular para o meio de extração.

A extração de carotenoides foi influenciada significativamente pelas tecnologias de MEF e US, utilizadas como métodos de pré-tratamento de extração. Nos experimentos de extração com MEF (50 - 60 V cm⁻¹, 60 Hz, 10 min, 30 - 60 °C) foi possível extrair até 86 % (1,5 ± 0,06 mg g⁻¹) do total de carotenoides presentes na biomassa. Esses experimentos foram realizados a 50 °C com 25 %, v/v de etanol (juntamente com a aplicação de MEF) durante o pré-tratamento e concentrações mais elevadas de etanol (até 75 %, v/v) durante a etapa difusiva. Rendimentos inferiores foram observados na temperatura de 30 °C, mesmo com a aplicação de MEF. Dessa forma, acredita-se que os efeitos da temperatura e a presença de etanol contribuíram para intensificar os efeitos de eletroporação promovidos pelo MEF, resultando em um efeito combinado das variáveis avaliadas na extração.

A aplicação do US resultou em rendimentos de até 80 % (1,3 ± 0,04 mg g⁻¹), utilizando 40 - 80 % da intensidade do ultrassom e concentrações de etanol de 60 - 75 %, v/v. Intensidades mais elevadas do ultrassom promoveram a degradação de carotenoides, diminuindo o

rendimento de extração. No caso da extração de carotenoides a partir da *H. luteoviridis* com o US, não foram observados efeitos negativos da aplicação do US quanto a não-seletividade dos extratos. Acredita-se que esses efeitos não foram observados pois as análises nos extratos foram realizadas após uma etapa de purificação (saponificação). Além disso, a presença de etanol possivelmente contribuiu para a seletividade, arrastando para o extrato somente os compostos mais apolares.

Dessa forma, considera-se que a principal vantagem das tecnologias de US e MEF para a extração de carotenoides é a possibilidade de realizar a extração com etanol, que é um solvente mais ambientalmente amigável, se comparado aos solventes comumente utilizados para a extração. A substituição de solventes pode reduzir custos de processo, uma vez que etapas de purificação do produto e o tratamento dos resíduos poderão ser facilitadas. Para avaliar qual é a melhor tecnologia a ser utilizada, é necessário realizar um estudo mais detalhado envolvendo os gastos energéticos em cada processo. De maneira geral, o ultrassom é uma tecnologia mais barata e mais fácil de ser implementada a nível industrial. A utilização de um sistema de MEF em escala contínua exigiria levar em consideração questões de segurança, uma vez que corrente elétrica seria aplicada. Esses cuidados são ainda mais relevantes quando se utiliza PEF, visto que a tensão elétrica envolvida nesse processo é muito alta.

A extração de lipídeos, por outro lado, foi influenciada somente pela concentração de etanol, uma vez que as tecnologias avaliadas (US e MEF) não influenciaram significativamente a extração. Os melhores rendimentos de extração (até 81 %, $146,2 \pm 3,9 \text{ mg g}^{-1}$) foram obtidos com 75 % (v/v) de etanol.

Para a extração de ficocianinas e proteínas a partir da *Spirulina platensis*, os extratos obtidos com o PEF apresentaram coloração azul característica das ficocianinas, evidenciando a extração seletiva dos compostos quando essa tecnologia foi utilizada. Utilizando as maiores energias (56 e 112 J mL^{-1}) e após 30 min de etapa difusiva, foi possível obter os maiores rendimentos de extração (até $85,2 \pm 5,7 \text{ mg g}^{-1}$ e $48,4 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de ficocianinas e proteínas, respectivamente).

Os extratos obtidos com o PEF podem ser comparados aos extratos obtidos pela destruição das células utilizando ciclos de congelamento e descongelamento ($64,7 \pm 3,7 \text{ mg g}^{-1}$ e $48,3 \pm 1,6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ficocianinas e proteínas, respectivamente). Esse método é utilizado somente em laboratório, não sendo viável industrialmente. O congelamento lento das células promove o rompimento da estrutura celular devido a mudanças de pressão na membrana celular e pela

formação de grandes cristais de gelo, que crescem nos espaços intercelulares, deformando e rompendo a membrana das células adjacentes. Assim como o PEF, esse método também proporcionou uma extração seletiva das ficocianinas, uma vez que os extratos apresentaram coloração azul e baixa concentração de clorofilas.

Utilizando o moinho de bolas (4 ciclos, 15s, 30 Hz) foi possível extrair $94,9 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}$ de ficocianinas e $46,1 \pm 4,4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteínas e usando o US (20 % de intensidade, 9 W cm^{-2} , 5 min, $25 \text{ }^\circ\text{C}$), $45,7 \pm 2,1 \text{ mg g}^{-1}$ e $44,8 \pm 5,3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de ficocianinas e proteínas, respectivamente. Quando comparados com os extratos obtidos com PEF e congelamento e descongelamento, os extratos obtidos com o moinho de bolas e com o US apresentaram maiores concentrações de clorofilas e detritos celulares, evidenciando uma extração menos seletiva.

Por fim, a aplicação de MEF ($46 - 55 \text{ V cm}^{-1}$, 15 e 20 min, $45 \text{ e } 50 \text{ }^\circ\text{C}$) na extração de ficocianinas e proteínas não apresentou efeito significativo nos rendimentos de extração. Acredita-se que esse resultado se deve a baixa intensidade dos efeitos de eletroporação. Os estudos que apresentaram resultados positivos com a utilização de MEF em outras matrizes são estudos em que temperaturas mais elevadas foram aplicadas em conjunto com o campo elétrico moderado. Portanto, acredita-se que quando campos elétricos moderados são aplicados a células de microalgas é necessário realizar a combinação com outra variável que favoreça a permeabilização da membrana celular. Essa é uma hipótese e são necessários mais estudos para comprová-la, uma vez que a aplicação de MEF em células de microalgas foi realizada pela primeira vez no presente trabalho. Além disso, até o presente momento, não foram encontrados outros estudos que avaliaram a tecnologia para o mesmo propósito.

As conclusões gerais do presente trabalho são apresentadas a seguir:

- (i) A aplicação de US e MEF como métodos de pré-tratamento aumentam a eficiência de extração de carotenoides. Essas tecnologias possibilitam a utilização de etanol como solvente, que é considerado um solvente menos agressivo ao meio ambiente.
- (ii) A aplicação de PEF como método de pré-tratamento de extração promove a extração seletiva de ficocianinas e proteínas. Dessa forma, é possível obter um extrato mais purificado se comparado com o método convencional de extração utilizando o moinho de bolas.

Algumas sugestões para trabalhos futuros são apresentadas a seguir.

Desenvolver metodologias de análise para possibilitar o melhor entendimento dos efeitos de eletroporação promovidos pelo MEF, uma vez que a extração de compostos celulares é um indicativo que as células foram rompidas, porém os efeitos na estrutura da membrana celular não são elucidados com base somente nesses resultados. Ainda, é necessário entender o tempo de resposta das diferentes células ao campo elétrico, tempo de duração dos poros e tamanho dos poros.

Avaliar métodos de purificação dos extratos obtidos com o ultrassom, uma vez que essa tecnologia proporcionou a obtenção de extratos com elevadas concentrações dos compostos de interesse em tempos de processamento baixos. Além disso, pode-se realizar análises de aplicação dos extratos obtidos em alimentos e produtos cosméticos para avaliar a influência dos tratamentos na qualidade dos produtos finais.

Referências bibliográficas

- Aiba, S. & Ogawa, T. (1977). Assessment of Growth Yield of a Blue--green Alga, *Spirulina platensis*, in Axenic and Continuous Culture. *Journal of General Microbiology*, **102**, 179–182.
- Akoh, C.C. & Min, D.B. (2008). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. CRC Press.
- Ali, S.K. & Saleh, A.M. (2012). Spirulina - An overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**, 9–15.
- Andersson, I. & Backlund, A. (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 275–291.
- Asavasanti, S., Ristenpart, W., Stroeve, P. & Barrett, D.M. (2011). Permeabilization of plant tissues by monopolar pulsed electric fields: effect of frequency. *Journal of food science*, **76**, E98-111.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, **117**, 426–436.
- Bai, F., Gusbeth, C., Frey, W. & Nick, P. (2017). Nanosecond pulsed electric fields trigger cell differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1859**, 651–661.
- Bennett, A. & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, **58**, 419–35.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.
- Boussiba, S. & Richmond, A.E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from

- the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, **120**, 155–159.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **9**, 1551–8.
- Brochier, B. (2018). Efeito do campo elétrico na inativação de enzimas do caldo de cana durante aquecimento ôhmico.
- Brochier, B., Mercali, G.D. & Marczak, L.D.F. (2016). Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. *LWT*, **74**, 396–403.
- Brochier, B., Mercali, G.D. & Marczak, L.D.F. (2018). Effect of ohmic heating parameters on peroxidase inactivation, phenolic compounds degradation and color changes of sugarcane juice. *Food and Bioproducts Processing*, **111**, 62–71.
- Carullo, D., Abera, B.D., Casazza, A.A., Donsì, F., Perego, P., Ferrari, G. & Pataro, G. (2018). Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, **31**, 60–69.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S. & Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*, **102**, 7159–7164.
- Champenois, J., Marfaing, H. & Pierre, R. (2015). Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology*, **27**, 1845–1851.
- Chan, C.-H., Yusoff, R. & Ngoh, G.-C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, **92**, 1169–1186.
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A., Allaf, T. & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **71**, 157–168.
- Chen, C., Smye, S.W., Robinson, M.P. & Evans, J.A. (2006). Membrane electroporation theories: a review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, **44**, 5–14.

- Chew, K.W., Yap, J.Y., Show, P.L., Suan, N.H., Juan, J.C., Ling, T.C., Lee, D.J. & Chang, J.S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, **229**, 53–62.
- Cho, H.Y., Yousef, A.E. & Sastry, S.K. (1996). Growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus* under ohmic heating. *Biotechnology and bioengineering*, **49**, 334–340.
- Chung, R.W.S., Leanderson, P., Lundberg, A.K. & Jonasson, L. (2017). Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, **262**, 87–93.
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. & Laemmli, U.K. (1977). *Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. Journal of Biological Chemistry*.
- Costa, A.M., Bueno, K.T.L., Rosa, A.P.C. da & Costa, J.A.V. (2019). The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina* sp. LEB18. *LWT*, **99**, 173–178.
- D'Alessandro, E.B. & Antoniosi Filho, N.R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **58**, 832–841.
- Deenu, A., Naruenartwongsakul, S. & Kim, S. (2013). Optimization and economic evaluation of ultrasound extraction of lutein from *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **18**, 1151–1162.
- Diprat, A.B., Menegol, T., Boelter, J.F., Zmozinski, A., Rodrigues Vale, M.G., Rodrigues, E. & Rech, R. (2017). Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **97**, 3463–3468.
- Donsì, F., Ferrari, G. & Pataro, G. (2010). Applications of Pulsed Electric Field Treatments for the Enhancement of Mass Transfer from Vegetable Tissue. *Food Engineering Reviews*, **2**, 109–130.
- Doucha, J. & Lívanský, K. (2008). Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**, 431–440.

- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K.N. & Ravishankar, G.A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, **16**, 389–406.
- Esquivel-Hernández, D., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S., García-Pérez, J., Mancera-Andrade, E., Núñez-Echevarría, J., Ontiveros-Valencia, A., Rostro-Alanis, M., García-García, R., Torres, J., Chen, W. & Parra-Saldívar, R. (2017a). Effect of Supercritical Carbon Dioxide Extraction Parameters on the Biological Activities and Metabolites Present in Extracts from *Arthrospira platensis*. *Marine Drugs*, **15**, 174.
- Esquivel-Hernández, D.A., Ibarra-Garza, I.P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S.P., Rostro-Alanis, M. de J., Alemán-Nava, G.S., García-Pérez, J.S. & Parra-Saldívar, R. (2017b). Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **11**, 215–231.
- Esquivel-Hernández, D.A., Rodríguez-Rodríguez, J., Rostro-Alanis, M., Cuéllar-Bermúdez, S.P., Mancera-Andrade, E.I., Núñez-Echevarría, J.E., García-Pérez, J.S., Chandra, R. & Parra-Saldívar, R. (2017c). Advancement of green process through microwave-assisted extraction of bioactive metabolites from *Arthrospira Platensis* and bioactivity evaluation. *Bioresource Technology*, **224**, 618–629.
- Eugène Vorobiev, N.L. (2008). Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials.
- Fan, X., Cui, Y., Zhang, R. & Zhang, X. (2018). Purification and identification of anti-obesity peptides derived from *Spirulina platensis*. *Journal of Functional Foods*, **47**, 350–360.
- Fennema, O.R. (2007). *Fennema's Food Chemistry*. 4th edn.
- Fennema, O.R., Damodaran, S., Parkin, K.L. & Fennema, O.R. (2007). *Fennema's Food Chemistry*. *Fennema's Food Chemistry*. 4th edn. FL, USA.: CRC Press.
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J. & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, **11**, 375–392.
- Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Pereira, R.N., Teixeira, J.A. & Rocha, C.M.R. (2019). Moderate Electric Fields as a Potential Tool for Sustainable Recovery of Phenolic Compounds from *Pinus pinaster* Bark. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **7**,

8816–8826.

- Figueiredo, A.R.P., Costa, E. da, Silva, J., Domingues, M.R. & Domingues, P. (2019). The effects of different extraction methods of lipids from *Nannochloropsis oceanica* on the contents of omega-3 fatty acids. *Algal Research*, **41**, 101556.
- Frey, W., Gusbeth, C. & Schwartz, T. (2013). Inactivation of *Pseudomonas putida* by Pulsed Electric Field Treatment: A Study on the Correlation of Treatment Parameters and Inactivation Efficiency in the Short-Pulse Range. *The Journal of Membrane Biology*, **246**, 769–781.
- Geadá, P., Rodrigues, R., Loureiro, L., Pereira, R., Fernandes, B., Teixeira, J.A., Vasconcelos, V. & Vicente, A.A. (2018). Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology – Applications, techniques and future trends. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **94**, 656–668.
- Geankoplis, C.J. (2003). *Transport Processes and Separation Process Principles*.
- Gerardo, M.L., Hende, S. Van Den, Vervaeren, H., Coward, T. & Skill, S.C. (2015). Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Research*, **11**, 248–262.
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R. & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, **2**, 401–408.
- Gong, M. & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, **34**, 1396–1412.
- Grimalt, M., Hernández, F., Legua, P., Almansa, M.S. & Amorós, A. (2018). Physicochemical composition and antioxidant activity of three Spanish caper (*Capparis spinosa* L.) fruit cultivars in three stages of development. *Scientia Horticulturae*, **240**, 509–515.
- Gross, J. (1991). *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*. Van Nostrand Reinhold.
- Guillard, R.L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals* (edited by W. Smith & M. Chanley). Pp. 29–60. Springer US.
- Heffernan, N., Smyth, T.J., FitzGerald, R.J., Vila-Soler, A., Mendiola, J., Ibáñez, E. & Brunton, N.P. (2016). Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae

- and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **37, Part B**, 221–228.
- Hoyos-Arbeláez, J., Blandón-Naranjo, L., Vázquez, M. & Contreras-Calderón, J. (2018). Antioxidant capacity of mango fruit (*Mangifera indica*). An electrochemical study as an approach to the spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, **266**, 435–440.
- Humphrey, A.M. (2006). Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. *Journal of Food Science*, **69**, C422–C425.
- İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M. & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, **70**, 78–88.
- Jaeschke, D.P., Menegol, T., Rech, R., Mercali, G.D. & Marczak, L.D.F. (2016a). Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. *Process Biochemistry*, **51**.
- Jaeschke, D.P.D.P., Menegol, T., Rech, R., Mercali, G.D.G.D. & Marczak, L.D.F.L.D.F. (2016b). Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. *Process Biochemistry*, **51**.
- Jaeschke, D.P.D.P., Rech, R., Marczak, L.D.F.L.D.F. & Mercali, G.D.G.D. (2017). Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresource Technology*, **224**, 753–757.
- Jesus, C.S. de, Silva Uebel, L. da, Costa, S.S., Miranda, A.L., Morais, E.G. de, Morais, M.G. de, Costa, J.A.V., Nunes, I.L., Souza Ferreira, E. de & Druzian, J.I. (2018). Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. *Bioresource Technology*, **256**, 86–94.
- Jomova, K. & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **70**, 102–110.
- Joseph, J.D. & Ackman, R.G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, **75**, 488–506.
- Kantar, S. El, Boussetta, N., Lebovka, N., Foucart, F., Rajha, H.N., Maroun, R.G., Louka, N.

- & Vorobiev, E. (2018). Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyphenols extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **46**, 153–161.
- Kim, S.-K. (2015). *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Academic Press.
- Kochem, L.H., Fré, N.C. Da, Redaelli, C., Rech, R. & Marcílio, N.R. (2014). Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. *Chemical Engineering & Technology*, **37**, 59–64.
- Kulshrestha, S. & Sastry, S. (2003). Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **4**, 189–194.
- Kulshrestha, S.A. & Sastry, S.K. (2010). Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **11**, 78–83.
- Kusnadi, C. & Sastry, S.K. (2012). Effect of moderate electric fields on salt diffusion into vegetable tissue. *Journal of Food Engineering*, **110**, 329–336.
- Lam, G.P. 't, Postma, P.R., Fernandes, D.A., Timmermans, R.A.H., Vermuë, M.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H. & Olivieri, G. (2017). Pulsed Electric Field for protein release of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, **24**, 181–187.
- Lauceri, R., Chini Zittelli, G., Maserti, B. & Torzillo, G. (2018). Purification of phycocyanin from *Arthrospira platensis* by hydrophobic interaction membrane chromatography. *Algal Research*, **35**, 333–340.
- Lebovka, N., Vorobiev, E. & Chemat, F. (2011). *Enhancing extraction processes in the food industry*. CRC Press.
- Lebovka, N.I., Shynkaryk, M. & Vorobiev, E. (2007). Moderate Electric Field Treatment of Sugarbeet Tissues. *Biosystems Engineering*, **96**, 47–56.
- Li, B., Gao, M.-H., Chu, X.-M., Teng, L., Lv, C.-Y., Yang, P. & Yin, Q.-F. (2015). The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, **749**, 107–114.

- Lima, M. & Sastry, S.K. (1999). The effects of ohmic heating frequency on hot-air drying rate and juice yield. *Journal of Food Engineering*, **41**, 115–119.
- Lin, J.-H. (2015). Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, **184**, 421–428.
- Loghavi, L., Sastry, S.K. & Yousef, A.E. (2008). Effect of Moderate Electric Field Frequency on Growth Kinetics and Metabolic Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress*, **24**, 148–153.
- Loginova, K. V, Lebovka, N.I. & Vorobiev, E. (2011a). Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *Journal of Food Engineering*, **106**, 127–133.
- Loginova, K. V, Vorobiev, E., Bals, O. & Lebovka, N.I. (2011b). Pilot study of countercurrent cold and mild heat extraction of sugar from sugar beets, assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, **102**, 340–347.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, **193**, 265–75.
- Luengo, E., Martínez, J.M., Bordetas, A., Álvarez, I. & Raso, J. (2015). Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **29**, 15–22.
- Ma, Y.-A., Cheng, Y.-M., Huang, J.-W., Jen, J.-F., Huang, Y.-S. & Yu, C.-C. (2014). Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **37**, 1543–1549.
- Machado, L.F., Pereira, R.N., Martins, R.C., Teixeira, J.A. & Vicente, A.A. (2010). Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature. *Journal of Food Engineering*, **96**, 520–527.
- Macías, F.A., Galindo, J.L.G., García-Díaz, M.D. & Galindo, J.C.G. (2007). Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 155–178.
- Mahnič-Kalamiza, S., Vorobiev, E. & Miklavčič, D. (2014). Electroporation in Food Processing and Biorefinery. *The Journal of Membrane Biology*, **247**, 1279–1304.
- Mandelli, F., Yamashita, F., Pereira, J.L. & Mercadante, A.Z. (2012). Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis*

- using fractional factorial design. *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**, 126–134.
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X. & Jing, K. (2018). Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, **255**, 293–301.
- Martínez, J.M., Luengo, E., Saldaña, G., Álvarez, I. & Raso, J. (2017). C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. *Food Research International*, **99**, 1042–1047.
- Memije-Lazaro, I.N., Blas-Valdivia, V., Franco-Colín, M. & Cano-Europa, E. (2018). *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. *Journal of Functional Foods*, **43**, 37–43.
- Metropolitana, U.A. & Whitaker, S. (2015). DETERMINATION OF ANTIOXIDANT AND CHELATING ACTIVITY OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM SPIRULINA (*Arthrospira maxima*) OBTAINED BY SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **14**, 25–34.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E. & Busheva, M.C. (2003). Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, **102**, 55–59.
- Mishra, S.K., Suh, W.I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S. & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, **155**, 330–333.
- Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P. & Kalil, S.J. (2011). C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **28**, 45–49.
- NORTHCOTE, D.H., GOULDING, K.J. & HORNE, R.W. (1960). The chemical composition and structure of the cell wall of *Hydrodictyon africanum* Yaman. *The Biochemical journal*, **77**, 503–508.
- Nowicka, A., Kucharska, A.Z., Sokół-Łętowska, A. & Fecka, I. (2019). Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria × ananassa* Duch. *Food Chemistry*, **270**, 32–46.

- Ohse, S., Bianchini Derner, R., Ávila Ozório, R., Gordo Corrêa, R., Badiale Furlong, E. & Roberto Cunha, P.C. (2015). Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *Idesia (Arica)*, **33**, 93–101.
- Ovando, C.A., Carvalho, J.C. de, Vinícius de Melo Pereira, G., Jacques, P., Soccol, V.T. & Soccol, C.R. (2018). Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from *Spirulina* : A review. *Food Reviews International*, **34**, 34–51.
- Padyana, A.K., Bhat, V.B., Madyastha, K.M., Rajashankar, K.R. & Ramakumar, S. (2001). Crystal Structure of a Light-Harvesting Protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **282**, 893–898.
- Pan-utai, W. & Iamtham, S. (2018). Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycoyanin from *Arthrospira platensis*. *Journal of King Saud University - Science*.
- Papadaki, S., Kyriakopoulou, K., Tzovenis, I. & Krokida, M. (2017). Environmental impact of phycocyanin recovery from *Spirulina platensis* cyanobacterium. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **44**, 217–223.
- Pappas, E. & Schaich, K.M. (2009). Phytochemicals of Cranberries and Cranberry Products: Characterization, Potential Health Effects, and Processing Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**, 741–781.
- Park, K.-H., Kim, J.-R.J.-Y., Choi, I., Kim, J.-R.J.-Y. & Cho, K.-H. (2015). ω -6 (18:2) and ω -3 (18:3) fatty acids in reconstituted high-density lipoproteins show different functionality of anti-atherosclerotic properties and embryo toxicity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **26**, 1613–1621.
- Park, W., Kim, H.-J., Li, M., Lim, D., Kim, J., Kwak, S.-S., Kang, C.-M., Ferruzzi, M., Ahn, M.-J., Park, W.S., Kim, H.-J., Li, M., Lim, D.H., Kim, J., Kwak, S.-S., Kang, C.-M., Ferruzzi, M.G. & Ahn, M.-J. (2018). Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin, in *Spirulina* Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, **23**, 2065.
- Parniakov, O., Apicella, E., Koubaa, M., Barba, F.J., Grimi, N., Lebovka, N., Pataro, G., Ferrari, G. & Vorobiev, E. (2015a). Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. *Bioresource Technology*, **198**, 262–267.
- Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N. & Vorobiev, E.

- (2015b). Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **27**, 79–85.
- Patel, A., Gami, B., Patel, P. & Patel, B. (2017). Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **71**, 535–547.
- Patel, H.M., Rastogi, R.P., Trivedi, U. & Madamwar, D. (2018). Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. *Algal Research*, **32**, 372–383.
- Peng, M.-L., Chiu, H.-F., Chou, H., Liao, H.-J., Chen, S.-T., Wong, Y.-C., Shen, Y.-C., Venkatakrisnan, K. & Wang, C.-K. (2016). Influence/impact of lutein complex (marigold flower and wolfberry) on visual function with early age-related macular degeneration subjects: A randomized clinical trial. *Journal of Functional Foods*, **24**, 122–130.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, **83**, 346–356.
- Petrović, S., Zvezdanović, J. & Marković, D. (2017). Chlorophyll degradation in aqueous mediums induced by light and UV-B irradiation: An UHPLC-ESI-MS study. *Radiation Physics and Chemistry*, **141**, 8–16.
- Phong, W.N., Show, P.L., Ling, T.C., Juan, J.C., Ng, E.-P. & Chang, J.-S. (2018). Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae—Recent developments and future perspectives. *Algal Research*, **31**, 506–516.
- Pohndorf, R.S., Camara, Á.S., Larrosa, A.P.Q., Pinheiro, C.P., Strieder, M.M. & Pinto, L.A.A. (2016). Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. *Biomass and Bioenergy*, **93**, 25–32.
- Pojić, M., Mišan, A. & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, **75**, 93–104.
- Poojary, M.M., Barba, J.F., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, A.D. & Juliano, P. (2016). Innovative Alternative Technologies to Extract Carotenoids from Microalgae and Seaweeds. *Marine Drugs*, **14**.
- Postma, P.R., Miron, T.L., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H. & Eppink, M.H.M.

- (2015). Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology*, **184**, 297–304.
- Postma, P.R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., Olivieri, G. & Ferrari, G. (2016). Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field–temperature treatment. *Bioresource Technology*, **203**, 80–88.
- Prabakaran, P. & Ravindran, A.D. (2011). A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, **53**, 150–154.
- Praporscic, I., Shynkaryk, M.V., Lebovka, N.I. & Vorobiev, E. (2007). Analysis of juice colour and dry matter content during pulsed electric field enhanced expression of soft plant tissues. *Journal of Food Engineering*, **79**, 662–670.
- Praveenkumar, R., Kim, B., Choi, E., Lee, K., Park, J.-Y., Lee, J.-S., Lee, Y.-C. & Oh, Y.-K. (2014). Improved biomass and lipid production in a mixotrophic culture of *Chlorella* sp. KR-1 with addition of coal-fired flue-gas. *Bioresource Technology*, **171**, 500–505.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ganesan, V. & Carvalho, I.S. (2015). Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 1–12.
- Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J. & Miklavčič, D. (2016). Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **37**, Part C, 312–321.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231–1237.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science.
- Ritger, P.L. & Peppas, N.A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, **5**, 23–36.
- Rocha, C.M.R., Genisheva, Z., Ferreira-Santos, P., Rodrigues, R., Vicente, A.A., Teixeira, J.A.

- & Pereira, R.N. (2018). Electric field-based technologies for valorization of bioresources. *Bioresource Technology*, **254**, 325–339.
- Rodrigues, D.B., Flores, É.M.M., Barin, J.S., Mercadante, A.Z., Jacob-Lopes, E. & Zepka, L.Q. (2014). Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, **65**, Part B, 144–148.
- Rodriguez-Amaya. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*.
- Rodriguez-Amaya & Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington DC: ILSI Press.
- Roquebert, M.F. & Bury, E. (1993). Effect of freezing and thawing on cell membranes of *Lentinus edodes*, the shiitake mushroom. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **9**, 641–647.
- Saini, R.K. & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, **240**, 90–103.
- Sarkis, J.R., Boussetta, N., Blouet, C., Tessaro, I.C., Marczak, L.D.F. & Vorobiev, E. (2015). Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **29**, 170–177.
- Saulis, G. & Saulė, R. (2012). Size of the pores created by an electric pulse: Microsecond vs millisecond pulses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1818**, 3032–3039.
- Saulis, G., Venslauskas, M.S. & Naktinis, J. (1991). Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **321**, 1–13.
- Schüler, L.M., Schulze, P.S.C., Pereira, H., Barreira, L., León, R. & Varela, J. (2017). Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. *Algal Research*, **25**, 263–273.
- Sensoy, I. & Sastry, S.K. (2004). Extraction Using Moderate Electric Fields. *Journal of Food Science*, **69**, FEP7-FEP13.
- Sidler, W.A. (1994). Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Pp. 139–216. Dordrecht: Springer Netherlands.

- Sila, A. & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, **21**, 10–26.
- Sillanpää, M., Pham, T.-D. & Shrestha, R.A. (2008). *Ultrasound Technology in Green Chemistry*.
- Silve, A., Papachristou, I., Wüstner, R., Sträßner, R., Schirmer, M., Leber, K., Guo, B., Interrante, L., Posten, C. & Frey, W. (2018). Extraction of lipids from wet microalga *Auxenochlorella protothecoides* using pulsed electric field treatment and ethanol-hexane blends. *Algal Research*, **29**, 212–222.
- Simpson, R., Ramírez, C., Birchmeier, V., Almonacid, A., Moreno, J., Nuñez, H. & Jaques, A. (2015). Diffusion mechanisms during the osmotic dehydration of Granny Smith apples subjected to a moderate electric field. *Journal of Food Engineering*, **166**, 204–211.
- Singh, S., Kate, B.N. & Banerjee, U.C. (2005). Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, **25**, 73–95.
- Sitzmann, W., Vorobiev, E. & Lebovka, N. (2016). Applications of electricity and specifically pulsed electric fields in food processing: Historical backgrounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **37**, 302–311.
- Somavat, R., Mohamed, H.M.H. & Sastry, S.K. (2013). Inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores under ohmic and conventional heating. *LWT - Food Science and Technology*, **54**, 194–198.
- Soni, R.A., Sudhakar, K. & Rana, R.S. (2017). Spirulina – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*, **69**, 157–171.
- Soria, A.C. & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 323–331.
- Soto-Sierra, L., Stoykova, P. & Nikolov, Z.L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, **36**, 175–192.
- Tamayo Tenorio, A., Kyriakopoulou, K.E., Suarez-Garcia, E., Berg, C. van den & Goot, A.J. van der. (2018). Understanding differences in protein fractionation from conventional crops, and herbaceous and aquatic biomass - Consequences for industrial use. *Trends in Food Science & Technology*, **71**, 235–245.

- Tavanandi, H.A., Mittal, R., Chandrasekhar, J. & Raghavarao, K.S.M.S. (2018). Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Research*.
- Timmermans, R.A.H., Nierop Groot, M.N., Nederhoff, A.L., Boekel, M.A.J.S. van, Matser, A.M. & Mastwijk, H.C. (2014). Pulsed electric field processing of different fruit juices: Impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, **173**, 105–111.
- Tiwari, B.K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **71**, 100–109.
- Tsai, H.-P., Chuang, L.-T. & Chen, C.-N.N. (2016). Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis* sp. DS3. *Food Chemistry*, **192**, 682–690.
- Vali Aftari, R., Rezaei, K., Mortazavi, A. & Bandani, A.R. (2015). The Optimized Concentration and Purity of *Spirulina platensis* C-Phycocyanin: A Comparative Study on Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction Methods. *Journal of Food Processing and Preservation*, **39**, 3080–3091.
- Valverde, F., Romero-Campero, F.J., León, R., Guerrero, M.G. & Serrano, A. (2016). New challenges in microalgae biotechnology. *European Journal of Protistology*, **55**, Part A, 95–101.
- Vernès, L., Abert-Vian, M., Maâtaoui, M. El, Tao, Y., Bornard, I. & Chemat, F. (2019). Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. *Ultrasonics Sonochemistry*, **54**, 48–60.
- Wang, W.-C. & Sastry, S.K. (2002). Effects of moderate electrothermal treatments on juice yield from cellular tissue. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **3**, 371–377.
- Wang, W. & Sastry, S.K. (2000). Effects of thermal and electrothermal pretreatments on hot air drying rate of vegetable tissue. *Journal of Food Process Engineering*, **23**, 299–319.
- Weaver, J.C. & Chizmadzhev, Y.A. (1996). Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **41**, 135–160.
- Wu, H.-L., Wang, G.-H., Xiang, W.-Z., Li, T. & He, H. (2016). Stability and Antioxidant

- Activity of Food-Grade Phycocyanin Isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*, **19**, 2349–2362.
- Yoshikawa, N. & Belay, A. (2008). Single-laboratory validation of a method for the determination of c-phycocyanin and allophycocyanin in spirulina (*Arthrospira*) supplements and raw materials by spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, **91**, 524–529.
- Zardo, I. (2018). Extração de compostos fenólicos das tortas de canola e girassol e avaliação da aplicação in vitro do extrato obtido.
- Zarrouk, C. (1966). Contribution à l'étude d'une cyanophycée : influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler (Livro, 1900s) [WorldCat.org] [Internet document] .
- Zhang, B., Feng, H., He, Z., Wang, S. & Chen, H. (2018). Bio-oil production from hydrothermal liquefaction of ultrasonic pre-treated *Spirulina platensis*. *Energy Conversion and Management*, **159**, 204–212.
- Zhang, L., Wang, L.-J., Jiang, W. & Qian, J.-Y. (2017). Effect of pulsed electric field on functional and structural properties of canola protein by pretreating seeds to elevate oil yield. *LWT*, **84**, 73–81.
- Zhu, Z., He, J., Liu, G., Barba, F.J., Koubaa, M., Ding, L., Bals, O., Grimi, N. & Vorobiev, E. (2016). Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **33**, 1–9.
- Zhu, Z., Wu, Q., Di, X., Li, S., Barba, F.J., Koubaa, M., Roohinejad, S., Xiong, X. & He, J. (2017). Multistage recovery process of seaweed pigments: Investigation of ultrasound assisted extraction and ultra-filtration performances. *Food and Bioproducts Processing*, **104**, 40–47.