

# ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS DE MICROALGA CHLORELLA VULGARIS VIA SOLVENTES ORGÂNICOS



<https://doi.org/10.22533/at.ed.5691125310313>

Data de submissão: 24/12/2025

Data de aceite: 02/06/2026

### **Graziella do Nascimento Silva**

Universidade Federal da Bahia/  
Universidade Salvador  
Programa de Pós-graduação em  
Engenharia Química  
Salvador – Ba  
<https://lattes.cnpq.br/2146151656408667>

### **Raiane Vieira Chaves**

Universidade Federal de Sergipe  
Rede Nordeste de Biotecnologia  
São Cristóvão – SE  
<http://lattes.cnpq.br/9096559129747858>

### **Werlisson Santos Souza**

Universidade Federal da Bahia/  
Universidade Salvador  
Programa de Pós-graduação em  
Engenharia Química  
Salvador – Ba  
<http://lattes.cnpq.br/1967291372351934>

### **Iago Hudson da Silva Souza**

Universidade Federal de Sergipe  
Laboratório de Biotecnologia Ambiental  
São Cristóvão – SE  
<http://lattes.cnpq.br/7605283497685600>

### **Miguel de Jesus Pereira**

Universidade Federal de Sergipe  
Laboratório de Biotecnologia Ambiental  
São Cristóvão – SE  
<https://lattes.cnpq.br/5857730324372761>

### **Sandy Poderoso da Rocha**

Universidade Federal de Sergipe  
Departamento de Engenharia Química  
São Cristóvão - SE  
<https://lattes.cnpq.br/5428211901747643>

### **José Raí de Jesus Coelho**

Universidade Federal de Sergipe  
Programa de Pós-graduação em  
Engenharia Química  
São Cristóvão – SE  
<http://lattes.cnpq.br/9677371033219448>

### **Keilla Santos Cerqueira**

Universidade Federal da Bahia/  
Universidade Salvador  
Programa de Pós-graduação em  
Engenharia Química  
Salvador – Ba  
<http://lattes.cnpq.br/1010365561925617>

### **Jacqueline Rêgo da Silva Rodrigues**

Universidade Federal de Sergipe  
Departamento de Engenharia Química  
São Cristóvão – SE  
<http://lattes.cnpq.br/5402578453593374>

### **Roberto Rodrigues de Souza**

Universidade Federal de Sergipe  
Departamento de Engenharia Química  
São Cristóvão – SE  
<http://lattes.cnpq.br/0292200610294281>

**RESUMO:** As microalgas estão cada vez mais sendo utilizadas em diversas áreas devido a suas propriedades como alta taxa de crescimento, elevada capacidade de absorção de  $\text{CO}_2$  e produção de diversos bioprodutos com alto valor agregado. Uma das microalgas mais cultivadas e estudadas atualmente é *Chlorella vulgaris* pois ela possui altas taxas de crescimento e pode ser cultivada em diversos tipos de ambientes produzindo grandes quantidades de proteínas e carboidratos. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar o processo de extração por solvente dos carboidratos totais da microalga *Chlorella vulgaris*. Os solventes utilizados foram o hexano e o líquido iônico acetato de 2-hidroxietanolamina (2-HEAA). Foram nove experimentos com condições específicas, todos foram cultivados por 28 dias e apresentaram no dia 14 o final da fase exponencial. Com o auxílio de análises e técnicas foi possível determinar a cinética de crescimento, a hidrólise ácida para obtenção de carboidratos, a extração de carboidratos utilizando os solventes hexano e líquido iônico no experimento que apresentou melhor eficiência na hidrólise ácida. Os dados indicaram que o experimento com concentração de  $\text{NaNO}_3$   $1500 \text{ mg L}^{-1}$ , fotoperíodo de 16h apresentou maior produtividade com  $0,714 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , porém foi o experimento com  $\text{NaNO}_3$   $2300 \text{ mg L}^{-1}$  e fotoperíodo de 16h que apresentou um resultado estatisticamente significativo quanto a análise de desejabilidade, apresentando uma extração de 37% da fração de carboidratos totais e de 77,4% quando realizada a extração através do solvente líquido iônico. Os resultados indicam que o LI foi mais eficiente na remoção seletiva de compostos não estruturais e na preservação ou enriquecimento relativo da fração polissacarídica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cultivo; líquido iônico; solvente; carboidratos; microalga; hexano.

## STUDY OF THE EXTRACTION OF TOTAL CARBOHYDRATES FROM THE MICROALGA CHLORELLA VULGARIS VIA ORGANIC SOLVENTS

**ABSTRACT:** Microalgae are increasingly being used in various fields due to their properties, such as high growth rates, high  $\text{CO}_2$  absorption capacity, and the production of various high-value-added bioproduts. One of the most cultivated and studied microalgae currently is *Chlorella vulgaris*, as it has high growth rates and can be cultivated in various types of environments, producing large quantities of proteins and carbohydrates. Therefore, the objective of this work was to evaluate the solvent extraction process of total carbohydrates from the microalga *Chlorella vulgaris*. The solvents used were hexane and the ionic liquid 2-hydroxyethanolamine acetate (2-HEAA). Nine experiments were conducted under specific conditions; all were cultivated for 28 days and showed the end of the exponential phase on day 14. With the aid of analyses and techniques, it was possible to determine the growth kinetics, the acid hydrolysis for obtaining carbohydrates, and the carbohydrate extraction using hexane and ionic liquid solvents in the experiment that showed the best efficiency in acid hydrolysis. The data indicated that the experiment with a  $\text{NaNO}_3$  concentration of  $1500 \text{ mg L}^{-1}$  and a 16h photoperiod showed the highest productivity with  $0.714 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ . However, the experiment with  $\text{NaNO}_3$   $2300 \text{ mg L}^{-1}$  and a 16h photoperiod showed a statistically significant result regarding desirability analysis, presenting an extraction of 37% of the total carbohydrate fraction and 77.4% when extraction was performed using the ionic liquid solvent. The results indicate that the ionic liquid was more efficient in the selective removal of non-structural compounds and in the preservation or relative enrichment of the polysaccharide fraction.

**KEYWORDS:** Cultivation; ionic liquid; solvent; carbohydrates; microalgae; hexane.

## INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos fotossintéticos procarióticos e eucarióticos (a esses pertencem alguns dos gêneros *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*). Possuem estruturas simples de crescimento rápido (Li *et al.*, 2008; Makareviciene, Skorupskaite and Andruleviciute, 2013; Rahman *et al.*, 2014). Reproduzem-se usando a fotossíntese o qual converte energia solar em energia química (Mata, Martins and Caetano, 2010).

O cultivo em larga escala de microalgas vem crescendo nas últimas décadas visto que ela pode ser aplicada em diversas áreas (Wen *et al.*, 2016). A biodiversidade das microalgas proporciona a produção de diferentes compostos como proteínas, pigmentos, lipídeos, ácidos graxos, biodiesel, biogás (Souliès *et al.*, 2013).

Os lipídeos e os carboidratos produzidos pelas microalgas possuem grande potencial na produção de biocombustíveis. Parte importante no cultivo de microalgas para biocombustível é o auxílio na redução da poluição ambiental (Dempfle, Kröcher and Studer, 2021).

O biocombustível mais predominante é o bioetanol. É utilizado como combustível para veículos leves ou como reagente aditivo de combustíveis de transporte pesado (Dempfle, Kröcher and Studer, 2021).

A biomassa lignocelulósica serve como matéria-prima para biocombustíveis e tem sido considerada devido ao seu potencial, disponibilidade abundante e a sua condição de se renovar (Khoshkho *et al.*, 2022). A produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica passa por um pré-tratamento para quebrar a celulose, hemicelulose e lignina (Dempfle, Kröcher and Studer, 2021).

A produção de bioetanol a partir de microalgas vem ganhando destaque devido a seu rápido crescimento e alto teor de carboidratos. Sendo assim, se faz necessário romper a parede celular para liberar os açúcares. Essa ruptura pode ser realizada através da hidrólise ácida como também a partir da extração utilizando solventes (Abomohra *et al.*, 2021; Dempfle, Kröcher and Studer, 2021).

A extração dos carboidratos da biomassa da microalga ocorre com a ruptura da parede celular, acarretando na liberação dos componentes intracelulares a partir da hidrólise química (Sirajunnisa and Surendhiran, 2016). O uso do tratamento com ácido diluído pode hidrolisar com eficácia os carboidratos da microalga com alto rendimento de açúcar (Wang *et al.*, 2016).

A lignocelulose faz parte da composição da microalga, sendo um polímero de carboidratos, formado por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose pode ser convertida em glicose, ácido orgânico e álcoois. A hemicelulose pode ser degradada em cilose, furfural e etanol (Shen and Sun, 2021). A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos está crescendo devido à glicose obtida da celulose e dos açúcares liberados da hemicelulose (Tavares, Sene and Christ, 2016).

O líquido iônico (LI) é um solvente que vem substituindo solventes orgânicos nas extrações de carboidratos, por ser considerado “verde”. Ele também é utilizado em reações catalíticas, processos de separação, fluídos de transferência de calor entre outros (Alvarez *et al.*, 2011).

O LI é um sal orgânico em estado líquido, composto de um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico. Possuem pressão de vapor muito baixa, não emitindo gases poluentes. No entanto, sua grande desvantagem é o preço alto e sua característica não volátil (Alavijeh *et al.*, 2020; Alvarez *et al.*, 2011).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de extração com líquido iônico e hexano dos carboidratos, comparando com os métodos físicos de ruptura através da hidrólise.

METODOLOGIA

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM) da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Concentração de biomassa, cultivo e meio de cultura

A concentração de biomassa (g L<sup>-1</sup>) foi monitorada três vezes por semana ao longo de 28 dias de cultivo, com o objetivo de acompanhar a produção de biomassa. As curvas de crescimento foram obtidas por meio da determinação de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, a 750 nm. A conversão entre DO e concentração de biomassa foi realizada a partir de uma curva de calibração construída ao final do ciclo de cultivo, utilizando diferentes diluições do sobrenadante (0, 25, 50, 75 e 100%).

Os inóculos da microalga *Chlorella vulgaris*, foram cultivados em 300 mL de meio BG-11 (Rippka *et al.*, 1979), sob fluxo luminoso constante de 200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (fornecida por lâmpadas fluorescentes), aeração forçada constante de 2 L.min<sup>-1</sup> e temperatura de 26 ± 4 °C.

Os experimentos foram realizados utilizando um planejamento experimental do tipo fatorial 3<sup>2</sup>, como pode ser observado na Tabela 1. A concentração de nitrato de sódio e o fotoperíodo de cultivo foram variáveis independentes.

Variável independente	Níveis		
	-1	0	1
Fotoperíodo	24:0	16:8	8:16
Concentração de NaNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	700	1500	2300

Tabela 1: Valores das variáveis independentes analisadas no planejamento experimental

Fonte: Autoria própria (2021)

Os cultivos atingiram o estado estacionário de crescimento com 28 dias. A curva de calibração obtida no cultivo da *Chlorella vulgaris* sob as condições dos experimentos exposta na tabela 1 foi construída no Excel. As equações da reta foram obtidas através do ajuste linear com auxílio do software Excel e estão demonstradas na tabela 2.

Ensaio	Fotoperíodo	Conc. de NaNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Equação
1	-1 (24:0)	-1 (700)	Y= 7,511X
2	-1 (24:0)	0 (1500)	Y= 13,5306X
3	-1 (24:0)	+1 (2300)	Y= 13,51X
4	0 (16:8)	-1 (700)	Y= 15,25X
5	0 (16:8)	0 (1500)	Y= 17,78X
6	0 (16:8)	+1 (2300)	Y= 16,66X
7	+1 (8:16)	-1 (700)	Y= 13,05X
8	+1 (8:16)	0 (1500)	Y= 12,9X
9	+1 (8:16)	+1 (2300)	Y= 14,25X

**Tabela 2:** Equações referentes à curva de calibração dos experimentos 1 a 9

Fonte: Autoria própria (2021)

Onde Y é a concentração em g L-1 e X é a absorbância. Utilizando essas equações foi possível calcular a concentração de biomassa a partir dos valores de absorbância determinados pelo espectrofotômetro.

### Cinética química de crescimento

O crescimento dos cultivos foi descrito pela equação apresentada a seguir:

$$C = \frac{C_o \cdot C_{\text{máx}} e^{\mu_{\text{máx}} \cdot \tau}}{C_{\text{máx}} - C_o \cdot e^{\mu_{\text{máx}} \cdot \tau}} \tag{1}$$

Onde C é a concentração celular no tempo t, Co é a concentração celular no instante de início do crescimento, Cmax é a concentração celular máxima atingida no período, t é o tempo e μmax é a velocidade máxima específica de crescimento.

Através de μmax é possível calcular o tempo de geração (tg) associado, ou seja, o tempo necessário para duplicação do número de células e, por conseguinte, da biomassa do cultivo. As equações a seguir descrevem tg e P (produtividade média de biomassa, g L-1 dia-1), respectivamente:

$$t_g = \frac{\ln (2)}{\mu_{\text{máx}}} \tag{2}$$

$$P = \frac{C_f - C_o}{t}$$

[3]

Onde  $C_f$  é a concentração final de biomassa no cultivo (g L<sup>-1</sup>),  $C_o$  é a concentração inicial de biomassa no cultivo (g L<sup>-1</sup>) e  $t$  é o tempo total de dias.

## Carboidratos – Hidrólise ácida

A quantificação dos carboidratos foi realizada de forma indireta, por meio da hidrólise ácida da biomassa de microalga, realizando a conversão dos polissacarídeos em açúcares redutores, seguida da determinação dos açúcares totais.

A hidrólise ácida foi realizada com base no método descrito por Miranda, Passarinho e Gouveia (2012). Alíquotas de biomassa seca (50 g L<sup>-1</sup>) foram tratadas com 1 mL de ácido sulfúrico a 3% (v/v) em tubos de vidro borossilicato e submetidas à autoclave a 120 °C e 1,2 bar por 30 min. Após o resfriamento, as suspensões foram transferidas para tubos Falcon, utilizando-se 4 mL de água destilada, seguidas de centrifugação. Os sobrenadantes obtidos foram então coletados para a análise.

A concentração de açúcares totais foi determinada por uma adaptação do método fenol-sulfúrico, originalmente desenvolvida por Dubois et al., 1951), utilizando glicose como padrão analítico. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação pós-autoclave foram diluídos em água destilada na proporção 1:1000 (v/v).

Alíquotas de 2 mL das amostras diluídas foram reagidas com 50 µL de fenol a 80% (v/v) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (95%, p.a.). Após incubação à temperatura ambiente por 40 min, a absorbância foi medida a 490 nm em espectrofotômetro.

A quantificação foi realizada a partir de uma curva de calibração construída com soluções padrão de glicose nas concentrações 0,000; 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,050; 0,080 e 0,1 g L<sup>-1</sup>. Com a regressão linear obteve a Equação 4, com  $R^2 = 0,9986$ .

$$Y = 0,08772X - 0,000449$$

[4]

Onde  $Y$  é a concentração de glicose e  $X$  o valor da absorbância.

## Extração por solvente (hexano e líquido iônico) dos carboidratos totais

Foi empregada a mesma metodologia para a extração de carboidratos totais, modificando apenas o solvente. Os solventes utilizados foram o hexano/etanol e o líquido iônico acetato de 2-hidroxietanolamina/etanol.

### Síntese do líquido iônico 2-HEAA

O líquido iônico prótico acetato de 2-hidroxietanolamina (2-HEAA) foi preparado adaptando a metodologia de Álvarez (2011). Foram utilizados 60 mL de monoetanolamina e 57,2 mL de ácido acético. A monoetanolamina foi adicionada a um balão de fundo achatado com duas bocas equipado com condensador de refluxo e um termômetro que intercalava com o funil de bromo contendo ácido acético. O ácido foi adicionado gota a gota à monoetanolamina. O sistema foi deixado sobre agitação com barra magnética a 35°C por 24h, tendo cuidado com a temperatura para não ocorrer desidratação do sal até a amina correspondente. Por fim, o líquido iônico foi armazenado a temperatura ambiente em frasco âmbar. A reação é uma neutralização ácido-base simples.

### Determinação de extrativo

Para determinação do teor de extrativo utilizou a metodologia padrão TAPPI T204 cm-97 (TAPPI,1997) adaptada. Pesou-se 1 g de biomassa seca, em seguida, a amostra foi transferida para o cartucho de um extrator Soxhlet. Foram realizadas duas extrações, sendo a primeira composta de uma mistura de solventes hexano e etanol, líquido iônico e etanol com proporção 1:2 v/v (50/100 mL). A segunda extração começou após a primeira ficar incolor, acrescentando 150 mL de etanol. Ao final da extração transferiu o cartucho para um bquer com 150 mL de água destilada e deixou no banho termostático por 1 h a 98 °C. Em seguida, filtrou a vácuo com 500 mL de água quente. O teor é calculado através da Equação 5.

$$TE \% = \frac{MPFA - MPF}{MA} \times 100 \quad [5]$$

Onde TE% é o teor de extrativo, MPF é a massa de papel de filtro, MA é a massa inicial da amostra e MPFA é a massa de papel filtro com amostra seca.

### Determinação de holocelulose

Para determinar a holocelulose, adaptou a metodologia utilizada por (Silva, 2018). Pesou 1,5 g da massa retida no papel de filtro que foi extraída, adicionou 60 mL de água destilada em um erlenmeyer, colocou uma barra magnética e levou ao agitador sob temperatura de 70 °C. A cada 1 h adicionou 1 mL de ácido acético glacial e 1,5 mL de hipoclorito de sódio, deixando o erlenmeyer fechado, repetiu esse passo cinco vezes. Em seguida, levou até o banho de gelo por 30 minutos e filtrou a vácuo, utilizando água destilada gelada até o pH ficar neutro. Por fim, lavar com 50 mL de acetona (propanona), lavar com água destilada e secar em estufa até o peso se manter constante. O teor de holocelulose pode ser encontrado através da Equação 6.

$$TH \% = \frac{MPFH - MPF}{MA} \times 100 \quad [6]$$

Onde o TH% é o teor de celulose, MPFH é a massa de papel de filtro com amostra seca, MPF é a massa do papel de filtro e MA é a massa da amostra inicial.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados e analisados conforme os objetivos propostos.

### Cinética química de crescimento

As concentrações foram determinadas a partir da curva de calibração e em seguida, os dados foram ajustados por meio da Equação 1 utilizando a regressão linear, implementado no software scidavis. Foram elaborados nove gráficos correspondentes à velocidade específica máxima de crescimento para cada um dos nove experimentos realizados.

Para o experimento 1, a velocidade máxima foi de  $\mu_{\max} = 0,299/\text{dia}$  com  $R^2 = 0,93$ . Na tabela 3 segue os dados das velocidades máximas encontradas para todos os experimentos. Também se encontra o tempo necessário para duplicação do número de células e a produtividade média de biomassa, calculadas a partir das equações 2 e 3, respectivamente.

Ensaio	$C_0$ (g L <sup>-1</sup> )	$C_{\max}$ (g L <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (dia <sup>-1</sup> )	$R^2$	$t_g$ (dia)	$P$ (g L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )
1	0,676	12,679	0,299	0,92	2,32	0,429
2	1,110	15,479	0,499	0,93	1,39	0,513
3	1,257	16,324	0,406	0,91	1,71	0,538
4	1,327	15,280	0,279	0,89	2,48	0,498
5	1,636	21,619	0,180	0,93	3,85	0,714
6	1,633	19,598	0,107	0,93	6,48	0,642
7	1,396	17,903	0,120	0,89	5,80	0,590
8	1,251	14,914	0,135	0,85	5,13	0,488
9	1,240	13,365	0,154	0,91	4,50	0,433

Tabela 3: Resultado da cinética de crescimento

Fonte: Autoria própria (2021)

Através da análise de variância (ANOVA) no software statistica não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para a produtividade, sendo o  $p = 0,316$  para o fotoperíodo e  $p = 0,722$  para a concentração de NaNO<sub>3</sub>. Ou seja, nenhum fator apresentou



efeito estatisticamente significativo sobre a produtividade. O intercepto foi significativo  $p < 0,05$ , sendo o valor médio da produtividade bem estimado, mas as variações observadas não podem ser atribuídas aos fatores estudados.

Da mesma maneira não houve uma diferença significativa para o tempo de geração, uma vez que, o efeito do fotoperíodo sobre o tempo de geração não estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança ( $p = 0,103$ ) e a concentração de  $\text{NaNO}_3$  não apresenta nenhum efeito significativo sobre o tempo de geração ( $p = 0,785$ ). O erro residual alto, 2,117 sugere que outros fatores não controlados podem estar influenciando a resposta.

Para a concentração máxima nenhum fator ou termo quadrático apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). Assim como observado para a produtividade e tempo de geração, as variações da concentração máxima não podem ser atribuídas estatisticamente aos fatores estudados dentro da faixa experimental. O modelo descreve adequadamente o nível médio da resposta, mas não explica suas variações.

Diante dos resultados, o experimento 5 foi o que apresentou maior produtividade, com concentração de  $\text{NaNO}_3$   $1500 \text{ mg L}^{-1}$ , fluxo luminoso de  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  durante 16h por dia. E a segunda maior produtividade é do experimento 6, com concentração de  $\text{NaNO}_3$   $2300 \text{ mg L}^{-1}$ , fluxo luminoso de  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  durante 16h por dia. Percebeu-se que a partir do 14º dia, a fase exponencial de crescimento finaliza, entrando na fase estacionária.

Segundo (Rocha, Garcia and Henriques, 2003) um maior crescimento da microalga ocorre quando a intensidade luminosa é maior e a temperatura também, sendo sugerido que trabalhos posteriores possam ser trabalhados em faixas de temperaturas mais altas e com intensidade luminosa maior, a fim de avaliar se as variáveis resposta terão resultados significativos.

## Carboidratos – Hidrólise ácida

Com o auxílio da curva de calibração, Equação 4, foi possível obter os valores de concentração de açúcares totais extraídos na hidrólise ácida, ou concentração de glicose equivalente, em  $\text{g L}^{-1}$ . Os dados podem ser observados na Tabela 4.

Com os valores calculados da glicose equivalente ( $M_{g-eq}$ ) e da biomassa inicial da hidrólise ( $M_o$ ), foi calculada a fração mássica de açúcares totais ( $\%Fm$ ). De acordo com a equação 6.

$$\%Fm = \frac{M_{g-eq}}{M_o} \quad [6]$$

Ensaio	Concentração de açúcar (g L <sup>-1</sup> )	Massa inicial da hidrólise (g)	(%FM)
1	0,011	0,0502	2,19
2	0,0069	0,0503	14
3	0,0098	0,0508	19
4	0,018	0,0501	36
5	0,015	0,0499	30
6	0,019	0,0514	37
7	0,00001	0,0161	0,06
8	0,0048	0,0265	18
9	0,0091	0,0504	18

Tabela 4: Resultado da hidrólise ácida

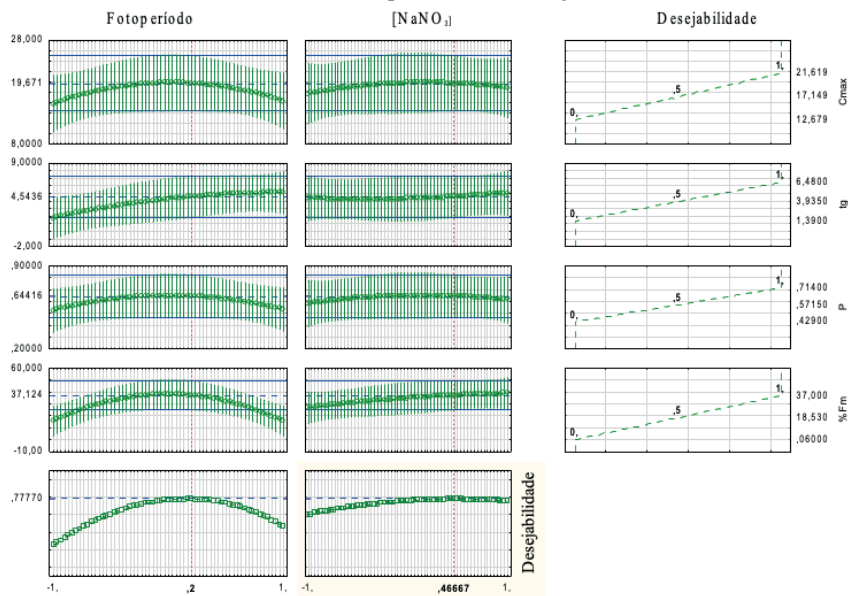
Fonte: Autoria própria (2021)

Através da análise de variância (ANOVA) realizada no software Statistica, verificou-se que o fotoperíodo tem efeito significativo sobre a fração mássica de açúcares totais ( $p=0,021$ ), já a concentração de  $\text{NaNO}_3$  não influenciou estatisticamente. Para os efeitos, o fator determinante foi o fotoperíodo, com efeito quadrático.

Ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com o de Nasirpour, Ravanshad e Mousavi, (2022), que investigaram diferentes estratégias de hidrólise para a conversão de carboidratos presentes na biomassa microalgal, incluindo ultrassonificação, hidrólise ácida em alta temperatura e a combinação desses métodos, a eficiência de conversão por ultrassom isolada foi relativa baixa, correspondendo a 3,33%. Entretanto, a aplicação do ultrassom como etapa auxiliar à hidrólise ácida resultou em aumento significativo no rendimento, da ordem de 14,2%. Ainda, eles demonstraram que o aumento da concentração de ácido sulfúrico de 1 para 3 N promoveu um aumento expressivo no rendimento de conversão, atingindo 90,7%, correspondendo a 136 mg g<sup>-1</sup> de biomassa de *Chlorella*. No presente estudo, a hidrólise ácida foi realizada utilizando ácido sulfúrico a 3% (v/v), sob condições de 120 °C e 1,2 bar, por 30 min, resultando em uma produção de glicose equivalente correspondente a 37% da fração mássica de açúcares totais. Embora esse rendimento seja inferior aos valores reportados pelos autores, é importante destacar que as condições operacionais adotadas neste trabalho foram menos severas, tanto em termos de concentração ácida quanto de intensidade térmica, o que reduz a degradação de açúcares e formação de subprodutos inibidores.

Diante destes resultados, foi realizada a análise de desejabilidade utilizando o software Statistica, esta análise fornece qual a condição dos fatores que é a melhor resposta com base nas variáveis resposta, neste caso, a concentração máxima, tempo de geração, produtividade e porcentagem de fração mássica de açúcares totais. O gráfico pode ser visualizado na Figura 1.

## Perfis de valores preditos e desejabilidade



**Figura 1:**

Gráfico dos perfis de valores preditos e desejabilidade

Fonte: Autoria própria (2021)

Por meio da função desejabilidade, considerando os modelos ajustados para cada variável resposta em função do fotoperíodo e da concentração de nitrato de sódio, foi verificado que os perfis dos valores preditos evidenciaram influência significativa do fotoperíodo, com comportamento não linear e presença de um valor intermediário, enquanto a concentração de  $\text{NaNO}_3$  apresentou efeito mais suave sobre as respostas avaliadas.

A maximização da desejabilidade global foi alcançada em níveis intermediários das variáveis independentes, correspondendo a valores codificados de aproximadamente 0,2 para o fotoperíodo e 0,47 para a concentração de  $\text{NaNO}_3$ . Ao converter para valores reais indicou um fotoperíodo ótimo de 17,6:6,4 e uma concentração de  $\text{NaNO}_3$  ótima de 1873 mg L<sup>-1</sup>, condições na quais as respostas apresentaram valores preditos próximos aos seus respectivos ótimos individuais, resultando em elevada desejabilidade global.

Sendo assim, utilizando as análises individuais de cada resposta e a desejabilidade, o experimento 6 foi escolhido para que fosse realizada a extração de açúcares utilizando o solvente hexano e o solvente líquido iônico.

### Extração por solvente (hexano e líquido iônico) dos carboidratos totais

A partir dos dados das Tabelas 3 e 4, sabendo que o experimento 6, apresentou maior porcentagem de fração mássica de açúcares totais, também a segunda maior

produtividade, bem como está próximo do valor da desejabilidade, a partir dele que foi realizada a extração com hexano e com o líquido iônico.

Utilizando as Equações 5 e 6, foram obtidos os seguintes resultados expostos na Tabela 5.

Teor de extrativos - hexano (%)	Teor de extrativos – líquido iônico (%)	Teor de holocelulose – hexano (%)	Teor de holocelulose - líquido iônico (%)
78,76 ± 1,84	66,86 ± 2,54	27,16 ± 1,98	77,4 ± 3,05

Tabela 5: Resultado da Extração por solvente

Fonte: Autoria própria (2021)

Apesar do teor de extrativos hexano apresentar maiores resultados, através do teste t realizado no software estatística, o teor de extrativos com líquido iônico apresentou um  $p=0,001$  ao comparar os dois.

E ao comparar o teor de holocelulose pelo teste t, o resultado que apresentou melhor resposta estatisticamente foi com líquido iônico também com  $p=0,003$ .

Conforme reportado por (Nasirpour, Ravanshad and Mousavi, 2022), a utilização isolada do líquido iônico [BMIM]Cl resultou em conversões expressivas de carboidratos, atingindo 72%, evidenciando a elevada capacidade desses solventes em desestruturar a matriz celular microalgal. A incorporação de HCl ao líquido iônico levou a uma redução nos rendimentos de conversão, comportamento associado à interação preferencial do próton ácido com o ânion do LI, diminuindo sua eficácia na solvatação e ruptura da parede celular. A literatura também demonstra que a aplicação de ultrassom combinado ao LI resulta em aumento no rendimento de conversão, alcançando valores próximos a 100%. No presente trabalho, a extração com o LI 2-HEAA e hexano resultou em diferenças na fração extraível e na composição residual da biomassa. Enquanto a extração com hexano apresentou maior teor de extrativos (78,76%), a extração com LI promoveu um aumento significativo no teor de holocelulose, 77,4%, em comparação a apenas 27,16% na biomassa tratada com hexano.

Esses resultados indicam que o LI foi mais eficiente na remoção seletiva de compostos não estruturais e na preservação ou enriquecimento relativo da fração polissacarídica. Assim, em conformidade com a literatura, os resultados obtidos neste estudo confirmam que os LI favorecem a concentração de carboidratos potencialmente fermentáveis.

## CONCLUSÃO

Todos os experimentos passaram pela análise da cinética de crescimento e dos carboidratos. Apenas o experimento 6 passou pela extração utilizando solvente.

A metodologia empregada para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, modificando a concentração de nitrato de sódio e o fotoperíodo, foi bem-sucedida.

Com relação à cinética de crescimento verificou que o experimento com concentração de  $\text{NaNO}_3$  1500 mg/L e fotoperíodo de 16h ligado obteve maior produtividade. Mas estatisticamente significativo levando a análise de todas as variáveis resposta, o que obteve melhor resposta foi o experimento 6, com fotoperíodo 16:8 e concentração de  $\text{NaNO}_3$  de 2300 mg/L. Todos os experimentos alcançaram o fim da fase exponencial no dia 14.

A maior liberação de carboidratos utilizando a hidrólise ácida ocorreu com o experimento 6, que foi de 37%. Por possuir maior liberação, foi realizada a extração do mesmo utilizando hexano e líquido iônico. O teor de carboidratos extraídos obteve maior eficiência ao utilizar a hidrólise ácida, uma vez que a extração com hexano apresentou 27,16% de carboidratos e a da hidrólise ácida 37%.

Como o objetivo da pesquisa era estudar o processo de extração por solvente dos carboidratos totais, sendo assim, o experimento 6 (concentração de nitrato de sódio 2300 e fotoperíodo de 16h) foi o que demonstrou ser mais eficiente e estatisticamente significativo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFS, ao CNPq, FAPESB e a CAPES pelo apoio financeiro para execução do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ABOMOHR, A. E.-F.; EL-HEFNAWY, M. E.; WANG, Q.; HUANG, J.; LI, L.; TANG, J.; MOHAMMED, S. Sequential bioethanol and biogas production coupled with heavy metal removal using dry seaweeds: Towards enhanced economic feasibility. *Journal of Cleaner Production*, v. 316, p. 128341, 20 set. 2021.
- ALAVIJEH, R. S.; KARIMI, K.; WIJFFELS, R. H.; BERG, C. VAN DEN; EPPINK, M. Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource Technology*, v. 309, p. 123321, 1 ago. 2020.
- ALVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; AZNAR, M.; IGLESIAS, M. Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxy ethylammonium acetate + (water, methanol, or ethanol)}. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 43, n. 7, p. 997–1010, 1 jul. 2011.
- DEMPFLE, D.; KRÖCHER, O.; STUDER, M. H.-P. Techno-economic assessment of bioethanol production from lignocellulose by consortium-based consolidated bioprocessing at industrial scale. *New Biotechnology*, 31 jul. 2021.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. *Nature* 1951 168:4265, v. 168, n. 4265, p. 167–167, 1951.
- KHOSH KHO, S. M.; MAHDAVIAN, M.; KARIMI, F.; KARIMI-MALEH, H.; RAZAGHI, P. Production of bioethanol from carrot pulp in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* and beet molasses inoculum; A biomass based investigation. *Chemosphere*, v. 286, p. 131688, 1 jan. 2022.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress*, v. 0, n. 0, p. 0–0, 12 mar. 2008.

MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V.; ANDRULEVICIUTE, V. Biodiesel fuel from microalgae-promising alternative fuel for the future: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2013 12:2, v. 12, n. 2, p. 119–130, 15 mar. 2013.

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

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 342–348, 1 jan. 2012.

NASIRPOUR, N.; RAVANSHAD, O.; MOUSAVI, S. M. Ultrasonic-assisted acid and ionic liquid hydrolysis of microalgae for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2022 13:17, v. 13, n. 17, p. 16001–16014, 14 jan. 2022.

RAHMAN, A.; ANTHONY, R. J.; SATHISH, A.; SIMS, R. C.; MILLER, C. D. Effects of wastewater microalgae harvesting methods on polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, v. 156, p. 364–367, 1 mar. 2014.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1 mar. 1979.

ROCHA, J. M. S.; GARCIA, J. E. C.; HENRIQUES, M. H. F. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, v. 20, n. 4–6, p. 237–242, 1 jul. 2003.

SHEN, X.; SUN, R. Recent advances in lignocellulose prior-fractionation for biomaterials, biochemicals, and bioenergy. *Carbohydrate Polymers*, v. 261, p. 117884, 1 jun. 2021.

SILVA, R. DE O. Utilização dos resíduos sólidos da indústria cacaueteira para produção de etanol. Universidade Federal do Espírito Santo, 28 fev. 2018. Disponível em: <<http://repositorio.ufes.br/handle/10/7820>>. Acesso em: 19 dez. 2025

SIRAJUNNISA, A. R.; SURENDRIRAN, D. Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, 1 dez. 2016.

SOULIÈS, A.; PRUVOST, J.; LEGRAND, J.; CASTELAIN, C.; BURGHELEA, T. I. Rheological properties of suspensions of the green microalga *Chlorella vulgaris* at various volume fractions. *Rheologica Acta* 2013 52:6, v. 52, n. 6, p. 589–605, 23 abr. 2013.

TAPPI. T 204 cm-97. Solvent extractives of wood and pulp. 1997, 4 p.

TAVARES, B.; SENE, L.; CHRIST, D. Valorization of sunflower meal through the production of ethanol from the hemicellulosic fraction. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 20, n. 11, p. 1036–1042, 2016.

WANG, Y.; GUO, W.; CHENG, C. L.; HO, S. H.; CHANG, J. S.; REN, N. Enhancing bio-butanol production from biomass of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with sequential alkali pretreatment and acid hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 557–564, 1 jan. 2016.

WEN, X.; DU, K.; WANG, Z.; PENG, X.; LUO, L.; TAO, H.; XU, Y.; ZHANG, D.; GENG, Y.; LI, Y. Effective cultivation of microalgae for biofuel production: a pilot-scale evaluation of a novel oleaginous microalga *Graesiella* sp. WBG-1. *Biotechnology for Biofuels* 2016 9:1, v. 9, n. 1, p. 123–, 13 jun. 2016.