



UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR

Recredenciada pela Portaria – MEC n.º 747, de 10/09/2020 – D.O.U. 11/09/2020

Mantenedora: UNIPAR – SOCIEDADE EMPRESARIAL LTDA.

Coordenação de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura

Juliana Gaiolla Cordeiro Tomitão

**Validação de método extrativo para *Chlorella vulgaris* por design experimental de
Box-Behnken**

**Umuarama
2026**

Juliana Gaiolla Cordeiro Tomitão

Validação de método extrativo para *Chlorella vulgaris* por design experimental de Box-Behnken

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura pela Universidade Paranaense - UNIPAR.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Jaqueline Hoscheid

Umuarama
2026

Ficha Catalográfica

T657v Tomitão, Juliana Gaiolla Cordeiro.

Validação de método extrativo para *Chlorella vulgaris* por design experimental de Box-Behnken / Juliana Gaiolla Cordeiro Tomitão. – Umuarama : Universidade Paranaense – UNIPAR, 2026.

35 f.

Orientadora: Dr^a. Jaqueline Hoscheid.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Paranaense – UNIPAR.

1. Atividade antioxidante. 2. *Chlorella vulgaris*. 3. Extrato otimizado. 4. Microalga. 5. Turbo extração. I. Universidade Paranaense – UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 579.83

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido minha fortaleza em todos os momentos, guiando meus passos e concedendo sabedoria, saúde e perseverança para que este sonho se tornasse realidade.

À minha orientadora, Professora Jaqueline, pela confiança, orientação, incentivo e valiosas contribuições científicas, fundamentais para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo, Rogério, pelo amor, companheirismo, paciência e apoio incondicional ao longo de toda essa jornada, especialmente nos momentos de maior desafio. Aos meus filhos, Helena e Artur, minha maior motivação, pela compreensão das ausências, pelo carinho diário e por serem a razão do meu esforço e dedicação.

Aos parceiros de laboratório, pelo apoio, colaboração, trocas de conhecimento e convivência ao longo desta caminhada. Em especial, à Mariana, pela ajuda constante, disponibilidade, amizade e contribuição fundamental para a realização deste trabalho.

À Coordenadoria de Pós-Graduação (COPG/UNIPAR, Brasil), à Coordenadoria de Pesquisa e Extensão (COPEX/UNIPAR, Brasil), à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA, Paraná/Brasil) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil), pelo apoio institucional e financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, pela oportunidade de formação acadêmica, pelo conhecimento adquirido e pelo apoio institucional ao longo do curso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	6
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	11
1. Obtenção da microalga	11
2. Extração cinética	11
3. Rendimento extrativo	12
4. Quantificação da capacidade antioxidante	12
4.1. Potencial de redução de ferro (FRAP)	12
4.2. Sistema β -caroteno / Ácido linoléico	12
4.3. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	13
4.4. ABTS ^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))	13
5. Otimização do Método de Extração.....	13
6. Caracterização do extrato por UHPLC-MS/MS (Cromatografia líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massa em Tandem)	14
7. Análise estatística.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
1. Cinética de extração para <i>Chlorella vulgaris</i> por turbo extração	15
2. Avaliação do impacto das variáveis frente a otimização de método extrativo por turbo extração	18
CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	35

Juliana Gaiolla Cordeiro Tomitão

Validação de método extrativo para *Chlorella vulgaris* por design experimental de Box-Behnken

RESUMO: As microalgas têm se destacado como fontes promissoras de recursos biológicos. *Chlorella vulgaris*, uma microalga verde unicelular, apresenta reconhecidas propriedades anti-inflamatórias, atividade antioxidante, capacidade de modular o perfil lipídico e elevado teor de compostos bioativos. No contexto dos processos extrativos, inovações tecnológicas têm permitido otimizar a recuperação desses compostos, reduzindo custos e agregando valor ao produto final. Entre os fatores que influenciam essa otimização destacam-se o tipo de solvente, a temperatura, o tempo de extração e o método empregado. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi otimizar o método de turbo extração de bioativos com potencial antioxidante na microalga *C. vulgaris*, visando a futura prospecção de produtos para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Inicialmente, uma cinética de extração em tempos de 1 a 20 minutos foi avaliada, e comparada as técnicas de infusão e infusão seguida de precipitação etanólica, quanto aos parâmetros rendimento e atividade antioxidante. Posteriormente foi aplicado um planejamento experimental Box–Behnken, que considerou temperatura (20, 40 e 60 °C), velocidade (9000, 12000 e 15000 rpm) e razão soluto:solvente (10, 30 e 50 g/mL), por turbo extração com Ultra-Turrax® durante 15 minutos. As condições ideais de extração foram definidas como: 15000 rpm, razão soluto:solvente 1:10 g/mL e temperatura de 20 °C. A caracterização fitoquímica do extrato otimizado permitiu identificar 29 compostos distintos, sendo os majoritários aminoácidos e ácidos graxos. Os ensaios de atividade antioxidante demonstraram o alto desempenho do método extrativo, atribuído sobretudo à expressiva presença de derivados de ácidos graxos e aminoácidos. Conclui-se que a otimização do processo extrativo de *C. vulgaris* potencializa a recuperação de compostos de alto potencial antioxidante, evidenciando sua aplicabilidade na produção de ingredientes funcionais e nutracêuticos. Esses resultados fortalecem o papel da microalga como uma fonte versátil e estratégica para o desenvolvimento de bioprodutos inovadores.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. *Chlorella vulgaris*. Extrato otimizado. Microalga. Turbo extração.

Juliana Gaiolla Cordeiro Tomitão

Validation of an extractive method for *Chlorella vulgaris* using the Box–Behnken experimental design

ABSTRACT: Microalgae have emerged as promising sources of biological resources. *Chlorella vulgaris*, a unicellular green microalga, exhibits well-documented anti-inflammatory properties, antioxidant activity, the ability to modulate lipid profiles, and a high content of bioactive compounds. In the context of extraction processes, technological innovations have enabled the optimization of bioactive compound recovery, reducing costs and adding value to the final product. Among the factors influencing this optimization are solvent type, temperature, extraction time, and the extraction method employed. Accordingly, the aim of this study was to optimize the turbo-extraction method for the recovery of bioactive compounds with antioxidant potential from the microalga *C. vulgaris*, targeting future product prospecting for the pharmaceutical, cosmetic, and food industries. Initially, extraction kinetics over periods ranging from 1 to 20 minutes were evaluated and compared with infusion and infusion followed by ethanolic precipitation, considering extraction yield and antioxidant activity (FRAP and β -carotene assays). Subsequently, a Box–Behnken experimental design was applied, evaluating temperature (20, 40, and 60 °C), rotational speed (9000, 12000, and 15000 rpm), and solute-to-solvent ratio (10, 30, and 50) using turbo extraction with an Ultra-Turrax® system for 15 minutes. The optimal extraction conditions were defined as 15000 rpm, a solute-to-solvent ratio of 1:10 g/mL, and a temperature of 20 °C. Phytochemical characterization of the optimized extract allowed the identification of 29 distinct compounds, with amino acids and fatty acids as the predominant constituents. The antioxidant activity assays demonstrated the high performance of the extraction method, mainly attributed to the expressive presence of fatty acid derivatives and amino acids. In conclusion, optimization of the extraction process for *C. vulgaris* enhances the recovery of compounds with high antioxidant potential, demonstrating its applicability in the production of functional and nutraceutical ingredients. These findings reinforce the role of this microalga as a versatile and strategic source for the development of innovative bioproducts.

Keywords: Antioxidant activity. *Chlorella vulgaris*. Optimized extract. Microalga. Turbo extraction.

Otimização do processo de extração melhora o potencial antioxidante de *Chlorella vulgaris*

RESUMO: Este estudo avaliou a otimização do método de turbo extração (TE) em *Chlorella vulgaris* visando à maximização do potencial antioxidante, com aplicação futura em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios. Métodos convencionais de infusão foram comparados à TE, sendo a cinética avaliada e o tempo otimizado em 15 minutos. Utilizou-se um planejamento Box-Behnken associado à metodologia de superfície de resposta para investigar os efeitos da proporção soluto:solvente (1:10, 1:30 e 1:50 m/v), velocidade (9000, 12000 e 15000 rpm) e temperatura (20, 40 e 60 °C). A análise de desejabilidade indicou como condição ideal 1:10, 15000 rpm e 20 °C. O extrato otimizado apresentou incrementos de 13,7%, 44,9%, 45,0% e 3186,18% nas atividades antioxidantes por β -caroteno, ABTS, FRAP e DPPH, respectivamente, em relação à infusão. A caracterização fitoquímica identificou 29 compostos, predominantemente ácidos graxos e aminoácidos, evidenciando maior recuperação de bioativos antioxidantes.

INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos aquáticos microscópicos capazes de realizar fotossíntese e amplamente reconhecidos por seu potencial como fontes de recursos biológicos valiosos. Sua versatilidade permite aplicações em diversos setores, incluindo alimentos, cosméticos, agricultura, biocombustíveis e medicina. Esses organismos sintetizam uma ampla variedade de compostos bioativos, cujos efeitos benéficos à saúde incluem atividades antioxidante, antibacteriana, antiviral, antitumoral, regenerativa, anti-hipertensiva, neuroprotetora e imunestimulante (Dolganyuk, 2020).

Além de sua relevância biológica, as microalgas apresentam expressivo potencial econômico. O cultivo e a produção de biomassa geram oportunidades para diferentes segmentos industriais, e o avanço das pesquisas tem contribuído para reduzir os custos associados aos bioprodutos e ampliar suas aplicações (Mesadri *et al.*, 2021). Nesse contexto, as microalgas se destacam como alternativas promissoras para a bioeconomia e para a segurança energética, especialmente devido ao desenvolvimento de biorrefinarias capazes de produzir energia sustentável (Banu *et al.*, 2020).

Chlorella sp. é uma microalga unicelular fotossintetizante cujo acúmulo de lipídios é diretamente influenciado pelas condições de cultivo (Je; Yamaoka, 2022). Rica em diversos nutrientes, sua suplementação regular tem sido associada a múltiplos benefícios à saúde, incluindo fortalecimento da resposta imunológica, redução de radicais livres e auxílio no controle de diabetes, hipertensão e hiperlipidemia. Esses efeitos estão relacionados à elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, vitaminas D e B12, além de ferro presente em sua composição (Bito *et al.*, 2020).

A biomassa de *Chlorella* sp. apresenta composição notavelmente equilibrada, contendo aproximadamente 43% de proteínas, 33% de lipídios e 13,5% de carboidratos, além de aminoácidos e ácidos graxos essenciais e carotenoides. Essa composição reforça seu potencial como recurso sustentável para as indústrias farmacêutica e alimentícia (Rasheed *et al.*, 2021). Ademais, sua aplicação tem se expandido para formulações de biofertilizantes, uma vez que suas propriedades antibacterianas e antifúngicas contribuem para o manejo do solo, a fertilização de sementes e o controle de pragas (Gómez-Luna; Tormos-Cedeño; Ortega-Díaz, 2022). Além disso, devido à sua disponibilidade e fácil

absorção de seus nutrientes, possibilita a substituição parcial ou total de fertilizantes químicos (Albuquerque, 2024).

Chlorella vulgaris, espécie verde, unicelular, eucariótica e de morfologia esférica, destaca-se por sua expressiva atividade anti-inflamatória (Chaudhari; Baviskar, 2021). Tal efeito está associado à presença de polissacarídeos extracelulares, considerados promissores como adjuvantes no tratamento de inflamações crônicas das vias aéreas, por modularem a síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias (Capek *et al.*, 2020). A suplementação com *C. vulgaris* também demonstrou melhorar o perfil lipídico, reduzindo o colesterol total e LDL em doses inferiores a 1.500 mg/dia (Sherafati, *et al.*, 2022). Concomitantemente, seu uso pode reduzir os níveis da enzima hepática AST em indivíduos com doença hepática não alcoólica (Yarmohammadi *et al.*, 2021).

Um estudo anterior já apontou que o extrato de *C. vulgaris* é capaz de diminuir a inflamação por um efeito conjunto de metabólitos e enzimas antioxidantes, capazes de atuar na resposta inflamatória local em modelo de edema de pata (Chaudhari; Baviskar, 2021). De forma complementar, Sibi e Rabina (2016) observaram que o extrato da microalga inibe a resposta inflamatória *in vitro* ao reduzir a produção de óxido nítrico e a síntese de prostaglandinas, TNF- α e interleucina-6.

Pradhan *et al.* (2021) demonstraram que o extrato metanólico de *C. vulgaris* apresenta propriedades antioxidantes comparáveis ao padrão de ácido ascórbico em ensaios *in vitro*. Essa característica favorece sua aplicação em produtos cosméticos, como loções e cremes, conferindo proteção contra radicais livres e promovendo benefícios à pele (Agustina; Aidha; Oktarina, 2021). Além disso, preparações em gel têm apresentado capacidade regenerativa, sugerindo seu potencial no tratamento de feridas (Dammar; Tanti; Amir, 2023).

Dado que as microalgas são fontes estratégicas de compostos de alto valor agregado, a viabilidade econômica e comercial depende diretamente da eficiência das técnicas de extração. Métodos convencionais apresentam limitações, como longos tempos de processamento e baixa sustentabilidade ambiental. Sob esta perspectiva, inovações tecnológicas têm permitido o desenvolvimento de processos de extração mais sustentáveis, favorecendo a implementação de biorrefinarias verdes, com redução de custos e maior eficiência ambiental (Sousa *et al.*, 2023).

Portanto, o desenvolvimento de produtos aperfeiçoados, especialmente aqueles que envolvem a identificação de novos compostos bioativos, é regulamentado no Brasil,

tanto para suplementos alimentícios, onde se aplica a RDC nº 839/2023 (Brasil, 2023), quanto para dermocosméticos, seguindo a resolução RDC nº 894/2024 (Brasil, 2024).

Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar o método de turbo extração (TE) para a obtenção de extratos de *C. vulgaris* com elevado potencial antioxidante, visando à futura prospecção de produtos farmacêuticos, cosméticos e/ou alimentícios.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção da microalga

A biomassa seca de *C. vulgaris* foi adquirida comercialmente da empresa Allmicroalgae – Natural Products S.A., localizada na cidade de Pataias, Portugal. De acordo com as informações nutricionais declaradas no rótulo do fabricante, o produto apresenta, por 100g: valor energético de 350 kcal (1464 kJ); 10 g de lipídios, sendo 2 g de ácidos graxos saturados, 1,50 g de monoinsaturados e 6 g de poli-insaturados; 8 g de hidratos de carbono, dos quais 0 g de açúcares e 0,8 g de amido; 15 g de fibra; 55 g de proteínas; 0,35 g de sal; 200 µg de vitamina B12; e 150 mg de ferro. Adicionalmente, o rótulo informa a presença de 3 g de ômega 3, 1800 mg de clorofila, 850 mg de luteína e 900 mg de carotenoides.

A produção industrial de microalgas pela Allmicroalgae – Natural Products S.A. é realizada sob rigoroso controle de qualidade e tecnologias avançadas, iniciando-se no banco de células mestre para manutenção das cepas. O cultivo ocorre de forma escalonada, passando por reatores de vidro, sistemas autotróficos e reatores tubulares industriais sob luz solar. Após o crescimento, a biomassa é concentrada por filtração, submetida à pasteurização e centrifugação para obtenção de pasta concentrada. Por fim, realiza-se a secagem por aspersão para produção do pó, seguido de embalagem e armazenamento (Allmicroalgae – Natural Products S.A., 2026).

2. Extração cinética

Para cada extração, 1 g de biomassa seca de *C. vulgaris* e 50 mL de água destilada foram utilizados. A extração foi conduzida utilizando um dispersor digital Ultra-Turrax® T25 digital (IKA), equipado com um elemento de dispersão modelo 18G (IKA). O processo foi conduzido a 12.000 rpm e o tempo de extração determinado a partir de ensaio cinético (1, 3, 5, 10, 15 e 20 min) (Jacobucci *et al.*, 2025).

Imediatamente ao final da extração, foram realizadas a filtração, congelamento e a liofilização do solvente extrator. Posteriormente os extratos foram armazenados em freezer (-20 °C) até sua utilização. As preparações foram realizadas em triplicatas independentes.

A título de comparação, foram realizadas extrações por infusão (Inf) e Infusão seguida de precipitação etanólica do infuso (I+PEI). A biomassa seca de *C. vulgaris* (1 grama) foi inicialmente submetida à infusão em 50 mL de água destilada a 90 °C. O recipiente foi fechado e a extração foi mantida por 5 horas, até que a temperatura ambiente fosse atingida. Em seguida, o infuso foi filtrado, congelado e liofilizado. A técnica foi executada em triplicata.

Já para o preparo do extrato por I+PEI, a biomassa seca foi inicialmente submetida à infusão, conforme descrito anteriormente, e após filtração, o filtrado foi tratado com álcool etílico a 95%, na proporção de 1:3 (v/v), conforme Islam, *et al.* (2016), com modificações, causando a insolubilização de polissacarídeos e proteínas. Transcorridos três dias, o precipitado foi removido por filtração, o solvente foi extraído usando um evaporador rotativo (Nova Ética, São Paulo, Brasil) e a fração resultante foi congelada e liofilizada (JJ Científica, modelo LJJ02, São Paulo, Brasil). Os extratos foram armazenados em freezer (-20 °C) até sua caracterização. A técnica foi executada em triplicata.

Os extratos foram avaliados quanto ao rendimento e capacidade antioxidante.

3. Rendimento dos extratos

O rendimento dos extratos (%) foi determinado gravimetricamente, pela razão da massa de extrato liofilizado *versus* a massa da matéria-prima (biomassa seca), multiplicada por 100 (m/m%).

4. Quantificação da capacidade antioxidante

Para as análises espectrofotométricas da capacidade antioxidante, os extratos foram solubilizados em água destilada na concentração de 1000 µg mL⁻¹ e avaliados em triplicata independente.

4.1. Potencial de redução de ferro (FRAP)

A análise FRAP foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por Santos, *et al.* (2016). Para determinar a capacidade antioxidante, uma curva de calibração ($y = 0,7131x - 40,937$; $R^2 = 0,9976$) foi plotada com sulfato ferroso (Sigma-Aldrich®) e os resultados foram apresentados como µmol de Fe²⁺ por grama de extrato (µmol_{Fe2+ gext}⁻¹).

4.2. Sistema β -caroteno / Ácido linoléico

A atividade antioxidante total foi determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, de acordo com Mattos *et al.* (2009), em espectrofotômetro (SpectraMax Plus384 Microplate Reader) à 470 nm. Alíquotas de 100 μ L da emulsão β -caroteno/ácido linoléico foram distribuídas em poços contendo 10 μ L dos extratos. A absorbância inicial foi registrada imediatamente, seguida da incubação das placas a 50 °C. As leituras subsequentes foram realizadas a cada 15 minutos, ao longo de 120 minutos, sendo os valores corrigidos pelo branco correspondente a cada amostra. A atividade antioxidante total foi expressa como percentual de inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, conforme a equação:

$$\%AA = [1 - (\text{AbsC}_{\text{final}} - \text{AbsC}_{\text{inicial}}) / (\text{AbsAm}_{\text{final}} - \text{AbsAm}_{\text{inicial}})] \times 100$$

Onde:

%AA corresponde à percentagem de atividade antioxidante;

AbsC_{inicial} referem-se à absorbância inicial do controle;

AbsC_{final} referem-se à absorbância final do controle;

AbsAm_{inicial} referem-se à absorbância inicial da amostra

AbsAm_{final} referem-se à absorbância final da amostra.

4.3. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O ensaio DPPH foi realizado conforme descrito por Silveira *et al.* (2018). Uma curva de calibração ($y = 0,5741x + 696,7$; $R^2 = 0,9953$) foi plotada usando Trolox (Sigma-Aldrich®), e a capacidade de eliminação de radicais DPPH foi expressa em equivalentes de Trolox ($\mu\text{M}_{\text{Trolox}}$).

4.4. ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

Os ensaios ABTS foram conduzidos conforme descrito por Re *et al.* (1999). Uma curva de calibração foi traçada usando Trolox ($y = 0,3283x + 695,93$; $R^2 = 0,9982$), e a capacidade de eliminação de radicais livres ABTS foi expressa em μmol de Trolox por grama de extrato ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$).

5. Otimização do Método de Extração

A metodologia de extração por TE foi utilizada para otimizar o processo, empregando um delineamento experimental Box-Behnken com três níveis e triplicata no

ponto central. Essa estratégia resultou em 13 combinações e 15 experimentos. Foram avaliados os efeitos da taxa de cisalhamento (9000, 12000 e 15000 rpm), da proporção soluto:solvente (1:10, 1:30 e 1:50 p/v) e temperatura (20, 40 e 60 °C). Os experimentos foram randomizados. Todas as extrações foram realizadas por 15 minutos. Imediatamente após a extração, os extratos foram filtrados, congelados e liofilizados. Os extratos foram então avaliados quanto ao rendimento e capacidade antioxidante.

Após obtidos todos os resultados, foi realizada a análise estatística da desejabilidade, para encontrar o ponto ótimo das extrações. O extrato otimizado foi preparado e caracterizado quanto ao rendimento, capacidade antioxidante e perfil fitoquímico por UHPLC-MS/MS.

6. Caracterização do extrato otimizado por UHPLC-MS/MS (Cromatografia líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massa em Tandem)

O extrato otimizado foi analisado em um sistema UHPLC-MS/MS (Shimadzu Nexera X2, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas Q-TOF Impact II (Bruker, Alemanha). Aproximadamente 10 mg de extrato foram solubilizada em 1 mL de metanol grau LC-MS, agitado em vórtex por 10 minutos, centrifugados por mais 10 minutos e filtrados com filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) (Millex, 0,22 μm \times 13 mm, Millipore) e injetado em um volume de 2 μL .

Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna CSH C18 (Waters, EUA, 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm), mantida a 40 °C. A fase móvel consistiu em água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol (fase B) para o modo de ionização negativo e água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (fase B) para o modo de ionização positivo, ambos com grau de pureza LC-MS. A separação foi realizada em 20 min utilizando o seguinte gradiente: 0,1 min 10% B; 0,1–7 min 50% B; 7–12 min 98% B; 12–15 min 98% B; 15–17 min 10% B; 17–20 min 10% B. O fluxo foi mantido constante em 0,250 mL min^{-1} durante toda a corrida cromatográfica.

O espectrômetro de massas Q-TOF Impact II com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) foi utilizado no modo de aquisição automática MS/MS. A taxa de aquisição foi de 5 Hz (MS e MS/MS), e a faixa de ajuste foi m/z 120–1200. Os espectros de massas foram coletados nos modos de íons positivos e negativos, com a voltagem do capilar ajustada para 3,50 kV, temperatura da fonte a 200 °C e taxa de fluxo do gás de dessolvatação de 9 L min^{-1} .

O cromatograma de íons e os espectros MS e MS/MS foram visualizados com o software Data Analysis 4.3 e os metabólitos foram anotados comparando os espectros de fragmentação do MassBank of North America (MoNA) (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>) e com a literatura.

7. Análise estatística

Para comparar os resultados das técnicas de extração, foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas foram comparadas utilizando o teste de Tukey com significância de $p \leq 0,05$. A otimização do método de extração foi conduzida por meio de um delineamento Box-Behnken, dentro de um modelo linear, também com nível de significância de $p \leq 0,05$, avaliando três variáveis independentes e triplicatas no ponto central em um único bloco. O software STATISTICA 13.0 (Statsoft®, EUA) foi utilizado para análise dos dados, confecção dos gráficos de superfície resposta e análise da desejabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Cinética de extração para *Chlorella vulgaris* por turbo extração

As técnicas de extração impactam diretamente a qualidade dos compostos bioativos, afetando parâmetros como eficiência, rendimento e estabilidade, podendo ainda alterar sua estrutura e reatividade (Teixeira *et al.*, 2025). A capacidade antioxidante das microalgas apresenta forte correlação com o processo extrativo empregado (Wang, *et al.*, 2023), ademais, sabe-se que o tempo de contato da amostra com o solvente influencia o potencial de extração. Nesse contexto, foram comparadas a infusão convencional, a infusão seguida de precipitação etanólica do infuso (I+PEI) e a turbo extração (TE).

A cinética de extração demonstrou que, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos avaliados, houve tendência de aumento no rendimento do extrato com a ampliação do tempo de extração até 15 minutos (Tabela 1). A partir desse ponto, verificou-se a estabilização do rendimento, sugerindo o estabelecimento de equilíbrio no processo extrativo e indicando que períodos superiores não resultariam em incrementos adicionais.

Observou-se que, além do maior rendimento, a TE apresentou maior capacidade antioxidante pelos métodos FRAP e β -caroteno (BC), enquanto pelos métodos DPPH e ABTS•+ não houve diferenças significativas entre as técnicas avaliadas. Conforme observado, para a capacidade antioxidante, pelos métodos de FRAP e BC, a metodologia e o tempo de extração apresentaram variação significativa, corroborando com Zhou, *et al.* (2023), que demonstrou que a atividade antioxidante varia significativamente entre espécies e metodologias analíticas. *Porphyra sulcata* apresentou os maiores valores pelos métodos DPPH (43,73 mg TE g⁻¹) e ABTS•+ (40,66 mg TE g⁻¹), enquanto *Coccolithophorid* sp. destacou-se no método FRAP (4,2 mg TE g⁻¹), evidenciando a amplitude do potencial antioxidante entre diferentes microalgas e a influência da composição da matriz biológica.

Tabela 1. Rendimento, e capacidade antioxidante dos extratos de *C. vulgaris* obtidos em diferentes tempos extrativos por turbo extração (TE) e comparação com as técnicas convencionais de infusão (Inf.) e infusão seguida de precipitação etanólica do infuso (Inf.+PEI).

Método	Tempo	Rendimento (%)	DPPH ($\mu\text{M}_{\text{Trolox}}$)	ABTS•+ ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{molFe}^{2+} \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$)	BC (%)
Inf.	5 h	22,90±0,02b	8,18±4,92b	83,55±2,15a	76,57±0,81c	58,90±7,63d
Inf.+PEI	3 dias	22,36±0,03b	61,31±67,74a	94,21±0,00a	94,80±2,14bc	63,24±1,13d
TE	1 min	57,84±0,00a	97,89±3,69a	91,17±0,00a	89,19±0,81bc	64,68±2,21cd
TE	3 min	58,48±0,04a	102,25±2,46a	100,30±8,61a	104,15±2,14ab	68,18±4,39bcd
TE	5 min	63,49±0,08a	86,57±7,39a	85,07±4,31a	97,61±0,81b	76,18±0,83ab
TE	10 min	63,42±0,02a	98,76±2,46a	89,64±2,15a	103,68±10,11b	74,78±3,12ab
TE	15 min	71,23±0,07a	90,05±2,46a	94,21±0,00a	106,49 ±12,46ab	79,42±0,94a
TE	20 min	69,44±0,03a	74,38±2,46a	85,07±0,00a	122,38±4,51a	73,30±0,23abc

Dados apresentados pela média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística por ANOVA seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$). Inf = infusão; PEI = precipitado etanólico do infuso; TE = turbo extração; BC = atividade antioxidante determinada pelo método do sistema β -caroteno/ácido linoléico

De modo geral, macro e microalgas constituem fontes altamente promissoras de novos antioxidantes para a indústria alimentícia, em função de sua expressiva biodiversidade e capacidade de adaptação a diferentes ambientes aquáticos. Ensaio *in vitro* e *in vivo* são essenciais para avaliar a eficácia antioxidante, a viabilidade econômica e o impacto ambiental desses compostos em diferentes matrizes, favorecendo a identificação de espécies e processos extrativos mais eficientes e a obtenção de extratos com características funcionais superiores (Pruteanu *et al.*, 2023).

Sabe-se que a obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante é central para a prospecção de produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, uma vez que esses compostos estão diretamente relacionados à neutralização de espécies reativas de oxigênio e à prevenção de danos oxidativos em sistemas biológicos (Agustina; Aidha; Otkarina, 2021). Espécies como *Euglena gracilis*, *Arthrospira platensis*, *Nannochloropsis* sp. e *Phaeodactylum tricornutum* exibem elevados níveis de atividade antioxidante, reforçando que a eficiência da técnica empregada para liberar e concentrar compostos bioativos é determinante para o resultado final (Wang *et al.*, 2023). Contudo ainda há lacunas quanto à otimização de métodos acessíveis e à avaliação de seus impactos sobre a atividade antioxidante de *C. vulgaris*.

Assim, considerando a influência das técnicas e da cinética de extração sobre o rendimento e a atividade antioxidante, os resultados obtidos indicam que o tempo de extração de 15 minutos foi capaz de combinar elevado rendimento e alta capacidade antioxidante pelos métodos FRAP e β -caroteno. Dessa forma, esse tempo foi selecionado para a etapa subsequente deste estudo e para a otimização do método por meio de um planejamento experimental do tipo Box-Behnken.

2. Avaliação do impacto das variáveis frente a otimização de método extrativo por turbo extração

Para avaliar o efeito das variáveis: proporção soluto:solvente, velocidade e a temperatura frente ao rendimento e capacidade antioxidante, foi aplicado um planejamento experimental Box-Behnken em modelo linear com intervalo de confiança de 95% (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação dos fatores de extração e análise de variância na otimização do processo de turbo extração no tempo de 15 minutos.

Ensaio	Velocidade (rpm)	Razão soluto/solvente (g/mL)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)	FRAP ($\mu\text{mol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$)	BC (%)	DPPH ($\mu\text{M}_{\text{Trolox}}$)	ABTS ⁺ ($\mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$)
1	9000	10	40	19,74	134,53	81,52	284,61	169,84
2	15000	10	40	40,93	168,19	89,52	278,20	185,07
3	9000	50	40	38,27	128,92	77,72	284,04	112,98
4	15000	50	40	25,40	138,74	84,56	283,47	116,54
5	9000	30	20	30,99	117,23	84,75	285,36	134,38
6	15000	30	20	52,81	132,43	69,30	284,98	128,22
7	9000	30	60	33,30	121,21	76,14	283,85	162,74
8	15000	30	60	23,67	117,00	98,31	281,02	119,58
9	12000	10	20	20,64	153,70	79,90	282,72	127,20
10	12000	50	20	34,04	126,58	78,62	283,66	150,04
11	12000	10	60	28,55	169,59	88,79	278,73	152,58
12	12000	50	60	23,74	120,51	73,05	282,72	134,81
13*	12000	30	40	25,83±1,62	109,29±1,85	72,64±1,30	278,14±2,83	137,01±1,17
		R ²		0,92128	0,92593	0,93712	0,86175	0,52973
		R ² ajustado		0,7796	0,7926	0,82395	0,6129	0,01
		Fcalculado		6,50	6,94	8,28	3,46	0,63
		Ftabelado		4,77	4,77	4,77	4,77	4,77

Nota: *Ponto central – Resultado expresso pela média ± desvio padrão ($n=3$).

A análise de variância foi realizada pelo teste F, onde o modelo é considerado validado, ou seja, se ajusta aos dados experimentais, quando $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. O teste “F” comprovou a validade do modelo frente às variáveis dependentes: rendimento, e capacidades antioxidantes pelos métodos de FRAP e BC. Os coeficientes de determinação (R^2) e R^2 ajustado também foram determinados, valores de R^2 próximos a 1 apontaram o ajuste do modelo às variáveis estudadas, e diferenças menores que 0,2 entre o R^2 e R^2 ajustado, confirmaram o ajuste das variáveis (Granella *et al.*, 2023).

Em relação à capacidade antioxidante avaliada pelos ensaios DPPH e ABTS, o teste F indicou que o modelo não foi válido para essas variáveis. Esse resultado pode ser atribuído ao mecanismo antioxidante e à composição química dos extratos de *C. vulgaris*, constituídos majoritariamente por ácidos graxos e aminoácidos, conforme será demonstrado posteriormente por UHPLC-MS/MS. Nesse perfil, não foram detectados flavonoides nem outros compostos fenólicos contendo anéis aromáticos e grupos hidroxila fenólicos, estruturas diretamente relacionadas ao mecanismo de oxirredução, fundamental para a resposta antioxidante em ensaios pelos métodos de DPPH e ABTS^{•+} (Lang *et al.*, 2024; Bejenaru *et al.*, 2025). Assim, embora amplamente utilizados para caracterizar extratos ricos em fenóis, esses métodos não fornecem uma medida válida da atividade antioxidante de extratos compostos essencialmente por ácidos graxos e aminoácidos. Por sua vez, o ensaio do β -caroteno constitui um método eficaz para avaliar o potencial antioxidante de compostos lipofílicos (Shahidi; Samarasinghe, 2025), o que pode explicar a validade do modelo observada no teste F.

Os modelos obtidos pela regressão linear explicaram 77,96% das variações entre os valores experimentais e os previstos para rendimento de extração, 79,26% e 82,39%, das variações entre os valores experimentais e previstos para capacidade antioxidante pelos métodos de FRAP e β -caroteno, respectivamente.

O maior rendimento global de extração foi obtido na condição de 15000 rpm, em uma razão soluto:solvente de 1:30 g mL⁻¹, a 20 °C. As variáveis temperatura e velocidade, e as interações temperatura \times razão, temperatura \times velocidade e velocidade \times razão foram significativas, como apresentado no gráfico de Pareto (Fig. 1A). O efeito interativo entre as variáveis também está ilustrado nos gráficos de superfície resposta (Fig. 1B, C, D). A análise das superfícies de resposta permite notar que, na interação razão \times velocidade (Fig. 1B), os fatores apresentaram influência mútua, indicando que a otimização conjunta dessas variáveis é fundamental para maximizar a eficiência do processo. Resultados semelhantes foram observados por Chen *et al.* (2024), que relataram que o efeito sinérgico

entre temperatura e tempo de extração elevou significativamente o rendimento de polissacarídeos extraídos da microalga *Porphyridium*. Na interação temperatura × velocidade, maiores velocidades contribuíram para melhores rendimentos (Fig. 1C). Por fim, de forma semelhante, na interação temperatura × razão, maiores razões contribuíram para melhores rendimentos (Fig. 1D).

Quando avaliado a capacidade antioxidante pelo método de FRAP as variáveis velocidade e razão, e as interações temperatura × razão, temperatura × velocidade, e velocidade × razão foram significativas, como apresentado no gráfico de Pareto e de superfície de resposta (Fig. 2). O efeito da velocidade está em concordância com os achados de Stramarkou *et al.* (2021), os quais avaliaram o processo de extração da microalga *Cryptocodinium cohnii* visando à obtenção de ácido docosa-hexaenoico (DHA). Os autores observaram que o aumento da velocidade promove maior cisalhamento e turbulência, intensificando a liberação de compostos bioativos.

A análise das superfícies de resposta evidenciou a interação entre temperatura × velocidade no processo de extração (Fig. 2C). Em geral, espera-se que o aumento da temperatura favoreça a extração e, conseqüentemente, eleve a capacidade antioxidante, o que é corroborado pelos resultados do método β-caroteno, que indicaram maior capacidade antioxidante, atrelada a maior extração de compostos bioativos, sob condições de temperaturas elevadas e baixas razões mássicas (Fig. 3). Contudo, isso se opõe aos dados obtidos para o ensaio FRAP, aonde a maior capacidade antioxidante foi obtida em extrações realizadas a 20 °C.

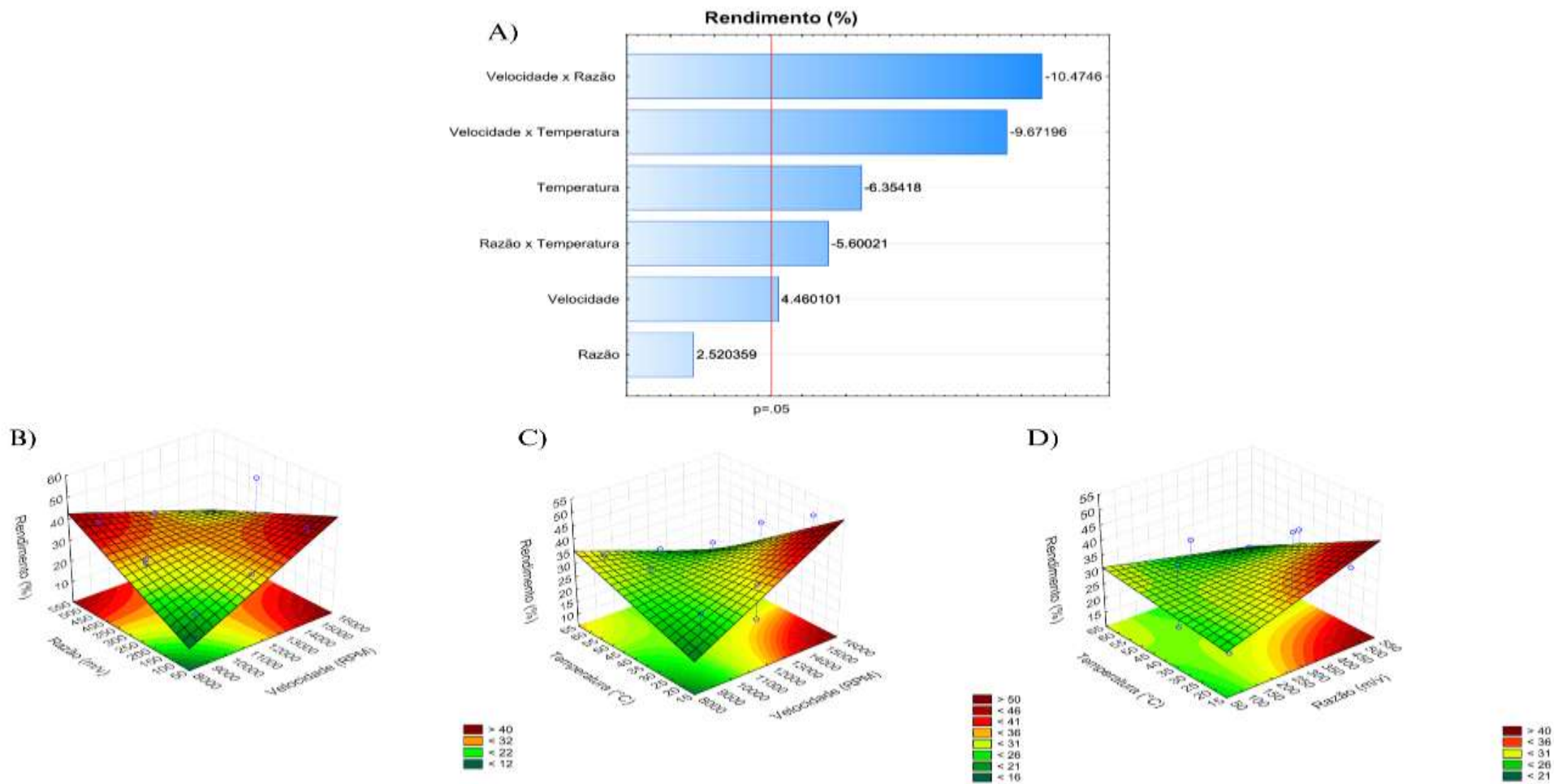


Figura 1. Diagrama de Pareto para o efeito das variáveis independentes frente ao rendimento (A) e gráficos de superfície de resposta das interações entre as variáveis razão × velocidade (B), temperatura × velocidade (C), e temperatura × razão .

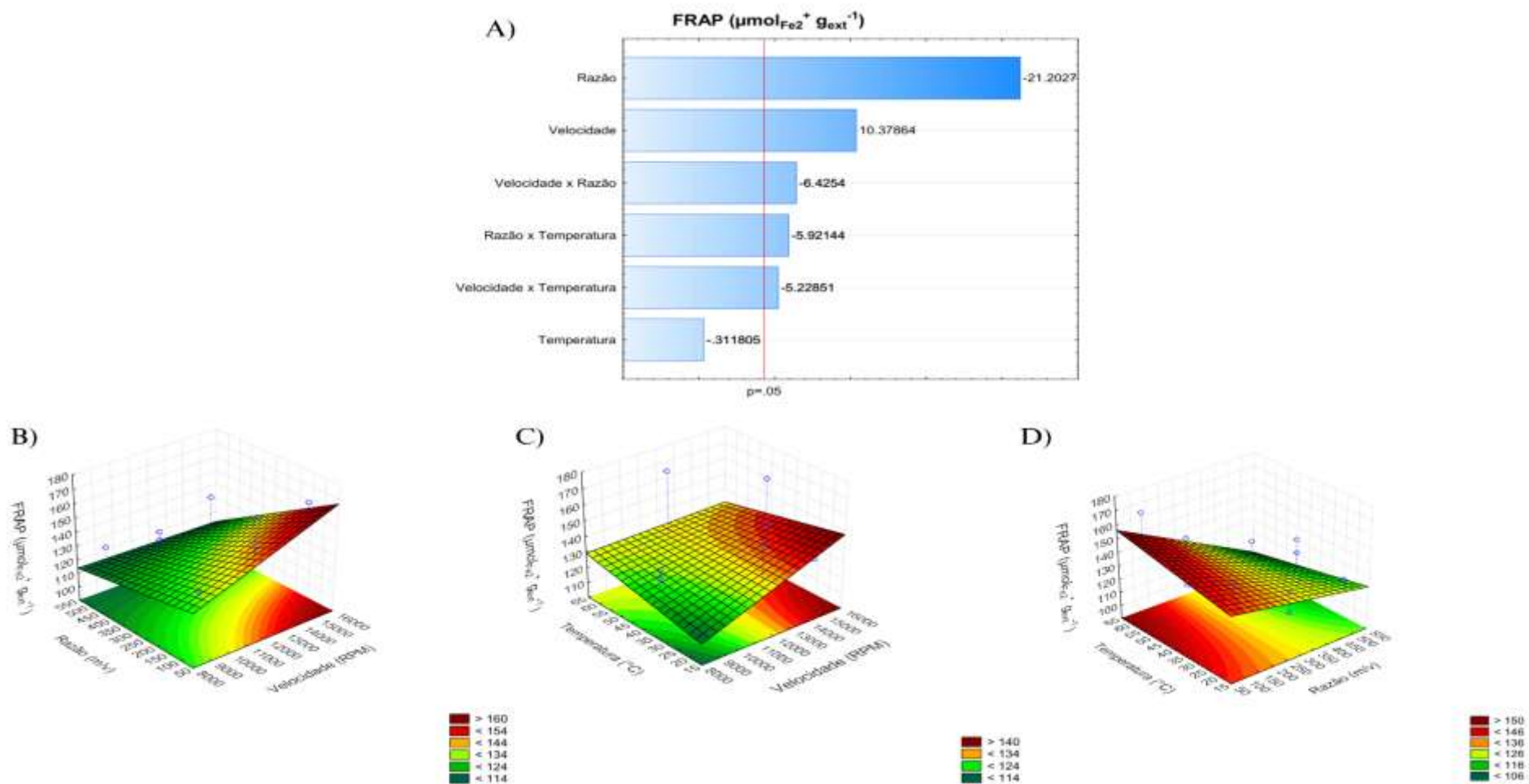


Figura 2. Diagrama de Pareto para o efeito das variáveis independentes frente à capacidade antioxidante por FRAP (A) e gráficos de superfície de resposta das interações entre as variáveis razão \times velocidade (B), temperatura \times velocidade (C) e temperatura \times razão (D).

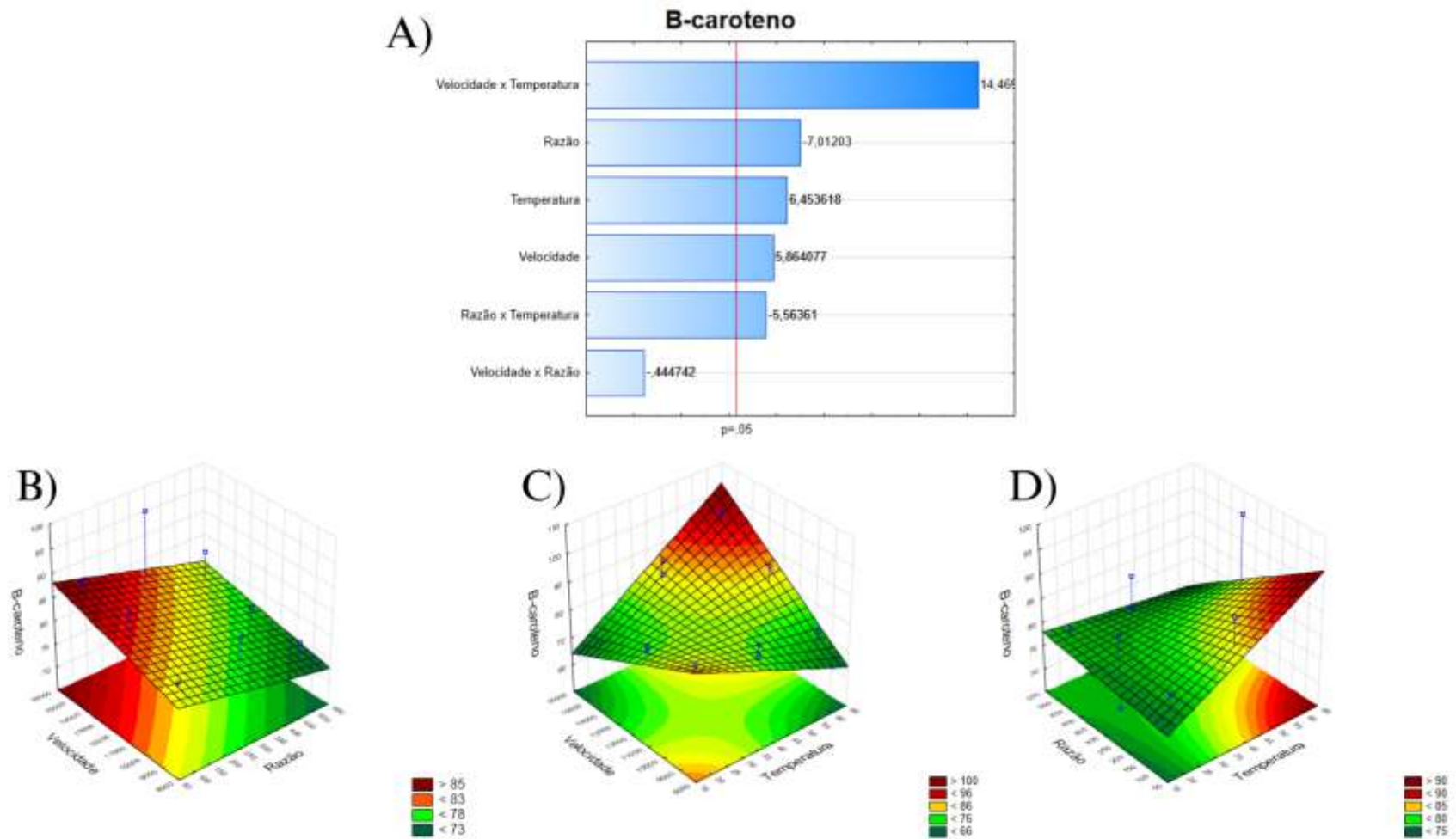


Figura 3. Diagrama de Pareto para o efeito das variáveis independentes frente à capacidade antioxidante por β -caroteno (A) e gráficos de superfície de resposta das interações entre as variáveis razão \times velocidade (B), temperatura \times velocidade (C) e temperatura \times razão (D).

Assim, para encontrar o ponto ótimo das extrações, foi realizada a análise estatística de desejabilidade, onde as condições apontadas como ótimas para a extração foram: velocidade de 15000 rpm, razão soluto:solvente 1:10 g mL⁻¹ e temperatura de 20 °C. Processos extrativos conduzidos em temperaturas baixas ou próximas à ambiente (20–25 °C) apresentam vantagens significativas sob as perspectivas tecnológica, econômica e ambiental. A operação em condições térmicas brandas reduz a necessidade de aporte de calor externo, diminuindo diretamente o consumo energético, aspecto especialmente relevante, considerando que grande parte dos custos operacionais industriais está associada à energia empregada em operações térmicas. Conforme destacado por Chongo (2025), métodos de extração “verdes” geralmente utilizam temperaturas moderadas ou ambiente, o que contribui para a redução do consumo energético e, simultaneamente, para a preservação de compostos bioativos termossensíveis, mantendo sua integridade química e funcional. De forma complementar, Faraldo e Byrne (2024) ressaltam que o calor de processo representa uma parcela expressiva do gasto energético industrial, e que estratégias que minimizam a demanda térmica podem reduzir significativamente os custos operacionais e favorecer a transposição para escala industrial. Nesse contexto, o método desenvolvido no presente estudo, a 20 °C, mostra-se vantajoso tanto do ponto de vista energético quanto econômico, além de estar alinhado aos princípios da extração sustentável, apresentando elevado potencial de escalonamento industrial.

Os valores preditos pela análise estatística de desejabilidade (anexo I) e os valores experimentais para as variáveis dependentes (rendimento, e capacidade antioxidante por FRAP e β-caroteno), bem como a caracterização do extrato pelos métodos de DPPH e ABTS estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização do extrato otimizado de *C. vulgaris* pela análise de desejabilidade.

Parâmetro	Valor predito	Valor experimental
Rendimento (%)	19,74	24,97
FRAP (μmolFe²⁺ g_{ext}⁻¹)	107,89	111,06 ± 1,40
BC (%)	69,31	66,98 ± 1,53
DPPH (μM_{Trolox})	-	268,81 ± 4,08
ABTS^{•+}(μmol_{Trolox} g_{ext}⁻¹)	-	121,11 ± 0

Média ± desvio padrão (n=3).

De modo geral, esses parâmetros estatísticos indicam que os modelos apresentaram elevada capacidade preditiva e são adequados para descrever e otimizar simultaneamente o rendimento e a capacidade antioxidante dos extratos. Assim, os resultados confirmam a validade da abordagem experimental adotada e demonstram que as equações obtidas podem ser utilizadas com segurança para a predição das respostas dentro da faixa experimental estudada.

Adicionalmente, quando comparado ao extrato preparado por infusão, observam-se incrementos de 13,7%, 44,9%, 45,0% e 3186,18% nas atividades antioxidantes por β -caroteno, ABTS, FRAP e DPPH, respectivamente, corroborando seu potencial para aplicação no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos e/ou alimentícios.

Através da análise cromatográfica exploratória do extrato otimizado foram identificados 29 compostos, sendo eles aminoácidos, ácidos graxos e derivados, derivados de clorofila, terpeno, vitamina e ácido carboxílico (Tabela 4). O maior número de compostos foi encontrado em modo de ionização negativa, sendo predominantemente a presença de ácidos graxos livres, enquanto no modo positivo predominaram os aminoácidos, conforme já apresentado em estudos anteriores (Pantami *et al.*, 2020; Kusnanda *et al.*, 2023).

Tabela 4. Composição química, por UHPLC-MS/MS, do extrato otimizado de *C. vulgaris*.

Pico	RT (min)	Composição	Molecular formula	Positivo (m/z)			Negativo (m/z)			Classe
				Teórico m/z	Experimental m/z	Área	Teórico m/z	Experimental m/z	Área	
1	1,32	Xantina	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	153,0407	153,0404	215062	-	-	-	Alcaloide de purina
2	13,72	Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	205,1950	205,1949	25278	-	-	-	Terpeno
3	14,45	9,12,15-Ácido octadecatrienóico (ácido linolênico)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279,2327	279,2309	67752	277,2162	277,216	1309515	Ácido graxo
4	1,88	Lisina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	147,1134	147,1125	25364	-	-	-	Aminoácido
5	1,23	Glutamato	C ₅ H ₉ NO ₄	148,0604	148,0600	366703	-	-	-	Aminoácido
6	1,31	Fenilamina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166,0862	166,08611	365317	-	-	-	Aminoácido
7	1,90	Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175,1187	175,1189	13369	-	-	-	Aminoácido
8	1,21	Citrulina	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	176,1029	176,1029	31634	-	-	-	Aminoácido
9	1,29	Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182,0811	182,081	153522	-	-	-	Aminoácido
10	3,40	Triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205,0971	205,0973	311728	-	-	-	Aminoácido
11	7,45	Ciclo(leucilprolil)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	211,1441	211,1445	83082	-	-	-	Dipeptídeo cíclico
12	15,51	Feoforbideo-a	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593,2758	593,2765	5959495	-	-	-	Derivado de clorofila
13	14,71	Feoforbideo-b	C ₃₅ H ₃₄ N ₄ O ₆	607,2551	607,2552	101549	-	-	-	Derivado de clorofila
14	1,63	Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	124,0393	124,0392	834159	-	-	-	Vitamina
15	9,68	Ácido azelaico	C ₉ H ₁₆ O ₄	-	-	-	187,0965	187,0969	924264	Ácido carboxílico
16	1,29	Ácido succínico	C ₄ H ₆ O ₄	-	-	-	117,0187	117,0191	4298362	Ácido dicarboxílico
17	11,75	(15Z)-9,12,13 Trihidroxi-15 ácido octadecenóico	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	-	-	-	329,2322	329,2322	1235244	Oxilipina

18	14,30	Palmitato de metil-3-hidroxi	$C_{17}H_{34}O_3$	-	-	-	285,2424	285,242	75214	Oxilipina
19	14,13	1-Palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	$C_{21}H_{44}NO_7P$	-	-	-	452,2771	452,276	61612	Fosfolipídio
20	13,94	1-linoleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	$C_{23}H_{44}NO_7P$	-	-	-	476,2761	476,277	135648	Fosfolipídio
21	16,40	Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	$C_{16}H_{32}O_2$	-	-	-	255,2318	255,2316	379383	Ácido graxo
22	15,32	Ácido heptadecanóico (ácido margárico)	$C_{17}H_{34}O_2$	-	-	-	269,2475	269,2478	46124	Ácido graxo
23	13,17	Ácido 12-hidroxidodecanóico	$C_{12}H_{24}O_3$	-	-	-	215,1652	215,1655	45676	Ácido graxo
24	15,85	Ácido octadecanóico (ácido esteárico)	$C_{18}H_{36}O_2$	-	-	-	283,263	283,2633	184927	Ácido graxo
25	13,41	Ácido 9-hidroxi-10,12-octadecadienoico	$C_{18}H_{32}O_3$	-	-	-	295,2278	295,2275	1255832	Ácido graxo
26	11,46	Ácido 9,12,13-tri-hidroxi-10(e),15(z)-octadecadienóico	$C_{18}H_{32}O_5$	-	-	-	327,2163	327,2172	604131	Ácido graxo
27	14,21	Ácido 7,10-hexadecadienoico	$C_{16}H_{28}O_2$	-	-	-	251,2005	251,201	274578	Ácido graxo
28	14,74	Ácido 9,12-octadecadienóico (ácido linoleico)	$C_{18}H_{32}O_2$	-	-	-	279,2318	279,2313	1282850	Ácido graxo
29	14,62	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico (ácido araquidônico)	$C_{20}H_{32}O_2$	-	-	-	303,2318	303,2317	40573	Ácido graxo

Destaca-se que o extrato tem potencial para desenvolver uma elevada ação terapêutica, uma vez que os aminoácidos detectados participam de múltiplos processos fisiológicos, desde o fornecimento de energia até a regulação da secreção hormonal, contribuindo diretamente para a atividade imunológica e metabólica (Li; Wu; Ye, 2022).

Ademais, os ácidos graxos identificados desempenham funções essenciais no ambiente celular, especialmente aqueles contendo hidroxilas e derivados oxidativos, que atuam como importantes mediadores de processos associados ao estresse oxidativo. Estes ácidos graxos essenciais também exercem papéis fundamentais na modulação da resposta inflamatória, na proteção das células do sistema nervoso central frente à lipotoxicidade e no fortalecimento da resposta imune (Urso; Zhou, 2021; Dyllal *et al.*, 2022). Cabe destacar que os ácidos graxos podem contribuir para a capacidade antioxidante, atuando na modulação lipídica (Losada-Barreiro *et al.*, 2022), influenciando a estabilidade das reações oxidativas de matrizes oleosas, assim o sistema β -caroteno/ácido linoleico mostrou-se particularmente adequado para avaliar a atividade antioxidante de matrizes ricas em compostos lipofílicos, por refletir de maneira realista os processos de oxidação destes sistemas (Losada-Barreiro; Paiva-Martins; Bravo-Díaz, 2024; Bora *et al.*, 2025).

Dessa forma, esses resultados evidenciam a importância do método otimizado para a obtenção de extratos com adequada capacidade antioxidante, além de contribuírem para o aprimoramento das técnicas de extração de compostos bioativos de *C. vulgaris* com vistas a aplicações industriais.

CONCLUSÕES

Visando à obtenção de um extrato com elevado potencial antioxidante, a condição ótima foi alcançada por turbo extração, empregando razão soluto:solvente de 1:10 (p/v), a 20 °C e 15000 rpm, por 15 minutos. Essa condição mostrou-se especialmente favorável para o desenvolvimento de novos produtos, uma vez que atendeu ao objetivo central do estudo. O extrato otimizado apresentou predominância de aminoácidos e ácidos graxos em sua composição, fornecendo subsídios relevantes para a maximização da extração de compostos bioativos e a aplicação bem-sucedida de métodos extrativos em *C. vulgaris*.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. G. *et al.* Application of biomass from the microalgae *Chlorella* sp. as biofertilizer in the cultivation of *Raphanus sativus* L. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2024. DOI: 10.33448/rsd-v13i1.44739.
- ALLMICROALGAE – Natural Products S.A. *Our process – Microalgae*. Disponível em: <https://www.allmicroalgae.com/en/our-process-microalgae/>. Acesso em: 02 mar. 2026.
- AGUSTINA, S.; AIDHA, N. N.; OKTARINA, E. The extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris* for cosmetics. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, p. 012057, 2021. DOI:10.1088/1757-899X/1011/1/012057.
- BANU, J. R. *et al.* Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy-techno economic and life-cycle analysis. **Bioresource technology**, v. 302, p. 1-14, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122822.
- BEJENARU, C. *et al.* Polyphenols Profile, and In Vitro Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Romanian Wild-Grown Acer spp. (Sapindaceae). **Preprints**, p. 1-21, 2025. DOI: 10.20944/preprints202501.0083.v1.
- BITO, T. *et al.* Potential of *Chlorella* as a dietary supplement to promote human health. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2524, 2020. DOI: 10.3390/nu12092524.
- BORA, B. *et al.* Comparison between Indian and commercial chamomile essential oils: chemical compositions, antioxidant activities and preventive effect on oxidation of Asian seabass visceral depot fat oil. **Food Chemistry**, v. 26, p. 1-12, 2025 DOI: 10.1016/j.fochx.2025.102292.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 839, de 14 de dezembro de 2023**. Dispõe sobre a comprovação de segurança e a autorização de uso de novos alimentos e novos ingredientes. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 15 dez. 2023. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-839-de-14-de-dezembro-de-2023-531394967>.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 894, de 27 de agosto de 2024**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Cosmetovigilância para as empresas titulares da regularização de produtos cosméticos junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 28 ago. 2024. Disponível em: <https://anvisa.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-894-de-27-de-agosto-de-2024-531394967>.
- CAPEK, P. *et al.* *Chlorella vulgaris* α -L-arabino- α -L-rhamno- α , β -D-galactan structure and mechanisms of its anti-inflammatory and anti-remodelling effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 162, p. 188-198, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.151.
- CHAUDHARI, S. P.; BAVISKAR, D.T. Anti-inflammatory Activity of *Chlorella vulgaris* in Experimental models of Rats. **Int. J. Pharm. Investigation**, v. 11, n. 4, p. 358-361, 2021. DOI: 10.5530/ijpi.2021.4.64.

- CHEN, Y. *et al.* Extraction optimization of polysaccharides from wet red microalga *Porphyridium purpureum* using response surface methodology. **Marine Drugs**, v. 22, n. 11, p. 498, 2024. DOI: 10.3390/md22110498.
- CHONGO, Y. Extraction methods of bioactive compounds: a sustainability approach. **J. Food Sci. Gastron**, v. 3, n. 1, p. 29-37, 2025. DOI: 10.5281/zenodo.14610634.
- DAMMAR, I.; TANTI, I.; AMIR, L. R. Analysis of Polyphenol and Antioxidant *Chlorella Vulgaris* Extract: Preliminary Study. **Journal of International Dental and Medical Research**, v. 16, n. 1, p. 149-153, 2023.
- DYALL, S. C. *et al.* Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. **Progress in lipid research**, v. 86, p. 1-24, 2022. DOI: 10.1016/j.plipres.2022.101165.
- DOLGANYUK, V. *et al.* Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. **Biomolecules**, v. 10, n. 8, p. 1-24 2020. DOI: 10.3390/biom10081153.
- FARALDO, F.; BYRNE P. A Review of Energy-Efficient Technologies and Decarbonating Solutions for Process Heat in the Food Industry. **Energies**, v. 17, n. 12, p. 3051, 2024. DOI: 10.3390/en17123051.
- GÓMEZ-LUNA, L.; TORMOS-CEDENO, L.; ORTEGA-DÍAZ, Y. Cultivo y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: principales tendencias y potencialidades en la agricultura. **Tecnología Química**, v. 42, n. 1, p. 70-93, 2022. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S222461852022000100070&script=sci_arttext&tlng=pt
- GRANELLA, S. J. *et al.* Pretreated banana peels as a source for the recovery of phenolic compounds: extraction kinetics, ultrasound optimization, and conventional extraction methods. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 34, p. 100484, 2023. DOI:10.1016/j.jarmap.2023.100484.
- ISLAM, M. T. *et al.* Maceration-Vortex-Technique (MVT), a rapid and new extraction method in phyto-pharmacological screening. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 6, p. 1-3, 2016.
- JACOBUCCI, N.A.O. *et al.* Extractive optimization of bioactive compounds in aerial parts of *cuphea carthagenensis* using Box-Behnken experimental design. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2025. DOI: 10.1080/14786419.2024.2448845.
- JE, S.; YAMAOKA, Y. Biotechnological Approaches for Biomass and Lipid Production Using Microalgae *Chlorella* and Its Future Perspectives. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 32, n. 11, p. 1357-1372, 2022. DOI: 10.4014/jmb.2209.09012.
- KUSNANDA, A. J. *et al.* Antioxidant and α -glucosidase inhibitor activity characterization of bioactive components from *Parachlorella kessleri* AUP5. **AACL Bioflux**, v. 16, n. 4, p. 2252–2263, 2023.
- LANG, Y. *et al.* Classificação e ensaios antioxidantes de polifenóis: uma revisão. **Journal of Future Foods**, v. 4, n. 3, p. 193-204, 2024. DOI: 10.1016/j.jfutfo.2023.07.002.
- LI, M.; WU, Y.; YE, L. The role of amino acids in endothelial biology and function. **Cells**, v. 11, n. 8, p. 1-27, 2022. DOI: 10.3390/cells11081372.

- LOSADA-BARREIRO, S. *et al.* Biochemistry of antioxidants: Mechanisms and pharmaceutical applications. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, p. 1-47, 2022 DOI: 10.3390/biomedicines10123051.
- LOSADA-BARREIRO, S.; PAIVA-MARTINS, F.; BRAVO-DÍAZ, C.. Analysis of the efficiency of antioxidants in inhibiting lipid oxidation in terms of characteristic kinetic parameters. **Antioxidants**, v. 13, n. 5, p. 1-22, 2024. DOI: 10.3390/antiox13050593.
- MATTOS, L. M. *et al.* Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema β -caroteno/ácido linoléico. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, 2009.
- MESADRI, J.; WAGNER, R.; FAGUNDES, M. B. Potencial das microalgas na indústria farmacêutica. *In*: SEVERO I. A.; DO NASCIMENTO T. C.; FAGUNDES M. B.(org.) **Microalgas: potenciais aplicações e desafios**. Canoas, RS. Mérida Publishers, 2021, cap. 2, p. 45-62. *In*: <https://www.meridapublishers.com/mpad/mpad.pdf#page=45>.
- PANTAMI, H. A. *et al.* Comprehensive GCMS and LC-MS/MS metabolite profiling of *Chlorella vulgaris*. **Marine drugs**, v. 18, n. 7, p. 367, 2020. DOI: 10.3390/md18070367.
- PRADHAN, B. *et al.* Evaluation of the anti-bacterial activity of methanolic extract of *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] with special reference to antioxidant modulation. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-11, 2021. DOI:10.1186/s43094-020-00172-5.
- PRUTEANU, L. L. *et al.* The biochemistry and effectiveness of antioxidants in food, fruits, and marine algae. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p.1-32, 2023. DOI: 10.3390/antiox12040860.
- RASHEED, R. *et al.* Sustainable Food Production and Nutraceutical Applications from Qatar Desert *Chlorella* sp. (Chlorophyceae). **Animals**, v. 10, n. 8, p. 1-16, 2020. DOI 10.3390/ani10081413.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- SANTOS, K. A. *et al.* Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): Supercritical CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 114, p. 1-8, 2016.
- SIBI, G.; RABINA, S. Inhibition of pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella vulgaris* extracts. **Pharmacognosy research**, v. 8, n. 2, p. 118, 2016. DOI: 10.4103%2F0974-8490.172660.
- SILVEIRA, A. C. *et al.* Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2018. 11p.
- SHAHIDI, F.; SAMARASINGHE, A. Como avaliar a atividade antioxidante? Avanços, limitações e aplicações de abordagens *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 7, n. 50, p. 1-107, 2025. DOI: 10.1186/s43014-025-00326-z.
- SHERAFATI, N. *et al.* Effect of supplementation with *Chlorella vulgaris* on lipid profile in adults: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 66, p. 1-12, 2022. DOI: 10.1016/j.ctim.2022.102822.

STRAMARKOU, M. *et al.* Optimization of green extractions for the recovery of docosahexaenoic acid (DHA) from *Cryptocodinium cohnii*. **Algal Research**, v. 58, p. 1-10, 2021. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102374.

SOUSA, V. *et al.* Microalgae biomass as an alternative source of biocompounds: New insights and future perspectives of extraction methodologies. **Food Research International**, p. 113282, 2023. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113282.

TEIXEIRA, G. R. *et al.* (2025). Otimização extrativa de compostos bioativos dos frutos de *Malpighia emarginata* DC. através do planejamento experimental Box-Behnken. [Dissertação de Mestrado, Universidade Paranaense]. Repositório da Universidade Paranaense.

URSO, C. J.; ZHOU, H. Palmitic acid lipotoxicity in microglia cells is ameliorated by unsaturated fatty acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 9093, 2021. DOI: 10.3390/ijms22169093.

WANG, N. *et al.* Rapid screening of microalgae as potential sources of natural antioxidants. **Foods**, v. 12, n. 14, p. 2652, 2023. DOI: 10.3390/foods12142652.

YARMOHAMMADI, S. *et al.* Effect of *Chlorella vulgaris* on liver function biomarkers: a systematic review and meta-analysis. **Clinical nutrition research**, v. 10, n. 1, p. 83-94, 2021. DOI: 10.7762/cnr.2021.10.1.83.

ZHOU, L. *et al.* Extraction and characterization of bioactive compounds from diverse marine microalgae and their potential antioxidant activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 11, p. 1-11, 2023. DOI: 10.1002/cbdv.202300602.

ANEXOS I. Análise de desejabilidade

