

**Extração de Compostos Ómega-3 da
Microalga Marinha *Cryptocodinium cohnii***

Estudo do Efeito do Pré-tratamento da Matriz
Sólida e do Uso de *Biobased Solvents*

Filipe Manuel Sampaio Carreira de Menezes e Rosa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Orientadores:

Dr. Maria Beatriz Pinto Pereira Palma Nobre, Ph.D

Dr. Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva, Ph.D

Júri

Presidente: Prof. Dr. Maria Teresa Nogueira Leal da Silva Duarte, Ph.D

Orientador: Dr. Maria Beatriz Pinto Pereira Palma Nobre, Ph.D

Vogal: Dr. Patrícia Maria Azevedo Moniz, Ph.D

Novembro 2022

Agradecimentos

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto PTDC/EAM-AMB/30169/2017, intitulado "OMEGAFUEL - Nova plataforma para a produção de biocombustíveis e compostos ómega-3, da microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* biorrefinaria sustentável".

FCT (Portugal) UIDP/00100/2020, UIDP/00100/2020 e pelo financiamento do Laboratório Associado: Instituto de Ciências Moleculares (IMS) através do projeto LA/P/0056/202.

Em seguida, gostaria de agradecer aos meus pais. Foi graças ao vosso esforço e apoio que me foi possível concluir o curso e participar em todas as atividades a ele inerentes.

Às minhas orientadoras, Dr. Maria Beatriz Pinto Pereira Palma Nobre e Dr. Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva o meu maior e mais sincero obrigado. Foi graças ao vosso acompanhamento cuidado ao longo de todo este estágio que o meu trabalho foi possível.

À Dr. Patrícia Moniz, o meu agradecimento pela disponibilidade e simpatia com que sempre me acompanhou e a todo o conhecimento transmitido relativamente à fermentação de microalgas.

Ao Dr. Roseiro, agradeço não só o tempo e a paciência despendidos com a matriz experimental e a análise estatística, mas também a disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

Às minhas colegas de estágio, um obrigado por toda a ajuda que me deram e pela companhia que me fizeram durante toda esta etapa.

Ao restante pessoal do LNEG, agradeço-vos por todo o auxílio prestado durante o período que estagiei convosco, em especial às técnicas e auxiliares da Unidade de Bioenergia e Biorrefinarias do LNEG, Graça Conceição e Natércia Santos, por o todo o apoio no trabalho de laboratório.

Aos meus colegas de curso, Bárbara Jesus, Marco Estêvão, Marta Silva e Margarida Correia, um obrigado não é suficiente. Se hoje estou aqui, foi graças ao vosso companheirismo e empenho. Agradeço-vos por todo o apoio que me prestaram ao longo do curso, tanto a nível escolar como pessoal.

À minha restante família (em especial o meu irmão, cunhada, sobrinho e avó, onde quer que estejas) e amigos (Daniela, Martim, Nicole, Rafael e Sophia), obrigado também por todo o apoio que me deram ao longo dos anos. Foi também graças a vós que estou onde estou. Obrigado pelo conforto nos momentos menos bons.

À Dr. Fernanda Mendes Barata, o meu obrigado pela ajuda prestada e o profissionalismo demonstrado ao longo dos anos em que estivemos juntos. A sua presença ajudou-me a encontrar o meu caminho.

Finalmente, obrigado, Zé Miguel. Foste uma adição recente, mas imprescindível para o meu sucesso e felicidade.

Resumo

Neste trabalho, procedeu-se à fermentação da microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* num reator de bancada, usando um regime *fed-batch*. Realizaram-se quatro fermentações com o objetivo de maximizar a acumulação de lípidos e ácidos gordos (TFA), em específico o ácido docosaheptaenoico (DHA), um composto de valor acrescentado. Os pigmentos acumulados foram também quantificados por espectrofotometria e cromatografia líquida. O teor de humidade e cinzas foi calculado para a eliminação da sua interferência nos resultados. Apenas a biomassa obtida no Ensaio IV acumulou lípidos suficientes que justificassem a extração: 26.58%(m/m), 25.45%(m/m) e 9.21%(m/m) em lípidos, TFA e DHA, respetivamente. Também se realizou um planeamento experimental utilizando a extração acelerada com solventes (ASE), de forma a estudar a influência dos fatores temperatura e tempo de extração no rendimento, utilizando solventes verdes. As melhores condições de extração, para ambos os solventes, foram 2 minutos e 200°C, obtendo-se 24.5 g/100g_{BM} em TFA e 9.2 g/100g_{BM} in DHA, para o acetato de etilo, e 26.2 g/100g_{BM} in TFA e 9.0 g/100g_{BM} em DHA, para o 2-metiltetrahidrofurano. Concluiu-se que nenhum dos fatores tem grande influência no rendimento da extração, sendo sempre elevado. Realizaram-se, também, extrações supercríticas (ESC) com CO₂ de forma a avaliar o efeito de mecanismos de rutura celular (homogeneização a alta pressão, HPH, e moagem no moinho de bolas) e métodos de secagem (convectiva e liofilização) no rendimento da extração em lípidos, TFA e DHA, concluindo que ambos os métodos de rutura celular são igualmente efetivos e a liofilização produz melhores resultados que a secagem convectiva.

Palavras-chave: *Cryptocodinium cohnii*, ácido docosaheptaenoico, ácidos gordos, extração acelerada com solventes, extração supercrítica, pigmentos.

Abstract

In this study, marine microalgae *Cryptocodinium cohnii* was cultivated in a bench bioreactor under a fed-batch regime. Four experiments were carried out with the goal of obtaining a biomass high yielding in lipids and fatty acids, especially docosahexaenoic acid (DHA), a value-added compound. The microalgal pigments were also analysed. Moisture and ashes content was evaluated to remove their influence in the results. Only Experiment IV yielded a biomass with enough lipids worth extracting. It yielded a biomass with 26.58%(m/m), 25.45%(m/m) and 9.21%(m/m) of lipids, fatty acids and DHA and 61.37 $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ of pigments, respectively. This biomass was used for the experimental planning using accelerated solvent extraction (ASE). This consisted of studying the influence of temperature and extraction time on extraction yield and was done using green solvents. The best extraction conditions, for both solvents, were 2 minutes and 200°C, yielding 24.5 g/100g_{BM} in fatty acids and 9.2 g/100g_{BM} in DHA, for ethyl acetate, and 26.2 g/100g_{BM} in fatty acids and 9.0 g/100g_{BM} in DHA, for 2-methyltetrahydrofuran. Time and temperature did not significantly affect extraction yield. Moreover, supercritical CO₂ extraction studies were also carried out with the aim of evaluating the influence of cell disruption mechanisms (high pressure homogenization and ball milling) and drying processes (convection and freeze drying) on the yield of total lipids, total fatty acids and DHA, concluding that freeze drying is the best drying method and HPH and ball milling are both efficient at cell breakage.

Keywords: *Cryptocodinium cohnii*, docosahexaenoic acid, fatty acids, accelerated solvent extraction, supercritical extraction, pigments.

Conteúdos

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Conteúdos.....	ix
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Símbolos.....	xviii
1 Introdução	1
1.1 Microalgas.....	1
1.1.1 Microalgas como fonte de ω -3	1
1.1.1.1 Definição de ω -3	1
1.1.1.2 DHA e benefícios para a saúde.....	1
1.1.2 Microalgas como fonte de biodiesel	2
1.1.2.1 Produção de biodiesel: Transesterificação	2
1.1.2.2 Biodiesel microalgal	2
1.1.3 <i>Cryptocodinium cohnii</i>	3
1.1.3.1 Caracterização.....	3
1.1.3.2 Fermentação.....	4
1.1.3.2.1 Composição do Meio	4
1.1.3.2.2 Taxa de Crescimento.....	4
1.2 Métodos de extração.....	5
1.2.1 Métodos convencionais.....	5
1.2.1.1 Maceração	5
1.2.1.2 Percolação.....	5
1.2.1.3 Decocção.....	5
1.2.1.4 Destilação por arrastamento de vapor.....	5
1.2.1.5 Extração por refluxo	6
1.2.1.6 Extração Soxhlet.....	6
1.2.1.6.1 Extração Soxhlet de alta pressão.....	7
1.2.1.6.2 Extração Soxhlet automatizada.....	7
1.2.1.6.3 Extração Soxhlet assistida por ultrassons	7
1.2.1.6.4 Extração Soxhlet assistida por micro-ondas.....	7
1.2.2 Métodos de extração alternativos.....	8
1.2.2.1 Extração assistida por ultrassons	8
1.2.2.2 Extração assistida por micro-ondas.....	8
1.2.2.3 Tecnologias elétricas de extração	8

1.2.2.4	Extração assistida por plasma frio.....	9
1.2.2.5	Extração assistida por encapsulamento.....	9
1.2.2.6	Extração com líquidos pressurizados.....	9
1.2.2.7	Extração com fluidos supercríticos.....	9
1.2.3	Métodos de extração verdes.....	9
1.2.3.1	Extração assistida por enzimas.....	9
1.2.3.2	Extração assistida por membranas.....	9
1.2.3.3	Extração com líquidos pressurizados.....	10
1.2.3.3.1	Modelo da extração.....	10
1.2.3.3.2	Funcionamento do equipamento.....	10
1.2.3.3.3	Solventes utilizados.....	11
1.2.3.3.4	Efeito da temperatura.....	11
1.2.3.3.5	Efeito da pressão.....	12
1.2.3.4	Extração com fluidos supercríticos.....	12
1.2.3.4.1	Modelo da extração.....	12
1.2.3.4.2	Funcionamento do equipamento.....	13
1.2.3.4.3	Solventes utilizados.....	14
1.2.3.4.4	Efeito da pressão e da temperatura.....	14
1.3	Métodos de pré-tratamento.....	14
1.3.1	Moagem no moinho de bolas.....	15
1.3.2	Homogeneização a alta pressão.....	15
1.4	Métodos de secagem.....	15
1.4.1	Liofilização.....	16
1.4.2	Secagem convectiva.....	16
1.5	Solventes verdes.....	16
1.5.1	Definição.....	16
1.5.2	Fluidos supercríticos.....	17
1.5.3	Solventes <i>biobased</i>	17
1.5.3.1	Acetato de Etilo.....	17
1.5.3.2	2-metiltetrahidrofurano.....	18
1.6	Objetivos.....	18
2	Materiais e métodos.....	20
2.1	Reagentes e equipamento.....	20
2.2	Fermentação de <i>C. Cohnii</i>	20
2.2.1	Preparação dos meios de crescimento.....	20
2.2.2	Fontes de Carbono.....	20
2.2.3	Fermentação no biorreator.....	21

2.2.4	Condições operatórias e sistema de controle da fermentação	22
2.2.4.1	Temperatura	22
2.2.4.2	pH	22
2.2.4.3	Oxigênio dissolvido	22
2.2.4.4	Densidade ótica	22
2.2.4.5	Citometria de fluxo	23
2.2.4.6	Observações microscópicas	24
2.2.4.7	Determinação experimental do peso seco.....	24
2.2.4.8	Quantificação do consumo da fonte de carbono.....	24
2.2.4.9	Quantificação do azoto.....	24
2.2.5	Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	25
2.2.5.1	Taxa específica de crescimento	25
2.2.5.2	Produtividade volumétrica média e instantânea	25
2.2.5.3	Composição e produtividade volumétrica de ácidos gordos	26
2.2.6	Pós-tratamento da biomassa.....	26
2.2.6.1	Determinação de humidade e cinzas	26
2.2.6.2	Determinação do perfil de ácidos gordos	27
2.3	Métodos de extração de lípidos.....	28
2.3.1	Pré-tratamento da biomassa	28
2.3.1.1	Moagem no moinho de bolas	29
2.3.1.2	Homogeneização a alta pressão (HPH)	29
2.3.2	Extração Soxhlet.....	29
2.3.3	Extração acelerada com solventes.....	30
2.3.3.1	Planeamento experimental.....	32
2.3.4	Extração supercrítica.....	34
2.3.4.1	Técnica experimental	36
2.3.5	Quantificação dos lípidos totais no extrato	37
2.4	Pigmentos da microalga <i>C. cohnii</i>	38
3	Resultados e discussão.....	39
3.1	Fermentações de <i>Cryptocodinium cohnii</i>	39
3.1.1	Ensaio I.....	39
3.1.2	Ensaio II.....	39
3.1.2.1	Monitorização da fermentação	39
3.1.2.2	Caracterização da biomassa.....	42
3.1.3	Ensaio III.....	42
3.1.3.1	Monitorização da fermentação	42
3.1.3.2	Caracterização da biomassa.....	43

3.1.4	Ensaio IV.....	43
3.1.4.1	Monitorização da fermentação	43
3.1.4.2	Caracterização da biomassa	47
3.1.5	Ensaio anteriores	48
3.1.5.1	Biomassa HPH e liofilizada	48
3.1.5.2	Biomassa HPH e seca na estufa.....	49
3.2	Extração de lípidos.....	49
3.2.1	Extração Soxhlet	50
3.2.2	Extração acelerada com solventes.....	52
3.2.2.1	Resultados utilizando acetato de etilo	53
3.2.2.1.1	Análise das superfícies de resposta.....	54
3.2.2.1.2	Análise dos parâmetros do planeamento experimental e validação estatística do modelo polinomial.....	55
3.2.2.2	Resultados com 2-metiltetrahidrofurano.....	56
3.2.2.2.1	Análise das superfícies de resposta.....	58
3.2.2.2.2	Análise dos parâmetros do planeamento experimental e validação estatística do modelo polinomial.....	59
3.2.3	Extração supercrítica.....	60
3.3	Extração de pigmentos.....	65
3.3.1	Extração Soxhlet.....	65
3.3.2	Extração acelerada com solventes.....	66
3.3.2.1	Caracterização da biomassa	66
3.3.2.2	Matriz experimental.....	67
3.3.2.2.1	Análise das superfícies de resposta.....	68
3.3.2.2.2	Análise dos parâmetros do planeamento experimental e validação estatística do modelo polinomial.....	70
3.3.3	Extração supercrítica.....	71
3.3.4	Análise dos pigmentos presentes no extrato lipídico	73
4	Conclusões e trabalho futuro.....	75
	Referências.....	79
	Anexo A – Reagentes e solventes.....	81
	Anexo B – Correção do volume do contador na ESC	82
	Cálculo da pressão do gás à saída do contador	82
	Correção do volume de dióxido de carbono consumido.....	82
	Anexo C – Análise de Pigmentos	83

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Condições experimentais obtidas pela distribuição de Doehlert.....	32
Tabela 2 – Níveis dos fatores testados codificados	33
Tabela 3 – Composição percentual da biomassa resultante do Ensaio II (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos totais (TFA) nos lípidos totais (LT).	42
Tabela 4 – Composição percentual da biomassa resultante do Ensaio III (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos totais (TFA) nos lípidos totais (LT).	43
Tabela 5 – Evolução do perfil de ácidos gordos (%FA _i /TFA) e lípidos totais, para t>94 h, no Ensaio IV.....	46
Tabela 6 – Composição percentual da biomassa resultante do Ensaio IV (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos totais (TFA) nos lípidos totais (LT).	47
Tabela 7 – Composição percentual da biomassa HPH e liofilizada (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos nos lípidos totais.	48
Tabela 8 – Composição percentual da biomassa HPH e estufa (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos nos lípidos totais.....	49
Tabela 9 – Fração de lípidos totais, ácidos gordos totais e DHA das biomassas provenientes das culturas realizadas neste trabalho, utilizando a extração Soxhlet. Resultados em %(m/m) e a biomassa é seca e livre de cinzas.	50
Tabela 10 – Fração de lípidos totais, ácidos gordos totais e DHA das biomassas* submetida a diferentes tratamentos de secagem e rutura celular, utilizando a extração Soxhlet. Resultados em %(m/m) e a biomassa é seca e livre de cinzas.	50
Tabela 11 – Resultados obtidos experimentalmente no ASE, utilizando acetato de etilo.....	53
Tabela 12 – Coeficientes do modelo polinomial que descrevem as respostas avaliadas no planeamento experimental e validação dos mesmos, para o solvente acetato de etilo. O fator 1 e o fator 2 correspondem à temperatura e ao tempo de extração, respetivamente.	56
Tabela 13 – Resultados obtidos experimentalmente no ASE, utilizando 2-metiltetrahidrofurano.	57
Tabela 14 – Coeficientes do modelo polinomial que descrevem as respostas avaliadas no planeamento experimental e validação dos mesmos, para o solvente 2-metiltetrahidrofurano. O fator 1 e o fator 2 correspondem à temperatura e ao tempo de extração, respetivamente.	59
Tabela 15 – Resultados obtidos para a concentração de pigmentos através da extração Soxhlet, em hexano. Resultados em µg/g _{BM}	66
Tabela 16 – Resultados obtidos para a concentração de pigmentos através do ASE, em hexano. Resultados em µg/g _{BM}	66
Tabela 17 – Resultados experimentais para a matriz experimental de ASE usando acetato de etilo (Ac.Et.) e 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF). Resultados em µg/g _{BM}	67
Tabela 18 – Coeficientes do modelo polinomial que descrevem as respostas avaliadas no planeamento experimental e validação dos mesmos, para os solventes acetato de etilo e 2-metiltetrahidrofurano. O fator 1 e o fator 2 correspondem à temperatura e ao tempo de extração, respetivamente.	70
Tabela 19 – Teores relativos dos carotenoides e carotenos obtidos por análise por HPLC para os extratos lípidos dos vários métodos.....	74

Tabela A1.1 – Reagentes e solventes utilizados na atividade experimental81

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação da molécula de DHA. Adaptado de [6].	2
Figura 2 – Reação de transesterificação. R_1 a R_3 são cadeias de hidrocarbonetos. Adaptado de [3].	2
Figura 3 – Representação esquemática da microalga <i>C. cohnii</i> . Adaptado de [2]. a: vista ventral. b: vista dorsal. LF: flagelo longitudinal, TF: flagelo transversal.	4
Figura 4 – Esquema da montagem experimental da extração Soxhlet. Adaptado de [8].	6
Figura 5 – Curva de ESC genérica (tempo vs rendimento acumulado em massa) com identificação das três fases de extração. Adaptado de [18].	13
Figura 6 – Biorreator da Electrolab Biotec, modelo FerMac 360, utilizado nos ensaios.	21
Figura 7 – Resumo esquemático das diversas operações a que foi submetida a biomassa microalgal após fermentação.	29
Figura 8 – Montagem experimental da extração Soxhlet.	30
Figura 9 – Imagem do equipamento utilizado (à esquerda) e representação esquemática (à direita).	31
Figura 10 – Equipamento de extração supercrítica utilizado na atividade experimental.	34
Figura 11 – Representação esquemática do equipamento de extração supercrítica utilizado no presente trabalho. 1 – garrafa de CO_2 ; 2 – válvula de não retorno; 3 – serpentina arrefecida com gelo; 4 – filtro de alta pressão; 5 – bomba de circulação; 6,7 – manómetros; 8 – regulador de pressão; 9 – serpentina aquecida no banho; 10,11 – células de extração; 12 – válvula de expansão (3 vias); 13 – tubo de recolha, de vidro e em U; 14 – rotâmetro; 15 – contador de gás húmido; 16 – banho termostático de água; 17-26 – válvulas.	34
Figura 12 – Evolução temporal da contagem celular e da absorvância corrigida no Ensaio II.	39
Figura 13 – Evolução dos pesos secos calculados por espectrofotometria, citometria e experimentalmente, para o Ensaio II.	40
Figura 14 – Evolução da concentração de fonte de carbono ao longo do tempo para o Ensaio II.	40
Figura 15 – Distribuição das várias subpopulações da cultura, ao longo do tempo, no Ensaio II.	41
Figura 16 – Evolução temporal da contagem celular e da absorvância corrigida no Ensaio IV	44
Figura 17 – Evolução dos pesos secos calculados por espectrofotometria e citometria, para o Ensaio II.	44
Figura 18 – Evolução da concentração de fonte de carbono ao longo do tempo para o Ensaio IV.	45
Figura 19 – Evolução da %DHA e %TFA na biomassa seca e livre de cinzas, %DHA nos TFA e produtividade de DHA.	45
Figura 20 – Distribuição das várias subpopulações da cultura, ao longo do tempo, no Ensaio IV.	46
Figura 21 – Perfil de ácidos gordos para a extração Soxhlet, em hexano, do Ensaio IV.	52

Figura 22 – Superfícies de resposta, obtidas no planeamento experimental, para os fatores de resposta, utilizando acetato de etilo como solvente.	54
Figura 23 – Superfícies de resposta, obtidas no planeamento experimental, para os fatores de resposta, utilizando 2-metiltetrahidrofurano como solvente.	58
Figura 24 – Curva cumulativa do rendimento de extração em lípidos ao longo do tempo, a 41°C e 300 bar, para as várias condições de pré-tratamento da biomassa.	62
Figura 25 – Comparação do rendimento em lípidos obtido pelas várias técnicas de extração, para os diversos pré-tratamentos da biomassa.	62
Figura 26 – Curva cumulativa do rendimento de extração em ácidos gordos totais (TFA) ao longo do tempo, a 41°C e 300 bar, para as várias condições de pré-tratamento da biomassa.	63
Figura 27 – Curva cumulativa do rendimento de extração em DHA ao longo do tempo, a 41°C e 300 bar, para as várias condições de pré-tratamento da biomassa.	63
Figura 28 – Comparação do rendimento em ácidos gordos totais (à esquerda) e em DHA (à direita) obtido pelas várias técnicas de extração, para os diversos pré-tratamentos da biomassa.	64
Figura 29 – Curva cumulativa do rendimento de extração em lípidos, ácidos gordos totais (TFA) e DHA ao longo do tempo, no ensaio a 41°C e 300 bar, e no ensaio de extração em duas etapas: 41°C/150 bar → 41°C/300 bar, para a biomassa liofilizada e moída no moinho de bolas.	64
Figura 30 – Superfícies de resposta, obtidas no planeamento experimental, para os fatores de resposta, utilizando acetato de etilo e 2-metiltetrahidrofurano como solvente. Leia-se “µg/g biomassa” no topo da figura.	69
Figura 31 – Curvas cumulativas do rendimento de extração de pigmentos totais, realizadas à temperatura de 41°C e pressão de 300 bar, para os vários pré-tratamentos da biomassa. ...	71
Figura 32 – Rendimento em pigmentos totais para os processos de extração estudados e os vários pré-tratamentos da biomassa.	73
Figura C.1 – Extratos lipídicos de <i>C. Cohnii</i> , em hexano, obtidos por ESC.	83
Figura C.2 – Padrões de β-caroteno.	83
Figura C.3 – Óleo obtido por extração Soxhlet da biomassa do Ensaio IV, em hexano.	84
Figura C.4 – Espectro de absorção, no visível, obtido por análise do concentrado de ASE da biomassa do Ensaio IV, em hexano.	84

Lista de Símbolos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AG – Ácido Gordo

AGT – Ácidos Gordos Totais

ASE – *Accelerated Solvent Extraction*

CFDA – *Carboxifluorescein Diacetate*

CSL – *Corn Steep Liquor*

DHA – Ácido Docosahexaenoico

DO – *Dissolved Oxygen*

ESC – Extração Supercrítica

FA – *Fatty Acid*

FAME – *Fatty Acids Methyl Esters*

GC – *Gas Chromatography*

HPH – *High-pressure Homogenization*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

LT – Lípidos Totais

OD – *Optical Density*

PBS – *Phosphate buffered Saline*

PI – *Propidium Iodide*

PLE – *Pressurized Liquid Extraction*

PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids*

TFA – *Total Fatty Acids*

YE – *Yeast Extract*

ω -3 – Ómega-3

1 Introdução

1.1 Microalgas

As microalgas são seres unicelulares e, regra geral, fotossintéticos. O seu interesse económico está nas suas diversas aplicações, como por exemplo: produção e acumulação de diversos lípidos, hidratos de carbono, vitaminas e pigmentos, entre outros; resistência a diversos contaminantes, o que permite a sua utilização no tratamento de águas residuais e lixiviados (biorremediação) e capacidade de captura do CO_2 atmosférico.[1] No que diz respeito à fração lipídica, são de sublinhar os óleos utilizáveis para a produção de biodiesel e os compostos de valor acrescentado como os ω -3, que possuem diversos efeitos benéficos para a saúde.[2] No que se refere aos biocombustíveis, para além do mencionado, são também utilizadas para a produção de biogás, biohidrogénio, biometano e bioetanol.[1]

Para além disso, apresentam diversas vantagens face a biomassas tradicionais (e.g., plantas). Exemplo disso são: alta eficiência fotossintética; produção rápida de biomassa; possibilidade da utilização de terrenos não aptos para a agricultura tradicional; maior rendimento de lípidos por unidade de área (seria necessária uma área cerca de 130 vezes maior para produzir a mesma quantidade de óleo a partir de soja, face a uma microalga com 30% de lípidos); não competição com a cadeia alimentar; menor mão de obra requerida; produtividade menos influenciada pelo clima (não são sazonais) e possibilidade de cultivo e extração contínuos (sem necessidade da interrupção do processo para manutenção do substrato).[3]

Apesar de todas as vantagens, existem ainda alguns entraves à sua utilização, nomeadamente: possível baixa produtividade (face a outros microrganismos como leveduras ou bactérias); custos elevados de mão de obra e extração; alta exigência de água e carecimento de proximidade a uma indústria para a captura de CO_2 . No caso da utilização de fotobiorreatores, poderá ainda existir o problema da acumulação de biomassa, sobreaquecimento, contaminação e deterioração do material transparente.[3]

1.1.1 Microalgas como fonte de ω -3

1.1.1.1 Definição de ω -3

Os ácidos gordos de ω -3 são ácidos gordos polinsaturados (*Poliunsaturated Fatty Acids*, PUFA) e são caracterizados por cadeias longas de carbono com mais de duas ligações duplas. Contêm um grupo carboxilo num terminal e um grupo metilo no outro. O carbono do grupo metilo é o carbono ω e é a partir daí que se conta a primeira ligação dupla.[4]

1.1.1.2 DHA e benefícios para a saúde

O ácido docosahexaenoico, DHA, é um PUFA com uma cadeia alquílica de 22 átomos de comprimento e 6 ligações duplas. Assim, o seu nome será ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico. Já na terminologia dos ácidos gordos, assume o nome de 22:6 ω -3.[5] Na Figura 1 pode observar-se a representação da sua molécula.

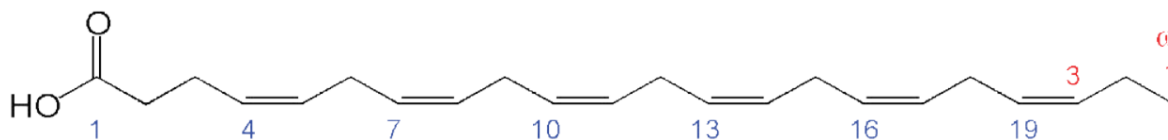


Figura 1 – Representação da molécula de DHA. Adaptado de [6].

O DHA possui efeitos benéficos para a saúde. No que diz respeito ao desenvolvimento fetal, este é imprescindível para a formação e manutenção do sistema nervoso. O mesmo se aplica em crianças, estando provada a relação entre a ingestão de DHA e o aumento da capacidade intelectual do indivíduo. A acuidade visual é também positivamente afetada. A probabilidade de contrair asma é menor.[7]

Já em adultos, o consumo continuado diminui o risco de hipertensão, enfarte, depressão e o declínio cognitivo. No que se refere a doenças oncológicas, uma dieta rica em DHA diminui a ocorrência e severidade de metástases. A sua ação é também anti-inflamatória, diminuindo a dor em pacientes que sofram, por exemplo, de artrite reumatoide.[7]

1.1.2 Microalgas como fonte de biodiesel

1.1.2.1 Produção de biodiesel: Transesterificação

O processo utilizado para a produção de biodiesel a partir de óleos é a transesterificação, pelo que é expectável que a produção de biodiesel microalgal utilize a mesma técnica. Esta consiste na reação do óleo obtido com um álcool (tipicamente metanol). O óleo é maioritariamente constituído por triglicéridos, pelo que, em primeiro lugar, estes serão convertidos em diglicéridos, depois monoglicéridos e, finalmente, em glicerol e ésteres metílicos de ácidos gordos (*Fatty Acids Methyl Esters*, FAME) – a fração de biodiesel.[3] Esta reação encontra-se ilustrada na Figura 2.

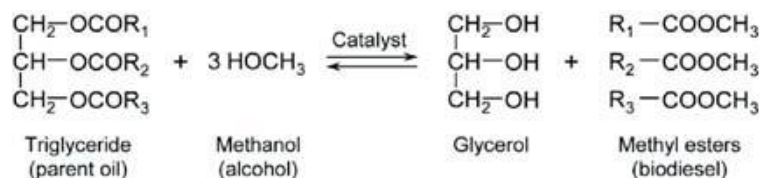


Figura 2 – Reação de transesterificação. R_1 a R_3 são cadeias de hidrocarbonetos. Adaptado de [3].

1.1.2.2 Biodiesel microalgal

Para que a utilização do biodiesel proveniente de microalgas seja possível, este deve obedecer às normas de qualidade impostas pela União Europeia. Os óleos obtidos pelas microalgas diferem dos vegetais na medida em que estes são mais ricos em insaturações, podendo ter quatro ou mais ligações duplas. Estas substâncias são mais suscetíveis à oxidação aquando do armazenamento, complicando a sua utilização para a produção de biodiesel, uma vez que, pelas normas europeias, a percentagem de FAME com quatro ou mais ligações duplas está reduzida a 1%.[3]

Pelo exposto, a maioria dos óleos de microalga não corresponderá aos padrões requeridos. No entanto, a diminuição das insaturações é possível por hidrogenação do óleo. [3]

De forma a diminuir os custos de produção do biodiesel proveniente da biomassa microalgal, deve-se implementar uma estratégia de produção numa biorrefinaria que melhore a qualidade da engenharia dos fotobiorreatores e das algas utilizadas, através da engenharia genética.[3]

À semelhança de uma refinaria convencional, uma biorrefinaria deve utilizar todos os componentes das matérias-primas para a produção de compostos com valor ou, pelo menos, utilizáveis pela própria. As microalgas, para além da fração lipídica, são constituídas por quantidades significativas de proteínas, hidratos de carbono e outros nutrientes. Quer isto dizer que a biomassa residual pode ser utilizada para a produção de alimento para animais ou, por exemplo, para a produção de metano por digestão anaeróbia, capaz de gerar eletricidade para operar a fábrica (cujo excesso pode ser vendido). A produção de metano não será tão económica como aquela em que é utilizado um substrato mais acessível, mas é possível. Para além do referido, podem ainda ser gerados produtos de alto valor acrescentado, que podem ser separados e comercializados.[3]

Tudo isto contribui para a diminuição do custo de produção do biodiesel proveniente de microalgas.

1.1.3 *Cryptocodinium cohnii*

1.1.3.1 Caracterização

A microalga *Cryptocodinium cohnii* é uma microalga marinha dinoflagelada heterotrófica que habita nas águas salobras litorais por todo o planeta. Uma vez que não possui cloroplastos, esta microalga é incapaz de realizar a fotossíntese.[2]

Pode existir sob duas formas, células nadadoras ou quistos. Quanto às do primeiro tipo, caracterizam-se pela presença de dois flagelos. O flagelo transversal é achatado, em forma de fita, rodeando total ou parcialmente a célula no sulco transversal. É responsável pela força propulsora e giratória da célula. Já o flagelo longitudinal encontra-se disposto longitudinalmente ao primeiro, funcionando como guia para o movimento celular.[2]

As células do tipo quisto são solitárias, de forma ovoide, e podem estar em estado inativo ou em divisão celular. As células deste tipo possuem teores de lípidos e de DHA superiores aos das células nadadoras.[2]

Na Figura 3 encontra-se uma representação esquemática de uma célula de *C. cohnii*.

Esta microalga destaca-se das outras pela grande capacidade de acumular lípidos (mais de 20% em peso seco) com um alto conteúdo de DHA (mais de 30% dos ácidos gordos totais, *Total Fatty Acids* – TFA). Para além disso, o teor de outros PUFA nos TFA é inferior a 1%.[2]

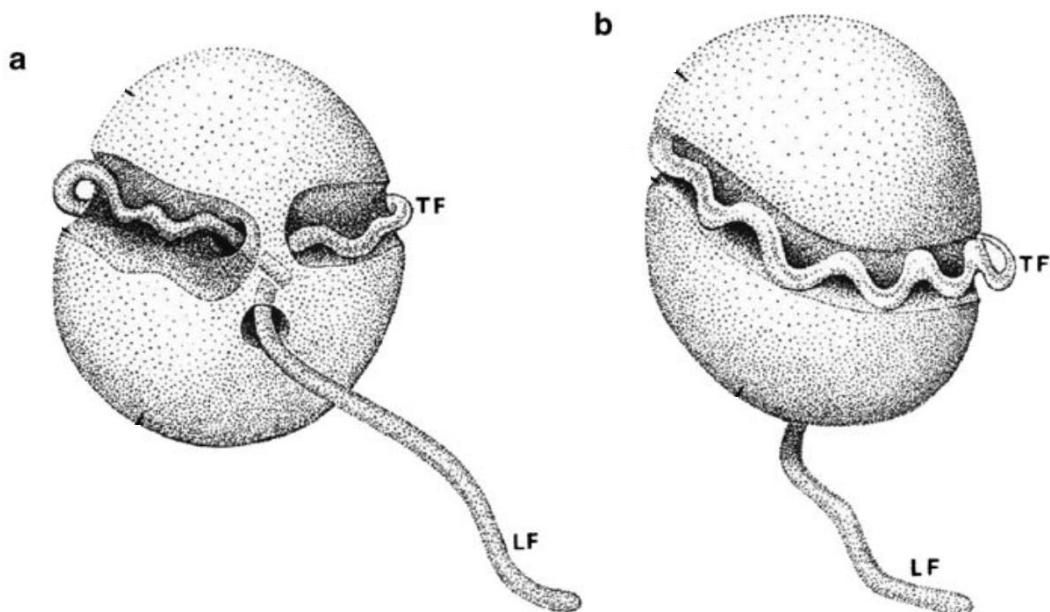


Figura 3 – Representação esquemática da microalga *C. cohnii*. Adaptado de [2].
a: vista ventral. b: vista dorsal. LF: flagelo longitudinal, TF: flagelo transversal.

1.1.3.2 Fermentação

1.1.3.2.1 Composição do Meio

Sendo um ser heterotrófico, esta microalga pode ser obtida por fermentação aeróbia num local escuro. Originalmente, a microalga foi cultivada em soluções de água do mar, extrato de levedura (*yeast extract*, YE), acetato de sódio e peptona. Outras fontes carbono orgânico podem ser glicose, dextrose, etanol, ácido acético ou acetato de sódio. Quanto às fontes de azoto, podem ser a peptona, YE, ácido glutâmico e produtos secundários de outras indústrias como o licor de maceração do milho (*corn steep liquor*, CSL) ou melaços (também fontes de carbono). Assim, é possível obter culturas de *C. Cohnii* utilizando substratos de baixo custo, tornando o seu uso industrial possível. Quanto a sais inorgânicos, água do mar natural é o meio mais adequado, mas água artificialmente salinizada é também utilizável. A presença de alguns sais de sódio, fosfatos, magnésio, potássio, boratos e carbonatos é também importante, juntamente com alguns metais pesados como ferro, manganês, cobalto e zinco e, por fim, compostos clorados e bromados.[2]

1.1.3.2.2 Taxa de Crescimento

No que diz respeito à taxa de crescimento, o seu máximo é para uma concentração de 20 g/L de glicose, sendo possível utilizar uma gama de 5-40 g/L. É necessário ter atenção à inibição pelo substrato. A concentração ótima de azoto é 2 g/L, podendo variar entre 0-10 g/L. A temperatura ótima de crescimento é 27°C, podendo estar entre 15-30°C. O oxigénio dissolvido (*dissolved oxygen*, DO) não deve ser inferior a 10% e é regulado pela agitação do meio. No entanto, não devem ser utilizadas grandes velocidades de agitação, uma vez que pode prejudicar o desenvolvimento de dinoflagelados. No que se refere ao pH, este pode variar entre 5,0-9,0, sendo preferencial o intervalo 6,0-7,0 e ótimo o pH de 6,6. A salinidade ótima é de 17,8 g/L, havendo inibição do crescimento para valores fora do intervalo de 5-50 g/L de NaCl.[2]

1.2 Métodos de extração

As matrizes sólidas não estão aptas para análise direta – ou por diluição excessiva ou pela incapacidade dos equipamentos para processar amostras sólidas. Desta forma, a preparação das amostras é uma das etapas mais importantes para a fazer, sendo também das etapas mais longas e a maior fonte de erro experimental. Os métodos de extração permitem alcançar o efeito, ou seja, para além de se obter as substâncias que se pretende, obtém-se também algo passível de ser estudado por métodos analíticos.[8]

1.2.1 Métodos convencionais

Os métodos de extração convencionais são amplamente utilizados e consistem na extração de compostos de uma matriz sólida através da utilização de solventes orgânicos.[9] Algumas das condições operatórias a ter em conta são: tempo de contacto, afinidade solvente/extrato, rácio biomassa/solvente, temperatura, número de ciclos de extração e tamanho da partícula da biomassa.[10]

1.2.1.1 Maceração

A maceração é uma técnica simples, económica e de *scale up* fácil.[11] Neste método, a escolha da polaridade do solvente é muito importante, uma vez que este se baseia na lixiviação dos compostos de interesse da matriz sólida. De forma a aumentar a solubilidade do mesmo, pode recorrer-se ao aquecimento ou à agitação.[8,9]

Terminada a extração, procede-se à filtração ou centrifugação, de forma a separar a solução de extrato da biomassa extratada. Ambas as técnicas são económicas e de fácil operação.[9]

As grandes desvantagens desta técnica são as largas quantidades de solvente e de tempo requeridos para a extração.[9]

1.2.1.2 Percolação

A percolação pode ser operada em modo *batch* ou contínuo. Nesta técnica, o solvente é continuamente substituído por solvente fresco. Desta forma, a extração é mais rápida que na maceração e todos os componentes solúveis são extraídos. A amostra é colocada sobre uma superfície porosa, é adicionado o solvente pelo topo e a solução do extrato é recuperada por baixo, já filtrada. [11–13]

1.2.1.3 Decocção

A decocção consiste na extração de compostos não voláteis e termorresistentes através da fervura do solvente (geralmente água). É utilizado para biomassas resistentes e fibrosas. O extrato é posteriormente arrefecido e filtrado ou coado.[11–13]

1.2.1.4 Destilação por arrastamento de vapor

A destilação por arrastamento de vapor consiste na injeção direta de vapor na matriz sólida, removendo compostos voláteis, como óleos essenciais. A desvantagem deste método é a grande quantidade de energia necessária para formar o vapor, os longos períodos de extração e a possível degradação dos compostos extraídos.[9]

1.2.1.5 Extração por refluxo

A extração por refluxo é análoga à decocção, na medida em que a amostra é aquecida com o solvente e, como tal, não pode ser usada na extração de compostos voláteis ou termossensíveis. Como o nome indica, após o aquecimento, o solvente é condensado e retorna à célula de extração (refluxo). Isto melhora a transferência de massa e a eficiência de contacto. Por ser necessário menos solvente e tempo de extração, esta técnica é mais eficiente que as técnicas previamente mencionadas.[12,13]

1.2.1.6 Extração Soxhlet

A extração Soxhlet foi inventada em 1879 e é a técnica mais utilizada para a extração por lixiviação dos compostos de interesse, sendo um caso particular da extração por refluxo. Para além disso, é usada há mais de um século como técnica *standard*, ou seja, como referência para o desempenho de novas técnicas de extração. As desvantagens deste método foram também o ponto de partida para a evolução e modernização de novas técnicas.[8] Pelo exposto, esta foi também a técnica padrão utilizada neste trabalho.

A extração Soxhlet convencional encontra-se na Figura 4.

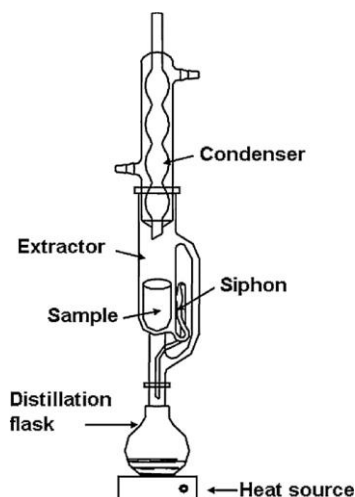


Figura 4 – Esquema da montagem experimental da extração Soxhlet. Adaptado de [8].

Esta extração consiste numa repetição de ciclos. Comece-se, por exemplo, pelo balão de destilação. A fonte de calor aquece o solvente até à ebulição e o seu vapor ascende pelo tubo mais à direita da Figura 4. No condensador, arrefece e desce até ao tubo portador da amostra. O nível de solvente vai aumentando e, ao mesmo tempo, vai-se dando a extração. Quando se atinge o nível mais alto do sifão, a solução do extrato é aspirada de volta ao balão de destilação e o ciclo recomeça.[8]

Este método possui como vantagens: o contacto constante da amostra com solvente fresco, o que desloca o equilíbrio de transferência de massa para o solvente; não é necessário filtrar a solução obtida; baixo custo do equipamento de base, o que permite o aumento da quantidade de biomassa processada, fazendo extrações em paralelo; é muito simples e não requer treino; a capacidade é superior ao de métodos mais recentes e não está sujeito a efeitos de matriz.[8]

Quanto às desvantagens, é de referenciar: tempos longos de extração; grande quantidade de solvente utilizada, cujo desperdício, para além de caro, apresenta problemas ambientais; a temperatura de extração é aproximadamente a temperatura de ebulição do solvente e, como o sistema se mantém durante algum tempo a essa temperatura, pode haver decomposição de substâncias termossensíveis; não existe agitação, o que poderia tornar a extração mais expedita; no final, uma etapa de evaporação/concentração é requerida; é limitada pelo extratante e é de difícil automação.[8]

Face a estas desvantagens, surgiram métodos novos, explorados em seguida.

1.2.1.6.1 Extração Soxhlet de alta pressão

A extração Soxhlet de alta pressão é conseguida pela colocação do extrator num autoclave ou pela utilização de extratores Soxhlet supercríticos. No entanto, neste tipo de extração, as condições supercríticas não são atingidas. Exemplo dos solventes utilizados são líquidos de baixo ponto de ebulição ou gases (a pressões e temperaturas normais) que atingem o estado líquido a altas pressões. As vantagens deste processo, levado a cabo entre 1000-1500 psi, passam por diminuir o tempo de extração e a quantidade de solvente requerida, não ter perda de solvente, ter operação autónoma, uma temperatura de extração inferior e, por conseguinte, maiores eficiências.[8,14]

1.2.1.6.2 Extração Soxhlet automatizada

A extração Soxhlet automatizada começou no equipamento comercial Soxtec®, permitindo poupanças substanciais em tempo e solvente. Esta técnica combina a extração e o refluxo em dois passos distintos de extração: ebulição e lavagem, seguido pela recuperação do extratante. Existem modelos cujo produto obtido garante seguir normas predefinidas.[8]

1.2.1.6.3 Extração Soxhlet assistida por ultrassons

A extração Soxhlet assistida por ultrassons utiliza o equipamento tradicional submergido num banho termostático por onde se propagam os ultrassons. Os resultados obtidos com esta técnica são similares ou ligeiramente melhores ao método tradicional, sendo a diferença maior a diminuição drástica dos ciclos de extração. No entanto, o efeito mais relevante é o da descompactação da biomassa compactada pelo constante pingar do extratante, evitando passos intermediários de moagem. O efeito oxidativo dos ultrassons não se faz sentir devido às condições moderadas que são utilizadas.[8]

1.2.1.6.4 Extração Soxhlet assistida por micro-ondas

A extração Soxhlet assistida por micro-ondas é a que apresenta melhorias mais significativas face à extração tradicional. Relativamente a outras técnicas assistidas por ultrassons, esta técnica: mantém a célula de extração aberta, operando à pressão atmosférica; a irradiação de micro-ondas foca-se na amostra; o passo da extração é realizado de acordo com a técnica tradicional, ou seja, mantém-se o contacto entre amostra e solvente fresco e não é necessário o passo da filtração.[8] Uma questão a ter em atenção neste método passa pela polaridade do solvente, ou seja, solventes polares (alta constante dielétrica) podem aquecer rapidamente em contacto com a radiação micro-ondas. Para a escolha do extratante, é necessário que este tenha um coeficiente de perda dielétrica alto ou seja uma mistura entre solvente de constante de perda dielétrica alto e baixo ou seja transparente à radiação referida. Para além disso, a amostra deve ter um alto coeficiente de perda dielétrica.[14]

1.2.2 Métodos de extração alternativos

Como referido, os métodos convencionais não são ecologicamente sustentáveis, pela grande quantidade de solventes orgânicos utilizados e pelos longos tempos de extração, daí que sejam necessárias abordagens mais eficientes.[15]

1.2.2.1 Extração assistida por ultrassons

A extração assistida por ultrassons foi brevemente explicada no Capítulo 1.2.1.6.3. São aplicadas frequências da ordem dos 20 kHz a 10 MHz à mistura de solvente com a matriz sólida. O tempo de extração é acelerado uma vez que as ondas ultrassónicas quebram a parede celular através de cavitação, libertando os compostos de interesse e melhorando a transferência de massa e difusão. Para além das vantagens mencionadas, é uma tecnologia económica, de alta eficiência e baixo consumo de solventes orgânicos.[10,12,16]

1.2.2.2 Extração assistida por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas foi brevemente explicada no Capítulo 1.2.1.6.4. É preparada uma mistura de solvente com a amostra, colocada numa célula de extração fechada, onde as condições de pressão e temperatura são controladas e são aplicadas radiações micro-ondas de frequência na ordem dos 30-300 MHz. A célula de extração pode também ser aberta, sendo, neste caso, a pressão igual à pressão atmosférica. A radiação micro-ondas atravessa a célula, interagindo com os compostos polares, resultando num aquecimento pela rotação dipolar desses compostos e a migração dos iões dissolvidos. Isto causa a rutura da parede celular e a libertação dos compostos de interesse.[10,12,16]

O tempo de extração é muito reduzido face a outros métodos, com eficiências de extração muito semelhantes. O custo é reduzido e o consumo de solventes orgânicos é menor, tal como a decomposição térmica. É possível utilizar a água presente na matriz sólida como solvente.[12,14,15]

1.2.2.3 Tecnologias elétricas de extração

As tecnologias elétricas de extração podem dividir-se em pulsos do campo elétrico e descarga elétrica de alta voltagem.[15]

Relativamente às extrações do primeiro tipo, estas consistem em pulsos elétricos de alta voltagem e curtos, aplicados na amostra, que provocam separação das cargas eletrostáticas e a electropermeação (mudanças na estrutura celular, que provocam o aparecimento de poros, por onde o material intracelular pode ser permeado). Assim, a separação é mais rápida e o rendimento maior. É necessário ter em atenção diversas variáveis, nomeadamente: força do campo, *input* de energia específica, número de pulsos e temperatura.[15]

As extrações do segundo tipo baseiam-se nas reações químicas e físicas que se dão por descargas electro-hidráulicas, provocando ondas choque de alta amplitude, radiação ultravioleta, formação de radicais livres altamente concentrados, cavitação e turbulência. Tudo isto causa rutura celular e permite a transferência de massa. Estes extratos possuem um poder antioxidante superior às do método anterior, pois a rutura celular provoca a libertação de compostos bioativos.[15]

1.2.2.4 Extração assistida por plasma frio

A extração assistida por plasma frio é uma técnica aspirante a extração verde. O plasma frio é um gás parcialmente ionizado, onde estão presentes iões, eletrões, fotões ultravioleta e radicais reativos neutros. O arrefecimento de iões e moléculas neutras mostrou-se um meio eficiente de transferência de energia. Esta técnica pode ser utilizada à pressão atmosférica e, portanto, não é necessário que a célula de extração possua controlo da temperatura e pressão, o que a torna numa técnica económica. Para além disto, o equipamento utilizado consome pouca energia.[15]

1.2.2.5 Extração assistida por encapsulamento.

A extração assistida por encapsulamento é um método avançado que altera as propriedades físicas ou isola os materiais extratados, protegendo-os do meio. A seleção do material da parede da cápsula é fundamental neste método, uma vez que controla a eficiência do processo.[13]

1.2.2.6 Extração com líquidos pressurizados

Esta técnica foi utilizada no presente trabalho. Consoante o solvente utilizado, esta técnica pode ser considerada uma técnica verde. Por este facto, este método está descrito no Capítulo 1.2.3.3.

1.2.2.7 Extração com fluidos supercríticos

Esta técnica foi utilizada no presente trabalho. Pelo mesmo motivo que a extração com líquidos pressurizados, apresentada no capítulo anterior, esta está descrita no Capítulo 1.2.3.4.

1.2.3 Métodos de extração verdes

Apesar dos métodos alternativos serem uma melhoria face aos tradicionais, continuam a utilizar solventes orgânicos (mesmo que em menor quantidade), representando, ainda, um problema ambiental e de biocompatibilidade. Assim, é necessário substituir os solventes referidos por solventes verdes.[15]

1.2.3.1 Extração assistida por enzimas

A extração assistida por enzimas é considerada uma técnica verde uma que utiliza enzimas para extrair compostos de interesse, sendo o solvente maioritariamente água. Existem diversos fatores que impactam esta extração, nomeadamente: pH, temperatura, tempo e custo e seleção da enzima. Esta extração funciona pela ação hidrolítica da parede celular.[12,13,15]

1.2.3.2 Extração assistida por membranas

A extração assistida por membranas apresenta potencial para um extrato com menor toxicidade, necessitando apenas de microlitros para acontecer. Para além disso, apresenta outras vantagens face a métodos tradicionais, como baixos custos de operação, operação simples, *scale up* mais fácil, não consome muita energia e rende um produto de maior qualidade (mais concentrado e de maior pureza). O composto de interesse atravessa a membrana para a fase recetora, de acordo com o coeficiente de partição da mistura amostra/solvente. A utilização de solventes não-polares é preferível, para que não haja perda através da membrana. A sua grande desvantagem passa pelas incrustações e possível colmatação da membrana. A eficiência da extração passa pela escolha correta da membrana (material e tamanho dos poros) e identificação e supressão das possíveis causas das incrustações.[13]

1.2.3.3 Extração com líquidos pressurizados

A extração com líquidos pressurizados (*Pressurized Liquid Extraction*, PLE) foi apresentada em 1995 pela Dionex Corporation, sob o nome de *Accelerated Solvent Extraction*, ASE®. Esta consiste na utilização de líquidos a altas pressões e temperaturas, que melhoram a qualidade da extração face à temperatura ambiente e à pressão atmosférica. A alta pressão permite que o solvente não esteja no estado gasoso, a uma temperatura superior ao seu ponto de ebulição atmosférico, melhorando a solubilidade e a transferência de massa.[17]

1.2.3.3.1 Modelo da extração

A eficiência desta extração depende da natureza da matriz da amostra, do analito a extrair e da localização do analito na matriz. O modelo que descreve esta extração considera que as partículas são porosas e estão rodeadas por uma camada orgânica. Assim, a extração resume-se nos seguintes passos: dessorção do composto da matriz, difusão pela camada orgânica até à interface matriz-fluido, passagem para o solvente e difusão no solvente para fora do poro (dependente também da convecção).[17]

A definição da localização do composto na matriz é também muito importante, podendo considerar-se que este se encontra: adsorvido à superfície da matriz, dissolvido num poro e/ou adsorvido na superfície, dissolvido/adsorvido num nanoporo, quimicamente ligado à matriz ou dissolvido na solução. O passo limitante da extração é, então, dependente da natureza da matriz. Em aplicações ambientais, o passo limitante é, habitualmente, o passo da dessorção, uma vez que a ligação matriz/soluto é difícil de quebrar. No entanto, na matéria vegetal, o passo limitante é a solubilização ou difusão.[17]

1.2.3.3.2 Funcionamento do equipamento

A extração ASE pode ocorrer em modo estático ou em modo dinâmico. O modo dinâmico consiste em bombear continuamente solvente fresco, o que implica a utilização de bombas de alta pressão. Por este motivo, ainda não existem equipamentos que funcionem exclusivamente em regime dinâmico.[17]

O modo estático consiste na injeção de solvente, contacto com a amostra (extração) e remoção do extrato. Pode haver repetições deste ciclo. Já no modo dinâmico, o caudal de solvente é definido para um tempo estático e a bomba injeta solvente a um caudal constante.[17]

As condições operatórias do equipamento variam entre a temperatura ambiente e 200°C e entre 35-200 bar. A presença de água afeta a eficiência da extração. Assim, para amostras com alto teor de humidade, devem usar-se terras diatomáceas que absorvam a água da matriz. Para amostras com baixo teor de humidade, podem usar-se esferas de vidro. A utilização de agentes de dispersão para criação do leito de extração é importante uma vez que enchem a célula e diminuem a utilização de solvente por diminuírem o volume da célula. Quando são atingidas as condições operatórias, a extração decorre num ciclo estático por um tempo predeterminado. No total, a extração leva, geralmente, 5-15 minutos. No final, a célula de extração é lavada utilizando um gás inerte e purgada para o frasco de recolha. Os fatores determinantes para a eficiência deste modo são a solubilidade do soluto no solvente e o coeficiente de partição do soluto na água e no solvente.[17]

O material da maioria das células de extração é o aço inoxidável 316L, o que restringe a utilização a condições de pH não extremas. No entanto, já existem células com revestimento, o que permitem uma utilização mais alargada de pH e, por conseguinte, a realização de tratamentos ainda na célula, como a saponificação.[17]

Uma das desvantagens do modo estático é a extração incompleta, pela utilização de volumes muito reduzidos. Isto pode ser ultrapassado pela utilização de mais ciclos de extração.[17]

Como referido, o ASE pode ser definido por uma fase de solubilização seguido de uma fase de difusão. Em matrizes cujo passo da dispersão é o limitante (devido às fortes interações matriz/soluto ou aos longos caminhos de difusão para percorrer), a temperatura do solvente e o tamanho do particulado são os fatores que mais influenciam a eficiência da extração. O aumento da temperatura ou a diminuição do tamanho da amostra devem, neste caso, influenciar positivamente o rendimento e o tempo da extração.[17]

No que se refere a matrizes cujo passo limitante é a solubilidade do analito no solvente e a velocidade da extração é maioritariamente dependente da partição do analito na matriz e no solvente, a constante utilização de solvente fresco será o que tornará melhor o rendimento da extração.[17]

1.2.3.3.3 Solventes utilizados

A regra base na escolha do solvente para a extração é “igual dissolve igual”, ou seja, deve-se escolher a polaridade do solvente de acordo com a polaridade da substância a extrair. É também necessário ter em conta a solubilidade e a difusividade do analito no solvente, que devem ser elevadas, sendo mínimas para os restantes componentes da amostra, de forma a obter extratos de alta pureza e seletividade. Para solutos muito diluídos, a velocidade de extração é afetada pela velocidade da transferência de massa. Assim, a escolha do solvente deve ser feita de forma a garantir a solvatação e libertação do soluto.[17]

Para além das propriedades físico-químicas e de transporte referidas, é ainda ter em atenção os fatores económicos, de segurança e de sustentabilidade aquando da escolha do solvente. A escolha de solventes menos tóxicos (ou mais verdes) e, por isso, mais fáceis de remover, é preferível.[17]

Finalmente, e consoante a aplicação do extrato, a escolha do solvente será também condicionada pela legislação existente. Desta forma, para as indústrias alimentar, farmacêutica, de suplementos dietéticos, etc., a escolha de solventes recai sobre os considerados GRAS (*generally recognised as safe*) e todos os que sejam permitidos por legislação para essas aplicações (i.e., que cumpram as restrições de segurança, toxicidade e risco).

1.2.3.3.4 Efeito da temperatura

A temperatura da extração é um dos fatores críticos no desempenho da extração (eficiência e seletividade). O aumento da temperatura melhora a eficiência da extração uma vez que ajuda na ruptura das interações soluto-matriz (van der Waals, pontes de hidrogénio e atração dipolar). Isto acontece pois o aumento da temperatura e, conseqüentemente, da energia do sistema diminui a energia de ativação requerido para o processo de dessorção. Para além disso, o aumento da temperatura diminui as superfícies de tensão dos intervenientes, facilitando a hidratação da amostra.

Diminui também a viscosidade, melhorando a penetração do solvente no interior da matriz. Note-se que o aumento da temperatura também aumenta a velocidade de difusão, ou seja, a velocidade de transferência de massa, permitindo extrações mais rápidas (especialmente em extrações controladas pelo passo difusivo) e diminuindo a quantidade de solvente necessária.[17]

As desvantagens do aumento da temperatura passam pela maior probabilidade da extração de outros compostos (diminuição da seletividade) e degradação de produtos termossensíveis.[17]

1.2.3.3.5 Efeito da pressão

A principal vantagem da utilização de pressões altas é, como já foi dito, manter o solvente no estado líquido a temperaturas superiores ao ponto de ebulição atmosférico. Para além dessa, a alta pressão ajuda o solvente a penetrar melhor nos poros da amostra, causa ruptura da matriz (melhorando a transferência de massa) e pode ajudar a eliminar problemas como a existência de bolhas de ar que impedem a chegada do solvente à amostra. No entanto, à exceção da primeira vantagem, os efeitos da pressão são praticamente desprezáveis.[17]

1.2.3.4 Extração com fluidos supercríticos

A extração supercrítica, ESC, apresenta diversas vantagens face aos métodos convencionais pois utiliza um fluido em condições supercríticas, isto é, em condições de pressão e temperatura acima do seu ponto crítico, e que por isso apresenta propriedades físico-químicas e de transporte, como a densidade, difusividade, viscosidade e constante dielétrica, diferentes, e muitas vezes mais vantajosas que os solventes convencionais. Um fluido supercrítico apresenta viscosidade mais baixa que um solvente líquido e difusividade relativamente alta, próxima da de um gás, permitindo uma melhor difusão através da matriz sólida e, como tal, taxas de transferência de massa mais elevadas. Para além disto, a sua densidade pode ser alterada com a pressão e a temperatura. Assim, e uma vez que a densidade está relacionada com a solubilidade, o poder solvente pode ser alterado variando a pressão. Outras vantagens da ESC são eficiências de extração mais altas (rendimentos maiores e tempos de extração menores) e a possibilidade de ligação direta a um cromatógrafo. Finalmente, outra grande vantagem, é no caso em que é usado um gás como fluido supercrítico, o retorno às condições normais de pressão e temperatura permite obter um extrato sem solvente, evitando posteriores operações de separação. [18]

1.2.3.4.1 Modelo da extração

O modelo da partícula desta extração é semelhante ao modelo do ASE, explicado no Capítulo 1.2.3.3.1.[18,19]

A diferença principal ocorre ao nível do modelo da extração. De acordo com [19] este processo de extração pode ser dividido em 3 etapas. Primeiramente, a matriz vegetal absorve o fluido supercrítico, dilatando (“*swelling*”) a estrutura celular, membranas e poros intermoleculares, diminuindo a resistência à transferência de massa. Em segundo lugar, ocorre a solubilização do extrato e a transferência de massa do interior da matriz para a superfície exterior. Finalmente, estes são transportados pelo solvente supercrítico e removidos do mesmo.[18]

Para otimizar uma ESC, é necessário conhecer os dados termodinâmicos (solubilidade e seletividade) e cinéticos (coeficientes de transferência de massa) do processo. Os parâmetros cinéticos, podem ser retirados da curva de extração, representada, geralmente, pela massa extraída acumulada em função tempo de extração. Esta curva é altamente dependente dos parâmetros operatórios e dos fenômenos que ocorrem no extrator de leito fixo. A curva de extração é também influenciada pelo caudal de solvente e pelo tamanho de partícula da matriz sólida, o que dificulta a comparação entre diferentes biomassas e montagens experimentais.[18]

A curva de extração divide-se em três fases, como se pode observar na Figura 5. A primeira fase é o período a velocidade de extração constante (*Constant Extraction Rate, CER*). Nesta fase, a superfície das partículas está coberta de soluto e a convecção é o principal mecanismo de transporte, sendo a solubilidade do composto no fluido supercrítico (ou o equilíbrio de fases) o passo que controla esta etapa do processo.

A segunda fase é o período de queda/diminuição da velocidade de extração (*Falling Extraction Rate, FER*). Nesta fase, a camada superficial de óleo começa a diminuir e o mecanismo de difusão começa a atuar, juntamente com a convecção. Nesta etapa o controlo do processo é a transferência externa de massa.

A terceira, e última fase, é o período de velocidade de extração baixa (*Low Extraction Rate, LER*). A camada exterior de óleo é praticamente inexistente e a transferência de massa é maioritariamente controlada pela difusão (*Diffusion Controlled, DC*) de soluto no interior das partículas e, como tal, a transferência interna de massa controla o processo de extração nesta etapa.[18]

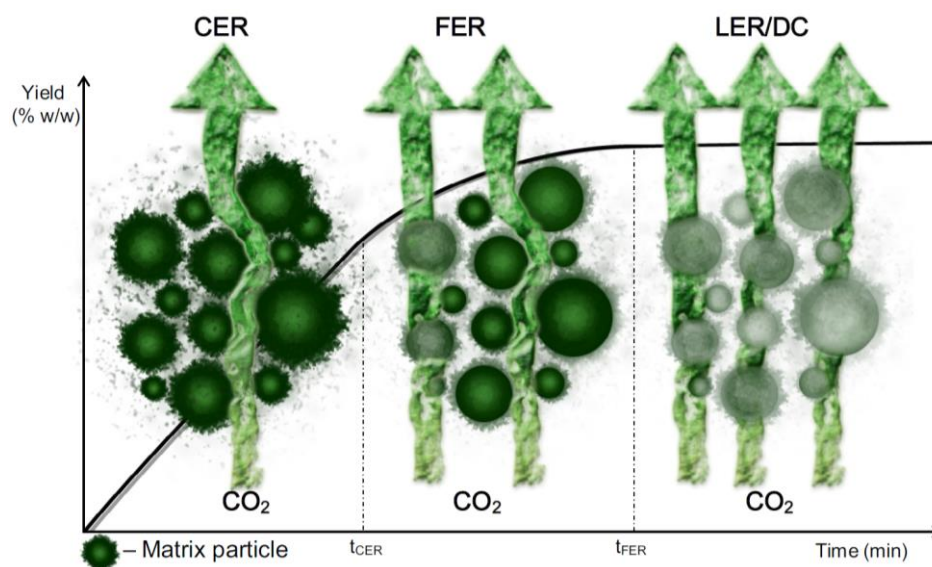


Figura 5 – Curva de ESC genérica (tempo vs rendimento acumulado em massa) com identificação das três fases de extração. Adaptado de [18].

1.2.3.4.2 Funcionamento do equipamento

O equipamento da extração supercrítica, resumidamente, consiste num fornecimento constante de solvente, controlado por válvulas, uma célula de extração e um vaso de recolha.[20] Como existem

diversos equipamentos de ESC, explicar-se-á melhor o funcionamento do equipamento utilizado no Capítulo 2.3.4.

1.2.3.4.3 Solventes utilizados

Existem diversos compostos que podem ser utilizados como solvente, como por exemplo, o metanol, o etano e a água. No entanto, o solvente mais utilizado é o CO₂, por vários motivos, como: ser relativamente inócuo para a saúde humana e para o ambiente, cumprindo as regras de sustentabilidade impostas pelo governo para processos químicos; a temperatura crítica moderada (31.2°C) o que não promove a decomposição de produtos termossensíveis e o extrato não está em contacto com o ar, prevenindo reações de oxidação. Para além disso, a vantagem indicada no Capítulo 1.2.3.4 também se aplica, ou seja, a obtenção de um extrato livre de solvente por regresso às condições normais de pressão e temperatura. Outra vantagem é que, à escala industrial, é possível a sua reciclagem. [18]

Uma das desvantagens da utilização de dióxido de carbono é o facto de este ser pouco polar e, desta forma, não ter a capacidade de extrair compostos mais polares. De forma a ultrapassar este problema, são adicionados co-solventes polares, em pequenas quantidades. É necessário ter em atenção o impacto que estes co-solventes podem causar nas propriedades do CO₂ puro.[18]

1.2.3.4.4 Efeito da pressão e da temperatura

Como foi referido, uma das vantagens da utilização de CO₂ é a baixa temperatura crítica. Desta forma, a temperatura nunca será muito elevada para que não exista degradação dos produtos extraídos.[18]

A pressão de vapor é apenas dependente da temperatura. Já a densidade, viscosidade e difusividade são dependentes da pressão e temperatura. Assim, variações nestes parâmetros vão ter reflexões acentuadas na hidrodinâmica, solubilidade e transferência de massa.[18]

Quando a pressão constante, a variação da temperatura provoca efeitos divergentes na solubilidade, explicando melhor, a densidade diminui mas a pressão de vapor aumenta.[18]

Já a temperatura constante, o aumento da pressão resulta no aumento da densidade e altera a solubilidade do soluto – melhora a recuperação de frações voláteis e piora a recuperação de frações não voláteis. Ou seja será possível ajustar a seletividade do solvente por ajuste da pressão e, assim, controlar a composição do extrato.[18]

1.3 Métodos de pré-tratamento

A ruptura da parede celular é essencial para a extração de componentes intracelulares como como óleos e pigmentos. A espessura e a composição química são importantes na determinação da resistência da parede celular. A robustez da parede celular é imprescindível para a escolha do método de rutura e das condições do mesmo.[21]

Em seguida, apresentam-se os métodos de pré-tratamento da biomassa utilizados neste trabalho.

1.3.1 Moagem no moinho de bolas

A moagem no moinho de bolas consiste na utilização de uma célula de moagem onde se colocam esferas e a biomassa e, posteriormente, se sujeita a agitação, provocando a disrupção celular.[21]

Alguns dos parâmetros a ter em conta são o tamanho das partículas da biomassa, o diâmetro das esferas, o rácio biomassa/esferas, a fração de enchimento da célula e a frequência de agitação. A diminuição do tamanho das esferas e utilização de mais esferas provoca um aumento da eficiência da rutura. O aumento da quantidade de biomassa diminui essa eficiência.[21]

Este método é um dos métodos mais promissores, uma vez que é um método verde (não se usam substâncias perigosas), fácil de aplicar e muito versátil (por todos os parâmetros ajustáveis para a obtenção de melhores resultados), embora a otimização possa ser tediosa, pelo grande número de variáveis a otimizar. As desvantagens passam pelo consumo elevado de energia (a nível industrial) e a necessidade de um capital elevado para a aquisição de equipamento.[21,22]

1.3.2 Homogeneização a alta pressão

A homogeneização a alta pressão (*High-pressure Homogenization*, HPH) é usada para a produção de emulsões mas pode ser também utilizada para disrupção celular. Tipicamente, uma suspensão de células é bombeada a alta pressão por uma válvula, colidindo com um anel de impacto. Depois, sai dessa zona, havendo uma queda de pressão elevada. Existem vários mecanismos de rutura propostos: quebra devido à mudança brusca de pressão, tensão de corte, cavitação e o impacto das células (a alta velocidade) na válvula.[21]

Sendo a queda de pressão um dos fatores mais importantes na disrupção, a pressão de operação do processo é uma das variáveis mais importantes a controlar. O aumento da pressão é responsável pelo aumento da fração de células rompidas. O número de passagens é também um fator importante, sendo o aumento do número também responsável pelo aumento da fração referida.[21]

O HPH não é muito dependente da concentração celular. Desta forma, por se poderem utilizar altas concentrações celulares, este método tem um grande potencial industrial.[21]

1.4 Métodos de secagem

Outra das grandes dificuldades no processamento das microalgas passa pela sua separação do meio de cultura. Foram sugeridos métodos como a floculação seguido de centrifugação para um aumento da concentração de biomassa. A floculação não tem um grande gasto energético, mas forma um efluente difícil de tratar e o floculante pode ter um custo elevado. A centrifugação implica grandes custos de investimento e operacionais. Assim, é difícil implementar estas técnicas a nível industrial. Feito isto, é necessário remover a restante água para que não ocorra degradação nem haja interferência com a extração. Este é, efetivamente, o passo que requer maior energia.[23,24]

No trabalho experimental realizado nesta tese, recorreu-se à centrifugação da cultura, seguida pela secagem da biomassa utilizando os métodos descritos de seguida.

1.4.1 Liofilização

A liofilização não causa danos celulares e, como tal, é bastante utilizada, uma vez que preserva os componentes de interesse. Comparativamente a outros métodos, este é o que apresenta melhor eficiência na secagem. No entanto, possui elevados custos de investimento e operacionais e tem longos períodos de secagem (superiores a 12h).[24]

Este processo ocorre em três fases. Em primeiro lugar, a temperatura da amostra é reduzida até que esteja completamente congelada. Na segunda etapa, inicia-se o primeiro passo de secagem, que consiste na remoção do solvente por sublimação, ou seja, é criado um vácuo de forma a que a pressão seja inferior à pressão de vapor do solvente sólido. O último passo e o segundo de secagem, consiste na dessorção da água que não congelou, mas que se encontrava absorvida e adsorvida na amostra.[25]

1.4.2 Secagem convectiva

A secagem convectiva pode acontecer em fornos ou com micro-ondas. O sólido é seco pela utilização de ar a temperaturas na ordem dos 40-55°C. Podem ainda utilizar-se tapetes rolantes ou tabuleiros. Este método pode ter potencial para uso industrial, porém, é necessário realizar estudos que minimizem o consumo de energia.[24]

1.5 Solventes verdes

Os solventes são utilizados em todos os processos químicos, quer a nível industrial quer a nível laboratorial. Assim, nas últimas décadas, com o nascimento da Química Verde, surgiu uma preocupação com a utilização de solventes devido aos efeitos que provocam na saúde humana, os impactos ambientais que causam e a dependência de matérias-primas não-renováveis para a sua produção. Exemplo disto são solventes tradicionalmente utilizados, como o tetracloreto de carbono, o benzeno e o tricloroetileno, que são carcinogénicos, ou o n-hexano, o tetracloroetileno e o tolueno que são neurotóxicos. Para além disso, a maior parte dos solventes orgânicos é volátil, potencialmente inflamável e explosivo.[26]

Desta forma, baseado nos princípios da Química Verde, a procura de solventes menos perigosos e ambientalmente benignos tornou-se numa área de interesse da química e da engenharia química, de maneira a tornar os processos mais seguros, amigos do ambiente e sustentáveis. Assim, de acordo com a Química Verde, sempre que praticável devem desenhar-se processos cujas substâncias não prejudicam a saúde e o ambiente e todas as substâncias auxiliares não devem ser utilizadas ou, se forem estritamente necessárias, devem ser inócuas.[26]

1.5.1 Definição

Um solvente verde, de acordo com a Química Verde, deve: ser obtido por matérias-primas renováveis; estar disponível a larga escala; ter preços acessíveis e competitivos com solventes tradicionais; ser reciclável com processos ecologicamente eficientes; estar disponível a alta pureza para evitar processos de separação; ser preparado com alta economia de átomos e processos de economia de energia; ter uma toxicidade negligível, minimizando riscos aquando da manipulação, descarte e utilização pelo consumidor; ser altamente biodegradável sem a produção de metabólitos tóxicos; ter propriedades (e.g., viscosidade, polaridade e densidade) semelhantes a solventes tradicionais; ser

térmica e electroquimicamente estável durante o processo; não ser inflamável e ser de fácil armazenamento e transporte.[26]

Algumas empresas, como a Pfizer, a GlaxoSmithKline e a Sanofi desenvolveram um sistema de pontuação onde os solventes são classificados de acordo com a sua concordância (ou não) com os fatores previamente mencionados. Analisando os solventes utilizados neste trabalho, o n-hexano é considerado de uso indesejável, com problemas significativos e de substituição requerida; o acetato de etilo é de uso preferido, apresenta alguns problemas e é de uso recomendado; o 2-metiltetrahidrofurano é utilizável, apresenta alguns problemas e é de uso recomendado pela Pfizer, GlaxoSmithKline e Sanofi, respetivamente.[26]

1.5.2 Fluidos supercríticos

Por outro lado, os fluidos supercríticos podem também ser usados como solventes. Os mais utilizados são a água e o dióxido de carbono. As vantagens da utilização deste último passam por ser não inflamável, inerte, não tóxico, acessível, ter a possibilidade de recuperação total e, por ser um gás a condições PTN, permitir obter, por simples descompressão, extratos livres de solvente. O uso de fluidos supercríticos tem sofrido uma expansão rápida e considerável, encontrando-se, atualmente, vários exemplos de aplicações a nível industrial em áreas como a alimentar, suplementos dietéticos (nutracêutica), farmacêutica, de perfumes e fragâncias ou até mesmo em limpeza a seco. Um dos exemplos mais conhecidos de utilização industrial de CO₂ supercrítico é a extração de cafeína para a produção de descafeinado [26,27]

1.5.3 Solventes *biobased*

Os solventes *biobased*, de acordo com os objetivos da química verde, são solventes produzidos a partir de matérias-primas renováveis, geralmente subprodutos da indústria agroalimentar ou colheitas agrícolas ricas em hidratos de carbono ou matérias orgânicas consideradas resíduos.[26] Neste tese serão realizados estudos com dois solventes considerados *biobased*: o acetato de etilo e o 2-metiltetrahidrofurano.

1.5.3.1 Acetato de Etilo

O acetato de etilo é um solvente orgânico com diversas aplicações, nomeadamente, extração líquido-líquido, separação cromatográfica e síntese orgânica. Comercialmente, é possível encontrá-lo em tintas, vernizes e colas e é utilizado na produção de esmaltes, plásticos e borrachas.[26]

A sua produção é feita utilizando o bioetanol e é possível obtê-lo com alta pureza. O bioetanol é obtido por hidrólise e fermentação de resíduos amiloides, lignocelulósicos e/ou ricos em açúcares. O acetato de etilo, sendo uma opção mais verde, tem vindo a substituir solventes como a metil-etil-cetona e o benzeno e misturas deste com etanol substituem o diclorometano (DCM) em separações cromatográficas.[26]

1.5.3.2 2-metiltetrahidrofurano

O 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF) é um solvente comercialmente disponível com amplas aplicações na síntese orgânica. É produzido através de matérias-primas renováveis como a celulose, hemiceluloses e lignina que são convertidos em ácido levulínico e furfural e, posteriormente, em 2-MeTHF. Este apresenta resultados promissores na substituição de solventes e, desta forma, a sua síntese encontra-se em constante revisão e procuram-se métodos de produção melhorados. É também utilizado para investigar sínteses orgânicas ambientalmente benignas.[26]

Comparado com outros solventes cíclicos, como o THF, apresenta melhor estabilidade, baixa miscibilidade em água e menor ponto de fusão. Também é um bom substituto para o DCM em processos de extração e reações bifásicas, diminuindo os impactos ambientais. Para além disso, apresenta propriedades semelhantes ao tolueno, apresentando menos riscos em operações com hidretos e organometálicos.[26]

Pelo exposto, o 2-MeTHF tem sido aplicado em diversas indústrias, produzindo, frequentemente, excelentes resultados e, dada à sua baixa toxicidade, deverá ser implementado em mais processos da indústria química e farmacêutica.[26]

1.6 Objetivos

Numa perspetiva mais geral, este trabalho pretende a produção de culturas de alta concentração celular, com elevado teor lipídico, da microalga *Cryptocodinium Cohnii* para, de seguida, se estudarem os processos de extração da fase lipídica através de técnicas consideradas amigas do ambiente (e.g. extração com líquidos pressurizados e extração supercrítica).

Assim, realizaram-se fermentações utilizando fontes de carbono economicamente mais acessíveis, como o melaço de cana e o glicerol, num biorreator de bancada, em regime *fed-batch*. Para tal, monitorizou-se a fermentação utilizando diversas técnicas, das quais se destacam a espectrofotometria (densidade celular), a citometria de fluxo (atividade enzimática, densidade e integridade celular), observações microscópicas (desenvolvimento celular e contaminações), cromatografia líquida (quantificação da fonte de carbono residual) e cromatografia gasosa (evolução do perfil de ácidos gordos).

Terminada a fermentação, utilizaram-se dois métodos de ruptura celular e diminuição do tamanho da partícula de biomassa: homogeneização a alta pressão (HPH) e moagem no moinho de bolas. Para além disso, utilizaram-se também dois métodos de secagem: liofilização e secagem convectiva (em estufa). Assim, foi possível avaliar o efeito destes métodos na eficiência da extração de ácidos gordos da biomassa microalgal.

A extração com líquidos pressurizados (ou extração acelerada com solventes) permitiu estudar a utilização de solventes verdes e amigos do ambiente (“*biobased*”) para a obtenção da fração lipídica referida. Para tal, utilizaram-se, como solventes, o acetato de etilo e o 2-metiltetrahidrofurano. Também se tentou otimizar este processo, através do estudo da influência de dois dos parâmetros operatórios da extração: tempo de contacto e temperatura. Para tal, efetuou-se um planeamento experimental baseado numa superfície de resposta e utilizando a distribuição para dois fatores de Doehlert.

A extração supercrítica foi utilizada como técnica para a obtenção de extratos enriquecidos em DHA, tendo em conta os diferentes pré-tratamentos da biomassa.

Finalmente, ainda se quantificaram os pigmentos acumulados pela microalga *C. Cohnii* através de espectrofotometria e cromatografia líquida.

2 Materiais e métodos

2.1 Reagentes e equipamento

Os reagentes e solventes utilizados no presente trabalho encontram-se detalhados na Tabela A1.1 do Anexo A. Os equipamentos utilizados serão especificados ao longo deste capítulo.

2.2 Fermentação de *C. Cohnii*

2.2.1 Preparação dos meios de crescimento

As células da microalga *Cryptocodinium cohnii* (American Type Culture Collection 30772) são mantidas em culturas com meio *starter*, a 25°C, na ausência de luz. São reinoculadas mensalmente para manutenção do meio e das células. Esta preparação é feita em *erlenmeyers* de 250 mL, sendo apenas 90 mL ocupados com meio de composição de 23 g/L de sal marinho, 1,8 g/L de YE e 9 g/L de glicose. Este meio é previamente esterilizado num autoclave (Uniclave 88, A. J. Costa LDA, Portugal). De seguida, é inoculado com 10 mL de uma suspensão a 10% (v/v) de células de *C. Cohnii*.

Feito isto, é necessário preparar a cultura para se inocular no reator. Assim, é necessário preparar o meio inóculo, constituído por 25 g/L de sal marinho, 2 g/L de YE e 20 g/L de equivalente de glicose, de acordo com a fonte de carbono. Este meio é esterilizado da mesma forma que o anterior. De seguida, retiram-se 15 mL de *starter* e juntam-se a 135 mL de meio de inóculo, num *erlenmeyer* de 500 mL. Para além disto, adiciona-se também uma mistura de três antibióticos (cloranfenicol – 5 mg/L, penicilina G – 62 mg/L e estreptomina – 100 mg/L), na proporção de 1 mL para 1 L de meio, de forma a prevenir contaminações. A mistura de antibióticos é esterilizada por filtração. Posteriormente, é colocado durante 7 dias a incubar (incubador Unitrom Infors, Suíça), a 27°C e 110 rpm, ao fim dos quais está pronto para inoculação no fermentador.

Para além disto, é também necessário preparar o meio de fermentação. Este é constituído por 27 g/L de sal marinho, 0,5 g/L de YE, 5,5 g/L de CSL e o equivalente a 20 g/L de glicose. Este meio foi centrifugado (centrífuga, modelo 6-16KS, Sigma) para a remoção de partículas em suspensão e autoclavado (autoclave, Uniclave 88, A. J. Costa LDA, Portugal) para esterilização.

O pH de todos os meios foi acertado a 6,5 com NaOH e HCl, utilizando um potenciómetro (modelo C3021, Consort) e uma sonda (Mettler), antes da esterilização. Após a esterilidade, a manipulação dos meios e culturas foi realizada à chama.

2.2.2 Fontes de Carbono

As fontes de carbono variaram de acordo com a fermentação. Nos Ensaios I e II, utilizou-se melaço de cana. Nos Ensaios III e IV utilizou-se glicerol.

O melaço de cana de açúcar, cedido pela Açucareira de Alcântara, foi diluído na proporção 1:1 (v/v) com água destilada e acertado a pH 3 (através da utilização de HCl, 5 M). De seguida, foi colocado num autoclave (Uniclave 88, A. J. Costa LDA, Portugal), a 121°C, durante 1 h, para que se desse a sua hidrólise em glicose e frutose.

O glicerol destilado obtido de uma indústria de produção de biodiesel, a Iberol (Sociedade Ibérica de Biocombustíveis e Oleaginosas, S.A., Alhandra).

Estes substratos foram regularmente analisados por HPLC, de forma a aferir os açúcares presentes, permitindo o cálculo da quantidade que deveria ser adicionada ao reator.

2.2.3 Fermentação no biorreator

Todos os ensaios foram realizados num biorreator de 7 L (modelo FerMac 360, Electrolab Biotec), nunca se tendo excedido uma ocupação de 3 L e utilizando um regime *fed-batch*. Este encontra-se na Figura 6. Inicialmente, começou-se por se levar o reator ao autoclave, juntamente com todos os seus componentes, descritos adiante. Feito isto, colocou-se 2.7 L de meio de fermentação e 300 mL de inóculo. Juntou-se também a solução de antibiótico abordada no Capítulo 2.2.1, na mesma proporção, e uma solução de um antifúngico (8 mg de fosfomicina em 4 mL de dimetilsulfóxido). Para além disto, sempre que o sistema atingia a estacionariedade, introduziram-se pulsos, que consistem em 300 mL de uma solução dos nutrientes referidos, 10 vezes concentrada. Caso a formação de espuma fosse intensa, adicionava-se polietilenoglicol para a supressão da mesma.



Figura 6 – Biorreator da Electrolab Biotec, modelo FerMac 360, utilizado nos ensaios.

Este fermentador encontrava-se equipado com diversos instrumentos. A meio vê-se o rotor, onde se encontram anexadas duas turbinas de Rushton de de 4 pás, cuja velocidade de rotação pode ser ajustada. Do lado direito, vêem-se as bombas de injeção de ácido e base, reguladas por um elétrico de pH, não visível na figura. Na parte traseira, vê-se um rotâmetro para controle do caudal de ar, cuja

saída se vê do lado esquerdo da figura. Na parte dianteira do equipamento vê-se também o tubo de recolha de amostra. Existe ainda um termómetro, um eléctrodo de DO, uma manta de aquecimento, um sistema de refrigeração e um tubo de oliva (por onde era possível adicionar substâncias ao reator de forma estéril), não visíveis na figura. Os mecanismos de regulação das condições operatórias do reator serão explicados no capítulo seguinte.

2.2.4 Condições operatórias e sistema de controle da fermentação

Para controle do desenvolver da fermentação de *C. Cohnii*, recolheram-se amostras num regime bidiário. Para além disso, foi necessário recolher uma amostra imediatamente antes da inoculação e calibrar todo o equipamento. Recolheram-se também amostras antes e depois de se adicionarem pulsos de nutrientes.

2.2.4.1 Temperatura

A temperatura era mantida constante, a 27°C, por uma manta de aquecimento e por um sistema de refrigeração, ligado a água corrente.

2.2.4.2 pH

O pH do fermentador foi controlado pelo eléctrodo nele inserido. Este eléctrodo foi previamente calibrado utilizando soluções tampão de pH 4 e 7. O sistema de controle do reator bombeava HCl 2,5 M ou NaOH 2,5 M de forma a manter o *set-point* do pH, 6,5.

Para além disso, efetuaram-se medições periódicas de pH com um potenciómetro (modelo C3021, Consort) e uma sonda (Mettler), de forma a aferir a calibração do eléctrodo e a reajustar a calibração do fermentador, quando necessário.

2.2.4.3 Oxigénio dissolvido

O oxigénio dissolvido foi também medido com um eléctrodo próprio para o efeito. Para calibrar o eléctrodo, é preciso injetar azoto no sistema até que o valor lido pelo equipamento se mantenha constante (cerca de 6h). Nesse momento, define-se o 0% de DO. De seguida, bombeia-se ar no sistema à rotação máxima que se utilizará na fermentação (300-400 rpm, no caso). Espera-se que a leitura se mantenha estacionária (cerca de 6h, também) e marca-se o 100% de DO.

Com o progredir da fermentação, sempre que a DO fosse inferior a 30%, procedia-se ao aumento da velocidade de agitação do meio (cujo *set-point* inicial era 150 rpm), promovendo a dissolução do oxigénio atmosférico no meio e aumentando a DO. O caudal de ar manteve-se sempre constante, a 1 g/L.h.

2.2.4.4 Densidade ótica

A densidade ótica, OD, permite acompanhar o crescimento de microalga. Esta foi medida num espectrofotómetro UV-Vis (modelo Genesys 20, Thermo Spectronic), a 470 nm, visto ser o comprimento de onda para o qual a absorvância da cultura é máxima. Esta leitura efetuou-se em triplicado, para garantir a sua precisão, assumindo-se a média como valor final. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, o valor da absorvância deve estar entre 0,2 e 0,6, pelo que se efetuaram diluições de forma a manter a resposta do equipamento neste intervalo. O branco foi traçado utilizando água destilada.

De forma a remover a influência do meio de cultura na leitura, subtraiu-se o valor da absorvância da amostra recolhida imediatamente antes da inoculação, obtendo-se a OD corrigida. Através da OD, foi possível calcular o peso seco em cada ponto, com uma correlação previamente obtida, que se encontra na Equação 1. Também se leu a OD dos pulsos, de forma a corrigir as OD seguintes.

$$\text{Peso Seco (g/L)} = 1,0889 \times OD - 0,2497 \quad (1)$$

2.2.4.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite determinar diversos parâmetros, como o peso seco, o estado da integridade da membrana celular e a presença atividade enzimática.

O citómetro utilizado nesta atividade foi um citómetro CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences, USA). Este consiste num equipamento que força as células das microalgas a passar num tubo de diâmetro ligeiramente superior ao de uma célula. No caminho que as células percorrem, estão três lasers, que atuam a comprimentos de onda diferentes: um violeta a 405 nm, um azul e 488 nm e um vermelho a 638 nm. Opostos aos lasers encontram-se detetores que registam a interrupção do feixe com a passagem das células, o que se denomina um evento. Assim, um citómetro pode ser visto como um contador de eventos, que permite a determinação dos parâmetros referidos.

Para tal, é necessário começar por preparar a amostra, num tubo de citómetro, diluindo-a de forma a que o número de eventos por segundo esteja entre 200 e 500 e o volume total seja 500 μL . Neste caso, o solvente é PBS (*Phosphate-buffered Saline*). É também necessário sonicar (modelo Transsonic T 660/H, Elma) a amostra, de forma a desfazer agregados que possam comprometer a leitura, ou seja, garantir uma leitura individual de cada célula. Ao analisá-la, é possível saber o número total de eventos, denominada autofluorescência, e, através da Equação 2, saber o peso seco.

$$\text{Peso seco(g/L)} = 9 \times 10^{-7} \times \text{eventos/mL} - 0,4133 \quad (2)$$

Para a determinação da integridade da membrana celular e da atividade enzimática, foi necessário utilizar dois corantes, o PI (iodeto de propídio) e o CFDA (diacetato de carboxifluoresceína), adicionando 2 e 3 μL de cada um, respetivamente, e mantendo o volume total de 500 μL . Esperaram-se 15 minutos (tempo de incubação), no escuro. O CFDA é um componente não-fluorescente que penetra a membrana celular por difusão passiva (daí que seja necessário esperar um tempo de incubação). Ao entrar, este é hidrolisado a um composto fluorescente, caso as enzimas estejam ativas. Caso não estejam, o composto não será fluorescente. Outra justificação para a não fluorescência pode ser uma membrana celular danificada, que permite a saída do CFDA, pelo que é necessário utilizar outro composto para aferir a integridade da membrana celular. Para tal, usa-se o PI. Este composto liga-se ao ADN mas é incapaz de penetrar membranas celulares intactas. Assim, as células viáveis serão aquelas positivas ao CFDA e negativas ao PI.

Os detetores do equipamento utilizados na autofluorescência são o FCS-A e o SSC-A, o FITC-A para o CFDA e o PC5.5-A para o PI. O software de análise de dados foi o CytExpert 2.4.

2.2.4.6 Observações microscópicas

Através da utilização de um microscópio ótico (modelo BX60, Olympus Corporation, Japão), equipado com objetivas de 40x, 100x e 1000x e luz visível, foi possível retirar algumas conclusões sobre o estado das amostras colhidas no reator, *starters* e inóculos. Uma vez que a morfologia da microalga era conhecida, estudou-se qualitativamente a evolução da fermentação e a viabilidade da utilização dos inóculos e *starters*, pela quantidade, movimento e dimensões das células. Para além disso, foi ainda possível a deteção de possíveis contaminações.

2.2.4.7 Determinação experimental do peso seco

O peso seco foi também experimentalmente determinado, não apenas com correlações. Para tal, recolheu-se 1 mL de amostra para um *ependorf*, centrifugou-se (centrífuga, modelo 2-16K, Sigma, Sartorius), removeu-se o sobrenadante e levou-se o *ependorf* à estufa, a 103°C, por 24 h. A massa do *ependorf* era previamente medida e assim era possível determinar o peso seco. Estas medições fizeram-se em duplicado.

2.2.4.8 Quantificação do consumo da fonte de carbono

A concentração de hidratos de carbono no meio foi determinada por HPLC (modelo 1260 Infinity II, Agilent). Este encontrava-se equipado com uma coluna Aminex HPX-87H ou HPX-87P (Bio-Rad), um detetor de dispersão (DAD) e um detetor de índice de refração (RID), sendo este último o utilizado para a análise. O eluente consistia numa solução aquosa de ácido sulfúrico (556 µL de H₂SO₄ em 2 L de solução). Através de retas de calibração traçadas com padrões de glicose, glicerol, frutose e sacarose, foi possível estabelecer as correlações entre as áreas dos picos e as concentrações e conhecer os tempos de eluição dos componentes.

Assim, as amostras, após serem recolhidas, devem ser preparadas para análise. Para tal, centrifugaram-se (centrífuga, modelo 2-16K, Sigma, Sartorius) 2 mL de amostra (em 2 *ependorfs*), recolheu-se o sobrenadante, filtrou-se e procedeu-se à análise por cromatografia líquida.

Uma vez que as colunas referidas são fortemente ácidas, poderiam hidrolisar a sacarose presente no meio (no caso das fermentações com melão de cana) a glicose e frutose, comprometendo a exatidão dos resultados. Por isso, utilizou-se um método auxiliar para a determinação de glicose, nesses casos. Este método consiste na utilização de tiras de deteção rápida (modelo Combur³ Test®, Roche). Estas tiras associavam cores a diferentes intervalos de concentração de glicose. Outra vantagem deste método face ao HPLC passa pela rapidez, uma vez que a utilização destas fitas dava resultados imediatos.

Quando um dos métodos indicava uma concentração de fonte de carbono inferior a 10 g/L, injetava-se um pulso no sistema.

2.2.4.9 Quantificação do azoto

A quantificação do azoto residual realizou-se através do método de Kjeldahl.[28] Para começar, recolhe-se 5 mg de sobrenadante de cada amostra, de forma análoga à do capítulo anterior. De seguida, transfere-se a amostra para um tubo de digestão, onde se junta 20 mL de ácido sulfúrico a 95-97% e 1 g de catalisador (constituído por sulfato de potássio, óxido de titânio, cobre e ácido esteárico

na proporção 93:3:3:1), que permite a conversão do azoto em sulfato de amônio. Feito isto, coloca-se a amostra no digestor (modelo K-424, Büchi). A temperatura deve ser suficiente para iniciar e manter a ebulição da mistura – cerca de 420°C. Passadas 2 h, a reação de digestão está completa.

Feito isto, é necessário aguardar que o tubo volte à temperatura ambiente. Depois, adiciona-se 100 mL de água destilada e 50 mL de uma solução de NaOH 50%(m/m). Neste passo dá-se a conversão do sulfato de amônio a hidróxido de amônio e, finalmente, a amoníaco.

Previamente, devem ser preparados *erlenmeyers* com 50 mL de ácido bórico a 4%(m/m) e 1 gota de indicador de pH. Este indicador prepara-se pela diluição de 2 g de vermelho de metilo e 1 g de azul de metileno em etanol a 95%(v/v).

Seguidamente coloca-se o tubo de digestão e o *erlenmeyer* no destilador (modelo K-350, Büchi) e coloca-se o equipamento em funcionamento por 6 minutos. Para determinar o amoníaco presente na amostra, titula-se a mesma com ácido clorídrico 0,1 M, até que haja uma mudança de cor de azul-esverdeado para roxo, a pH 5,4.

Finalmente, calculou-se a concentração de azoto residual, utilizando a massa de amostra inicial, m_a , o volume de titulante, V_t , e a Equação 3.

$$[Azoto](g/L) = \frac{0.14 \times V_t}{m_a} \quad (3)$$

2.2.5 Cálculo dos parâmetros cinéticos

2.2.5.1 Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento, v_{max} , é a taxa de crescimento da biomassa na fase exponencial, sendo utilizada apenas a porção da curva de fermentação desta fase para o seu cálculo. Esta é calculada através dos pesos secos ao longo da fermentação, PS , do peso seco no início da fermentação (inoculação), PS_0 , e do tempo que decorreu desde esse evento, t . A equação que a descreve é a Equação 4.

$$\ln(PS) = v_{max} \times t + \ln(PS_0) \quad (4)$$

2.2.5.2 Produtividade volumétrica média e instantânea

A produtividade média (ou global), \bar{P}_A é calculada pelas concentrações de biomassa no início da fermentação e no fim (X_0 e X_f , respetivamente), pelo tempo total da fermentação, t_{total} , utilizando a Equação 5.

$$\bar{P}_A = \frac{X_f - X_0}{t_{total}} \quad (5)$$

É também possível calcular a produtividade instantânea, com uma variação da Equação 5, substituindo as concentrações iniciais e finais por concentrações de dois pontos consecutivos da fermentação (X_i e X_{i+1}), e o tempo total de fermentação pela diferença temporal entre ambos – Equação 6.

$$P_A(t_{i+1}) = \frac{X_{i+1} - X_i}{t_{i+1} - t_i} \quad (6)$$

2.2.5.3 Composição e produtividade volumétrica de ácidos gordos

A composição percentual em ácidos gordos pode ser expressa-se em termos da massa do ácido gordo i , m_{AG_i} , e da massa de TFA, m_{TFA} . O seu cálculo encontra-se na Equação 7.

$$\%AG_i(m/m) = \frac{m_{AG_i}}{m_{TFA}} \times 100\% \quad (7)$$

É, também, possível calcular a percentagem de ácidos gordos na biomassa seca e livre de cinzas, $\%TFA$, com a Equação 8,

$$\%TFA(m/m) = \frac{m_{TFA}}{m_{BM_{SSC}}} \times 100\% \quad (8)$$

onde $M_{BM_{SSC}}$ é a massa da biomassa seca e sem cinzas.

A produtividade volumétrica média em TFA, $\overline{P_{TFA}}$ pode ser calculada, assim como a de DHA, $\overline{P_{DHA}}$, pelo uso das Equações 9 e 10, respetivamente.

$$\overline{P_{TFA}} = \overline{P_A} \times \%TFA \quad (9)$$

$$\overline{P_{DHA}} = \overline{P_{TFA}} \times \%AG_{DHA} \quad (10)$$

2.2.6 Pós-tratamento da biomassa

Terminada a fermentação, procede-se à recolha, secagem e outras análises das amostras recolhidas durante a fermentação. Para tal, é necessário começar por centrifugar toda a cultura (centrífuga, modelo 6-16KS, Sigma). Terminada a primeira centrifugação, descarta-se o sobrenadante, adiciona-se água destilada e lava-se o bolo resultante da centrifugação, para remoção de matéria solúvel (como por exemplo, sal). Torna-se a centrifugar e descarta-se o sobrenadante.

Feito isto, as amostras são congeladas a -18°C para posterior secagem. A secagem da biomassa foi feita por dois métodos: liofilização e secagem na estufa. O liofilizador (modelo Heto Power Dry LL 3000, Thermo Scientific) funciona a -55°C e as amostras são liofilizadas por 48 h. A secagem na estufa é realizada a 45°C pelo período de 24 h.

Note-se que o tratamento por liofilização também foi aplicado a algumas amostras recolhidas durante a fermentação (as mesmas onde se quantificou o azoto). As únicas diferenças estão na supressão do passo de lavagem e na diminuição do tempo de liofilização para 24h.

2.2.6.1 Determinação de humidade e cinzas

A determinação da humidade e das cinzas permite corrigir a massa das microalgas em diversos cálculos, anulando o efeito, por exemplo, de altas concentrações de matéria inorgânica.

Para proceder a este cálculo, é necessário começar por tarar os cadinhos. Para tal, é necessário colocá-los na mufla por 1 h a 550°C e, de seguida, transferi-los para um exsiccador para arrefecerem à temperatura ambiente. Feito isto, deve registar-se a sua massa, $m_{cadinho}$.

Para determinação da humidade, com os cadinhos tarados, pesa-se entre 100-250 mg de biomassa para o seu interior, $m_{amostra}$, sendo colocados numa estufa a 103°C por 24h, de modo a que haja evaporação total da água presente. Estes cadinhos com biomassa devem arrefecer num exsiccador e, seguidamente, esta massa deve registar-se, $m_{cadinho+amostra\ seca}$.

Para o cálculo das cinzas, coloca-se os cadinhos com a amostra seca, na mufla, a 550°C por 3 h, para que haja incineração da matéria orgânica e sobrem apenas as cinzas. Depois deste período, os cadinhos devem mais uma vez ser arrefecidos num exsiccador e a sua massa registada, $m_{cadinho+cinzas}$.

Com todos estes dados, é possível calcular a percentagem de humidade e de cinzas, através da Equações 11 e 12, respetivamente.

$$\%Humidade(m/m) = \frac{m_{cadinho} + m_{amostra} - m_{cadinho+amostra\ seca}}{m_{amostra}} \times 100\% \quad (11)$$

$$\%Cinzas(m/m) = \frac{m_{cadinho+cinzas} - m_{cadinho}}{m_{amostra}} \times 100\% \quad (12)$$

2.2.6.2 Determinação do perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi analisado recorrendo à cromatografia gasosa. O cromatógrafo utilizado (modelo SCION-436-GC, Buker, Alemanha) encontrava-se equipado com um detetor de ionização de chama e uma coluna capilar fundida com sílica (modelo Supelcowax 10, Supelco), com um diâmetro interno de 0,32 mm e 30 m de comprimento. O eluente foi hélio com um caudal de 3,5 mL/min.

Quanto às condições operatórias do equipamento, este possui um injetor a 250°C, uma coluna de temperatura variável e a 13,5 psi e um detetor a 280°C. A variação da temperatura da coluna deu-se da seguinte forma: começou a 200°C e aqueceu, durante 8 minutos, até 240°C, onde se mantém constante por 16 minutos.

No entanto, esta análise é sensível a ácidos gordos e não aos mono, di e triglicéridos presentes no óleo, pelo que é necessário aplicar a reação de transesterificação. Esta técnica foi aplicada diretamente à biomassa e aos óleos extraídos da mesma. A única diferença no método está na quantidade de amostra utilizada em cada análise. No caso de se utilizar óleo, devem pesar-se 15-20 mg óleo. Para a transmetilação direta da biomassa, deve pesar-se a quantidade de biomassa a que equivalem as 15-20 mg de óleo (geralmente 100-160 mg de biomassa, dependendo do teor em óleo). Para validação dos resultados, os ensaios foram realizados em duplicado.

O protocolo para a reação de transmetilação do óleo foi o seguinte: colocar as amostras em tubos de ensaio com tampa de rosca e vedante. De seguida, adiciona-se o 0,2 mL de padrão interno (ácido heptadecanoico, C17:0, 5 mg/mL) ou seja, o equivalente a 1 mg de C17:0. Feito isto, prepara-se uma solução de metanol e cloreto de acetilo 19:1 (v/v), em banho de gelo (por ser um processo exotérmico), e adiciona-se 2 mL da mistura a cada amostra. Coloca-se azoto nos tubos, de forma a que atmosfera seja inerte e não existam reações de oxidação, e fecha-se corretamente os frascos, para

que não haja perda de reagentes. Seguidamente, colocam-se os tubos num banho termostático a 80°C, durante 1 h, no escuro. terminado este tempo, os tubos são retirados do banho e espera-se que arrefeçam. Adiciona-se, de seguida, 1 mL de água destilada e 2 mL de n-heptano. Este passo serve para separar substâncias hidrossolúveis que não tenham reagido, como o metanol, dos FAMES formados, que por serem apolares, migram para o n-heptano. Entretanto, devem preparar-se pipetas de Pasteur com algodão hidrófilo na ponta, para servir de suporte ao sulfato de sódio anidro. A fase orgânica, que fica no topo do tubo de ensaio, deve ser recolhida com outra pipeta de Pasteur e colocada no interior da “pipeta filtro”, cuja ponta deve ser colocada num *vial* de GC. Este pequeno sistema de filtração remove partículas em suspensão e fase aquosa que possa ter sido aspirada.

Terminada a reação, os *vials* devem guardar-se no congelador, a -18°C, caso não sigam diretamente para análise no GC-FID. Após análise neste equipamento, atribuição dos ácidos gordos aos picos presentes no cromatogramas é feita por comparação com os tempos de retenção de padrões conhecidos (GLC 75, GLC 85 e GLC 459, Nu-CheckPrep). A quantificação dos ácidos gordos em cada amostra é feita por comparação ao padrão interno, ou seja, sabe-se que a área do pico do padrão corresponde a 1 g e que ambos são diretamente proporcionais, por um fator de resposta. Assim, pode saber-se a massa de cada ácido gordo identificado, através da Equação 13,

$$m_{AG_i} = \frac{A_{AG_i}}{A_{C17:0}} \times FR_{AG_i} \quad (13)$$

onde m_{AG_i} é a massa do ácido gordo i , A_{AG_i} e $A_{C17:0}$ são a área do pico do ácido gordo i e do padrão interno, respetivamente, e FR_{AG_i} é o fator de resposta do ácido gordo i .

2.3 Métodos de extração de lípidos

Os lípidos acumulados pela biomassa durante a fermentação foram extraídos usando as técnicas que compõem o estudo desta tese. Como explicado no Capítulo 1.2.1.6, a extração por Soxhlet foi considerada a técnica de referência para comparação da eficiência dos outros métodos de extração. A extração dos lípidos da biomassa microalgal foi também realizada pelos métodos: extração acelerada por solventes (ASE) e extração com CO₂ supercrítico.

2.3.1 Pré-tratamento da biomassa

Tal como referido nos objetivos da tese, os estudos experimentais envolvem a avaliação do efeito do pré-tratamento da biomassa, em termos da secagem e da rutura celular, no rendimento da extração.

Assim, após colheita da biomassa do fermentador, parte da biomassa foi submetida a homogeneização a alta pressão. Após este processo, esta biomassa seguiu para secagem, sendo testados dois processos. Uma parte da biomassa (proveniente da homogeneização a alta pressão) foi submetida a liofilização e outra parte foi seca na estufa.

Por outro lado, a parte da biomassa que seguiu do fermentador para a centrifugação foi, de seguida, liofilizada. Previamente aos ensaios de extração, esta biomassa foi submetida a moagem no

moinho de bolas. Na Figura 7 encontra-se esquematizado a sequência de operações realizadas neste trabalho, para mais fácil compreensão do estudo realizado.

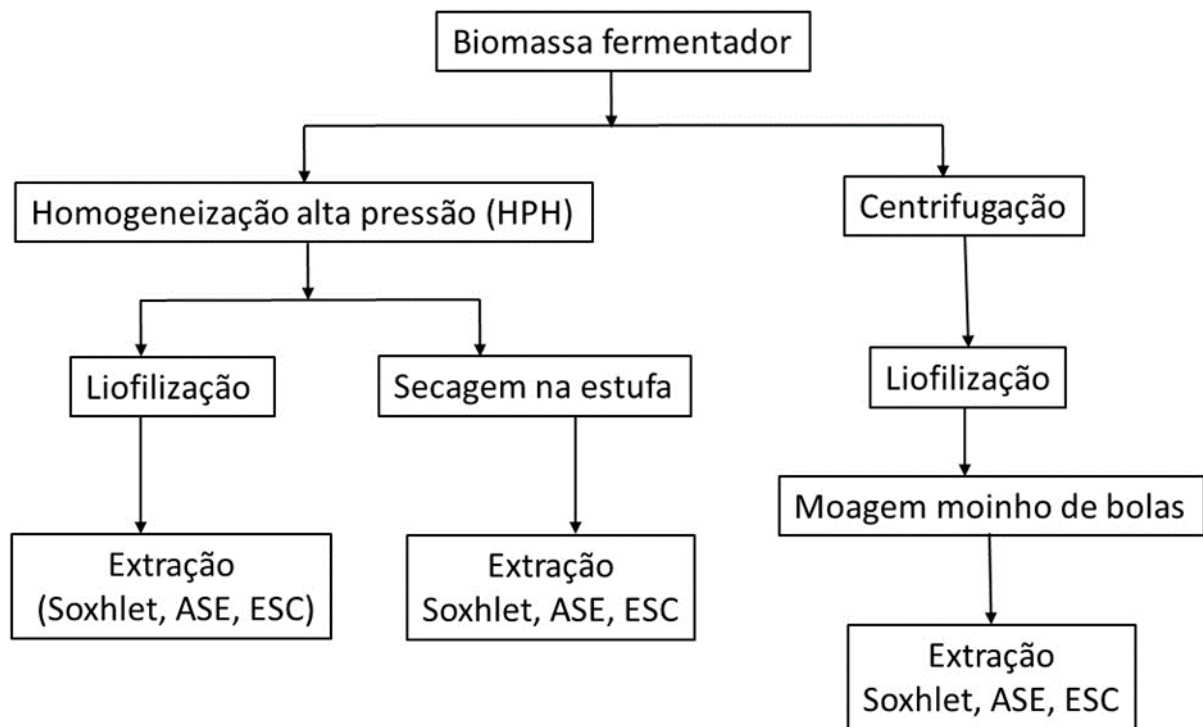


Figura 7 – Resumo esquemático das diversas operações a que foi submetida a biomassa microalgal após fermentação.

2.3.1.1 Moagem no moinho de bolas

A biomassa resultante da fermentação, depois de liofilizada, como descrito no Capítulo 2.2.5, foi submetida a moagem num moinho de bolas (modelo MM400, Retsch). Para tal, colocaram-se 0,5 g de biomassa em cada almofariz juntamente com 3 esferas metálicas (AISI 316) de diâmetro igual a 1 cm. O moinho operou durante 3,5 minutos, a uma frequência de agitação de 25 Hz.

2.3.1.2 Homogeneização a alta pressão (HPH)

Após o término da fermentação, parte da cultura foi diretamente submetida a homogeneização a alta pressão. Para tal, utilizou-se um homogeneizador de alta pressão laboratorial PandaPLUS 2000 (Alemanha). A cultura foi submetida a uma pressão de 600 bar e foi efetuada uma passagem (ou seja, 1 ciclo a 600 bar). Após isto, parte da amostra foi congelada para posterior liofilização e outra parte foi submetida a secagem convectiva.

2.3.2 Extração Soxhlet

A extração Soxhlet foi realizada utilizando hexano. O método corresponde ao explicado no Capítulo 1.2.1.6.

Para efetuar a extração, colocaram-se 0,5 g de biomassa submetida aos diversos pré-tratamentos num cartucho de celulose, juntamente com um pouco de algodão, e o cartucho foi fechado com uma dobra, de forma a que não houvesse biomassa a abandonar o mesmo. Feito isto, colocou-se o cartucho no tubo com sifão. Já no balão de destilação, colocaram-se cerca de 160 mL de solvente. O sistema de refrigeração consistiu num condensador de Allihn onde passava água corrente.

A extração inicia-se quando a ebulição do solvente começa e deve manter-se a temperatura ligeiramente acima do limiar da ebulição (cerca de 80°C). Tem a duração de 6h. As extrações foram todas feitas em duplicado, de forma a garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Na Figura 8, observa-se a montagem experimental. Note-se que no sistema de Soxhlet número 2 (ver Figura 8) já se verifica a mudança da cor do solvente.



Figura 8 – Montagem experimental da extração Soxhlet.

Terminada a extração, a solução contendo o extrato é filtrada e os compostos quantificados. O pós-tratamento e a quantificação dos vários componentes da amostra (lípidos totais, ácidos gordos e pigmentos) será explicado no Capítulo 2.3.5.

2.3.3 Extração acelerada com solventes

A extração acelerada com solvente foi utilizada para extração de lípidos da microalga *C. Cohnii*, uma vez que, pela utilização de solventes verdes, como explicado no Capítulo 1.2.3.3, pode ser considerada uma técnica verde. Para além disso, permite obter resultados semelhantes à extração Soxhlet, em tempos muito inferiores, com menores quantidades de biomassa e um volume de solvente muito reduzido. O equipamento utilizado foi o Dionex ASE 150, da Thermo Scientific, acoplado a uma garrafa de azoto, como gás de pressurização e lavagem. Este encontra-se na Figura 9, juntamente com uma representação esquemática do mesmo.

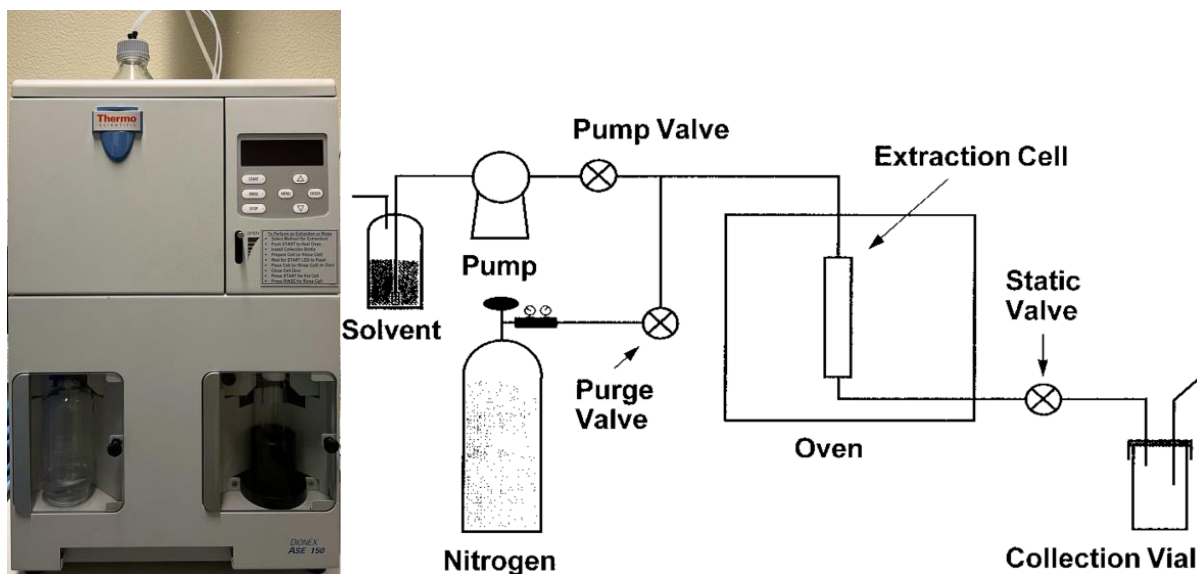


Figura 9 – Imagem do equipamento utilizado (à esquerda) e representação esquemática (à direita).

A garrafa de solvente encontra-se no topo da imagem, o forno e a célula de extração encontram-se imediatamente abaixo e o frasco de recolha encontra-se no canto inferior direito.

Para realização dos ensaios, utilizam-se 250 mg da biomassa (submetida aos diversos pré-tratamentos) que são misturados com 4 g de esfera de vidro (3 mm ϕ) e colocados dentro do extrator (5 cm³ de volume interno). Nas extremidades deste, é colocado um filtro de celulose, como suporte do leito e para evitar o arrastamento de biomassa da célula de extração. A mistura de esferas com a biomassa permite obter um leito mais fluido, facilitar a dispersão do solvente por toda a matriz sólida e evitar a colmatação do leito sólido e a existência de caminhos preferenciais (“channeling”) para o solvente. Para além disso, no final da extração, a separação das esferas da biomassa é fácil, permitindo a reutilização das esferas e o pós-processamento da biomassa extratada (o que já não se encontra no âmbito deste trabalho). Todas as extrações foram realizadas em duplicado, para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Realizou-se a extração por ASE, para todas as amostras de biomassa resultante dos vários pré-tratamentos anteriormente definidos, utilizando hexano como solvente e um programa padrão que consistia em 2 ciclos de extração estáticos, com duração de 3 minutos, à temperatura de 120°C. Estes ensaios permitem comparar o efeito dos vários tipos de pré-tratamento da biomassa no rendimento e eficácia da extração por ASE.

Por outro lado, a biomassa liofilizada e submetida a moagem no moinho de bolas, foi utilizada para fazer o estudo de otimização por desenho experimental de dois parâmetros da técnica de ASE (tempo de extração e temperatura), para dois solventes considerados verdes e ambientalmente benignos: acetato de etilo e 2-metiltetrahydrofurano. Na secção seguinte (2.3.3.1) está detalhado o planeamento experimental utilizado neste estudo.

Relativamente a todas as experiências realizadas pela técnica de ASE, as condições restantes foram idênticas em todas as extrações: volume de lavagem de 60%, tempo de purga de 30 segundos e tempo de pré-aquecimento de 1 minuto.

No final, obtém-se uma solução contendo o extrato e que será analisada de forma análoga ao realizado para os extratos obtidos por Soxhlet, cujo tratamento se encontra no Capítulo 2.3.5.

2.3.3.1 Planeamento experimental

O planeamento das experiências baseou-se na variação simultânea de dois fatores num domínio experimental com as condições operativas a utilizar no ASE. Utilizou-se um método com base numa superfície de resposta, com distribuição para dois fatores de Doehlert [29]. O objetivo deste planeamento é estabelecer condições de temperatura e tempo de extração (fatores) para as quais o rendimento da extração (em lípidos totais, ácidos gordos totais e DHA) é máximo.

O domínio experimental foi definido estabelecendo o intervalo de variação de temperaturas entre 40 a 200°C, que corresponde à gama de trabalho do equipamento e o tempo de extração entre 2 e 20 minutos, uma vez que se sabe que que extrações mais longas não provocam aumentos de rendimento significativos [30]. Da mesma forma, utilizou-se apenas um ciclo de extração, uma vez que se aferiu em estudos anteriores [30] que a existência de mais ciclos não conduzia a melhorias no rendimento e eficácia da extração.

De seguida, foi possível aplicar a distribuição de Doehlert [29], obtendo as condições específicas para cada ensaio. Assim, realizaram-se 14 ensaios em 7 condições diferentes, uma vez que se considerou uma matriz com um número de repetições de ensaio igual a 2, com vista à obtenção de graus de liberdade suficientes para aplicação da análise de variância. A Tabela 1 resume as temperaturas e tempos de extração utilizados. Como solventes, utilizaram-se acetato de etilo e 2-metiltetrahidrofurano, perfazendo um total de 28 extrações.

Tabela 1 – Condições experimentais obtidas pela distribuição de Doehlert.

Testes	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1-2	120	11
3-4	200	11
5-6	40	11
7-8	160	19
9-10	80	3
11-12	160	3
13-14	80	19

Obteve-se, desta forma uma superfície de resposta cujo modelo que a descreve é um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 14).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (14)$$

Nesta equação, Y corresponde à resposta de cada experiência, β aos diversos parâmetros do modelo polinomial e X ao nível do fator experimental.

Para além disto, foi também necessário codificar os níveis dos fatores experimentais, pelas vantagens apresentadas em estudos da área [31], permitindo a utilização de diferentes unidades no mesmo modelo. Esta codificação consiste em criar uma simetria em relação a um centro, em unidades codificadas. Explicando melhor, transformar as variáveis em valores equidistantes a um valor central, variando entre -1 e 1 (limites mínimo e máximo, respetivamente). Esta transformação foi feita recorrendo à Equação 15.

$$F_i = \frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \quad (15)$$

Nesta equação, F_i corresponde à transformação codificada, Z_i aos níveis, Z_i^0 ao valor real do fator no centro do planeamento e ΔZ_i às unidades codificadas. Assim, apresenta-se na Tabela 2 os níveis de cada fator experimental, codificados.

Tabela 2 – Níveis dos fatores testados codificados

Testes	Temperatura real (°C)	Temperatura codificada	Tempo real (min)	Tempo codificado
1-2	120	0	11	0
3-4	200	1	11	0
5-6	40	-1	11	0
7-8	160	0,5	19	0,87
9-10	80	-0,5	3	-0,87
11-12	160	0,5	3	0,87
13-14	80	-0,5	19	-0,87

De forma a obter os parâmetros β , deve-se resolver a equação matricial para equações lineares, apresentada na Equação 16.

$$Y = F \times \beta \Leftrightarrow \beta = 1/F \times Y \quad (16)$$

Nesta equação, Y representa a matriz das respostas experimentais, F a matriz dos valores codificados e β a matriz dos parâmetros. Note-se que o número de colunas da matriz $1/F$ não é igual ao número de linhas da matriz Y , pelo que não podem ser diretamente multiplicadas. Assim, é ainda necessário proceder a outra transformação [32], que se mostra na Equação 17.

$$\beta = (F'F) \times F'Y \quad (17)$$

onde F' é a matriz transposta de F .

Para terminar, validou-se o ajuste do modelo polinomial aos resultados obtidos experimentalmente utilizando um método estatístico, o teste de Fisher de razão das variâncias. Aferiu-se a eficácia dos parâmetros e o desajuste do modelo [31].

2.3.4 Extração supercrítica

Da mesma forma que o ASE, a extração supercrítica foi também realizada para obtenção da fração lipídica de *C. Cohnii* pelas várias vantagens que apresenta, das quais vale a pena mencionar: a utilização de um solvente verde, a possibilidade de fracionamento durante a extração e a obtenção de um extrato livre de solvente.

O equipamento utilizado para a extração encontra-se na Figura 10.



Figura 10 – Equipamento de extração supercrítica utilizado na atividade experimental.

Uma vez que diversas partes do equipamento não estão visíveis na figura, apresenta-se a Figura 11, onde este se representa esquematizado.

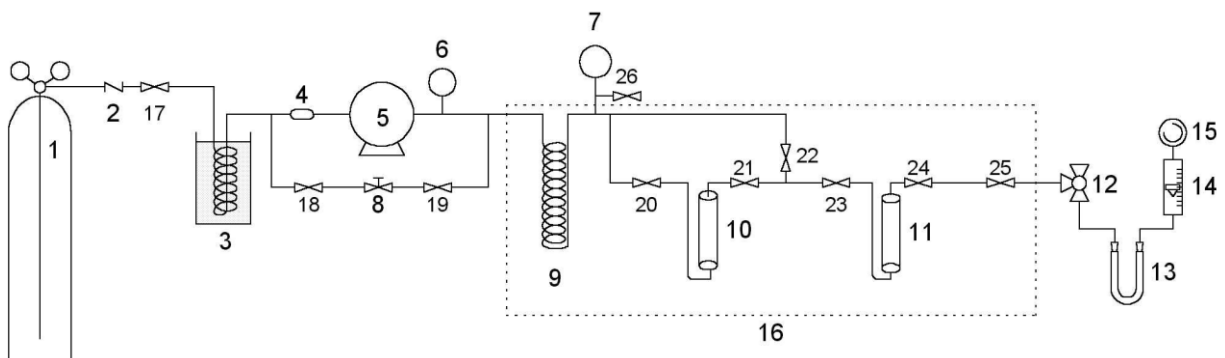


Figura 11 – Representação esquemática do equipamento de extração supercrítica utilizado no presente trabalho. 1 – garrafa de CO₂; 2 – válvula de não retorno; 3 – serpentina arrefecida com gelo; 4 – filtro de alta pressão; 5 – bomba de circulação; 6, 7 – manômetros; 8 – regulador de pressão; 9 – serpentina aquecida no banho; 10, 11 – células de extração; 12 – válvula de expansão (3 vias); 13 – tubo de recolha, de vidro e em U; 14 – rotâmetro; 15 – contador de gás húmido; 16 – banho termostático de água; 17-26 – válvulas.

O equipamento encontra-se ligado a uma garrafa de dióxido de carbono liquefeito (1). Esta garrafa possui um tubo prolongador, que vai da saída de gás até ao fundo da garrafa, de forma a garantir que apenas o CO₂ liquefeito sai. Abandonando a garrafa, o líquido segue para uma serpentina (3) de comprimento igual a 2 m, arrefecida por gelo. De seguida, o fluido é filtrado num filtro de alta pressão (4), de malha de 7 µm (modelo SS-4F-7, Whiley), antes de entrar na bomba (5) (modelo NSI-33R, Bodine Electric Company). Esta injeta o dióxido de carbono no sistema, cuja pressão é controlada pelo regulador de pressão (8) (modelo 26-1761-24, Tescom Corporation) e pode ser lida no manómetro (6) (modelo PG10-4.5, General Service Gauge, Tipo S, Omega Engineering).

Ao sair da bomba, o fluido atravessa uma serpentina (9) de 6 m de comprimento, submergida num banho termostático de água (16), de forma a aumentar a sua temperatura acima da temperatura crítica do CO₂, possibilitando a sua transição a fluido supercrítico. A temperatura do banho (16) é mantida por duas resistências com agitador (Special 240 V, Grant e ED 230V, Julabo), é medida por uma sonda de resistência de platina (modelo PRA 6035, Comark Electronics) e é indicada num leitor digital (modelo 6800, Comark Electronics), com precisão de ±0.05°C.

A pressão no sistema de extração pode ser lida com alta precisão (até 500.0 bar, incerteza de ±0.5 bar) num manómetro (7) (tipo Bourdon, modelo CM-64435 TC, Heise). O fluido supercrítico é injetado na célula de extração (modelo MS-17, High Pressure Equipment) (11) que está também submersa no banho (16). Esta célula, de aço inoxidável ASI 316, tem 5 cm³ de volume interno e é fechada com um aperto de 7.5 m.kg.

Após o tempo de contacto adequado com a amostra, o fluido supercrítico, juntamente com as substâncias extraídas, são transportados para fora da célula e são expandidos à pressão atmosférica, numa válvula de três vias (12) (modelo 60-15 HF4, High Pressure Equipment). Esta válvula encontra-se à mesma temperatura do banho e esta é mantida por um reóstato (Selecta, 300 W). A temperatura é também medida por uma sonda de resistência de platina (modelo PRA 6035, Comark Electronics) e é indicada num leitor digital (modelo 6800, Comark Electronics), com precisão de ±0.05°C.

Depois da válvula, existe um tubo de vidro, em U (13), submerso em gelo e cujo interior está preenchido com algodão, de modo a criar uma ratoeira onde os compostos precipitam, para serem depois recuperados. O dióxido de carbono, livre de extrato lipídico, abandona o tubo em U (13), passando por um rotâmetro (14) (Modelo Masterflex, Cole Palmer), onde se mede o seu caudal de saída. O caudal é controlado pela válvula 12. De seguida, passa por um contador de gás húmido (15) (modelo 802 AI-17-1, American Meter Company). Sendo este equipamento analógico e a menor divisão da escala 0.01 L, permite obter resultados com a precisão de ±0.005 L. É também possível medir a temperatura do gás no contador, no intervalo de 0 a 50 °C, num termómetro de mercúrio. Com o auxílio de um cronómetro, é também possível medir o caudal de gás. O volume lido no contador deve ser corrigido para as condições normais de pressão e temperatura. Para tal, recorreu-se a um barómetro (modelo U242, F. Darton), onde se pode ler a pressão atmosférica e a temperatura ambiente. Este processo encontra-se descrito no Anexo B.

2.3.4.1 Técnica experimental

Primeiramente, procede-se à montagem da célula de extração. O enchimento da célula, de forma semelhante ao ASE, é feito por uma mistura de 1,2 g de biomassa de *C. Cohnii* e cerca de 5 g de esferas de vidro, de 3 mm de diâmetro, de forma a não colmatar o leito da matriz sólida, pela formação de um bolo. Para além disso, colocou-se algodão hidrófilo em ambas as extremidades do extrator, de modo a evitar o arrastamento da biomassa. A célula é, então, anexada ao resto do equipamento de extração supercrítica.

Feito isto, o banho deve ser enchido até ao topo, submergindo a célula de extração, a serpentina, a tubagem e as válvulas contidas no seu interior. Terminado de encher, deve proceder-se à ligação das resistências de aquecimento e determinação do *set-point* da temperatura. Deve também ligar-se a sonda e o leitor digital, para aferir a evolução da temperatura do banho. Verifica-se também se existem fugas, pela existência (ou não) de bolhas nas juntas extrator/equipamento. Liga-se a resistência para aquecimento da válvula de três vias (12). Coloca-se o tubo em U.

Seguidamente, deve saturar-se o contador de gás húmido, pela passagem de dióxido de carbono no mesmo. Uma vez que o CO₂ é solúvel em água, este poder-se-ia dissolver e comprometer a leitura. Para tal, faz-se passar o gás referido durante 45 minutos, abrindo as válvulas 17 e 26. É também necessário conectar a válvula 26 à entrada do contador. Após a saturação, o nível de água do contador deve ser ajustado. É preciso registar a altura manométrica do contador (correspondente à altura de mangueira submergida num recipiente de vidro, por inexistência de manómetro), a pressão atmosférica e a temperatura ambiente, de forma a realizar a correção do volume de dióxido de carbono consumido (referido no capítulo anterior e explicitado no Anexo B). No final do processo de saturação, a válvula 26 deve ser fechada.

Em seguida, deve arrefecer-se a zona de compressão da tubagem (3). Este passo garante que não existe transição de estado do CO₂ (i.e., mantém o gás liquefeito), que provocaria problemas de cavitação na bomba.

Garantido o arrefecimento da tubagem que antecede a bomba, esta pode ser ligada, sendo a sua eficiência regulada para cerca de 40%. Devem abrir-se as válvulas 18, 19, 22 e 23. Deve então atentar-se a evolução da pressão do sistema no manómetro (7) e alterar o regulador de pressão para o valor da pressão pretendido. Quando atingido o equilíbrio, a válvula 23 pode ser aberta, lentamente, de forma a pressurizar a célula de extração. Abre-se a válvula 24. A extração está pronta para começar.

Para dar início à extração, abre-se, cuidadosamente, a válvula de três vias (12) no sentido sistema/tubo em U e começa-se a contar o tempo de extração. O caudal deve ser ajustado, com o rotâmetro (30-50%) e confirmado com o contador e um cronómetro, para cerca de 0.12 g/min. Recolhem-se quatro extratos ao longo do tempo total de extração: os primeiros três a cada 30 minutos e o quarto passados 90 minutos do terceiro, sendo o tempo total de extração de 180 minutos.

Entre recolhas, a válvula de três vias e a tubagem adjacente são lavadas. Embora se tente assegurar que o fluido supercrítico leva todo o extrato consigo, poderá ocorrer alguma precipitação de compostos na válvula de expansão (12) e tubagem adjacente, pelo que estas são lavadas com hexano,

através da utilização da terceira via da válvula de três vias (12). Antes de mais, devem fechar-se as válvulas 12, 23 e 24. Diminui-se a eficiência da bomba para cerca de 30% e desliga-se. Retira-se o tubo em U. Abre-se a válvula (12) no sentido exterior/tubo em U e faz-se passar hexano pela válvula e tubagens. Começa-se por uma quantidade reduzida de solvente, para a lavagem inicial; seguida por uma quantidade moderada, recirculada três vezes e, finalmente, mais uma pequena quantidade de solvente fresco para garantir a lavagem total. Seca-se as tubagens com um gás inerte. Feito isto, pode continuar-se para o extrato seguinte, substituindo o tubo em U e seguindo a ordem inversa das operações referidas. No último extrato, após o fecho das válvulas e o desligar da bomba, passa-se solvente da mesma forma, com a diferença que se passa desde o ponto de ligação a jusante do extrator até ao exterior.

Terminada a extração recolhe-se o extrato do tubo em U. Para tal, o interior de cada tubo, bem como o algodão que o preenchia são lavados com hexano, múltiplas vezes – até que o solvente saia incolor. Esta solução é depois tratada da mesma forma que as previamente referidas noutros métodos de extração. Este processo encontra-se explicitado no capítulo seguinte.

Os estudos de extração supercrítica foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito do pré-tratamento da biomassa no rendimento em lípidos totais, ácidos gordos e DHA. Assim a biomassa proveniente dos vários pré-tratamentos anteriormente descritos foi submetida a extração com CO₂ supercrítico, tendo sido os ensaios experimentais realizados à temperatura de 41°C e pressão de 300 bar. Foi ainda realizada uma experiência 41°C e um valor de pressão mais baixo (150 bar). Nesta última experiência procedeu-se a uma extração sequencial em duas etapas, sendo a primeira realizada nas condições referidas, 41°C e 150 bar, com a duração de 180 minutos, e a segunda etapa realizada a 41°C e 300 bar, com a duração de 45 minutos. O intuito deste ensaio experimental foi conseguir um fracionamento do extrato em duas frações, com enriquecimento da segunda fração em DHA.

2.3.5 Quantificação dos lípidos totais no extrato

Como se pode verificar, depois de todas as extrações obtém-se uma solução extrato, onde estão os componentes de interesse que se pretendem recuperar e quantificar.

A quantificação do extrato total (lípidos totais) foi realizada por gravimetria (balança, modelo AI3204-S, Mettler Toledo). Assim, a solução contendo o extrato foi evaporada sob vácuo, usando um evaporador rotativo (rota-vapor, modelo R110 Büchi e bomba de vácuo, modelo V-500, Büchi Vac), e a quantidade de extrato total obtida por pesagem. Para tal utilizaram-se balões de concentração, previamente tarados e a peso contante, os quais após a concentração no rota-vapor eram colocados na estufa por 1h a 30°C e, após isto, por 12 h no exsiccador, de forma a ficarem também a peso constante. Todas estas operações eram realizadas protegendo o extrato da luz (cobrindo os recipientes com folha de alumínio) e a atmosfera inerte (sob azoto) de forma a evitar a degradação dos compostos por ação da luz e do ar. Previamente à evaporação das soluções, e para as situações que assim justificassem, a solução contendo o extrato era filtrada (filtros PTFE, 0,2 µm).

Pelo exposto, com a Equação 18 é possível calcular a fração lipídica ou o extrato total, obtido nos vários ensaios.

$$\%LT(m/m) = \frac{m_{balao+lipidos} - m_{balao}}{m_{BMSSC}} \times 100\% \quad (18)$$

onde $\%LT(m/m)$ é a fração de lípidos totais na biomassa seca e livre de cinzas, $m_{balao+lipidos}$ é a massa do balão após a concentração, m_{balao} é a massa do balão vazio e m_{BMSSC} é a massa de biomassa seca e sem cinzas.

Terminada a quantificação dos lípidos totais, a quantificação do perfil de ácidos gordos foi realizada para todas as amostras, seguindo o protocolo descrito no Capítulo 2.2.6.2.

2.4 Pigmentos da microalga *C. cohnii*

Os pigmentos da microalga *Cryptocodinium cohnii* foram quantificados por espectrofotometria no visível, quando em concentração superior ao limite de detecção do equipamento, utilizando um espectrofotómetro UV-Vis (Hitachi U-2000). Para tal, após o passo de filtração, mediu-se o volume de amostra. De seguida, transferiu-se uma parte para uma cuvete e colocou-se no equipamento, traçando o espectro de absorção na gama de comprimentos de onda 380-700 nm. Feito isto, recorreu-se à Lei de Lambert-Beer, Equação 19, para cálculo da concentração de pigmentos.

$$C = \frac{A}{\varepsilon \times l} \quad (19)$$

Nesta equação, C é a concentração de pigmentos no extrato, A é a absorvância, ε é a absorvidade e l é o percurso ótico. O valor de absorvância utilizado foi o máximo, estando situado na região de comprimentos de onda 453-458 nm. O valor da absorvidade utilizado foi 259,2 L.g⁻¹.cm⁻¹ que é o valor de absorvidade para o β -caroteno, em hexano, para o comprimento de onda de máxima absorção e, desta forma, o valor de pigmentos totais vem em equivalentes de β -caroteno.

O extrato obtido foi também analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para tal, utilizou-se um cromatógrafo líquido (modelo Series 1100, Hewlett Packard), com um detetor UV-Vis ajustado a 457 nm (comprimento de onda máximo de absorção da maior parte dos extratos). Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 Vydac 201 TP54 (250x46 mm), num regime de eluição isocrático, a um caudal de 1 ml/min, sendo o eluente uma mistura de metanol e acetonitrilo 90:10 (v/v), respetivamente. O β -caroteno nos extratos foi identificado por comparação com o tempo de retenção do padrão (CalBiochem, 97%). Verificou-se que os cromatogramas apresentavam outros picos correspondendo a outros carotenos, sendo possível identificar a presença de γ -caroteno, tendo em atenção os dados presentes na literatura para esta microalga [33].

Com o valor da concentração, o volume de solução e a massa da biomassa utilizada na extração, foi possível calcular o rendimento da extração em pigmentos.

3 Resultados e discussão

3.1 Fermentações de *Cryptocodinium cohnii*

Realizaram-se quatro fermentações, de acordo com os métodos previamente descritos, utilizando duas fontes de carbono: melação de cana e glicerol. Estas fermentações decorreram num biorreator de 7 L, 3 L de volume útil, em regime *fed-batch*, com monitorização constante da temperatura, pH e DO. Também se aferiu a concentração da biomassa e a evolução da fração lipídica e do perfil de ácidos gordos.

3.1.1 Ensaio I

No Ensaio I utilizou-se melação de cana como fonte de carbono e as condições operatórias descritas no Capítulo 2.2.4. No entanto, houve uma contaminação provocou o término da fermentação e o descarte da cultura.

3.1.2 Ensaio II

3.1.2.1 Monitorização da fermentação

O Ensaio II consistiu numa repetição do Ensaio I. A evolução do número de células foi monitorizada por citometria de fluxo e por espectrofotometria. Note-se que, por erro de cálculo, a concentração de glicose no reator foi muito superior à recomendada, pelo que foi necessário purgar cerca de 1.8 L do reator e recomeçar a fermentação, por adição de nutrientes, meio e inóculo. Os resultados, considerados apenas após a reinoculação, encontram-se na Figura 12.

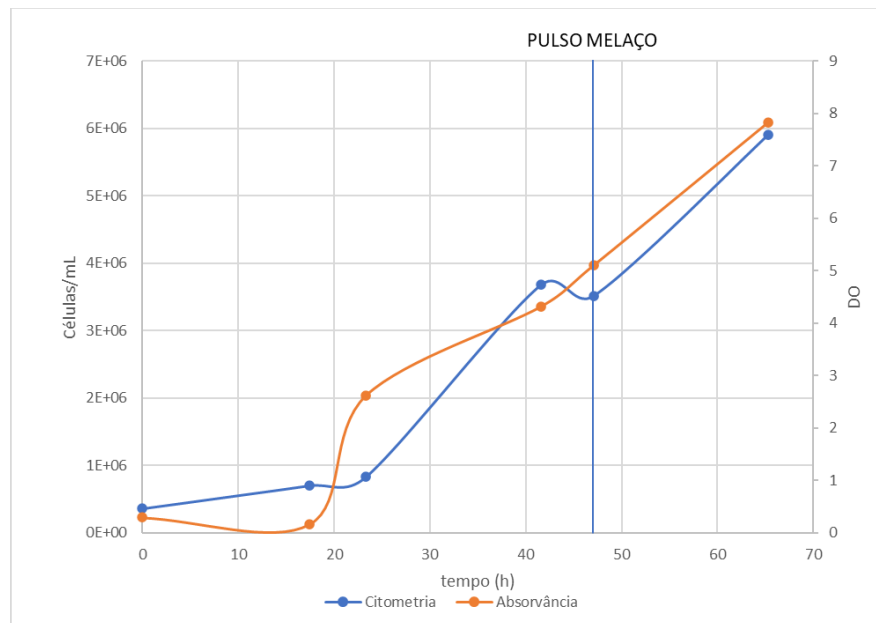


Figura 12 – Evolução temporal da contagem celular e da absorvância corrigida no Ensaio II.

Na Figura 12, o traço vertical consiste num pulso de melação. Através das correlações apresentadas nos Capítulos 2.2.4.4 e 2.2.4.5, foi possível converter estes valores para a evolução em peso seco e representá-los juntamente com os pesos secos obtidos experimentalmente (Figura 13).

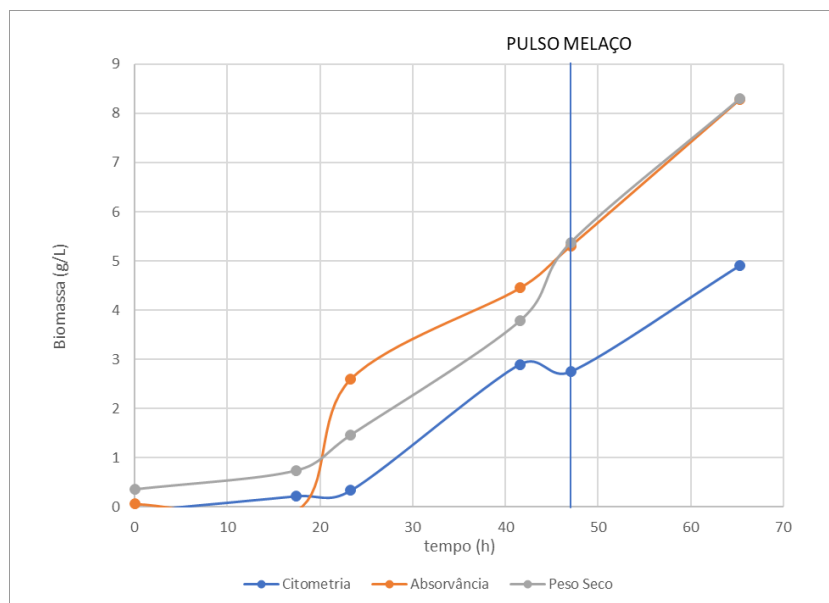


Figura 13 – Evolução dos pesos secos calculados por espectrofotometria, citometria e experimentalmente, para o Ensaio II.

Como se pode verificar, o peso seco seguiu a mesma tendência por ambos os métodos, sendo o da espectrofotometria o que melhor se adequa e o utilizado para o cálculo da taxa específica de crescimento. Não se observou um patamar nesta curva, pela terminação precoce, e considerou-se que a fase exponencial teve a mesma duração que a fermentação, sendo o valor da taxa $0,060 \text{ h}^{-1}$. A concentração de biomassa máxima obteve-se no final da fermentação, sendo o seu valor $8,29 \text{ g/L}$.

Ao retirar-se a amostra para $t=47.1 \text{ h}$, verificou-se, pelas tiras Combur, que a concentração de glicose era muito reduzida. Quando sujeita a este tipo de stresse, a microalga utiliza os lípidos que acumula intracelularmente como fonte de carbono, diminuindo o seu teor lipídico. De forma a evitar isso, adicionou-se um pulso de melação de cana. Estes resultados foram, mais tarde, verificados por cromatografia, como se pode observar na Figura 14.

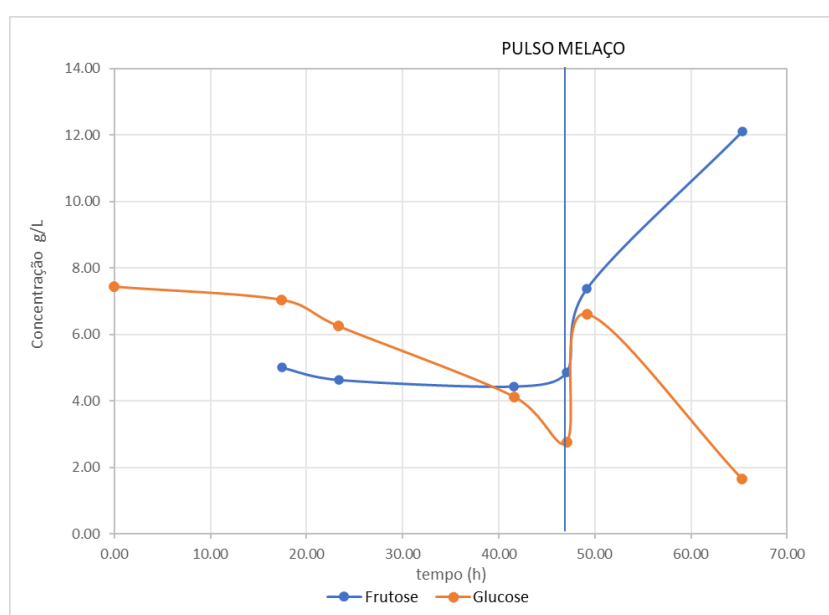


Figura 14 – Evolução da concentração de fonte de carbono ao longo do tempo para o Ensaio II.

Também é possível observar nesta figura que a frutose resultante da hidrólise do melaço não é consumida pela microalga, sendo a sua concentração constante. O aumento deve-se à adição do pulso. Para além disso, verificou-se pelas tiras de glicose, na amostra $t=65,33$ h, que a concentração de glicose estava a diminuir. O mesmo pôde ser aferido na Figura 14, *a posteriori*. Assim, por não haver experiência em relação a reinoculações da cultura, decidiu-se que o melhor a fazer seria terminar a fermentação, ao invés de se inserir outro pulso.

Os dados da agitação e do oxigénio dissolvido não foram registados e os de azoto residual e ácidos gordos obtiveram-se apenas para os dois últimos pontos, sendo praticamente constantes, indicando que terminar a fermentação foi a decisão correta, uma vez que não estava a ocorrer acumulação de lípidos.

Para além do peso seco, também se usou a citometria para aferição da integridade da membrana celular e da atividade enzimática, usando os corantes PI e CFDA, respetivamente. Os resultados encontram-se na Figura 15.

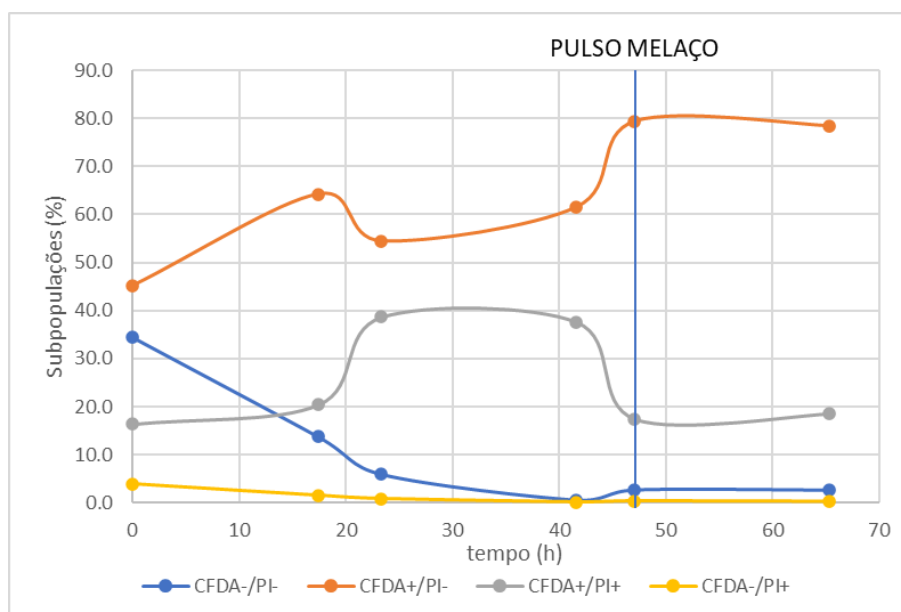


Figura 15 – Distribuição das várias subpopulações da cultura, ao longo do tempo, no Ensaio II.

A curva amarela corresponde à subpopulação com a membrana permeabilizada e sem atividade enzimática, praticamente inexistente ao longo de toda a fermentação.

A curva azul corresponde à subpopulação com a membrana intacta e sem atividade enzimática. A presença de uma fração considerável destas células ao início, 34,4%, deve-se ao facto de existir uma cultura no reator, anterior à reinoculação, que se encontrava inibida pelo substrato e, desta forma, não apresentava atividade enzimática. A fração deste tipo de células diminui consideravelmente, sendo praticamente inexistente no final, indicando a remoção da inibição.

A curva cinzenta corresponde à subpopulação com atividade enzimática mas com membrana permeada. O seu valor no final da fermentação, 18,6%, é muito próximo do inicial, 16,4%, pelo que as células não devem ter estado expostas a condições adversas.

Finalmente, a curva laranja corresponde à subpopulação com membrana intacta e com atividade enzimática, sendo a população de interesse. Este tipo de células foi sempre o mais presente ao longo do ensaio, terminando com uma fração de 78.4%, sendo um resultado satisfatório.

3.1.2.2 Caracterização da biomassa

Terminada a fermentação, procedeu-se então a análise para caracterização da biomassa obtida. Esta análise fez-se após a liofilização da biomassa da microalga. Note-se que todos os valores referidos se referem à biomassa seca e livre de cinzas.

Obeve-se uma humidade de $0,2\pm 0,2\%$ (m/m) e um teor em cinzas de $4,2\pm 0,2\%$ (m/m), de acordo com o método abordado no Capítulo 2.2.6.1.

Os lípidos totais foram determinados por extração Soxhlet e ASE, com hexano, sendo os resultados obtidos $7,60\pm 2,74$ g/100g_{BM} e $7,13\pm 2,07$ g/100g_{BM}.

Os pigmentos, em equivalentes de β -caroteno, foram quantificados apenas no extrato obtido por ASE, por espectrofotometria, sendo o resultado $27,58\pm 0,18$ μ g/g_{BM}.

Os ácidos gordos caracterizaram-se pela transmetilação do óleo resultante do Soxhlet e do óleo resultante do ASE. Os resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição percentual da biomassa resultante do Ensaio II (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos totais (TFA) nos lípidos totais (LT).

Ácido Gordido	Soxhlet	ASE
10:0 – Cáprico	0,94±0,01	1,62±0,03
12:0 – Láurico	5,29±0,06	7,45±0,06
14:0 – Mirístico	20,67±0,02	19,87±0,09
14:1 – Miristoleico	0,07±0,00	0
16:0 – Palmítico	22,60±0,31	16,15±0,07
16:1 ω 9 – Palmitoleico	1,64±0,02	1,32±0,03
18:0 – Esteárico	1,08±0,04	1,41±0,01
18:1 ω 9 – Oleico	11,87±0,12	11,01±0,09
18:2 ω 6 – Linoleico	1,10±0,03	0,39±0,01
20:0 – Araquídico	0,22±0,00	0,06±0,00
22:0 – Beénico	0,19±0,01	0,35±0,0000
22:5 ω 3 – DPA	0,30±0,01	0,35±0,00
22:6 ω 3 – DHA	33,94±0,29	40,02±0,27
%TFA/LT (m/m)	77,48±0,84	75,00±1,49

Como se pode verificar, esta biomassa possui um teor bastante elevado em DHA, cerca de 30-40% dos ácidos gordos totais. No entanto, dado à baixa fração lipídica e quantidade reduzida de biomassa, esta não foi utilizada, posteriormente.

3.1.3 Ensaio III

3.1.3.1 Monitorização da fermentação

No Ensaio III utilizou-se glicerol como fonte de carbono e as condições operatórias dos outros ensaios. No entanto, houve uma falha no biorreator, que provocou um aumento do pH durante a noite. Assim, terminou-se a fermentação sem registo da evolução da mesma.

3.1.3.2 Caracterização da biomassa

Da mesma forma que no ensaio anterior, caracterizou-se a biomassa após a centrifugação para remoção do meio e liofilização.

Relativamente ao teor em humidade e cinzas, os resultados foram $1,3\pm 0,1\%$ (m/m) e $5,3\pm 0,0\%$ (m/m), respetivamente.

Os lípidos totais foram caracterizados por extração Soxhlet e ASE, sendo os resultados obtidos $12,32\pm 0,12\%$ (m/m) e $10,97\pm 0,64\%$ (m/m).

Os pigmentos, em equivalentes de β -caroteno, foram aferidos no extrato de Soxhlet e ASE, sendo os valores $28,90\pm 6,95 \mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ e $19,87\pm 0,63 \mu\text{g/g}_{\text{BM}}$, respetivamente.

Os ácidos gordos foram quantificados por transmetilação do extrato lipídico resultante das extrações referidas. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição percentual da biomassa resultante do Ensaio III (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos totais (TFA) nos lípidos totais (LT).

Ácido Gordo	Soxhlet	ASE
10:0 – Cáprico	$1,71\pm 0,02$	$1,62\pm 0,03$
12:0 – Láurico	$7,45\pm 0,05$	$7,45\pm 0,06$
14:0 – Mirístico	$19,77\pm 0,10$	$19,87\pm 0,09$
14:1 – Miristoleico	0	0
16:0 – Palmítico	$16,33\pm 0,26$	$16,15\pm 0,07$
16:1 ω 9 – Palmitoleico	$1,37\pm 0,02$	$1,32\pm 0,03$
18:0 – Esteárico	$1,52\pm 0,05$	$1,41\pm 0,01$
18:1 ω 9 – Oleico	$11,42\pm 0,56$	$11,01\pm 0,09$
18:2 ω 6 – Linoleico	$0,42\pm 0,02$	$0,39\pm 0,01$
20:0 – Araquídico	$0,06\pm 0,00$	$0,06\pm 0,00$
22:0 – Beénico	$0,37\pm 0,00$	$0,35\pm 0,00$
22:5 ω 3 – EPA	$0,35\pm 0,01$	$0,35\pm 0,00$
22:6 ω 3 – DHA	$39,24\pm 0,78$	$40,02\pm 0,27$
%TFA/LT (m/m)	$72,85\pm 1,34$	$75,00\pm 1,49$

Esta biomassa, face à anterior, apresenta um maior teor lipídico, mantendo a vantagem da alta concentração de DHA nos TFA. Para além disso, obteve-se também mais biomassa que no ensaio anterior. No entanto, o teor lipídico continuava muito baixo, face à capacidade de acumulação de lípidos da *C. Cohnii*, pelo que não se utilizou esta biomassa em ensaios futuros.

3.1.4 Ensaio IV

3.1.4.1 Monitorização da fermentação

Este ensaio consistiu numa repetição do Ensaio III, usando glicerol como fonte de carbono e as condições operatórias utilizadas em todos os ensaios. O seguimento da fermentação foi, de forma semelhante, realizado por citometria e espetroscopia, estando os resultados na Figura 16.

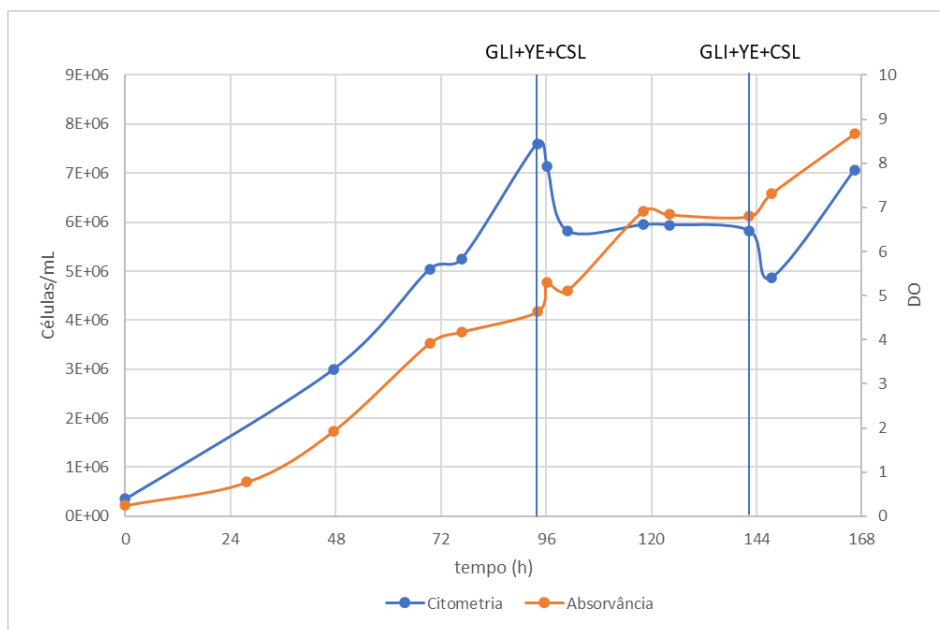


Figura 16 – Evolução temporal da contagem celular e da absorvância corrigida no Ensaio IV

Com as correlações já mencionadas, transformaram-se estes valores em valores de peso seco, cujo resultado se apresenta na Figura 17.

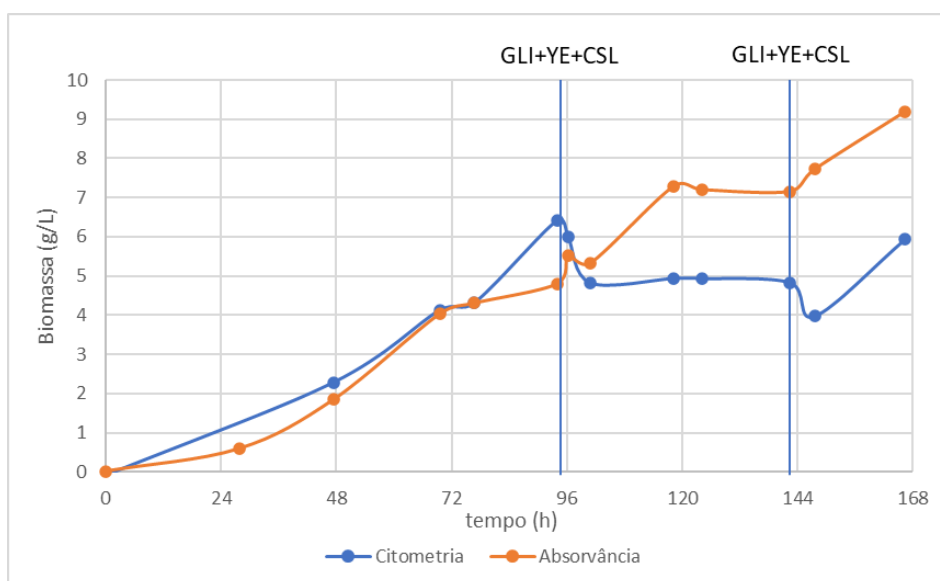


Figura 17 – Evolução dos pesos secos calculados por espectrofotometria e citometria, para o Ensaio II.

Como se pode verificar, ambos seguiram a mesma tendência, regra geral, estando sempre bastante próximos. A taxa específica de crescimento, pela OD corrigida, foi $0,019 \text{ h}^{-1}$ e a concentração máxima foi $9,19 \text{ g/L}$.

Como não existia forma imediata de obter a concentração de glicerol, utilizaram-se conhecimentos de fermentações anteriores e aguardou-se pelos resultados do HPLC, que se podem ver na Figura 18.

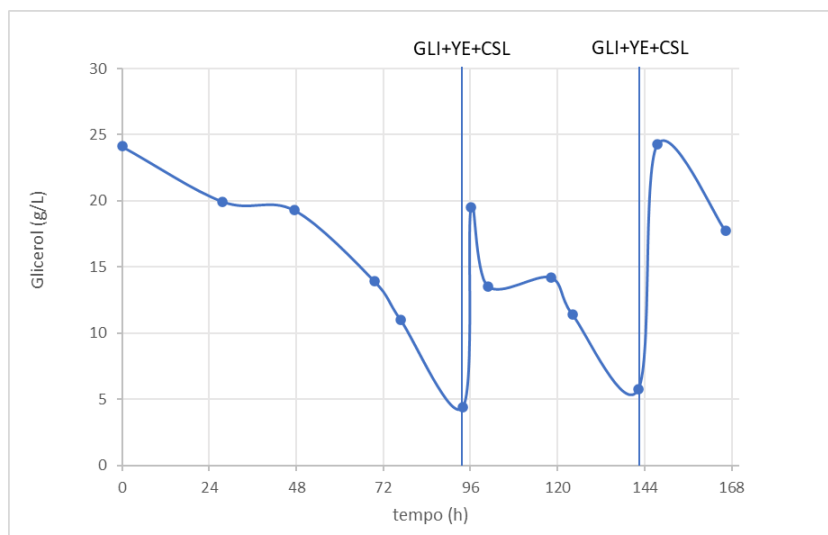


Figura 18 – Evolução da concentração de fonte de carbono ao longo do tempo para o Ensaio IV.

Como se pode verificar, os pulsos foram colocados nas alturas corretas, uma vez que a fonte de carbono estava a tender para zero nesses tempos.

Os dados da agitação e DO não foram registados, uma vez que esta fermentação já havia sido documentada e não havia interesse para o presente trabalho.

A evolução do perfil de ácidos gordos fez-se apenas para os últimos pontos da fermentação, a partir de t=94 h (fase estacionária). Este resultado, juntamente com a produtividade de DHA encontra-se na Figura 19.

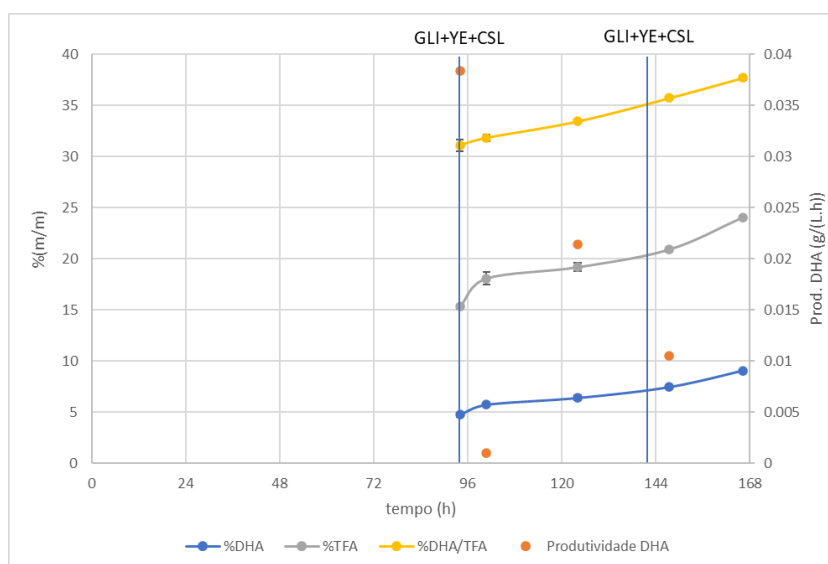


Figura 19 – Evolução da %DHA e %TFA na biomassa seca e livre de cinzas, %DHA nos TFA e produtividade de DHA.

A fração de ácidos gordos na biomassa seca e livre de cinzas variou entre 15,33 e 24,07%. A fração de DHA nesses ácidos gordos variou entre 27,70 e 31,10%, implicando uma fração de DHA na biomassa a variar entre 4,77 e 10,07%. A produtividade em DHA variou entre 0,011 e 0,038 g/(L.h). Durante toda esta fase, a microalga aumentou o seu teor em DHA, o que indica que durante este

período aconteceu a acumulação de DHA, tendo a sua concentração na microalga duplicado, aproximadamente. A evolução detalhada do perfil de ácidos gordos encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Evolução do perfil de ácidos gordos (%FA/TFA) e lípidos totais, para $t > 94$ h, no Ensaio IV.

Ácido Gordido	t=94 h	t=100,83 h	t=124,08 h	t=147,50 h	t=166,33 h
10:0 – Cáprico	1,17±0,04	1,43±0,13	1,18±0,00	1,03±0,00	1,11±0,03
12:0 – Láurico	9,46±0,10	9,48±0,48	9,67±0,12	8,99±0,02	8,61±0,07
14:0 – Mirístico	21,60±0,03	20,62±0,79	21,22±0,10	20,55±0,16	20,30±0,12
14:1 – Miristoleico	1,68±0,01	1,56±0,08	1,57±0,03	1,55±0,00	1,45±0,01
16:0 – Palmítico	17,74±0,10	17,29±0,18	16,76±0,31	15,66±0,09	15,33±0,22
16:1 ω 9 – Palmitoleico	4,10±0,03	3,90±0,14	3,92±0,02	3,82±0,00	3,48±0,03
18:0 – Estearico	0,62±0,02	0,77±0,25	0,48±0,02	0,43±0,00	0,47±0,00
18:1 ω 9 – Oleico	11,79±0,17	12,31±1,29	11,10±0,13	11,28±0,08	11,17±0,34
18:2 ω 6 – Linoleico	0,29±0,06	0,50±0,25	0,23±0,02	0,49±0,03	0,38±0,02
20:0 – Araquídico	0,12±0,01	0,11±0,02	0,09±0,00	0,07±0,01	0,07±0,00
22:0 – Beénico	0,08±0,01	0	0,07±0,00	0,07±0,01	0,10±0,00
22:5 ω 3 – EPA	0,24±0,01	0,21±0,01	0,29±0,01	0,34±0,00	0,37±0,00
22:6 ω 3 – DHA	31,10±0,57	31,81±0,36	33,42±0,17	35,71±0,04	37,70±0,19
%TFA/BM _{SSC} (m/m)	15,33±0,40	18,08±0,78	19,18±0,64	20,92±0,31	24,07±0,08

A partir destes resultados, é possível verificar que o teor em ácidos gordos insaturados e monoinsaturados diminui ou mantem-se constante, regra geral, enquanto o teor em DHA aumenta. Por outro lado, os ácidos gordos totais aumentam. Assim, como já foi mencionado noutro trabalho [30], a microalga está a utilizar os ácidos gordos monoinsaturados e insaturados para a produção de DHA.

Analisou-se, também, a distribuição da cultura de *C. Cohnii* pelas diferentes subpopulações abordadas no Ensaio II. O resultado encontra-se na Figura 20.

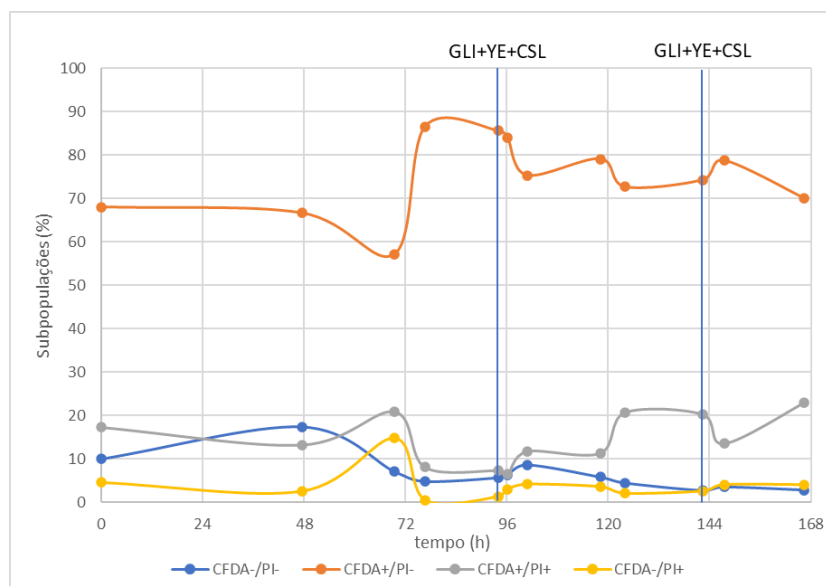


Figura 20 – Distribuição das várias subpopulações da cultura, ao longo do tempo, no Ensaio IV.

A subpopulação à qual corresponde a curva amarela, com membrana permeabilizada e sem atividade enzimática, apresentou-se quase sempre em pouca quantidade, sendo praticamente inexistente no final da fermentação.

A subpopulação com membrana intacta e sem atividade enzimática, correspondente à curva azul, foi também reduzida ao longo da fermentação, sendo quase nula no final.

A subpopulação com membrana permeabilizada e com atividade enzimática, descrita pela curva cinzenta, apresentou-se quase sempre em quantidade reduzida, apresentando um valor de 22,93% no final, uma percentagem significativa. Esta rutura da membrana pode estar relacionada com alguma influência do meio, como o aumento da agitação.

A subpopulação com membrana intacta e atividade enzimática, caracterizada pela curva laranja, é a de maior interesse e a que se apresentou, sempre, em maior quantidade, começando em 68,06% e terminando em 70,12%, tendo sido tão alta como 86,58%, para t=76,75 h.

3.1.4.2 Caracterização da biomassa

Após separação e liofilização das células da cultura, procedeu-se às análises previamente descritas.

O teor em humidade e cinzas obtido foi, respetivamente, $2,6 \pm 0,2\%$ (m/m) e $3,8 \pm 0,1\%$ (m/m).

O teor em lípidos totais foi obtido por extração por Soxhlet e por ASE, com hexano, sendo $26,58 \pm 1,58$ g/100g_{BM} e $24,13 \pm 0,57$ g/100g_{BM}, respetivamente. Verifica-se o que os valores obtidos são próximos, apesar de a extração por ASE conduzir a um teor em lípidos ligeiramente inferior. Verifica-se assim que a extração por ASE não é tão eficiente para a obtenção dos lípidos totais

Os pigmentos, em equivalentes de β -caroteno, foram quantificados no extrato do Soxhlet e do ASE, tendo-se obtido os valores de $67,26 \pm 0,68$ μ g/g_{BM} e $61,37 \pm 3,23$ μ g/g_{BM}.

Ainda se quantificaram os ácidos gordos, transmetilando a biomassa diretamente, o óleo do Soxhlet e do ASE, estando o resultado na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição percentual da biomassa resultante do Ensaio IV (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos totais (TFA) nos lípidos totais (LT).

Ácido Gordo	Biomassa	Soxhlet	ASE
10:0 – Cáprico	1,24±0,14	0,88±0,03	0,86±0,01
12:0 – Láurico	9,31±0,69	8,16±0,07	8,00±0,01
14:0 – Mirístico	20,87±0,44	20,79±0,08	20,48±0,05
14:1 – Miristoleico	1,53±0,08	1,47±0,01	1,42±0,02
16:0 – Palmítico	15,09±0,54	15,37±0,21	15,32±0,12
16:1 ω 9 – Palmitoleico	3,52±0,02	3,81±0,04	3,66±0,02
18:0 – Esteárico	0,42±0,03	0,43±0,02	0,41±0,01
18:1 ω 9 – Oleico	10,95±0,48	12,08±0,20	11,91±0,05
18:2 ω 6 – Linoleico	0,36±0,01	0,35±0,01	0,35±0,00
20:0 – Araquídico	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
22:0 – Beénico	0,08±0,01	0,08±0,00	0,08±0,00
22:5 ω 3 – EPA	0,36±0,00	0,33±0,00	0,35±0,00
22:6 ω 3 – DHA	36,22±0,31	36,20±0,36	37,12±0,18
%TFA/LT (m/m)	100,36±4,98	95,71±2,09	94,14±0,78

Atendendo ao facto de esta biomassa ter o maior teor de lípidos, maior fração de ácidos gordos e maior quantidade de biomassa disponível, esta foi a biomassa utilizada no estudo das matrizes experimentais do ASE e algumas ESC.

3.1.5 Ensaios anteriores

Neste trabalho, usaram-se também biomassas obtidas em ensaios anteriores. A caracterização da biomassa utilizada será feita nos subcapítulos adiante.

3.1.5.1 Biomassa HPH e liofilizada

O teor em humidade e cinzas desta biomassa foi, respetivamente, $3,6 \pm 0,2\%$ (m/m) e $14,8 \pm 0,1\%$ (m/m). O alto teor em cinzas desta biomassa deve-se ao facto de, para realizar o HPH, a cultura submetida diretamente a homogeneização logo após sair do fermentador. Após o HPH, as células estão quebradas, pelo que não se pode lavar para remoção do sal, sob o risco de se removerem lípidos. Assim, o alto teor de cinzas será devido à presença de sal.

O teor em lípidos totais foi determinado pela extração por Soxhlet e também por ASE, sendo os resultados obtidos, respetivamente, $21,98 \pm 3,80$ g/100g_{BM} e $16,37 \pm 0,08$ g/100g_{BM}.

A fração de pigmentos foi calculada pela análise do extrato do Soxhlet e do ASE, sendo os valores, respetivamente, $64,35 \pm 0,22$ µg/g_{BM} e $70,24 \pm 10,79$ µg/g_{BM}.

Note-se que existe uma grande incerteza associada ao valor dos lípidos totais por Soxhlet. Uma vez que o valor dos pigmentos se encontra concordante, esta incerteza deve estar relacionada com a etapa da recuperação, podendo os balões não estar a peso constante ou havido perdas na etapa da filtração, por exemplo.

Também se quantificaram os ácidos gordos diretamente da biomassa, assim como os do óleo do Soxhlet e do ASE, estando os resultados na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição percentual da biomassa HPH e liofilizada (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos nos lípidos totais.

Ácido Gordo	Biomassa	Soxhlet	ASE
10:0 – Cáprico	0,64±0,13	0,53±0,01	0,53±0,03
12:0 – Láurico	6,64±0,71	6,24±0,02	6,66±0,07
14:0 – Mirístico	20,89±0,36	20,84±0,07	21,44±0,24
14:1 – Miristoleico	1,02±0,07	1,06±0,01	0,82±0,47
16:0 – Palmítico	16,24±0,74	16,05±0,12	16,15±0,21
16:1ω9 – Palmitoleico	2,68±0,01	2,78±0,02	2,85±0,03
18:0 – Esteárico	0,63±0,06	0,61±0,01	0,57±0,02
18:1ω9 – Oleico	12,19±0,68	12,25±0,08	12,33±0,17
18:2ω6 – Linoleico	0,26±0,01	0,26±0,01	0,27±0,02
20:0 – Araquídico	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
22:0 – Beénico	0,08±0,01	0,08±0,00	0,08±0,00
22:5ω3 – EPA	0,38±0,01	0,40±0,00	0,40±0,02
22:6ω3 – DHA	38,28±0,19	38,84±0,32	37,86±0,88
%TFA/LT (m/m)	78,88±4,80	74,95±7,25	80,22±2,38

A percentagem de ácidos gordos nos lípidos totais para a biomassa foi ligeiramente inferior, mas o perfil de ácidos gordos é praticamente o mesmo. Uma vez que a biomassa não foi moída quando foi transmetilada, isto pode ser indicador da ineficiência da extração da mistura reacional utilizada na transmetilação. O valor de lípidos totais usado nos cálculos para a transmetilação direta da biomassa foi estimado a partir dos resultados obtidos na extração por Soxhlet.

3.1.5.2 Biomassa HPH e seca na estufa

O teor em humidade e cinzas desta biomassa foi, respetivamente, $8,2 \pm 0,5\%$ (m/m) e $14,5 \pm 0,1\%$ (m/m). O teor de humidade mais elevado está relacionado com o uso da estufa para a secagem. Esta revelou-se menos eficiente na secagem do que a liofilização. O alto teor de cinzas é justificado pelo mesmo motivo da biomassa HPH e liofilizada.

O teor em lípidos totais foi determinado pelos resultados obtidos na extração por Soxhlet e por ASE, sendo os resultados obtidos, respetivamente, $18,61 \pm 0,79$ g/100g_{BM} e $14,17 \pm 1,31$ g/100g_{BM}.

A fração de pigmentos foi calculada pela análise do extrato do Soxhlet e do ASE, sendo os valores, respetivamente, $60,21 \pm 0,00$ µg/g_{BM} e $58,73 \pm 5,36$ µg/g_{BM}.

Também se quantificaram os ácidos gordos da biomassa e do óleo do Soxhlet e do ASE, estando os resultados na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição percentual da biomassa HPH e estufa (em relação a TFA) e fração de ácidos gordos nos lípidos totais.

Ácido Gordo	Biomassa	Soxhlet	ASE
10:0 – Cáprico	0,89±0,06	0,52±0,08	0,56±0,02
12:0 – Láurico	7,95±0,23	6,21±0,35	6,72±0,08
14:0 – Mirístico	21,66±0,07	20,36±0,21	21,07±0,20
14:1 – Miristoleico	1,16±0,02	1,05±0,04	1,08±0,01
16:0 – Palmítico	15,77±0,19	15,94±0,18	15,97±0,07
16:1ω9 – Palmitoleico	2,76±0,00	2,76±0,02	2,84±0,01
18:0 – Esteárico	0,58±0,02	0,60±0,01	0,58±0,01
18:1ω9 – Oleico	11,71±0,16	12,44±0,20	12,37±0,04
18:2ω6 – Linoleico	0,28±0,01	0,26±0,01	0,27±0,02
20:0 – Araquídico	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
22:0 – Beénico	0,07±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00
22:5ω3 – EPA	0,38±0,01	0,40±0,00	0,40±0,00
22:6ω3 – DHA	36,73±0,02	39,32±0,36	38,02±0,30
%TFA/LT (m/m)	82,20±4,08	80,35±3,63	81,56±1,32

A diferença da percentagem de ácidos gordos nos lípidos totais para da biomassa e dos óleos pode ser justificada da mesma forma que na biomassa HPH e liofilizada.

3.2 Extração de lípidos

Relativamente à biomassa utilizada nos estudos desta tese, e dado que foram produzidas diversas culturas, será importante identificar a biomassa de cada estudo. Assim, a biomassa do Ensaio IV, por ter sido a que resultou em maior quantidade de biomassa, teor de lípidos e ácidos gordos, com um teor de cinzas e humidade reduzido, foi a utilizada para os estudos de otimização das

condições experimentais da extração por ASE, para os dois solventes testados. Esta biomassa foi também usada em alguns ensaios de extração supercrítica.

Por outro lado, nos ensaios de extração por ASE e de extração supercrítica, para estudo da influência do pré-tratamento e do método de secagem, foi utilizada biomassa produzida anteriormente a este trabalho e cuja caracterização será indicada nos respectivos capítulos

De notar que toda a biomassa, independentemente do *fed-batch* de cultura de que proveio, foi sempre caracterizada, como referido no capítulo 2.3.5: quantificação gravimétrica dos lípidos totais, obtidos por Soxhlet, com hexano; quantificação de ácidos gordos por transmetilação direta da biomassa e também por transmetilação dos ácidos gordos presentes no extrato lipídico do Soxhlet.

Em seguida, apresentam-se os resultados obtidos nas diversas extrações.

3.2.1 Extração Soxhlet

A extração Soxhlet, como também já foi dito, foi apenas utilizada para a caracterização da biomassa e como método de referência para comparação com a extração pelas técnicas verdes, ESC e ASE.

As extrações por Soxhlet foram realizadas em duplicado, utilizando, como solvente, hexano. Determinou-se o rendimento em lípidos totais por gravimetria e ácidos gordos, em específico, o DHA, por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos estão sumariados na Tabela 9 para as biomassas provenientes das culturas produzidas neste trabalho de dissertação e para a biomassa submetida a diferentes tratamentos de secagem e de moagem/rutura celular. De notar que esta biomassa foi produzida previamente ao início deste trabalho, no entanto, os pré-tratamentos foram realizados no decorrer do trabalho experimental desta tese.

Tabela 9 – Fração de lípidos totais, ácidos gordos totais e DHA das biomassas provenientes das culturas realizadas neste trabalho, utilizando a extração Soxhlet. Resultados em %(m/m) e a biomassa é seca e livre de cinzas.

Biomassa	%Lípidos	%TFA	%DHA
Ensaio II	7,60±2,74	5,89±0,06	2,00±0,00
Ensaio III	12,32±0,12	9,24±0,18	3,70±0,08
Ensaio IV	26,58±1,58	25,45±0,56	9,21±0,27

Tabela 10 – Fração de lípidos totais, ácidos gordos totais e DHA das biomassas submetida a diferentes tratamentos de secagem e rutura celular, utilizando a extração Soxhlet. Resultados em %(m/m) e a biomassa é seca e livre de cinzas.*

Biomassa	%Lípidos	%TFA	%DHA
Liofilizada (moinho de bolas)*[30]	20,61±0,55	18,46±0,96	6,99±0,45
HPH+liofilizada	21,98±3,80	16,48±1,59	6,40±0,66
HPH+estufa	18,61±0,79	14,96±0,68	5,88±0,22

*Biomassa produzida anteriormente à realização deste trabalho [30].

Os desvios foram reduzidos, regra geral, sendo o mais significativo, em termos percentuais, o dos lípidos totais para o Ensaio II. Uma vez que os desvios para os restantes parâmetros são reduzidos, é possível concluir que os erros aconteceram a montante da transmetilação, por exemplo, perda de óleo na filtração ou utilização de balões de recuperação que não estão a peso constante.

Uma vez que ocorreram problemas nas fermentações I, II e III, os resultados obtidos e apresentados na Tabela 9 não permitem avaliar a influência da fonte de carbono na produção de lípidos e ácidos gordos nem aferir a reprodutibilidade da fermentação.

A análise dos resultados expostos na Tabela 9 e na Tabela 10 mostra que a extração por Soxhlet é bastante eficiente para a obtenção de ácidos gordos, visto que o teor de TFA nos lípidos totais foi sempre superior a 70%, sendo tão alto como 95%, no caso da biomassa mais interessante para este trabalho (Ensaio IV).

Relativamente aos resultados obtidos para a biomassa submetida a homogeneização a alta pressão (ver Tabela 10), verifica-se que a posterior secagem pode alterar o conteúdo em lípidos, ácidos gordos e DHA, dependendo do método utilizado. De facto, a biomassa submetida a secagem por convecção (secagem na estufa) apresenta um teor inferior nos referidos compostos, em relação à biomassa submetida a secagem por liofilização. Tal pode, possivelmente, ser devido a que após o tratamento por HPH, e consequente rutura celular, os compostos fiquem sem a proteção da parede celular encontrando-se, por isso, mais suscetíveis à degradação por ação de agentes externos. A secagem na estufa, sendo conduzida a uma temperatura de 45°C, pode, assim, conduzir a alguma degradação, o que não acontece no processo de liofilização, em que a secagem ocorre a temperaturas muito baixas (-50°C). Hussain et al. (2015) [34] estudaram vários métodos de secagem de culturas da microalga *Chlorella vulgaris*, entre eles a liofilização e a secagem na estufa. Estes autores realizaram também a extração por Soxhlet da biomassa seca e quantificaram os lípidos totais e ácidos gordos totais. Verificaram, também, que a biomassa liofilizada apresentava rendimento ligeiramente superior em lípidos totais e em lípidos neutros, relativamente à biomassa seca na estufa. Shekarabi et al. (2019) [35] avaliaram o efeito de vários métodos de secagem no rendimento em lípidos da biomassa da *Isochrysis galbana*, testando liofilização, secagem na estufa, secagem ao sol e *spray-drying*. Neste caso, os autores observaram que o rendimento em lípidos totais foi superior para a biomassa seca na estufa, quando comparada com a liofilização. Estes autores verificaram também que o perfil de ácidos gordos sofreu ligeiras alterações consoante o método de secagem, observando-se que a liofilização preservou os PUFA e que a secagem sob temperatura (estufa) conduz a diminuição dos PUFAs. Finalmente, estes autores observaram também que a fração proteica da biomassa diminui com a secagem sob temperatura, tal não se verificando com a liofilização, pelo interesse de aplicação da biomassa restante após extração lipídica poderá condicionar a escolha do método de secagem.

No que diz respeito à comparação dos resultados obtidos para os métodos para moagem/rutura celular da biomassa, verifica-se que a biomassa submetida a HPH resulta em valores ligeiramente superiores de lípidos quando comparado com biomassa submetida a moagem em moinho de bolas. No entanto, o conteúdo em ácidos gordos totais é ligeiramente inferior para a biomassa submetida a HPH, sendo o conteúdo em DHA muito próximo para ambos os métodos de rutura. Uma possível explicação para estas variações poderá ser o facto de a fração lipídica numa microalga consistir maioritariamente em lípidos neutros, seguindo-se lípidos polares e, em muito menores quantidades, esteróis, tocoferóis, carotenoides, terpenos, entre outros [36]. Os lípidos não polares são lípidos de armazenamento da célula (compostos intracelulares), e correspondem maioritariamente a triacilgliceróis (TAGs)

constituídos predominantemente por ácidos gordos saturados e alguns insaturados, encontrando-se no interior das células. Por outro lado, existem também os lípidos estruturais dos quais fazem parte os lípidos polares como os fosfolípidos, os glicolípidos e ácidos gordos polinsaturados que formam complexos com os fosfolípidos das membranas. Os fosfolípidos e os esteróis são componentes importantes da membrana celular, atuando como uma barreira seletiva permeável da célula e dos seus organelos.

Assim sendo, a aplicação da HPH à cultura provoca um grau elevado de rompimento da membrana celular, o que conduz à exposição dos lípidos intracelulares, ficando facilmente acessíveis ao solvente. Adicionalmente, a rutura da membrana expõe, também, os fosfolípidos e os ácidos gordos polinsaturados ao solvente, sendo assim mais facilmente extraídos. Por outro lado, na moagem por moinho de bolas, a rutura da membrana celular pode não ser conseguida num grau tão elevado como no HPH, apesar da membrana sofrer sempre alguns danos/deformações e assim tornando-se mais facilmente permeável aos solventes e conseqüentemente à extração de compostos intracelulares, sendo mais difícil a extração dos lípidos constituintes da membrana (fosfolípidos).

Apresenta-se, na Figura 21, o perfil de TFA para o Ensaio IV. Refira-se que uma vez que a estirpe de microalga foi sempre a mesma, o perfil de ácidos gordos é muito semelhante.

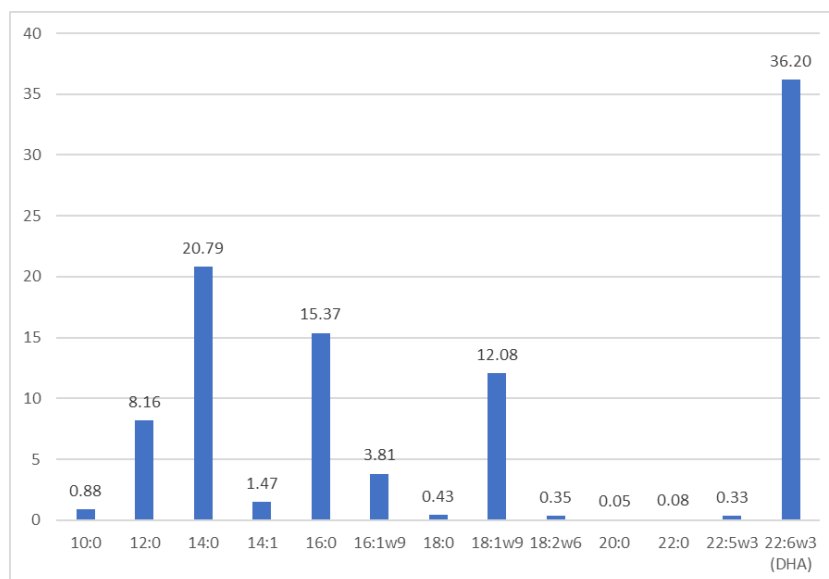


Figura 21 – Perfil de ácidos gordos para a extração Soxhlet, em hexano, do Ensaio IV.

3.2.2 Extração acelerada com solventes

Tal como referido no Capítulo 2.3.3.1, a extração acelerada com solventes, ASE, realizou-se com base num planeamento experimental assente numa superfície de resposta conforme a distribuição de Doehlert de dois fatores: temperatura (fator 1) e tempo de extração (fator 2). Os ensaios realizaram-se nos intervalos de temperatura e tempo de extração de 40-200°C e 2-20 minutos, respetivamente. Como solventes, testaram-se o acetato de etilo e o 2-metiltra-hidrofurano. A escolha destes solventes teve em conta o facto de serem considerados solventes bio-derivados (*“biobased solvents”*), isto é, solventes que podem ser obtidos a partir de fontes renováveis, como o furfural, o ácido levulínico ou o bioetanol [37] e, por isso, considerados verdes.

3.2.2.1 Resultados utilizando acetato de etilo

Na Tabela 11 encontram-se os resultados experimentais para a extração acelerada com solvente, acetato de etilo, nas condições experimentais referidas.

Tabela 11 – Resultados obtidos experimentalmente no ASE, utilizando acetato de etilo.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	%LT	%AGT	%DHA
1	120	11,00	24,50	22,01	7,94
2	120	11,00	25,68	22,79	8,37
3	200	11,00	28,67	24,49	8,90
4	200	11,00	27,61	22,92	8,31
5	40	11,00	24,65	23,05	8,59
6	40	11,00	24,25	22,65	8,40
7	160	18,80	26,59	24,29	8,89
8	160	18,80	27,35	24,00	8,73
9	80	3,20	24,97	23,03	8,48
10	80	3,20	25,17	23,17	8,48
11	160	3,20	26,69	24,24	8,92
12	160	3,20	25,88	24,63	9,03
13	80	18,80	25,54	24,05	8,81
14	80	18,80	24,85	23,23	8,57

Note-se que o poder solvente do acetato de etilo é superior ao do hexano, co-extraindo outras substâncias como complexos lípido-proteicos ou lípido-carbohidratos, sendo que por isso o extrato obtido não pode ser considerado como o extrato lipídico. Desta forma, foram apenas estudados os resultados referentes ao DHA e aos AGT no planejamento experimental. Assim, analisa-se brevemente os resultados obtidos em relação ao extrato total (designado por LT na Tabela 11 e no texto abaixo).

Uma observação mais geral da Tabela 11 mostra que o valor do extrato total não apresenta grandes variações ao longo do intervalo estudado para cada fator experimental, verificando-se que entre o valor mais baixo de rendimento e o maior valor obtido há um aumento de 18%.

Analisando o efeito de cada uma das variáveis no rendimento verifica-se que fixando a temperatura em 80°C o aumento o tempo de extração de 3 para 19 minutos, conduz uma variação do rendimento em LT de $25,07 \pm 0,14$ g/100g_{BM} para $25,20 \pm 0,48$ g/100g_{BM}, representando um aumento de cerca de 0,5%, ou seja, mantém-se praticamente inalterado.

Por outro lado, mantendo a temperatura em 160°C verifica-se que aumentando o tempo de extração de 3 para 19 minutos, existe uma variação do rendimento em LT de $26,29 \pm 0,57$ g/100g_{BM} para $26,97 \pm 0,54$ g/100g_{BM}, representando um aumento de cerca de 2,6%.

Pelo exposto, verifica-se que o aumento do tempo de extração não tem influência significativa no rendimento da extração, sendo, contudo, positiva.

Fixando o tempo de extração em 3 minutos, observa-se que aumentando a temperatura de 80°C para 160°C, existe uma variação do rendimento em LT de $25,07 \pm 0,14$ g/100g_{BM} para $26,29 \pm 0,57$ g/100g_{BM}, representando um aumento de cerca de 4,9%.

Fixando o tempo de extração em 11 minutos, verifica-se que aumentando a temperatura de 40°C para 120°C e para 200°C, existe uma variação do rendimento em LT de $24,45 \pm 0,28$ g/100g_{BM} para $25,09 \pm 0,84$ g/100g_{BM} e $28,14 \pm 0,75$ g/100g_{BM}, respectivamente. Isto traduz-se em aumentos percentuais de 2,6% e 15%.

Fixando o tempo de extração em 19 minutos, verifica-se que aumentando a temperatura de 80°C para 160°C, existe uma variação rendimento em LT de $25,20 \pm 0,48$ g/100g_{BM} para $26,97 \pm 0,54$ g/100g_{BM}, representando um aumento de cerca de 7%.

Assim, o aumento da temperatura tem sempre uma influência positivo no rendimento, sendo o parâmetro que mais o influencia. Nesta técnica, o aumento da temperatura provoca a diminuição da tensão superficial e da viscosidade e o aumento da difusividade do solvente. Desta forma, a penetração do solvente na matriz sólida é aumentada e facilitada, ensopando o leito de forma mais eficiente, o que implica melhorias na velocidade de transferência de massa e, conseqüentemente, no rendimento da extração.

3.2.2.1.1 Análise das superfícies de resposta

Na Figura 22, encontram-se os resultados obtidos para as superfícies de resposta em ácidos gordos totais (AGT) e ácido docosahexaenoico (DHA). Os dois gráficos apresentam a mesma conformação, o que significa que a concentração do DHA não varia no seio dos AGT, nas condições das experiências,

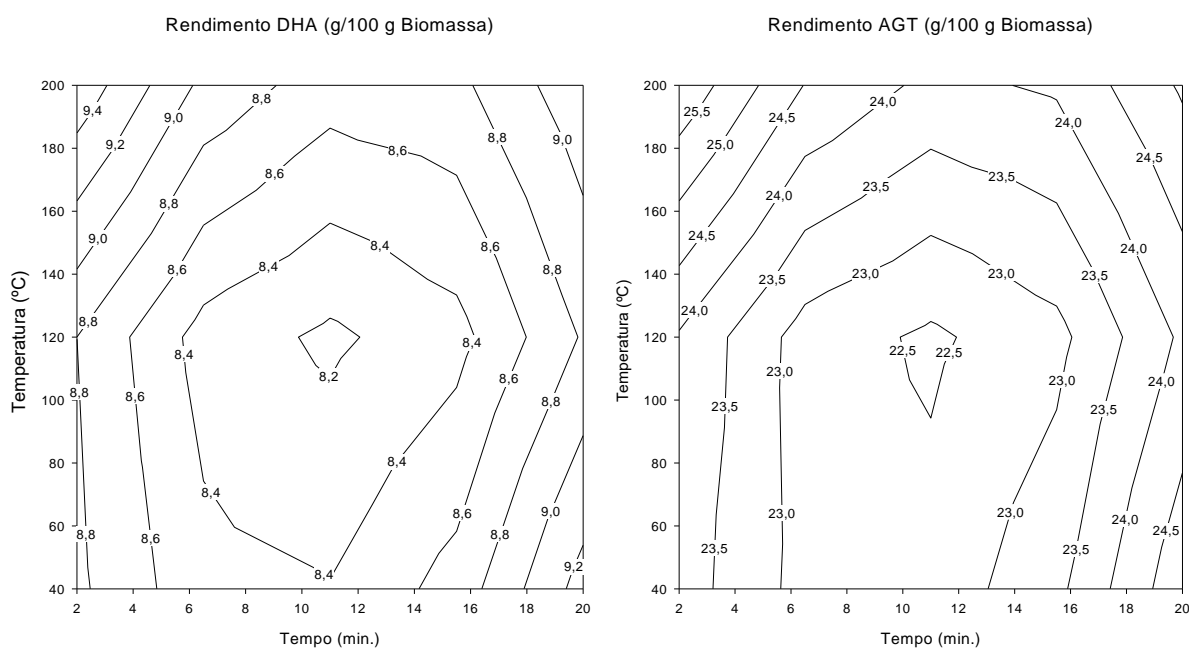


Figura 22 – Superfícies de resposta, obtidas no planeamento experimental, para os fatores de resposta, utilizando acetato de etilo como solvente.

Verifica-se que, para todas as temperaturas, o aumento do tempo de extração de 2 até 11 minutos apresenta uma diminuição da fração de AGT e DHA extraído, apresentando, de novo, um aumento de 11 até 20 minutos. Por exemplo, para os AGT, fixando a temperatura em 120°C, verifica-se uma diminuição de 24,0 para 22,5 g/100g_{BM}, cerca de 6,7%, aumentando o tempo de extração de 2 para 11 minutos. O aumento do tempo de extração até 20 minutos, resulta no aumento do rendimento até cerca de 24,0 g/100g_{BM}. Pelo exposto, verifica-se que existe um eixo de simetria para t=11 minutos.

De forma análoga, para todas as extrações, o aumento da temperatura de 40°C até cerca de 110°C para os AGT e 120°C para o DHA provoca uma diminuição das frações extraídas. No caso do DHA, fixando o tempo de extração em 11 minutos, representa uma redução de 8,4 para 8,2 g/100g_{BM}, cerca de 2,4%. Já aumentando a temperatura até 200°C, o rendimento aumenta até cerca de 8,7 g/100g_{BM}, representando um aumento de 6,1%. Assim, existe também uma simetria para este caso.

Relativamente à influência que mais se nota, conclui-se que a temperatura é o parâmetro mais decisivo no rendimento da extração, visto que é onde existe maior amplitude de valores (para os AGT, por exemplo, fixando 40°C e 2 minutos, existe uma variação de aproximadamente 24,0 para 24,5 g/100g_{BM} por aumento do tempo de extração para 20 minutos, enquanto existe uma variação para 25,5 g/100g_{BM} por aumento da temperatura para 200°C). Também se pode concluir isto pela existência de mais curvas de isoresposta a tender para a horizontal do que para a vertical, indicando que as variações são mais evidentes ao longo do eixo das ordenadas (temperatura) do que das abcissas (tempo).

Tanto para os TFA como para o DHA, as condições de temperatura e de tempo de extração que conduzem a melhores resultados de extração são 2 minutos e 200°C, obtendo 25,5 e 9,4 g/100g_{BM}, respetivamente. No entanto, é também possível obter uma extração de rendimento satisfatório utilizando 20 minutos e 40°C, uma vez que se recuperam 9,2 g/100g_{BM} de DHA e mais de 24,5 g/100g_{BM} de AGT. É necessário estudar-se se os gastos energéticos e, conseqüentemente, os impactos ambientais e se as produtividades são maiores utilizando uma alta temperatura durante pouco tempo ou uma baixa temperatura durante um período mais longo.

3.2.2.1.2 Análise dos parâmetros do planeamento experimental e validação estatística do modelo polinomial

Na Tabela 12, encontram-se os resultados obtidos para os parâmetros apresentados na Equação 14, β , e os parâmetros de validação do modelo.

Os parâmetros apresentados têm o seguinte significado: β_0 é o valor da resposta no centro do domínio experimental, β_1 caracteriza a importância relativa da temperatura, β_2 caracteriza a importância relativa do tempo, β_{12} relaciona a interação entre os dois fatores e β_{11} e β_{22} descreve o ajuste quadrático da superfície de resposta.

Tanto β_1 como β_2 são positivos, indicando que o aumento de ambos os fatores beneficia, regra geral, o aumento da extração. Por outro lado, verifica-se que, para ambos os casos o valor de β_2 é muito próximo de 0. Isto traduz-se pela pouca influência que o tempo de extração tem no rendimento da extração.

Tabela 12 – Coeficientes do modelo polinomial que descrevem as respostas avaliadas no planejamento experimental e validação dos mesmos, para o solvente acetato de etilo. O fator 1 e o fator 2 correspondem à temperatura e ao tempo de extração, respectivamente.

Modelo		%DHA	%AGT
Coeficientes	β_0	8,16	22,41
	β_1	0,14	0,59
	β_2	0,01	0,07
	β_{12}	-0,21	-0,48
	β_{11}	0,39	0,87
	β_{22}	0,65	1,61
Validação	Eficácia dos parâmetros	2,85	3,95
	Nível de significância(α), F(5,8)	0,91	0,96
	Desajuste	1,78	1,10
	Nível de significância(α), F(1,7)	0,78	0,67

O efeito da temperatura é mais notório que o do tempo, daí que o valor de β_2 seja superior ao de β_1 , em ambos os casos. Isto foi também concluído anteriormente ao verificar-se a amplitude de valores de rendimento variando ambos os fatores. Já o fator β_{12} é negativo, o que demonstra a baixa influência que o termo de interação tem nos resultados.

Os fatores β_{11} e β_{12} são apenas parâmetros de ajuste e não apresentam significado físico.

Ainda se verificou o desajuste do modelo através da aplicação do teste de Fisher. Assim, verifica-se que os valores do nível de significância, α , para a eficácia dos parâmetros é 0,91 e 0,96 para o DHA e para os AGT, respetivamente. Quer isto dizer que o modelo é adequado para descrever os resultados experimentais, aquele nível de significância.

No que diz respeito ao desajuste, obtiveram-se valores de α de 0,78 e 0,67. Estes valores, ligeiramente mais baixos, estão relacionados com a concordância dos resultados experimentais entre si e, desta forma, refletem erros experimentais que possam ter acontecido.

Embora os resultados apresentem pouca variação e os parâmetros sejam todos reduzidos, podem retirar-se ilações importantes sobre o comportamento do sistema nos intervalos experimentais (tempo de extração e temperatura) estudados. A conclusão mais importante que se depreende deste estudo é que não são necessários nem tempos de extração longos nem altas temperaturas (o que implica maiores gastos energéticos e, conseqüentemente, maiores impactos ambientais) para obter rendimentos satisfatórios.

3.2.2.2 Resultados com 2-metiltetrahydrofurano

Na Tabela 13 encontram-se os resultados experimentais para a extração acelerada com solvente, 2-metiltetrahydrofurano, nas condições experimentais referidas.

Da mesma forma que o acetato de etilo, o 2-metiltetrahydrofurano também co-extrai outras substâncias que não ácidos gordos, sendo considerados então, apenas, os resultados obtidos para os AGT e os DHA, na matriz experimental. Assim, analisa-se brevemente os resultados obtidos para o extrato total (designado por LT, na Tabela 13 e ao longo do texto de análise dos resultados).

Tabela 13 – Resultados obtidos experimentalmente no ASE, utilizando 2-metiltetrahidrofurano.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	%LT	%AGT	%DHA
1	120	11,00	28,75	24,88	7,87
2	120	11,00	29,11	25,70	8,09
3	200	11,00	31,03	25,58	8,33
4	200	11,00	31,66	25,57	8,26
5	40	11,00	29,28	24,95	7,99
6	40	11,00	28,24	24,54	7,82
7	160	18,80	30,55	25,93	8,23
8	160	18,80	30,36	25,55	8,35
9	80	3,20	28,46	26,59	8,08
10	80	3,20	28,19	25,45	8,35
11	160	3,20	29,18	25,83	8,43
12	160	3,20	28,67	25,85	8,45
13	80	18,80	29,00	25,82	8,52
14	80	18,80	28,82	25,79	8,89

Tal como verificado para a extração com acetato de etilo, os valores de rendimento do extrato total (LT) são muito próximos em toda a gama de temperaturas e tempos de extração estudados. Verifica-se que a diferença entre os valores máximo e mínimo de rendimento é de 13%. No entanto, e tal como para o acetato de etilo é feita de seguida a análise da variação do rendimento em LT em função da variação dos fatores experimentais.

Fixando a temperatura em 80°C verifica-se que aumentando o tempo de extração de 3 para 19 minutos, existe uma variação do rendimento em LT de $28,33 \pm 0,19$ g/100g_{BM} para $28,91 \pm 0,13$ g/100g_{BM}, representando um aumento de cerca de 2%.

Fixando a temperatura em 160°C verifica-se que aumentando o tempo de extração de 3 para 19 minutos, existe uma variação do rendimento em LT de $28,93 \pm 0,36$ g/100g_{BM} para $30,46 \pm 0,13$ g/100g_{BM}, representando um aumento de cerca de 5.3%.

Pelo exposto, verifica-se que o aumento do tempo de extração tem uma reduzida influência positiva no rendimento da extração.

Fixando o tempo de extração em 3 minutos, verifica-se que aumentando a temperatura de 80°C para 160°C, existe uma variação do rendimento em LT de $28,33 \pm 0,19$ g/100g_{BM} para $28,93 \pm 0,36$ g/100g_{BM}, representando um aumento de cerca de 2.1%.

Fixando o tempo de extração em 11 minutos, verifica-se que aumentando a temperatura de 40°C para 120°C e para 200°C, existe uma variação do rendimento em LT de $28,76 \pm 0,73$ g/100g_{BM} para $28,93 \pm 0,25$ g/100g_{BM} e $31,35 \pm 0,45$ g/100g_{BM}, respetivamente. Isto traduz-se em aumentos percentuais de 0,6% e 9%.

Fixando o tempo de extração em 19 minutos, verifica-se que aumentando a temperatura de 80°C para 160°C, existe uma variação do rendimento em LT de $28,91 \pm 0,13$ g/100g_{BM} para $30,46 \pm 0,13$ g/100g_{BM}, representando um aumento de cerca de 5,4%.

Assim, o aumento da temperatura tem sempre uma influência positivo no rendimento, sendo o parâmetro que mais o influencia, embora não existam grandes variações. Esta influência positiva da temperatura pode ser explicada da mesma forma que os obtidos para o acetato de etilo.

3.2.2.2.1 Análise das superfícies de resposta

Na Figura 23, encontram-se os resultados obtidos para as superfícies de resposta em ácidos gordos totais (AGT) e DHA.

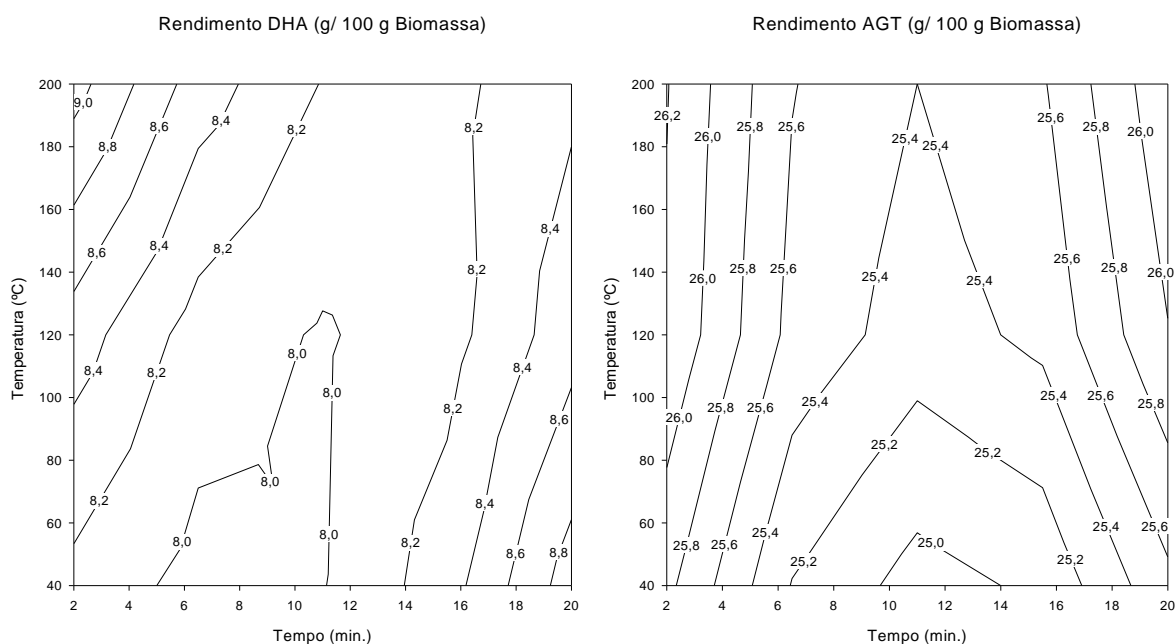


Figura 23 – Superfícies de resposta, obtidas no planeamento experimental, para os fatores de resposta, utilizando 2-metil-tetrahidrofurano como solvente.

De forma a facilitar a análise para o DHA, divide-se a sua superfície de resposta em quadrantes iguais. No quadrante inferior esquerdo, verifica-se que não existe praticamente alteração do valor de DHA (8,0-8,4 g/100g_{BM}), o que indica que nenhum dos parâmetros exerce grande influência na extração. O quadrante superior direito pode ser descrito de forma semelhante apresentando.

Já no quadrante inferior direito, verifica-se a existência de várias curvas de isoresposta a tender para a vertical. Quer isto dizer que, nesse quadrante, a resposta é mais dependente das abcissas (tempo) que das ordenadas (temperatura). Em termos práticos, fixando as condições (temperatura de 40°C e 11 minutos de extração – 8,0 g/100g_{BM}), verifica-se que: por aumento da temperatura até 120°C, não existe alteração no rendimento; por aumento do tempo até 20 minutos, aumenta-se o rendimento para cerca de 8,8 g/100g_{BM}, representando um aumento de 10%.

No quadrante superior esquerdo, observa-se também a existência de algumas curvas de isoresposta. Procedendo a uma análise semelhante, fixando uma temperatura de 120°C e um tempo de extração de 2 minutos (ou seja, 8,5 g/100g_{BM} de rendimento): por prolongamento do tempo até

11 minutos, verifica-se uma diminuição do rendimento para 8,0 g/100g_{BM} (6,25%); por aumento da temperatura até 200°C, incrementa-se o rendimento até 9,0 g/100g_{BM} (cerca de 5,9%).

No que diz respeito aos AGT, verifica-se que a amplitude de valores é muito reduzida, independentemente da variável considerada, variando entre 25,0 e 26,2 g/100g_{BM}. Para t=11 minutos, verifica-se um eixo de simetria.

Como não existe uma grande variação ao nível dos AGT, é possível concluir que a composição do extrato poderá ser controlada pelos parâmetros de estudo, recorrendo à superfície de resposta do DHA.

As melhores condições de extração foram, para ambos os casos, 2 minutos e 200°C, recuperando-se 9,0 g/100g_{BM} em DHA e 26,2 g/100g_{BM} em AGT.

3.2.2.2.2 Análise dos parâmetros do planeamento experimental e validação estatística do modelo polinomial

Na Tabela 14, encontram-se os resultados obtidos para os parâmetros apresentados na Equação 14, β , e os parâmetros de validação do modelo.

Tabela 14 – Coeficientes do modelo polinomial que descrevem as respostas avaliadas no planeamento experimental e validação dos mesmos, para o solvente 2-metiltetrahidrofurano. O fator 1 e o fator 2 correspondem à temperatura e ao tempo de extração, respetivamente.

	Modelo	%DHA	%AGT
Coeficientes	β_0	7,98	25,3
	β_1	0,1	0,24
	β_2	0,01	-0,09
	β_{12}	-0,37	0,06
	β_{11}	0,11	-0,14
	β_{22}	0,53	0,78
Validação	Eficácia dos parâmetros	4,63	1,93
	Nível de significância(α), F(5,8)	0,97	0,81
	Desajuste	5,21	2,32
	Nível de significância(α), F(1,7)	0,94	0,83

Os parâmetros apresentados refletem: β_0 , o valor da resposta no centro do domínio experimental; β_1 , a importância relativa da temperatura; β_2 , a importância relativa do tempo; β_{12} , a interação entre os dois fatores e β_{11} e β_{22} , o ajuste quadrático da superfície de resposta.

Começando por β_1 , verifica-se que são positivos, em ambos os casos, o que significa que a temperatura beneficia o rendimento da extração. Por outro lado, por terem um valor superior a β_2 , possuem uma influência no rendimento superior à do tempo.

Analisando os resultados para β_2 , verifica-se que são tão próximos de 0 que quase não têm influência no rendimento da extração. Para os AGT, o facto de este parâmetro ser negativo revela que o tempo de extração prejudica o rendimento.

Para β_{12} , observa-se, para o DHA que este é negativo e, para os AGT, que este é próximo de zero, revelando que não existe também uma grande influência advinda da interação dos dois fatores.

No que diz respeito a β_{11} e β_{22} , à semelhança do que foi dito anteriormente, por não terem significado físico, nada se pode concluir acerca dos seus valores.

Analisando agora para os parâmetros de validação, verifica-se um nível de significância, α , de 0,97 e 0,81 para a eficácia dos parâmetros para o DHA e os AGT, respetivamente. Quer isto dizer que os modelos descrevem corretamente os resultados experimentais.

Já para o nível de significância do desajuste, verifica-se que estes tomam o valor de 0,94 e 0,83. Isto denota a concordância experimental entre as réplicas realizadas para cada ensaio.

Embora estes resultados possam mostrar que o efeito da temperatura e do tempo no rendimento de extração dos vários compostos não será muito relevante, uma vez que não existe grande variação do rendimento com os parâmetros estudados, os resultados permitem algumas conclusões pertinentes relativamente à seleção de condições de trabalho no intervalo estudado. Quanto aos AGT, pode-se depreender que, quaisquer que sejam as condições, os valores de rendimento são sempre muito elevados, podendo ser utilizados tempos de extração curtos e temperaturas baixas, resultando em gastos operatórios menores e impactos ambientais menos significativos.

Por outro lado, como referido, uma vez que existe uma variação do DHA, mantendo-se praticamente inalterados os AGT, é possível controlar o conteúdo do extrato em DHA por ajuste dos parâmetros estudados.

3.2.3 Extração supercrítica

A extração de lípidos da microalga *Cryptocodinium cohnii* foi também estudada com outro solvente considerado ambientalmente benigno, CO₂ supercrítico, sendo por isso a técnica de extração supercrítica com CO₂ considerada uma técnica verde.

Nesta etapa do trabalho pretendeu-se avaliar o efeito do pré-tratamento da biomassa microalgal no rendimento da extração em lípidos, ácidos gordos totais (TFA), DHA e pigmentos totais. Para tal estudaram-se os métodos de moagem/rutura celular e os métodos de secagem. Os métodos de rutura celular testados foram homogeneização por alta pressão e moagem em moinho de bolas. As técnicas de secagem estudadas foram secagem por liofilização e por convecção (estufa). Na Figura 7 (Capítulo 2.3.1) encontra-se uma descrição esquemática das experiências realizadas.

De notar, tal como se indica no esquema da Figura 7, que além dos ensaios de extração supercrítica, a biomassa submetida aos diversos tratamento de rutura e secagem foi também testada no método de extração por Soxhlet com hexano (como descrito no Capítulo 2.3.2) e no método ASE também com hexano seguindo o descrito no capítulo 2.3.3, i.e. à temperatura de 120°C e realizando 2 ciclos de extração de 3 min. A finalidade destas experiências é de comparação do rendimento de extração pelas várias técnicas utilizadas, tendo em conta que o hexano e o CO₂, sendo ambos solventes de baixa polaridade, terão afinidade para o mesmo tipo de compostos, sendo, por isso, comparáveis.

Na Figura 24 apresenta-se o gráfico onde estão representadas as curvas de extração (curva cumulativa) para o rendimento em lípidos totais das várias condições de pré-tratamento estudadas, à temperatura de 41°C e pressão de 300 bar.

A ruptura celular é um passo necessário para que a extração seja eficiente. Isto verifica-se uma vez que o rendimento mais baixo (11%) corresponde à biomassa inteira (sem pré-tratamento de ruptura) e que este valor corresponde a cerca de 50% dos lípidos presentes na biomassa (considerando a extração por Soxhlet como referência). A ruptura com o moinho de bolas e por HPH conduz a extrações mais rápidas e com um rendimento muito superior, relativamente à biomassa inteira. Comparando os dois métodos de ruptura, observa-se que os rendimentos obtidos para as duas técnicas testadas são muito próximos, sendo o rendimento com a biomassa moída pelo moinho de bolas 2,2% superior ao obtido com a biomassa submetida a HPH.

Comparando os resultados obtidos para os dois processos de secagem, verifica-se que a biomassa submetida a liofilização apresenta um rendimento superior em lípidos, comparado com a secagem na estufa. Tal como referido para a análise da extração por Soxhlet, a secagem na estufa da biomassa liofilizada pode ter causado degradação dos compostos dado que a biomassa foi previamente sujeita a ruptura das células. Por consequência os compostos não estão protegidos pela membrana celular e, como tal, encontram-se mais expostos a agentes externos.

No que diz respeito ao perfil de extração, verifica-se que todas as condições apresentam curvas com um perfil muito similar, podendo considerar-se três zonas: uma primeira zona linear, uma segunda de transição e uma terceira zona de patamar. A existência das várias etapas está relacionada com o processo de extração, como descrito no Capítulo 1.2.3.4.1. Na primeira etapa, são extraídos os compostos mais acessíveis ao solvente, i.e., os compostos que se encontram no exterior das células que sofreram ruptura, sendo que o mecanismo que predomina é a solubilidade dos compostos no fluido supercrítico e é esse o fator que controla a cinética do processo. O declive da curva de extração, nesta primeira fase corresponde à solubilidade dos compostos no fluido supercrítico. Após se esgotarem os compostos livres, inicia-se a extração dos compostos intracelulares das células que sofreram ruptura, o que corresponde à segunda etapa de extração. Nesta etapa, o mecanismo que domina a extração é a transferência de massa externa. Finalmente, a terceira etapa do processo corresponde à extração das células intactas, sendo controlada pela resistência à transferência de massa interna. Na segunda e terceira etapas o processo é mais lento e a velocidade de extração diminui progressivamente, o que se pode observar pela diminuição do declive das curvas.

Comparando os 3 métodos de extração aplicados a cada uma das biomassas (Figura 25) verifica-se que a técnica de extração supercrítica apresenta rendimentos muito semelhantes à extração por Soxhlet e rendimentos superiores à extração por ASE, para qualquer pré-tratamento da biomassa.

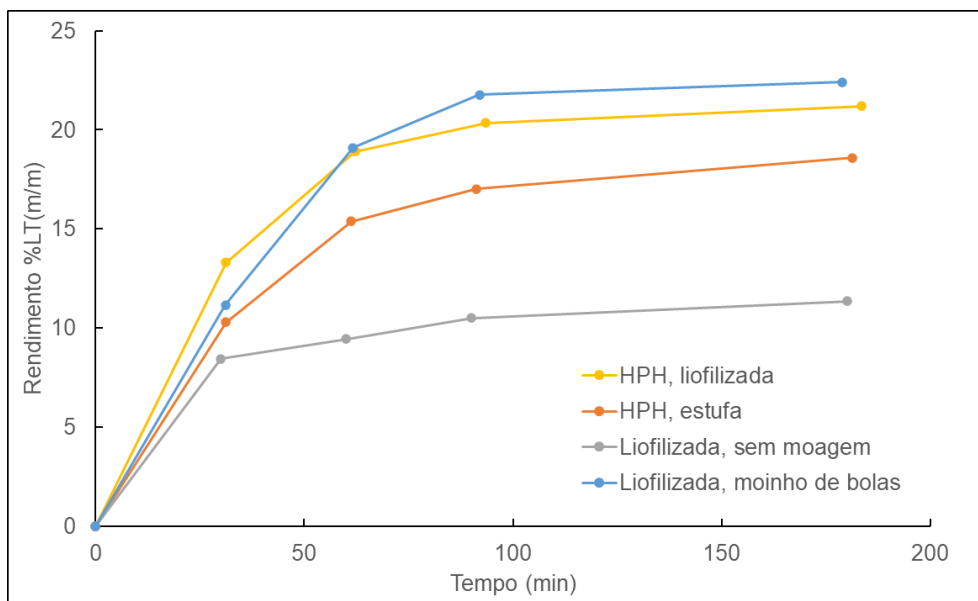


Figura 24 – Curva cumulativa do rendimento de extração em lípidos ao longo do tempo, a 41°C e 300 bar, para as várias condições de pré-tratamento da biomassa.

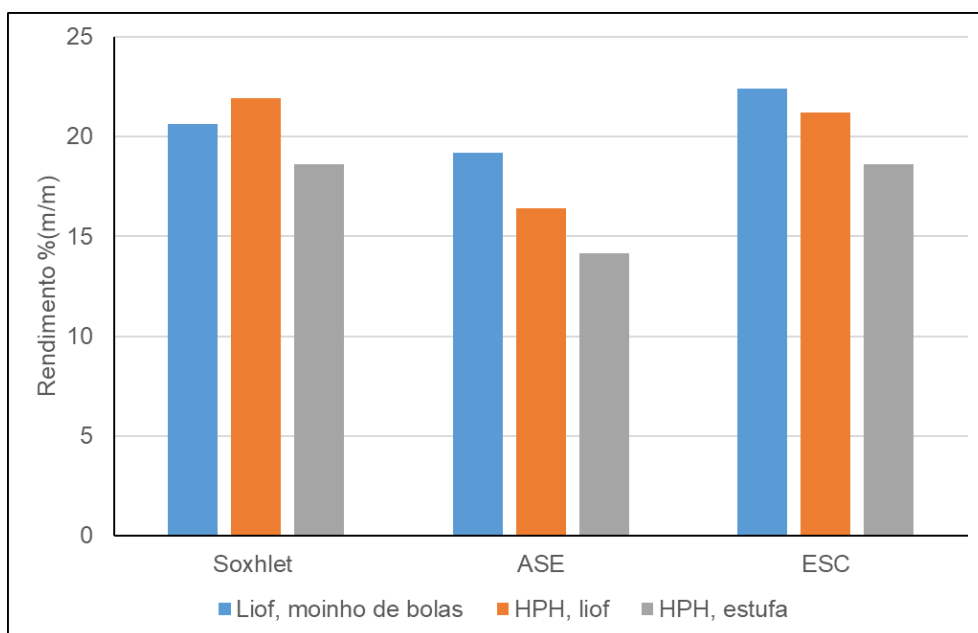


Figura 25 – Comparação do rendimento em lípidos obtido pelas várias técnicas de extração, para os diversos pré-tratamentos da biomassa.

Nos gráficos da Figura 26 e da Figura 27 são apresentadas as curvas cumulativas do rendimento em ácidos gordos totais e em DHA, respetivamente, para as várias condições de pré-tratamento estudadas, à temperatura de 41°C e pressão de 300 bar.

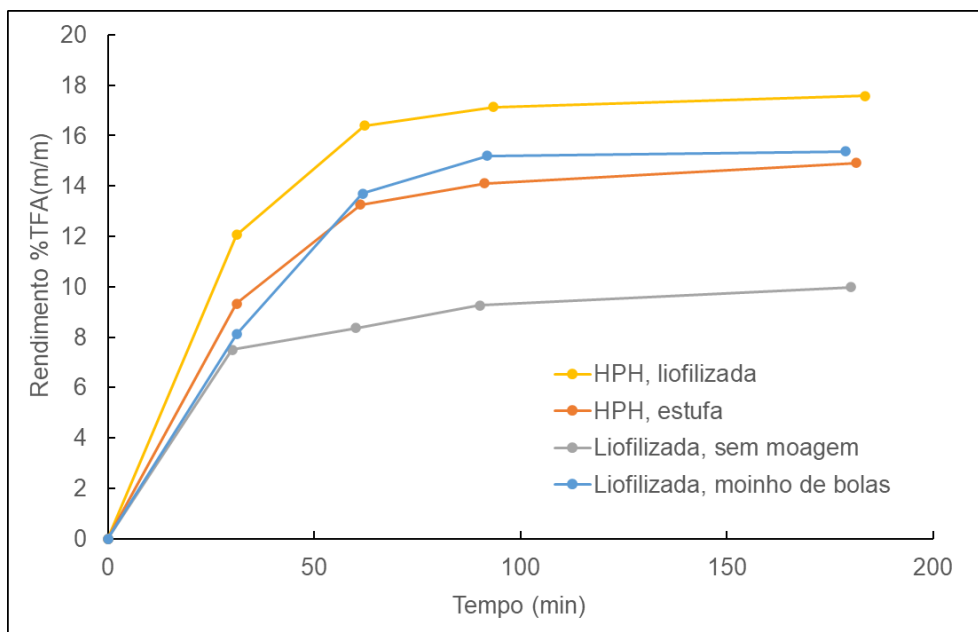


Figura 26 – Curva cumulativa do rendimento de extração em ácidos gordos totais (TFA) ao longo do tempo, a 41°C e 300 bar, para as várias condições de pré-tratamento da biomassa.

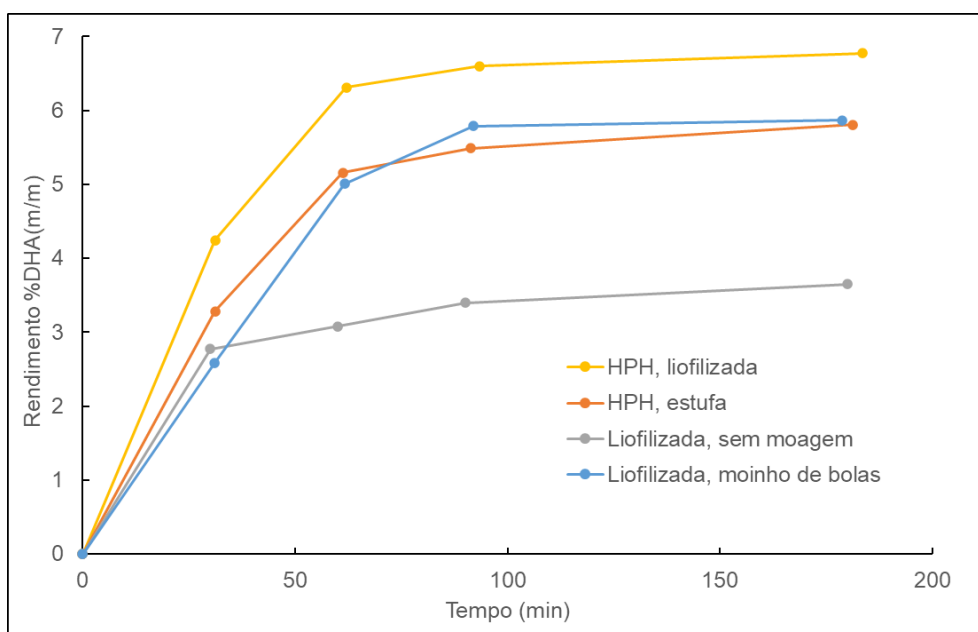


Figura 27 – Curva cumulativa do rendimento de extração em DHA ao longo do tempo, a 41°C e 300 bar, para as várias condições de pré-tratamento da biomassa.

Observando os gráficos, conclui-se que o rendimento de extração da biomassa submetida a HPH é superior ao obtido para a biomassa moída no moinho de bolas, para os ácidos gordos totais e para o DHA, verificando-se assim que o processo de rutura por HPH será mais eficiente para a extração destes compostos. O rendimento aumenta 14 a 15% quando o método de HPH é usado, comparativamente à moagem por moinho de bolas, para os compostos referidos. Esta tendência é similar à observada para a extração por Soxhlet.

Por outro lado, comparando os métodos de secagem, verifica-se que, tal como para os lípidos, também o rendimento em ácidos gordos e em DHA é superior na secagem por liofilização.

Comparando o rendimento obtido para os ácidos gordos totais e DHA pelos três métodos de extração, para as diferentes biomassas preparadas (Figura 28), verifica-se que a extração supercrítica apresenta um rendimento inferior às técnicas de Soxhlet e de ASE para a biomassa liofilizada e moída no moinho de bolas. No entanto, a biomassa submetida a HPH e liofilizada permite obter um rendimento por extração supercrítica superior ao obtido por Soxhlet (cerca de 5-6%) e ASE em ácidos gordos totais e em DHA. Por outro lado, a biomassa submetida a HPH e seca na estufa apresenta um valor de rendimento de ácidos gordos e de DHA, por extração supercrítica, idêntico ao obtido por Soxhlet e superior ao do ASE.

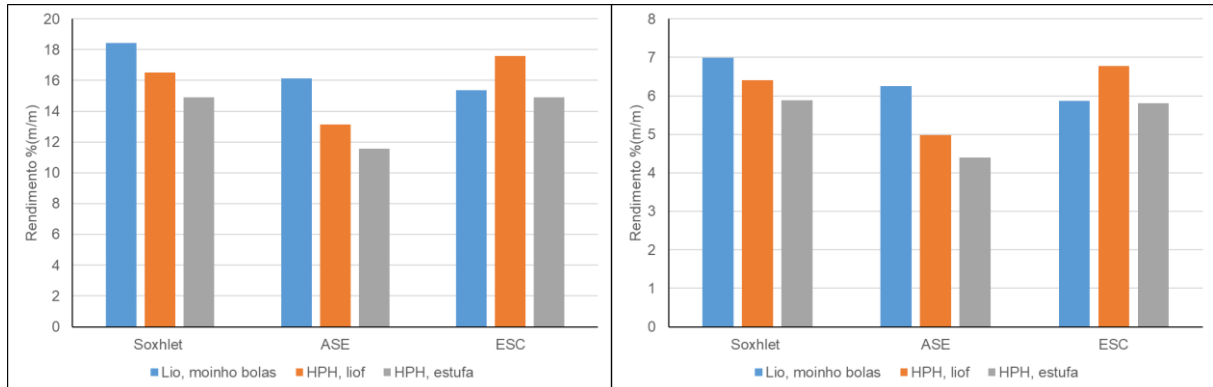


Figura 28 – Comparação do rendimento em ácidos gordos totais (à esquerda) e em DHA (à direita) obtido pelas várias técnicas de extração, para os diversos pré-tratamentos da biomassa.

Finalmente foi também realizado um ensaio de extração supercrítica obtendo duas frações a diferentes condições de densidade de CO₂ (e conseqüente solubilidade dos compostos), de modo a conseguir obter uma fração enriquecida em DHA. Para tal, efetuou-se a extração a 150 bar e 41°C, durante 180 minutos, seguida de um aumento de pressão para 300 bar, mantendo a temperatura a 41°C e obtendo o segundo extrato ao fim de 45 minutos. Os resultados obtidos são apresentados no gráfico da Figura 29.

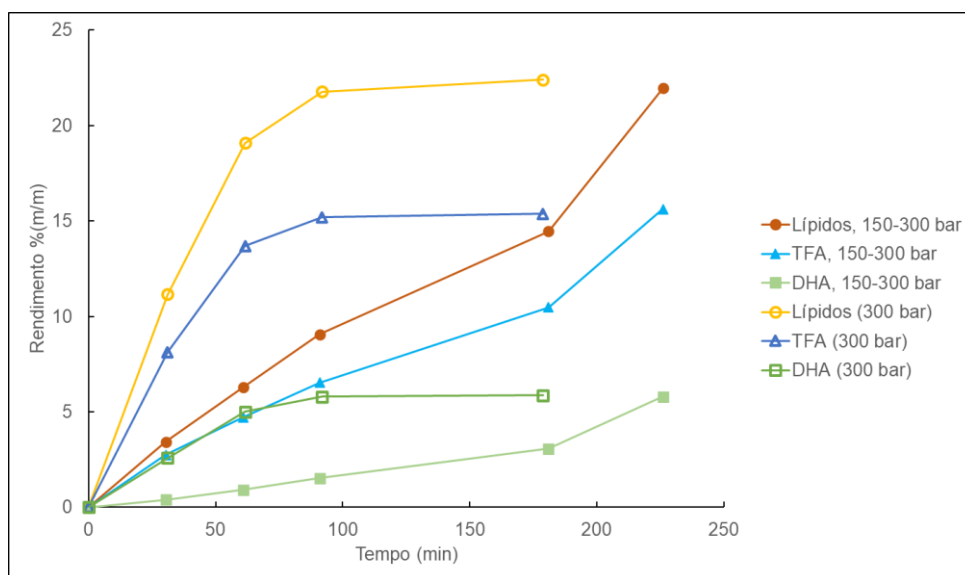


Figura 29 – Curva cumulativa do rendimento de extração em lípidos, ácidos gordos totais (TFA) e DHA ao longo do tempo, no ensaio a 41°C e 300 bar, e no ensaio de extração em duas etapas: 41°C/150 bar → 41°C/300 bar, para a biomassa liofilizada e moída no moinho de bolas.

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que se obteve uma primeira fração com uma concentração de 30% DHA/TFA e 21% DHA/Lípidos. A segunda fração apresentou uma composição de 53% DHA/TFA e 36% DHA/Lípidos. Assim, verifica-se que a estratégia de fracionamento por aumento sequencial da pressão ao longo do tempo permitiu obter um segundo extrato enriquecido em DHA, verificando-se um aumento de 80% da concentração de DHA nos ácidos gordos totais e de 36% da concentração de DHA nos lípidos. Nobre et al. (2013) reportaram o enriquecimento do segundo extrato da microalga *Nannochloropsis* sp. em carotenoides utilizando uma estratégia semelhante de extração [38].

3.3 Extração de pigmentos

As soluções obtidas pelos vários métodos de extração apresentavam uma cor amarelada, podendo ser alaranjada após a remoção do solvente. No Anexo C encontram-se figuras onde se demonstra o referido e um espectro de exemplo. Esta cor alaranjada será conferida pela presença de pigmentos (carotenoides) que, tal como os ácidos gordos, se acumulam durante a produção da cultura da microalga.

Os carotenoides são compostos poliisoprenóides que contêm, em geral, 40 átomos de carbono e uma extensa cadeia de duplas ligações conjugadas, contendo grupos terminais cíclicos ou acíclicos. Esta estrutura de duplas ligações conjugadas, também designada de cromóforo, é a responsável pela cor que estes compostos podem conferir. Estes compostos são sintetizados por plantas, algas e outros organismos fotossintéticos, por algumas bactérias não fotossintéticas e por fungos. Os animais podem metabolizar os carotenoides, mas não os conseguem sintetizar, sendo por isso necessário adquiri-los através da dieta alimentar.[39] Na microalga *Cryptocodinium cohnii* os carotenoides presentes são o β -caroteno e o γ -caroteno.[33] Estes dois carotenoides são precursores da vitamina A, apresentando assim um grande valor nutricional, para além de outras propriedades biológicas, como elevado poder antioxidante e anticancerígeno, ou até mesmo a sua elevada ação na proteção à exposição a radiações UV. Devido à sua estrutura, os carotenoides são compostos muito suscetíveis à ação da luz, oxigénio e calor, degradando-se facilmente na presença destes fatores ou sofrendo isomerização

Dada a importância dos pigmentos como compostos de valor acrescentado, a quantificação destes nos extratos obtidos foi realizada para todas as extrações realizadas. Para tal utilizou-se a análise por espectrofotometria UV-Visível e HPLC.

Apresentam-se, em seguida, os resultados obtidos para o rendimento em pigmentos nos diversos ensaios realizados.

3.3.1 Extração Soxhlet

Embora a extração Soxhlet tenha sido utilizada como referência para a extração de lípidos, também se quantificaram os pigmentos extraídos com esta técnica. Na Tabela 15 apresentam-se os resultados obtidos.

Como se pode verificar, a biomassa obtida no Ensaio IV é a que acumulou mais pigmentos.

Tabela 15 – Resultados obtidos para a concentração de pigmentos através da extração Soxhlet, em hexano. Resultados em $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$.

Biomassa	Pigmentos
Ensaio II	–
Ensaio III	28,90±6,95
Ensaio IV	67,26±0,68
HPH+liofilizada	64,35±0,22
HPH+estufa	60,21±0,00

Verifica-se que o rendimento de extração de pigmentos decresce ligeiramente comparando a biomassa com rutura HPH liofilizada e a seca na estufa. Tal deverá ser resultado da exposição da secagem na estufa expor a biomassa a temperaturas mais altas que a liofilização, promovendo assim a degradação dos compostos.

Por outro lado, comparando o rendimento em pigmentos da biomassa submetida a rutura com HPH com a biomassa liofilizada e moída em moinho de bolas, 72,30 $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ (valor obtido de [30]), verifica-se que a utilização do método de rutura por HPH conduz a um valor de rendimento em pigmentos inferior. Este decréscimo poderá estar relacionado com a degradação que ocorre com o processamento da biomassa, dado que a biomassa submetida a HPH foi sujeita a liofilização após a rutura celular e, desta forma, a secagem da biomassa ocorreu com as células fragmentadas e, como tal, os compostos estão expostos a ação de agentes de degradação, o que não se verificou na biomassa liofilizada e moída em moinho de bolas.

Comparando os valores de rendimento em pigmentos totais, para qualquer um dos métodos de extração, obtidos nesta tese, com os existentes na literatura [33], verifica-se que os valores para as culturas de *C. cohnii* produzidas neste trabalho são muito superiores aos obtidos pelos referidos autores para biomassa resultante de cultura por fermentação no escuro. Os referidos autores realizaram também culturas por fermentação com exposição à luz, que resultaram numa biomassa com um rendimento em pigmentos totais próximos dos obtidos neste trabalho.

3.3.2 Extração acelerada com solventes

A extração acelerada com solventes foi utilizada para caracterização da biomassa e para as matrizes experimentais. Os resultados obtidos apresentam-se, em seguida.

3.3.2.1 Caracterização da biomassa

Os resultados obtidos para caracterização da biomassa apresentam-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados obtidos para a concentração de pigmentos através do ASE, em hexano. Resultados em $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$.

Biomassa	Pigmentos
Ensaio II	27,58±0,18
Ensaio III	19,86±0,63
Ensaio IV	61,37±3,23
HPH+liofilizada	70,24±10,79
HPH+estufa	58,73±5,36

Verifica-se, pelo ASE, que a biomassa sujeita a HPH e, posteriormente, liofilizada é a biomassa com maior teor em pigmentos. No entanto, a incerteza experimental associada é muito elevada. A biomassa do Ensaio IV tem, também, uma concentração elevada de pigmentos.

3.3.2.2 Matriz experimental

Os resultados obtidos para os pigmentos obtidos na matriz experimental encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados experimentais para a matriz experimental de ASE usando acetato de etilo (Ac.Et.) e 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF). Resultados em $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Ac.Et.	2-MeTHF
1	120	11,00	59,05	68,03
2	120	11,00	59,44	67,08
3	200	11,00	53,63	55,32
4	200	11,00	52,11	53,18
5	40	11,00	79,45	85,63
6	40	11,00	76,12	86,37
7	160	18,80	59,93	63,51
8	160	18,80	50,01	66,33
9	80	3,20	78,03	78,80
10	80	3,20	79,15	75,18
11	160	3,20	64,72	68,73
12	160	3,20	64,49	62,39
13	80	18,80	71,96	72,92
14	80	18,80	71,53	78,21

Em primeiro lugar, observa-se que para a generalidade das condições, excetuando as dos testes 9 e 10, o 2-metiltetrahidrofurano é um melhor solvente para a extração de pigmentos que o acetato de etilo.

Fixando a temperatura em 80°C, verifica-se que aumentando o tempo de extração de 3 para 19 minutos, existe uma variação do rendimento em pigmentos de $78,59 \pm 0,80$ e $76,99 \pm 2,56$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ para $71,75 \pm 0,31$ e $75,57 \pm 3,74$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$, representando uma diminuição de 91,3% e 98,2% do valor inicial, para o acetato de etilo e o 2-metiltetrahidrofurano, respetivamente.

Fixando a temperatura em 160°C, verifica-se que aumentando o tempo de extração de 3 para 19 minutos, observa-se que existe uma variação do rendimento em pigmentos de $64,60 \pm 0,16$ e $65,56 \pm 4,48$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ para $54,97 \pm 7,02$ e $64,92 \pm 2,00$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$, representando uma diminuição de 85,1% e 99,0% do valor inicial, para o acetato de etilo e o 2-metiltetrahidrofurano, respetivamente.

Pelo exposto, verifica-se que o aumento do tempo de extração a uma determinada temperatura tem uma influência negativa no rendimento da extração. Uma vez que os pigmentos são compostos termossensíveis, a exposição prolongada a altas temperaturas pode causar a sua degradação, justificando esta diminuição.

Fixando o tempo de extração em 3 minutos, verifica-se que aumentando a temperatura de 80°C para 160°C, existe uma variação do rendimento em pigmentos de $78,59 \pm 0,80$ e $76,99 \pm 2,56$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ para $64,60 \pm 0,16$ e $65,56 \pm 4,48$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$, representando uma diminuição de 82,2% e 85,2% do valor original, para o acetato de etilo e o 2-metiltetrahydrofurano, respetivamente.

Fixando o tempo de extração em 11 minutos, verifica-se que aumentando a temperatura de 40°C para 120°C, existe uma variação rendimento em pigmentos de $77,78 \pm 2,35$ e $86,00 \pm 0,52$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ para $59,24 \pm 0,28$ e $67,55 \pm 0,67$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$, representando uma diminuição de 76,2% e 78,5% do valor original, para o acetato de etilo e para o 2-metiltetrahydrofurano, respetivamente.

Fixando o tempo de extração em 11 minutos, aumentando agora a temperatura até 200°C, existe uma variação rendimento em pigmentos para $52,87 \pm 1,07$ e $54,25 \pm 1,51$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ representando uma diminuição de 68,0% e 63,1% do valor para 40°C, para o acetato de etilo e para o 2-metiltetrahydrofurano, respetivamente.

Fixando o tempo de extração em 19 minutos, verifica-se que aumentando a temperatura de 80°C para 160°C, existe uma variação rendimento em pigmentos de $71,75 \pm 0,31$ e $75,57 \pm 3,74$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$ para $54,97 \pm 7,02$ e $64,92 \pm 2,00$ $\mu\text{g/g}_{\text{BM}}$, representando uma diminuição de 76,6% e 85,9% do valor original, para o acetato de etilo e o 2-metiltetrahydrofurano, respetivamente.

Pelo exposto, verifica-se, mais uma vez, que o aumento da temperatura, apesar de provocar melhorias, no caso dos LT, provoca sempre uma diminuição no rendimento em pigmentos. As melhores condições de extração para o acetato de etilo foram 3 minutos e 80°C e para o 2-metiltetrahydrofurano foram 11 minutos e 40°C. Note-se, no entanto, que o rendimento a 11 minutos e 40°C para o acetato de etilo foi muito semelhante às suas melhores condições. O bom resultado obtido a 80°C prende-se com o curto tempo de contacto. Quer isto dizer que o tempo funciona como um potenciador do efeito da temperatura, daí a sua influência ser negativa. O papel desempenhado pela temperatura é, efetivamente, o mais importante, pois foi a temperaturas mais baixas que se obtiveram melhores rendimentos.

3.3.2.2.1 Análise das superfícies de resposta

Na Figura 30, encontram-se os resultados obtidos para as superfícies de resposta pigmentos para o acetato de etilo e para o 2-metiltetrahydrofurano.

Como se pode verificar em ambas as figuras, sendo mais evidente para o 2-metiltetrahydrofurano, as curvas de isoresposta tendem para a horizontal, indicando que a resposta varia mais com as ordenadas (temperatura) do que com as abcissas (tempo de extração).

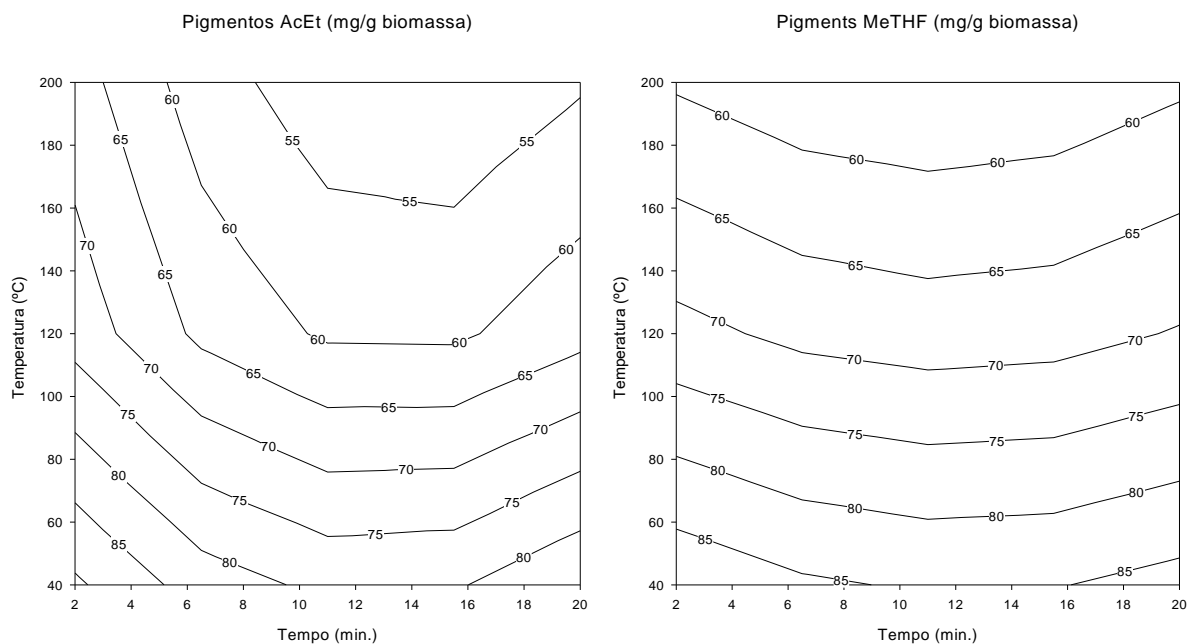


Figura 30 – Superfícies de resposta, obtidas no planejamento experimental, para os fatores de resposta, utilizando acetato de etilo e 2-metiltetrahidrofurano como solvente. Leia-se “µg/g biomassa” no topo da figura.

Analisando a superfície de resposta do acetato de etilo, fixando a temperatura em 40°C e 2 minutos, obtém-se um rendimento de 90 µg/g_{BM}. Aumentando o tempo da extração até 13 minutos, o rendimento diminui para cerca 80 µg/g_{BM}, representado uma diminuição para 88.9% do valor original. Aumentando o tempo até 20 minutos, existe uma ligeira melhoria no rendimento, acima de 80 µg/g_{BM}. Mantendo o valor inicial (40°C e 2 minutos), o aumento da temperatura até 200°C provoca uma diminuição do rendimento para 67,5 µg/g_{BM}, o que representa apenas 75% do valor original.

Analisando, agora, a superfície de resposta do 2-tetrametilhidrofurano, ao fixar a temperatura em 40°C e 2 minutos, obtém-se um rendimento de 85 µg/g_{BM}. Aumentando o tempo de extração até 13 minutos, ocorre uma ligeira diminuição do rendimento em pigmentos e, aumentando até 20 minutos, verifica-se um valor muito próximo ao inicial, o que indica que o tempo de extração não influencia a extração de forma significativa. Aumentando a temperatura até 200°C, o rendimento diminui para 60 µg/g_{BM}, o que representa apenas 70,6% do valor original. Assim, conclui-se, que o aumento da temperatura tem uma elevada influência negativa no rendimento da extração.

Pelo exposto, verifica-se, para ambos os casos, que o aumento do tempo de extração tem uma pequena influência negativa e a temperatura tem uma elevada influência negativa no rendimento da extração. Como referido, os pigmentos são compostos termossensíveis, pelo que o aumento da temperatura pode causar a sua degradação.

As melhores condições de extração, para ambos os casos, são 2 minutos e 40°C, obtendo 90 e 85 µg/g_{BM} para o acetato de etilo e para o 2-metiltetrahidrofurano, respetivamente. Este resultado demonstra que a extração dos pigmentos é realizada, na sua totalidade, em extrações curtas e a baixas temperaturas, as quais têm a vantagem de apresentarem baixos gastos energéticos e impactos ambientais.

Cruzando estes resultados com a extração de DHA e os AGT, verifica-se que, embora as suas melhores condições de extração sejam para 2 minutos e 200°C, é também possível obter rendimentos satisfatórios para as melhores condições dos pigmentos. Desta forma, verifica-se que é possível extrair os vários compostos de interesse, praticamente na sua totalidade, em condições económica e ambientalmente favoráveis e sem comprometer a recuperação de nenhum dos compostos.

3.3.2.2.2 Análise dos parâmetros do planeamento experimental e validação estatística do modelo polinomial

Na Tabela 18, encontram-se os resultados obtidos para os parâmetros apresentados na Equação 14, β , e os parâmetros de validação do modelo, para os solventes utilizados.

Tabela 18 – Coeficientes do modelo polinomial que descrevem as respostas avaliadas no planeamento experimental e validação dos mesmos, para os solventes acetato de etilo e 2-metiltetrahidrofurano. O fator 1 e o fator 2 correspondem à temperatura e ao tempo de extração, respetivamente.

	Modelo	Ac.Et.	2-MeTHF
Coeficientes	β_0	59,26	67,57
	β_1	-13,43	-14,26
	β_2	-4,76	-0,59
	β_{12}	-1,61	0,45
	β_{11}	6,07	2,56
	β_{22}	8,93	3,4
Validação	Eficácia dos parâmetros	31,22	25,16
	Nível de significância(α), F(5,8)	0,99	0,99
	Desajuste	1,41	4,59
	Nível de significância(α), F(1,7)	0,73	0,93

Os parâmetros apresentados refletem: β_0 , o valor da resposta no centro do domínio experimental; β_1 , a importância relativa da temperatura; β_2 , a importância relativa do tempo; β_{12} , a interação entre os dois fatores e β_{11} e β_{22} , o ajuste quadrático da superfície de resposta.

Começando por β_1 , verifica-se que ambos os valores são negativos e de valor absoluto elevado. Este resultado demonstra a grande influência negativa do aumento da temperatura no rendimento da extração.

Analisando β_2 , conclui-se que ambos os valores são negativos, sendo, para o 2-metiltetrahidrofurano próximo de 0. Isto demonstra a baixa influência negativa que o aumento do tempo de extração tem no rendimento.

Para β_{12} , observa-se, para o acetato de etilo, que este é negativo e, para o 2-tetrametilhidrofurano, que este é próximo de zero, revelando que a interação dos dois fatores não tem uma grande influência na extração de pigmentos.

No que diz respeito a β_{11} e β_{22} , como foi dito anteriormente, por não terem significado físico, nada se pode concluir acerca dos seus valores.

Analisando agora para os parâmetros de validação, verifica-se um nível de significância, α , de 0,99 para a eficácia dos parâmetros para ambos os solventes. Quer isto dizer que os modelos descrevem corretamente os resultados experimentais, com alta exatidão.

Já para o nível de significância do desajuste, verifica-se que estes tomam o valor de 0,73 e 0,93, para o acetato de etilo e para o 2-metiltetrahidrofurano, respetivamente. Isto denota a concordância experimental entre as réplicas realizadas para cada ensaio, demonstrando que existiram mais erros experimentais no caso do acetato de etilo.

3.3.3 Extração supercrítica

Os ensaios de extração supercrítica das várias biomassas testadas permitiram obter resultados para os pigmentos totais no extrato. O gráfico da Figura 31 apresenta as curvas cumulativas do rendimento em pigmentos totais obtido para a biomassa com os vários pré-tratamentos estudados.

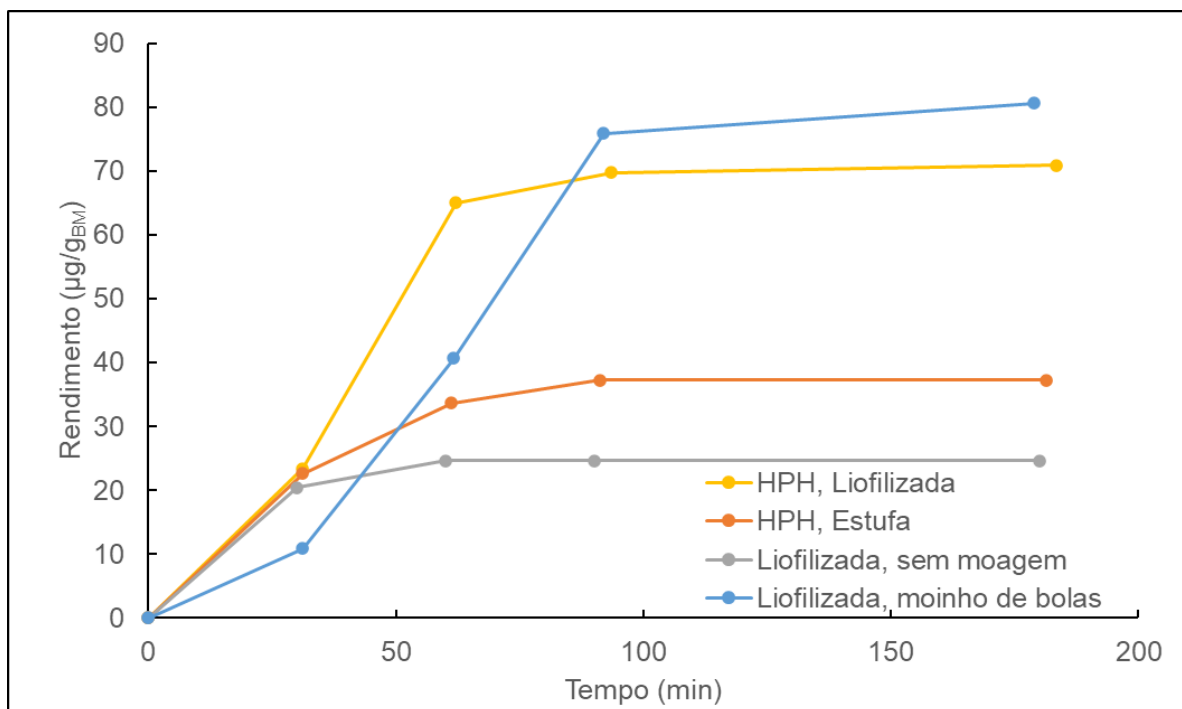


Figura 31 – Curvas cumulativas do rendimento de extração de pigmentos totais, realizadas à temperatura de 41°C e pressão de 300 bar, para os vários pré-tratamentos da biomassa.

Observando o gráfico da Figura 31, verifica-se que a biomassa liofilizada e submetida a moagem em moinho de bolas permite atingir o rendimento mais alto em pigmentos, 80,6 µg/g_{BM}. Por outro lado, a biomassa liofilizada mas sem qualquer pré-processamento de moagem ou rutura celular é a que apresenta o menor rendimento em pigmentos totais, apenas 24,6 µg/g_{BM}, evidenciando assim a importância da rutura celular para melhorar a eficiência da extração. De facto, a membrana celular da microalga representa um impedimento considerável à extração dos compostos, dado que os pigmentos são metabolitos intracelulares, podendo encontrar-se dentro dos cloroplastos, ligados aos tilacoides (sistema de membranas internas dos cloroplastos) ou em complexos proteína-pigmento.[39] Deste modo, submetendo a biomassa a processos de rutura, como HPH ou moagem em moinho de bolas, pode conseguir-se a fragmentação da membrana celular e das membranas de organelos internos e, deste modo, tornar acessíveis ao solvente os compostos intracelulares como os pigmentos, aumentando assim a eficiência da extração.

Comparando os dois métodos de rutura testados, observa-se que a extração de pigmentos da biomassa submetida a moagem por moinho de bolas apresenta-se um rendimento ligeiramente superior ao obtido com a biomassa submetida a HPH. Isto poderá dever-se ao facto de a biomassa submetida a HPH ter sido liofilizada após a rutura das células. Assim, os compostos intracelulares ficam expostos a agentes externos que podem promover a degradação dos compostos, durante toda a manipulação pela liofilização (apesar desta ser realizada a baixas temperaturas e evitando o contacto com a luz). Por outro lado, a biomassa submetida a moagem em moinho de bolas, sofreu o processamento de rutura após a liofilização, sendo de imediato submetida à ESC. Assim, os pigmentos libertados no processo de rutura terão sido menos sujeitos a ação de agentes de degradação.

De notar que a biomassa submetida a liofilização e moagem em moinho de bolas apresenta uma curva cumulativa de extração na qual se verifica a presença de uma ligeira inflexão na parte inicial da extração, o que significa que na fase inicial da extração a velocidade de extração será inferior à observada para a extração da biomassa inteira (não submetida a processo de rutura). Esta tendência já tinha sido observada por Gouveia et al. (2007) [40] na extração de pigmentos da *Chlorella vulgaris* usando biomassa sem moagem e com vários graus de moagem. Possivelmente, na fase inicial da extração haverá uma extração preferencial dos ácidos gordos, relativamente aos carotenoides, dado que a solubilidade dos primeiros em CO₂ supercrítico é muito superior à dos últimos. Sendo a disponibilidade de ácidos gordos da matriz, que estão acessíveis ao solvente, muito superior na biomassa submetida a moagem, verifica-se a referida extração preferencial.

No que diz respeito aos métodos de secagem, para a biomassa sujeita previamente a HPH, observa-se que a biomassa seca na estufa apresenta um rendimento em carotenoides muito inferior ao obtido para a biomassa submetida a liofilização. Esta tendência poderá estar relacionada com a exposição dos pigmentos a temperatura (45°C) e, como tal, agentes que causam degradação destes compostos termolábeis, na secagem por convecção, contrariamente à liofilização, que decorre a temperaturas muito baixas (-50°C).

Relativamente ao ensaio de extração supercrítica para fracionamento, os resultados obtidos mostram que na primeira fração (obtida a 150 bar e 41°C) não foi possível obter carotenoides. A segunda fração apresentou um rendimento de 41 µg/g_{BM}.

Comparando o rendimento em pigmentos obtido na extração supercrítica com o obtido pelos outros métodos de extração (Soxhlet e ASE), Figura 32, verifica-se que para a biomassa submetida a liofilização e moinho de bolas a extração supercrítica permite obter um rendimento em pigmentos próximo do valor obtido por ASE, 82,79 µg/g BM, e acima do valor obtido na extração por Soxhlet (72,30 µg/g BM) evidenciando-se assim que poderá ser uma alternativa interessante para a obtenção destes compostos. A mesma tendência verifica-se também para a biomassa submetida a HPH e liofilização.

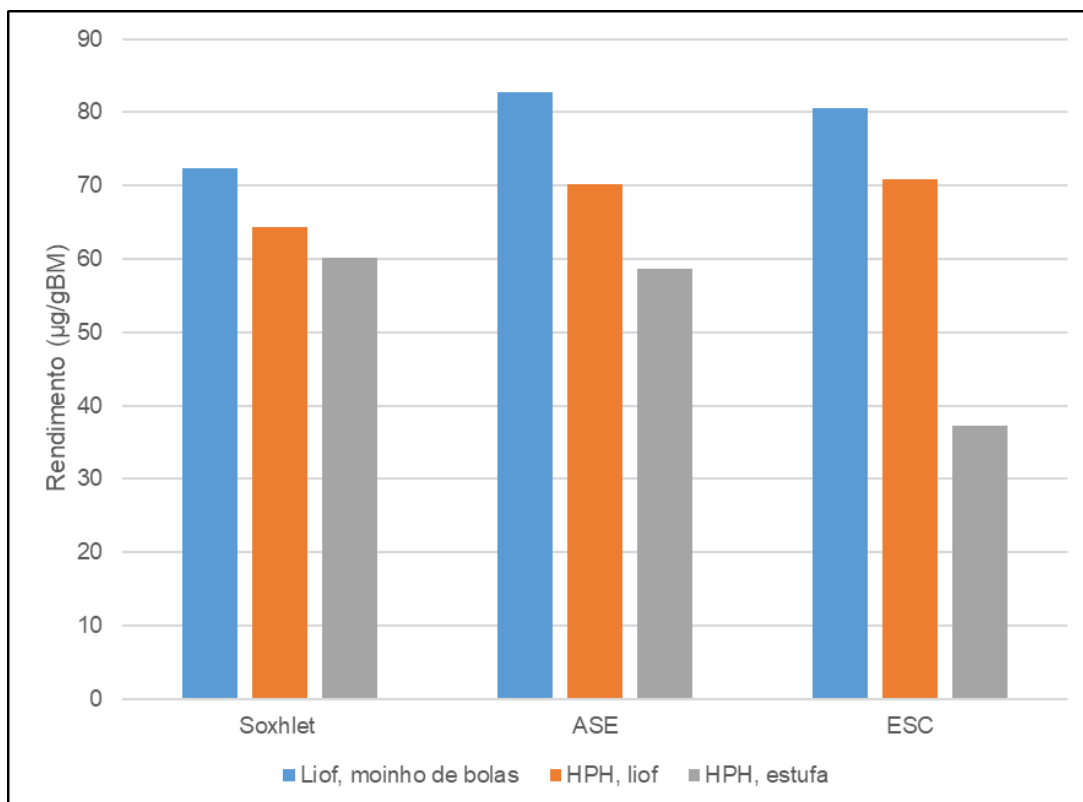


Figura 32 – Rendimento em pigmentos totais para os processos de extração estudados e os vários pré-tratamentos da biomassa.

Comparando os valores de rendimento em pigmentos totais, para qualquer um dos métodos de extração, obtidos nesta tese com os existentes na literatura [33], verifica-se que os valores para as culturas de *C. cohnii* produzidas neste trabalho são muito superiores aos obtidos pelos referidos autores para biomassa resultante de cultura por fermentação no escuro. Os referidos autores realizaram também culturas por fermentação com exposição a luz, que resultaram numa biomassa com um rendimento em pigmentos totais próximos dos obtidos neste trabalho.

3.3.4 Análise dos pigmentos presentes no extrato lipídico

O extrato lipídico obtido pelos diversos métodos de extração estudados foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com o objetivo de identificar os carotenoides presentes no óleo extraído.

Os trabalhos publicados por outros autores [33] indicam que a estirpe usual da microalga *C. cohnii* acumula maioritariamente β -caroteno e γ -caroteno (na presença ou ausência de luz). No entanto, a presença de inibidores no crescimento celular ou a alteração de certas condições de cultura podem resultar na síntese de outros tipos de carotenos.

Assim, foi realizada a análise cromatográfica utilizando como padrão, β -caroteno, de modo a identificar por comparação do tempo de retenção, a presença deste caroteno nos extratos lipídicos. A presença de γ -caroteno nos extratos lipídicos foi efetuada tendo em consideração os dados presentes na literatura para este carotenoide e o tempo de retenção do padrão β -caroteno.

Na Tabela 19 são apresentados teores relativos dos carotenoides registados nos cromatogramas dos extratos lipídicos de ASE em relação ao total de pigmentos.

Tabela 19 – Teores relativos dos carotenoides e carotenos obtidos por análise por HPLC para os extratos lípidos dos vários métodos.

Pigmentos	% (m/m pigmentos totais)				
	Soxhlet Liof, Moagem	ASE, Liof, Moagem	ASE, HPH, Liof	ASE, HPH, estufa	ESC, Liof,moagem
Outros	5,68	-	-	-	-
β-caroteno	18,51	16,39	15,07	-	18,80
γ-caroteno	24,30	37,71	38,02	-	40,06
Outro caroteno	24,25	36,42	34,24	-	27,49
Minor carotenos	27,26	9,48	16,65	100	13,65

A análise aos cromatogramas permitiu identificar o β-caroteno (por comparação com o padrão) e o γ-caroteno (com base nos dados da literatura). Para além disso, identificou-se também um pico correspondente a um carotenoide mais polar e vários picos com tempos de retenção superiores ao β-caroteno e também ao γ-caroteno, que foram considerados outro tipo de carotenos. De entre esses destaca-se um pico considerado “outro caroteno” pois apresenta, para quase todas as amostras, um valor de teor relativo entre 25-35% (m/m pigmentos totais), o qual é próximo do valor para o γ-caroteno. Os restantes picos, com os maiores tempos de retenção, apresentam valores menores de teor relativo e correspondem aos compostos de menor polaridade, tendo sido por isso agrupados em “*minor carotenos*”.

Ao observar a Tabela 19, verifica-se que o óleo obtido pelos diversos métodos testados apresenta um teor relativo em β-caroteno de 15-18% (m/m pigmentos totais), de γ-caroteno de 25 a 40% (m/m pigmentos totais), existindo ainda um terceiro caroteno com teor relativo muito idêntico ao do γ-caroteno (25-35% m/m pigmentos totais). Adicionalmente, pode também afirmar-se que os pigmentos presentes nos extratos lipídicos são carotenos dado que correspondem a 90% ou mais dos pigmentos detetados. Além disso, destes carotenos verifica-se que cerca de 50% são β-caroteno e γ-caroteno. Whither e Tuttle (1979) [33] observaram que as culturas de *C. cohnii* resultantes de fermentação no escuro acumulavam maior quantidade de γ-caroteno em comparação com β-caroteno, verificando que a razão β-caroteno/γ-caroteno estaria próxima de 0,67. Esta tendência é também observada no trabalho desta dissertação, verificando-se que a razão referida apresenta valores ainda menores (0,4-0,7), ou seja, a quantidade de γ-caroteno será ainda maior em relação ao β-caroteno.

4 Conclusões e trabalho futuro

O presente trabalho tinha como principal objetivo o estudo da utilização de solventes verdes na extração de lípidos (ácidos gordos, mais concretamente o DHA) da microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* e o estudo da influência de mecanismos de rutura celular (moagem no moinho de bolas e homogeneização a alta pressão, HPH) e de métodos de secagem (secagem convectiva na estufa e liofilização) no rendimento da extração. Para tal, utilizaram-se técnicas como a extração Soxhlet, a extração com líquidos pressurizados (ou extração acelerada por solventes) e a extração supercrítica.

Outro dos objetivos deste trabalho foi o estudo da influência de fontes de carbono de baixo custo no crescimento da microalga e na acumulação das substâncias referidas. Assim, utilizou-se melação de cana e glicerol, ambos subprodutos industriais, como fonte de carbono.

Para tal, foi necessário realizar-se fermentações da microalga *C. cohnii* que maximizassem a acumulação de lípidos, ácidos gordos e DHA. Realizaram-se quatro ensaios. O Ensaio I, onde se usou melação de cana hidrolisado como fonte de carbono, foi contaminado por outros microrganismos, o que implicou o descarte da cultura. O Ensaio II, repetição do Ensaio I, foi interrompido uma vez que a microalga se encontrava inibida pelo substrato. A biomassa resultante deste ensaio foi em pequena quantidade, com baixo teor em lípidos, ácidos gordos e DHA. No Ensaio III utilizou-se glicerol como fonte de carbono. No entanto, uma falha no equipamento levou a um aumento brusco do pH, o que implicou o término imediato da cultura. A biomassa obtida, de forma semelhante ao ensaio anterior, era pobre nas substâncias de interesse e em pouca quantidade. No Ensaio IV, repetição do Ensaio III, obteve-se uma biomassa rica em lípidos, ácidos gordos e DHA e em quantidade abundante.

Pelo exposto, embora não se tenha podido retirar conclusões acerca da influência do substrato na acumulação dos compostos referidos, concluiu-se que é possível gerar uma biomassa de qualidade (isto é, rica em lípidos, ácidos gordos e DHA com baixo teor de humidade e cinzas) utilizando uma fonte de carbono de baixo custo.

Assim, foi então possível seguir com as extrações. A extração Soxhlet, realizada sempre com n-hexano, funcionou como técnica de referência para os restantes métodos. Esta extração permitiu caracterizar a biomassa. Em termos de lípidos totais, a biomassa sujeita a HPH e liofilização foi a que teve melhores resultados, seguido da biomassa liofilizada e moída e da sujeita a HPH e secagem na estufa. Já para os ácidos gordos totais e o DHA, ocorreu uma pequena mudança – a biomassa liofilizada e moída teve o melhor rendimento, seguido da sujeita a HPH e liofilizada e da sujeita a HPH e seca na estufa. Estes resultados permitem concluir que a secagem na estufa, por ocorrer a uma temperatura mais elevada que a liofilização, provoca a degradação de alguns compostos, sendo a biomassa com piores resultados. Por outro lado, permitem também concluir que a HPH provoca um rompimento celular tão intenso que possibilita a extração de outros compostos que não ácidos gordos e, para além disso, expõe os conteúdos intracelulares ao meio, provocando a sua degradação.

Feito isto, recorreu-se à extração ASE para avaliação da utilização de solventes verdes na eficiência da extração dos compostos de interesse da microalga. Para tal, variaram-se dois parâmetros operatórios, o tempo de extração e a temperatura, registando a sua influência no rendimento da extração. Utilizaram-se também dois solventes: o acetato de etilo e o 2-tetrametilhidrofurano.

Começando com o acetato de etilo, verificou-se que o valor de lípidos totais era superior ao obtido por Soxhlet. Isto acontece uma vez que o poder solvente do acetato de etilo é superior ao do hexano, extraindo compostos como complexos lípido-proteicos e lípido-carbohidratos. No que diz respeito aos TFA e ao DHA, foram obtidos resultados muito próximos, mas inferiores ao Soxhlet. Concluiu-se que a temperatura e o tempo de extração influenciam pouco, a extração, mas de forma positiva. Também se concluiu que é possível obter extrações satisfatórias a baixas temperaturas, o que representa uma vantagem económica e ecológica. Para além disto, aferiu-se que a concentração de DHA nos TFA pouco varia.

A utilização de 2-metiltetrahidrofurano, em relação aos lípidos totais, conduziu a resultados semelhantes ao acetato de etilo, embora superiores, uma vez que este tem também um poder solvente superior ao do hexano. No entanto, no que se refere à extração de ácidos gordos, este solvente apresentou melhores resultados que qualquer outro. Já para o DHA apresentou resultados inferiores aos outros, mas próximos. Aferiu-se que, neste caso, a influência do tempo de extração é praticamente nula e a da temperatura é positiva. Para além disto, concluiu-se que os a extração dos ácidos gordos é praticamente invariável, pelo que se pode controlar a fração de DHA nestes por ajuste dos parâmetros operatórios. De forma semelhante ao acetato de etilo, inferiu-se que a realização de extrações a baixas temperaturas conduzia a resultados satisfatórios, apresentando as vantagens referidas. Assim, a utilização de *biobased solvents* para a extração da fração lipídica da microalga é possível.

Utilizou-se, ainda, a extração supercrítica, utilizando dióxido de carbono supercrítico, para avaliar as influências dos processos de rutura celular (moagem no moinho de bolas e homogeneização a alta pressão) e os métodos de secagem (convectiva na estufa e liofilização) e a possibilidade da obtenção de um extrato enriquecido em DHA.

Primeiramente, através da análise dos lípidos totais, concluiu-se que a rutura celular é imprescindível para a extração, uma vez que leva a extrações mais rápidas e mais eficientes. A moagem no moinho de bolas apresentou resultados um pouco melhores que o HPH. Já para os ácidos gordos totais e DHA, a biomassa sujeita a HPH e liofilização apresentou melhores resultados que a biomassa moída no moinho de bolas e liofilizada. Isto permite concluir que o HPH é um método de rutura mais eficiente para a extração destes compostos. Mais uma vez, a biomassa sujeita a HPH e seca na estufa foi a que apresentou piores resultados sendo melhores, no entanto, que a biomassa não moída.

Comparando os três métodos, para a extração de lípidos totais, concluiu-se que para qualquer uma das biomassas, a extração supercrítica apresenta resultados semelhantes ao Soxhlet e superiores ao ASE. No que diz respeito aos TFA e ao DHA, conclui-se: para a biomassa liofilizada e moída no moinho de bolas, o rendimento em ESC é inferior ao Soxhlet e ao ASE; para a biomassa sujeita a HPH

e liofilizada, a ESC apresentou rendimentos superiores ao Soxhlet e ao ASE; para a biomassa sujeita a HPH e seca na estufa, o rendimento foi semelhante ao Soxhlet e superior ao ASE.

Para além disto, utilizaram-se as características de um fluido supercrítico, alterando a pressão de trabalho para mudar a densidade do solvente e, por conseguinte, a solubilidade dos compostos, de forma a fracioná-los em dois extratos. Assim, foi possível obter um extrato enriquecido em DHA e um extrato enriquecido nos restantes ácidos gordos que pode ser utilizado na produção de biocombustíveis.

No que se refere aos pigmentos, os resultados obtidos por extração Soxhlet mostram o mesmo que os lípidos totais: a biomassa obtida no Ensaio IV acumulou mais lípidos, seguida da tratada por HPH e liofilização e, por fim, a submetida a HPH e seca na estufa.

De forma semelhante ao ASE para a extração da fase lipídica, estudou-se também a influência do tempo de extração e da temperatura no rendimento da extração. Assim, concluiu-se que a temperatura tem um efeito altamente negativo na extração de lípidos: uma vez que os pigmentos são substâncias altamente termolábeis, o aumento da temperatura causa a sua degradação e, por conseguinte, a diminuição do rendimento. O tempo de extração tem pouca influência no rendimento, sendo a pouca que tem negativa, uma vez que tem um efeito potenciador do efeito da temperatura. Assim, a extração de pigmentos era máxima para pequenos tempos de extração e baixas temperaturas. Os rendimentos de extração dos TFA e DHA era também satisfatório para estas condições. Pelo exposto, é possível extrair todos os compostos de interesse da microalga em condições de baixa temperatura e tempo de extração, provando, mais uma vez, a eficiência e sustentabilidade deste processo.

Para a extração supercrítica, a biomassa liofilizada e moída no moinho de bolas foi a que apresentou maior rendimento, seguida da biomassa sujeita a HPH e liofilizada e, finalmente, a seca na estufa. Mais uma vez, verifica-se que a HPH provoca uma rutura celular tão intensa que deixa os compostos expostos ao ar (oxigénio) e luz, o que causa sua degradação.

Por tudo o que foi dito, é possível concluir que a microalga *Cryptocodinium cohnii* apresenta grandes oportunidades de utilização futura. Primeiramente, consegue desenvolver-se e acumular lípidos em substratos advindos da indústria; acumula altos teores lipídicos na sua composição, com possibilidade de utilização na indústria das biorrefinarias e, para além disso, acumula uma elevada fração de DHA, utilizável na indústria farmacêutica e nutricional. Adicionalmente, ainda se provou com o trabalho desenvolvido nesta tese que existem métodos amigos do ambiente para a extração dos compostos referidos, utilizando solventes verdes e condições perto das condições ambiente, tudo vantagens que nem sempre se observam na indústria química. Em suma, o processo de cultura de *C. cohnii* e extração da sua fração lipídica apresenta grandes perspectivas na área da sustentabilidade.

Os dados obtidos e as conclusões retiradas ao longo deste trabalho levantam questões relevantes a abordar em trabalhos futuros. Em primeiro lugar, uma vez que as fermentações realizadas tinham como objetivo a maximização do teor lipídico (e em ácidos gordos, em específico o DHA), seria também interessante realizar a fermentação com o objetivo de potenciar a produção de pigmentos, ou

até de ambos os parâmetros. Para além disto, seria também interessante avaliar as propriedades biológicas do extrato obtido, nomeadamente o seu efeito antioxidante ou anticancerígeno. Nesta linha, seria também vantajosa a identificação dos compostos extraídos que apresentam maior atividade biológica e orientar as fermentações no sentido da sua acumulação ou mesmo a identificação de novos compostos biologicamente ativos no extrato.

Por outro lado, adotando uma perspetiva mais económico-ambiental, seria também interessante fazer a análise do ciclo de vida de todo o processo envolvendo a microalga *C. cohnii*, desde a sua cultura à extração. Após a extração, seria também proveitoso avaliar a possibilidade da valorização energética dos resíduos da extração (i.e., biomassa extratada) para a produção de biocombustíveis (e.g., biohidrogénio, biogás ou bioetanol) e, neste caso, fazer o *life cycle assessment* de todo o processo.

Referências

- [1] M. Dębowski, M. Zieliński, J. Kazimierowicz, N. Kujawska, S. Talbierz, Microalgae Cultivation Technologies as an Opportunity for Bioenergetic System Development—Advantages and Limitations, *Sustainability*. 12 (2020) 9980. <https://doi.org/10.3390/su12239980>.
- [2] A. Mendes, A. Reis, R. Vasconcelos, P. Guerra, T. Lopes da Silva, *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review, *J Appl Phycol*. 21 (2009) 199–214. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9351-3>.
- [3] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*. 25 (2007) 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
- [4] E. Scorletti, C.D. Byrne, Omega-3 Fatty Acids, Hepatic Lipid Metabolism, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Annu. Rev. Nutr.* 33 (2013) 231–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161230>.
- [5] P.C. Calder, Docosaehaenoic Acid, *Ann Nutr Metab*. 69 (2016) 8–21. <https://doi.org/10.1159/000448262>.
- [6] M. Khan, M. Rahman, S. Zaman, T. Jahangir, M. Razu, Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Algae, in: 2015: pp. 1–17.
- [7] L.A. Horrocks, Y.K. Yeo, HEALTH BENEFITS OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA), *Pharmacological Research*. 40 (1999) 211–225. <https://doi.org/10.1006/phrs.1999.0495>.
- [8] M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 2383–2389. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>.
- [9] M. Garcia-Vaquero, G. Rajauria, B. Tiwari, Conventional extraction techniques: Solvent extraction, in: *Sustainable Seaweed Technologies*, Elsevier, 2020: pp. 171–189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00006-8>.
- [10] S.I. Mussatto, Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin, in: *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier, 2015: pp. 93–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00011-5>.
- [11] P.K. Mukherjee, Extraction and Other Downstream Procedures for Evaluation of Herbal Drugs, in: *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*, Elsevier, 2019: pp. 195–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00006-5>.
- [12] Q.-W. Zhang, L.-G. Lin, W.-C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chin Med*. 13 (2018) 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
- [13] A. Sridhar, M. Ponnuchamy, P.S. Kumar, A. Kapoor, D.-V.N. Vo, S. Prabhakar, Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review, *Environ Chem Lett*. 19 (2021) 3409–3443. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01217-8>.
- [14] A. Zygler, M. Słomińska, J. Namieśnik, Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec, in: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Elsevier, 2012: pp. 65–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00037-5>.
- [15] C. Picot-Allain, M.F. Mahomoodally, G. Ak, G. Zengin, Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective, *Current Opinion in Food Science*. 40 (2021) 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>.
- [16] S. Gharaati Jahromi, Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants, in: M. Soto-Hernández, R. García-Mateos, M. Palma-Tenango (Eds.), *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84705>.
- [17] A. Mustafa, C. Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Analytica Chimica Acta*. 703 (2011) 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>.
- [18] R.P.F.F. da Silva, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 76 (2016) 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.
- [19] G. Brunner, Supercritical Gases as Solvents: Phase Equilibria, in: *Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes*, Steinkopff ; Springer, Darmstadt, New York, 1994.
- [20] R.M. Couto, P.C. Simões, A. Reis, T.L. Da Silva, V.H. Martins, Y. Sánchez-Vicente, Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*, *Eng. Life Sci.* (2010) NA-NA. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900074>.
- [21] C. Nitsos, R. Filali, B. Taidi, J. Lemaire, Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review, *Biotechnology Advances*. 45 (2020) 107650. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107650>.

- [22] Y.W. Sitotaw, N.G. Habtu, A.Y. Gebreyohannes, S.P. Nunes, T. Van Gerven, Ball milling as an important pretreatment technique in lignocellulose biorefineries: a review, *Biomass Conv. Bioref.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01800-7>.
- [23] T. Lafarga, Cultured Microalgae and Compounds Derived Thereof for Food Applications: Strain Selection and Cultivation, Drying, and Processing Strategies, *Food Reviews International*. 36 (2020) 559–583. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1655572>.
- [24] K.H. Min, D.H. Kim, M.-R. Ki, S.P. Pack, Recent progress in flocculation, dewatering, and drying technologies for microalgae utilization: Scalable and low-cost harvesting process development, *Bioresource Technology*. 344 (2022) 126404. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126404>.
- [25] X. Duan, X. Yang, G. Ren, Y. Pang, L. Liu, Y. Liu, Technical aspects in freeze-drying of foods, *Drying Technology*. 34 (2016) 1271–1285. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1099545>.
- [26] F.G. Calvo-Flores, M.J. Monteagudo-Arrebola, J.A. Dobado, J. Isac-García, Green and Bio-Based Solvents, *Top Curr Chem (Z)*. 376 (2018) 18. <https://doi.org/10.1007/s41061-018-0191-6>.
- [27] J. Coelho, P. Trucillo, B. Nobre, A.F. Palavra, R. Campardelli, E. Reverchon, Extraction and bioprocessing with supercritical fluids, *Physical Sciences Reviews*. 5 (2020) 20180069. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0069>.
- [28] P.Y. Lim, Determination of chemical properties of meat: Protein determination by Kjeldahl method, Marine Fisheries Research Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, 1987. <http://hdl.handle.net/20.500.12066/5310> (accessed October 3, 2022).
- [29] D.H. Doehlert, Uniform Shell Designs, *Applied Statistics*. 19 (1970) 231. <https://doi.org/10.2307/2346327>.
- [30] C. Henriques, Síntese de ómega-3 e ácidos gordos para a produção de biodiesel pela microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* e estudo de métodos sustentáveis para a sua extração, Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico, 2022.
- [31] S.N. Deming, S.L. Morgan, *Experimental design: a chemometric approach*, 2nd rev. and expanded ed, Elsevier, Amsterdam ; New York, 1993.
- [32] N.R. Draper, H. Smith, *Applied regression analysis*, 3rd ed, Wiley, New York, 1998.
- [33] N.W. Withers, R.C. Tuttle, Carotenes from Mutants of the Dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*, *The Journal of Protozoology*. 26 (1979) 135–138. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1979.tb02750.x>.
- [34] J. Hussain, Y. Liu, W.A. Lopes, J.I. Druzian, C.O. Souza, G.C. Carvalho, I.A. Nascimento, W. Liao, Effects of Different Biomass Drying and Lipid Extraction Methods on Algal Lipid Yield, Fatty Acid Profile, and Biodiesel Quality, *Appl Biochem Biotechnol*. 175 (2015) 3048–3057. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1486-5>.
- [35] S. Pezhman Hosseini Shekarabi, M. Shamsaie Mehrgan, N. Razi, S. Sabzi, BIOCHEMICAL COMPOSITION AND FATTY ACID PROFILE OF THE MARINE MICROALGA *Isochrysis galbana* DRIED WITH DIFFERENT METHODS, *J Microb Biotech Food Sci*. 9 (2019) 521–524. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.521-524>.
- [36] K.K. Sharma, H. Schuhmann, P.M. Schenk, High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production, *Energies*. 5 (2012) 1532–1553. <https://doi.org/10.3390/en5051532>.
- [37] V. Pace, P. Hoyos, L. Castoldi, P. Domínguez de María, A.R. Alcántara, 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry, *ChemSusChem*. 5 (2012) 1369–1379. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100780>.
- [38] B.P. Nobre, F. Villalobos, B.E. Barragán, A.C. Oliveira, A.P. Batista, P.A.S.S. Marques, R.L. Mendes, H. Sovová, A.F. Palavra, L. Gouveia, A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass, *Bioresource Technology*. 135 (2013) 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.084>.
- [39] A.C. Guedes, H.M. Amaro, F.X. Malcata, Microalgae as Sources of Carotenoids, *Marine Drugs*. 9 (2011) 625–644. <https://doi.org/10.3390/md9040625>.
- [40] L. Gouveia, B.P. Nobre, F.M. Marcelo, S. Mrejen, M.T. Cardoso, A.F. Palavra, R.L. Mendes, Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂, *Food Chemistry*. 101 (2007) 717.

Anexo A – Reagentes e solventes

Tabela A1.1 – Reagentes e solventes utilizados na atividade experimental

Nome	Fórmula química	Pureza(%)	Marca	Aplicação
Sal marinho	–	–	OceanusIberia	Meio de cultura
YE	–	–	HiMedia	Meio de cultura
CSP	–	–	COPAM	Meio de cultura
Glicerol bruto	–	–	Iberol	Meio de cultura
Melaço de cana	–	–	Açucareira de Alcântara	Meio de cultura
D-glicose, anidro	C ₆ H ₁₂ O ₆	99,5	Pronolab	Meio de cultura
Cloranfenicol	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	–	USB	Meio de cultura
Penicilina	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ NaO ₄ S	–	AlfaAesar	Meio de cultura
Sulfato de estreptomicina	(C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂) ₂₂ .3H ₂ SO ₄	–	PanReac	Meio de cultura
Hidróxido de sódio	NaOH	–	José M. Vaz Pereira, S.A.	Meio de cultura; azoto residual
Ácido clorídrico	HCl	–	Merck	Meio de cultura; azoto residual
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	97,0	Merck	HPLC; azoto residual
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	98,8	Merck	Azoto residual
CFDA	C ₂₉ H ₁₉ NO ₁₁	–	Life Technologies	Citometria
Iodeto de propídio	C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄	–	Life Technologies	Citometria
Metanol	CH ₃ OH	99,8	Merck	Transmetilação
Cloreto de acetilo	C ₂ H ₃ OCl	98,5	Panreac	Transmetilação
Ácido heptadecanoico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	–	Nu-Check-Prep	Transmetilação
N-heptano	C ₇ H ₁₆	99,0	Fisher Chemical	Transmetilação
Sulfato de sódio anidro	Na ₂ SO ₄	99,0	Merck	Transmetilação
N-hexano	C ₆ H ₁₄	95	Fisher Chemical	Soxhlet; ASE; ESC
Dióxido de carbono	CO ₂	99,998	Air Liquide	ESC
Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	99,9	Group Carlo Erba	ASE
2-metil-tetrahidrofurano	C ₅ H ₁₀ O	99,9	Carlo Erba	ASE

Anexo B – Correção do volume do contador na ESC

Cálculo da pressão do gás à saída do contador

A pressão à saída do contador foi calculada através da Equação B1.

$$P_{gas}^{contador} (mmHg) = (P_{atm} - C_{P_{atm}}) + \frac{\Delta h}{13,6} - P_{sat,H_2O}^{T_{contador}} \quad (B1)$$

Nesta equação, $P_{gas}^{contador}$ representa a pressão do gás à saída do contador, P_{atm} a pressão atmosférica, $C_{P_{atm}}$ a correção da pressão atmosférica para 0°C (variável com a pressão atmosférica e temperatura ambiente), Δh a altura manométrica de água do contador, 13,6 a densidade relativa do mercúrio (para conversão de mmH₂O em mmHg) e $P_{sat,H_2O}^{T_{contador}}$ a pressão de saturação da água à temperatura de saída do gás do contador.

Correção do volume de dióxido de carbono consumido

O volume corrigido obteve-se através da Equação B2 (variação da Lei dos Gases Perfeitos).

$$V_{corrigido}^{PTN} = \Delta V \times \frac{P_{gas}^{contador}}{760} \times \frac{273,15}{T} \quad (B2)$$

Na equação acima, $V_{corrigido}^{PTN}$ corresponde ao volume corrigido às condições normais de pressão e temperatura, ΔV à variação de volume de dióxido de carbono durante a extração e $P_{gas}^{contador}$ à pressão do gás à saída do contador. As condições normais de pressão e temperatura correspondem a 760 mmHg e 273,15 K, sendo este o significado dos valores apresentados no primeiro e segundo fator de correção, respetivamente.

Anexo C – Análise de Pigmentos

Como foi referido, quantificaram-se os pigmentos obtidos em praticamente todos os extratos obtidos. Assim, apresentam-se algumas figuras onde se evidencia a presença de pigmentos.



Figura C.1 – Extratos lipídicos de C. Cohnii, em hexano, obtidos por ESC.

Na Figura C.1 é possível verificar a evolução da cor do extrato lipídico de acordo com a concentração de pigmentos. Esta figura refere-se ao ensaio de fracionamento da ESC.

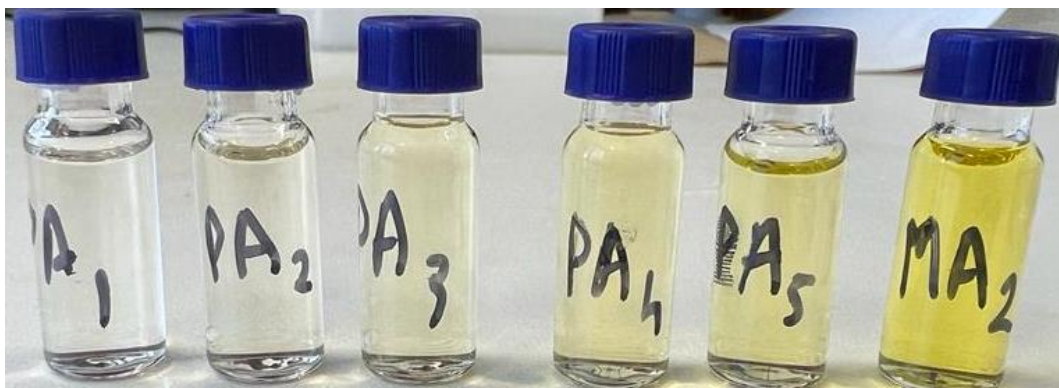


Figura C.2 – Padrões de β -caroteno.

Na Figura C.2 observam-se padrões de β -caroteno. A variação da cor com a concentração é semelhante à demonstrada na Figura C.1.

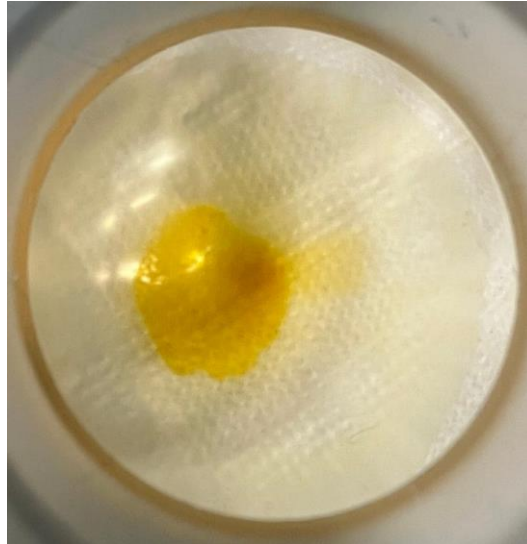


Figura C.3 – Óleo obtido por extração Soxhlet da biomassa do Ensaio IV, em hexano.

Na Figura C.3 evidencia-se o intensificar da cor do óleo após a remoção de solvente, passando a apresentar um aspeto mais alaranjado.

Finalmente, apresenta-se um espectro de exemplo, obtido pela análise do extrato concentrado do ASE da biomassa do Ensaio IV.

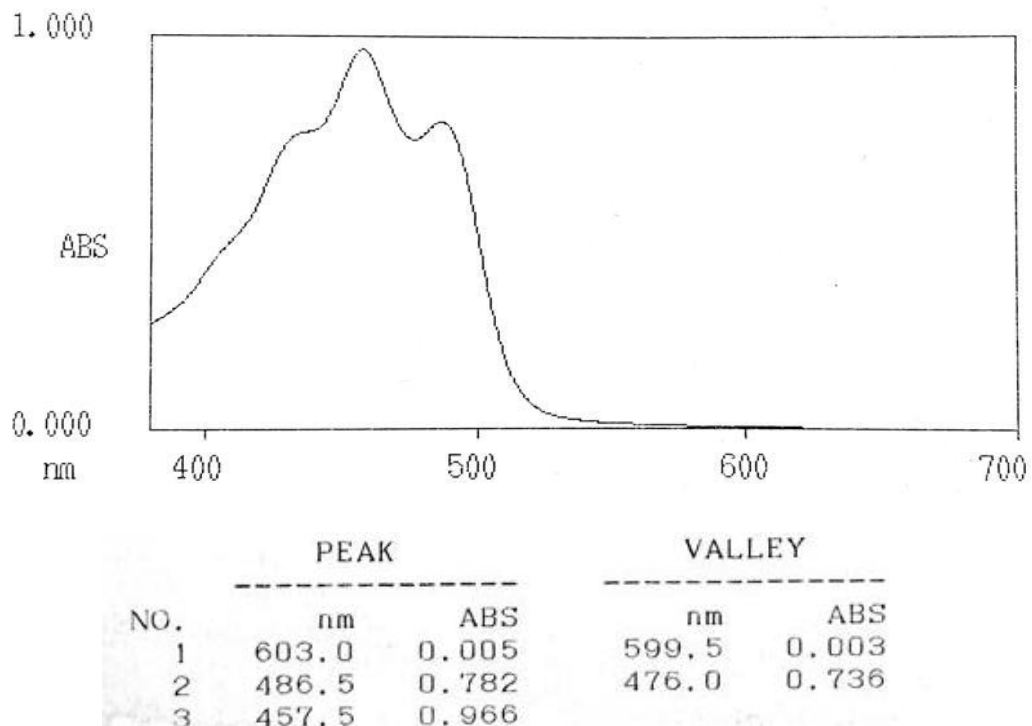


Figura C.4 – Espectro de absorção, no visível, obtido por análise do concentrado de ASE da biomassa do Ensaio IV, em hexano.

Verifica-se, tal como referido, que o máximo de absorção se situa no comprimento de onda de 457,5 nm.