

**Fracionamento do óleo extraído da microalga marinha
Cryptocodinium cohnii para obtenção de biocombustíveis
e compostos ómega-3 (ADH)**

Margarida Machado Bento

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Orientadores:

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

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

Júri

Presidente: Prof. Maria Joana Castelo-Branco de Assis Teixeira Neiva Correia

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

Vogal: Dr. Alberto Reis, Ph.D

Março 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”.

Primeiramente, agradeço à FCT pelo financiamento: UIDB/00100/2020 e UIDP/00100/2020 e LA/P/0056/2020.

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Dr. Maria Beatriz Pinto Pereira Palma Nobre e Dr. Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva, que me acompanharam na execução deste trabalho pela sua simpatia, partilha de conhecimentos e disponibilidade para me ajudar sempre que necessário.

Agradeço também à Dr. Patrícia Moniz por me ter auxiliado durante a fermentação da microalga, partilhando os seus conhecimentos, experiência de vida e simpatia. E ao Dr. Roseiro pela realização da matriz experimental e análise estatística.

Um agradecimento a todos os outros que conheci no Laboratório Nacional de Energia e Geologia pela sua camaradagem, conselhos e auxílio durante a execução do trabalho laboratorial.

Tenho também de reconhecer todos os amigos que fiz no Técnico por todas as aventuras que passámos, por todos os desafios que tivemos de superar e por todo o apoio que cada um deles foi ao longo destes últimos cinco anos.

Numa nota pessoal e muito importante, gostaria de agradecer à minha família, em especial à minha mãe, pai e irmão, pela sua dedicação, afeto, apoio e conselhos ao longo de toda a minha vida que me conduziram até este momento e que me moldaram na pessoa que sou hoje.

Resumo

O presente estudo explorou o uso do método de extração supercrítica com dióxido de carbono na recuperação dos lípidos sintetizados pela microalga marinha *Cryptocodinium cohnii*, com o intuito de implementar um processo simples e amigável do ambiente para a coprodução de biocombustíveis e produtos ω -3 de valor acrescentado (ácido docosahexaenóico).

Primeiramente, analisou-se o uso de glicerol bruto na produção de culturas de elevada densidade celular num reator laboratorial de bancada, tendo-se obtido uma concentração de biomassa igual a 20,2 g/L e um conteúdo de ácido docosahexaenóico de 5,3% (m/m_{biomassa seca e sem cinzas}).

De seguida, otimizou-se o método de extração supercrítica através da variação da pressão e temperatura de trabalho, de modo a maximizar os rendimentos de extração globais de lípidos e de ácido docosahexaenóico. Para tal recorreu-se a um planeamento experimental baseado numa superfície de resposta (*response surface methodology*), desenvolvido através da distribuição espacial de Doehlert. Esta abordagem permitiu concluir que as condições de pressão e temperatura que permitem obter os melhores rendimentos de extração de lípidos, 16,89 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas} e de ácido docosahexaenóico, 3,51 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}, são 187,5 bar e 41,3°C.

O planeamento experimental também permitiu concluir que, de uma maneira geral, a pressão apresenta uma influência mais significativa do que a temperatura nos rendimentos de extração, no entanto ambos os fatores devem ser controlados em simultâneo durante a extração supercrítica.

Por outro lado, em conjunto com os lípidos e ácidos gordos foi também possível extrair e quantificar os pigmentos acumulados pela *C. cohnii*. O conteúdo de pigmentos totais da microalga, estimado pela extração de Soxhlet, é igual a 72,28 $\mu\text{g/g}$ _{biomassa seca e sem cinzas}, sendo este composto maioritariamente por β -caroteno e γ -caroteno.

Por fim, este estudo também permitiu concluir que a aplicação da extração supercrítica na biorrefinaria da microalga *C. cohnii* é favorável, dado que foi possível fracionar a recolha do óleo extraído em duas frações distintas – uma primeira rica em ácidos gordos saturados e monoinsaturados e, por isso, apropriada para a produção de biocombustíveis e uma segunda que pode ser purificada no ácido docosahexaenóico, um produto de alto valor acrescentado cobijado pelas indústrias farmacêutica e nutracêutica.

Palavras-chave: Extração supercrítica; biorrefinaria; *Cryptocodinium cohnii*; ácido docosahexaenóico; pigmentos.

Abstract

This study explored the use of supercritical carbon dioxide extraction in the recovery of lipids synthesised by the marine microalgae *Cryptocodinium cohnii*, to implement a simple and environmentally friendly process for the co-production of biofuels and value-added ω -3 products (docosahexaenoic acid).

Firstly, the use of crude glycerol was analysed in the production of high cell density cultures in a bench-top laboratory reactor, which resulted in a biomass concentration equal to 20.2 g/L and a docosahexaenoic acid content of 5.3% (m/m_{ash-free dry biomass}).

Subsequently, the supercritical extraction method was optimized by varying the working pressure and temperature, to maximize the overall extraction yields of lipids and docosahexaenoic acid. To this end, an experimental design, based on a surface response methodology, developed through the spatial distribution of two factors of Doehlert, was used. This approach enabled the conclusion that the pressure and temperature conditions which yield the highest extraction of lipids, 16.89 g/100 g_{ash-free dry biomass} and of docosahexaenoic acid, 3.51 g/100 g_{ash-free dry biomass}, are 187.5 bar and 41.3°C.

Additionally, the experimental design also enabled the conclusion that, overall, pressure has a more significant influence than temperature in the extraction yields, however both factors must be controlled simultaneously during supercritical extraction.

Furthermore, in combination with the lipids and fatty acids it was also possible to extract and quantify the pigments accumulated by *C. cohnii*. The total pigment content of the microalgae, estimated by Soxhlet extraction, is equal to 72.28 μ g/g_{ash-free dry biomass}, which is composed mainly of β -carotene and γ -carotene.

Finally, this study also concluded that the application of supercritical extraction in the biorefinery of the microalgae *C. cohnii* is favourable, as it was possible to fractionate the extracted oil into two distinct fractions - a former rich in saturated and monounsaturated fatty acids and, therefore, suitable for the production of biofuels and a latter that can be purified into docosahexaenoic acid, a high value-added product sought by the pharmaceutical and nutraceutical industries.

Keywords: Supercritical extraction; biorefinery; *Cryptocodinium cohnii*; docosahexaenoic acid; pigments.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice.....	v
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	xii
Abreviaturas.....	xiv
1. Introdução	1
1.1. Microalgas	3
1.1.1. <i>Cryptocodinium cohnii</i>	3
1.1.1.1. Morfologia	3
1.1.1.2. Condições de crescimento	5
1.1.1.3. Conteúdo lipídico.....	5
1.2. Ácido docosahexaenóico	6
1.3. Extração de lípidos	7
1.3.1. Métodos convencionais	7
1.3.1.1. Método de Soxhlet.....	8
1.3.2. Métodos de extração verdes.....	8
1.3.2.1. Extração assistida por micro-ondas.....	9
1.3.2.2. Extração assistida por ultrassons	10
1.3.2.3. Extração assistida por pulsos de um campo elétrico	10
1.3.2.4. Extração assistida por surfactantes.....	12
1.3.2.5. Extração assistida por enzimas.....	13
1.3.2.6. Extração com líquidos iónicos.....	15
1.3.2.7. Extração com solventes reversíveis	16
1.3.2.8. Extração com líquidos expandidos por gases	17
1.3.2.9. Extração com solventes acelerada	18
1.3.2.10. Extração com fluidos supercríticos	20
1.4. Objetivos.....	24
2. Metodologia	25
2.1. Materiais e Equipamento	25
2.2. Fermentação da <i>Cryptocodinium cohnii</i>	25

2.2.1.	Condições de crescimento	25
2.2.2.	Fermentação no bioreator	25
2.2.3.	Análise da fermentação	27
2.2.3.1.	Densidade ótica	27
2.2.3.2.	Quantificação do consumo da fonte de carbono	27
2.2.3.3.	Quantificação do azoto no meio de cultura	27
2.2.3.4.	Observação ao microscópio	27
2.2.3.5.	Determinação dos ácidos gordos.....	28
2.2.3.6.	Teor de humidade e cinzas	28
2.3.	Métodos de extração de lípidos.....	28
2.3.1.	Método de extração de Soxhlet	29
2.3.2.	Extração supercrítica	30
2.3.2.1.	Planeamento experimental	33
2.4.	Análise e quantificação de pigmentos	35
2.5.	Fórmulas.....	36
2.5.1.	Concentração de azoto no meio de cultura	36
2.5.2.	Teor de humidade e cinzas	36
2.5.3.	Taxa específica de crescimento	36
2.5.4.	Produtividade em biomassa	37
2.5.5.	Análise dos ácidos gordos	37
2.5.6.	Rendimentos.....	38
2.5.7.	Recuperação de lípidos (Soxhlet).....	38
2.5.8.	Recuperações (fracionamento).....	39
2.5.9.	Concentração e massa de pigmentos.....	40
3.	Resultados e Discussão	41
3.1.	Fermentação da <i>Cryptocodinium cohnii</i>	41
3.1.1.	Análise do crescimento celular	41
3.1.2.	Perfil de ácidos gordos da <i>C. cohnii</i>	43
3.1.3.	Conteúdo de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo	46
3.1.4.	Concentração de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo	47
3.2.	Método de extração de Soxhlet.....	47
3.2.1.	Perfil de ácidos gordos	49
3.3.	Extração supercrítica.....	51
3.3.1.	Planeamento Experimental	51
3.3.1.1.	Análise dos resultados relativos aos lípidos totais	52
3.3.1.2.	Comparação da extração supercrítica com o método de Soxhlet	55

3.3.1.3.	Análise dos resultados relativos ao ADH e ácidos gordos para biodiesel	56
3.3.1.4.	Análise das superfícies de resposta	57
3.3.1.5.	Análise dos parâmetros do planeamento experimental	59
3.3.1.6.	Validação estatística dos modelos polinomiais	62
3.3.2.	Perfil de ácidos gordos das curvas de extração	63
3.3.3.	Fracionamento do óleo extraído	65
3.4.	Pigmentos da <i>Cryptocodinium cohnii</i>	70
3.4.1.	Conteúdo de pigmentos totais da microalga	71
3.4.2.	Análise dos carotenoides presentes no óleo extraído	73
3.4.3.	Pigmentos extraídos pela extração supercrítica	74
4.	Conclusões e perspetivas futuras	78
5.	Referências	80
Anexos		A
Anexo A	Reagentes e solventes	A
Anexo B	Cálculo do volume de dióxido de carbono corrigido	B
Anexo C	Cálculo dos parâmetros do modelo polinomial	C
Anexo D	Cálculo das variâncias da análise estatística	D
Anexo E	Cálculo da taxa específica de crescimento	E
Anexo F	Cálculo da concentração de biomassa	F
Anexo G	Perfis de ácidos gordos das curvas de extração	G
Anexo H	Análise dos pigmentos da microalga	K
Anexo I	Contribuição do trabalho	O

Índice de Figuras

Figura 1. Fotografia microscópica da microalga <i>C. cohnii</i> obtida neste estudo (com uma ampliação de 1000X).....	4
Figura 2. Representação esquemática da célula <i>Cryptothecodinium cohnii</i> , adaptada de Perret et al. (1991) [8]. a - Vista ventral. b - Vista dorsal. LF - Flagelo longitudinal. TF – Flagelo transversal.	4
Figura 3. Representação da molécula do ácido docosahexaenóico adaptada de [14].	6
Figura 4. Imagens recolhidas por microscopia eletrónica de varrimento de células da microalga <i>C. pyrenoidosa</i> antes e após a aplicação do pré-tratamento [28].	12
Figura 5. Diagrama pressão-temperatura do composto dióxido de carbono, adaptado de [45].	20
Figura 6. Montagem laboratorial da fermentação de <i>C. cohnii</i>	26
Figura 7. Diagrama esquemático do método de extração de Soxhlet. 1 - Placa de aquecimento. 2 - Balão de destilação. 3 - Solvente de extração (hexano). 4 - Cartucho de celulose contendo a amostra de biomassa. 5 - Extrator de Soxhlet. 6 - Condensador.....	29
Figura 8. Montagem laboratorial do método de extração de Soxhlet.....	30
Figura 9. Diagrama esquemático do aparelho de extração supercrítica. 1 – Cilindro de gás com tubo prolongador; 2 – válvula de não retorno; 3 – serpentina arrefecida com gelo; 4 – filtro de alta pressão; 5 – bomba de circulação; 6, 8 – manómetros; 7 – regulador de pressão; 9 – permutador de calor, 10 – célula de extração; 11 – banho de água; 12 – válvula de expansão (válvula de três vias); 13 – tubo de vidro em U; 14 – rotâmetro; 15 – contador de gás; 16-23 – válvulas.	31
Figura 10. Montagem laboratorial do aparelho de extração supercrítica presente no Departamento de Bioenergia e Biorrefinarias do Laboratório Nacional de Energia e Geologia.	32
Figura 11. Evolução da concentração de biomassa (em base seca e sem cinzas) ao longo do tempo de fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.	41
Figura 12. Evolução da concentração da fonte de carbono, glicerol bruto, ao longo do tempo de fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.	42
Figura 13. Evolução da concentração de azoto ao longo do tempo de fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.....	42
Figura 14. Representação gráfica da composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtida durante a fase exponencial e estacionária. A fase exponencial é ilustrada pelo perfil obtido no instante 101 horas e 45 minutos, enquanto o perfil após 185 horas foi selecionado para representar a fase estacionária.....	45
Figura 15. Evolução do conteúdo de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo da fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.....	46
Figura 16. Evolução da concentração de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo da fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho,	

respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.	47
Figura 17. Representação gráfica da composição em ácidos gordos do óleo extraído pelo método de Soxhlet, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT), obtida para os ensaios efetuados ao longo do tempo.	50
Figura 18. Representação gráfica da evolução do rendimento cumulativo em lípidos ao longo do tempo de extração para as condições em que a temperatura se encontra fixa no centro do domínio experimental (50°C) e a pressão varia de 150 para 225 e 300 bar. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cada medida específica. Os quatro pontos observados no gráfico correspondem aos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração – ao fim de trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas.	52
Figura 19. Representação gráfica da evolução do rendimento cumulativo em lípidos ao longo do tempo de extração. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cada medida específica. Estas curvas correspondem à média dos resultados obtidos na análise em duplicado de cada condição experimental. Os quatro pontos observados no gráfico correspondem aos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração – ao fim de trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas.	54
Figura 20. Superfícies de resposta para o rendimento em lípidos (g/100 g _{biomassa seca e sem cinzas}) (a); para o rendimento em ADH (g/100 g _{biomassa seca e sem cinzas}) (b) e para o rendimento em ácidos gordos para biodiesel (g/100 g _{biomassa seca e sem cinzas}) (c), obtidos no planeamento experimental para os fatores pressão (150 a 300 bar) e temperatura (40 a 60°C).	58
Figura 21. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 41,3°C e 187,5 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas.	63
Figura 22. Representação gráfica da composição em ácidos gordos das duas frações obtidas na execução do procedimento de fracionamento A selecionado, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). A primeira fração foi recolhida após 30 minutos de extração a 41,3°C e 187,5 bar e a segunda fração foi recolhida após 2 horas e meia de extração nas mesmas condições de pressão e temperatura.	69
Figura 23. Tipos de tonalidades distintas observadas para os extratos recolhidos na extração convencional de Soxhlet e durante a extração supercrítica.	71
Figura 24. Rendimento em pigmentos totais da microalga <i>C. cohnii</i> obtido no método de Soxhlet com hexano testado neste estudo e reportados na literatura por outros autores.	72
Figura 25. Representação gráfica da evolução do rendimento cumulativo em pigmentos ao longo do tempo de extração para as condições em que a temperatura se encontra fixa em 50°C e a pressão varia de 150 para 225 e 300 bar. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cada medida específica. Os quatro pontos observados no gráfico correspondem aos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração – ao fim de trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas.	75
Figura 26. Representação gráfica da evolução do rendimento cumulativo em pigmentos ao longo do tempo de extração. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cada medida específica. Os quatro pontos observados no gráfico correspondem aos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração – ao fim de trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas.	76
Figura E1. Logaritmo natural da concentração de biomassa ao longo do tempo de fermentação.	E
Figura E2. Logaritmo natural da concentração de biomassa para o período de duração da fase exponencial. Por ajuste linear aos dados experimentais representados obteve-se a equação	

da reta $y = (0,023 \pm 0,002) \times x - (0,3 \pm 0,2)$, com um coeficiente de correlação múltipla (R2) de 0,978. E

Figura F1. Representação gráfica da reta de calibração que permite relacionar a concentração de biomassa (em g/L) com a densidade ótica da suspensão celular. Através de um ajuste linear aos dados experimentais obteve-se a equação da reta $y = (1,4 \pm 0,2) \times x + (0 \pm 1)$ com um coeficiente de correlação múltipla (R2) de 0,976. F

Figura G1. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 50°C e 150 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. Nesta extração não foi possível analisar os extratos E1, E2 e E3 individualmente, uma vez que a quantidade de lípidos existente em cada um destes extratos era inferior ao limite de sensibilidade do equipamento de cromatografia gás-líquido. Assim, juntou-se esses três extratos e determinou-se o perfil de ácidos gordos ao fim de uma hora e meia de extração. O extrato E4 foi recolhido ao fim de 3 horas de extração. G

Figura G2. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 50°C e 225 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas. G

Figura G3. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 50°C e 300 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. Nesta extração não foi possível analisar os extratos E3 e E4 individualmente, uma vez que a quantidade de lípidos existente em cada um destes extratos era inferior ao limite de sensibilidade do equipamento de cromatografia gás-líquido. Assim, juntou-se esses dois extratos e determinou-se o perfil de ácidos gordos das últimas duas horas de extração. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos e o E2 ao fim de 1 hora de extração. H

Figura G4. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 41,3°C e 262,5 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas. H

Figura G5. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 58,7°C e 187,5 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas. I

Figura G6. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 58,7°C e 262,5 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas. I

Figura H1. Espectro do extrato lipídico (em hexano) recolhido após 3 horas de extração supercrítica a 41,3°C e 187,5 bar. K

Figura H2. Espectro da solução padrão de β -caroteno (em hexano). K

Figura H3. Cromatograma de HPLC da solução padrão de β -caroteno (em hexano).L
Figura H4. Cromatograma de HPLC do extrato lipídico (em hexano) recolhido no método de extração convencional de Soxhlet.....L
Figura H5. Cromatograma de HPLC do extrato lipídico (em hexano) recolhido após uma hora de extração supercrítica a 41,3°C e 262,5 bar.....M
Figura H6. Revelação da placa de sílica gel sob luz a 254 nm, resultante da análise de cromatografia de camada fina. Amostra 1 - solução padrão de β -caroteno; amostras 2 e 3 – extrato lipídico de Soxhlet; amostra 4 – extrato lipídico recolhido após 3 horas de extração a 50°C e 225 bar; amostra 5 - extrato lipídico recolhido após 1 hora de extração a 41,3°C e 262,5 bar; amostra 6 - extrato lipídico recolhido após 1 hora de extração a 50°C e 300 bar..M
Figura H7. Revelação da placa de sílica gel sob luz a 366 nm, resultante da análise de cromatografia de camada fina. Amostra 1 - solução padrão de β -caroteno; amostras 2 e 3 – extrato lipídico de Soxhlet; amostra 4 – extrato lipídico recolhido após 3 horas de extração a 50°C e 225 bar; amostra 5 - extrato lipídico recolhido após 1 hora de extração a 41,3°C e 262,5 bar; amostra 6 - extrato lipídico recolhido após 1 hora de extração a 50°C e 300 bar. A frente do solvente ficou a 12,5 cm da linha de base. Nos extratos lipídicos de Soxhlet identificou-se duas bandas que se encontram a 12,1 e 11,3 cm da linha de base. Na amostra 5 a banda identificada encontra-se a 12 cm da linha de base.....N

Índice de Tabelas

Tabela 1. Vantagens e limitações dos métodos de extração assistidos por pré-tratamentos.	14
Tabela 2. Vantagens e limitações dos métodos de extração com solventes alternativos.	19
Tabela 3. Condições de pressão e temperatura testadas na execução do planeamento experimental, obtidas através da distribuição de dois fatores de Doehlert.	34
Tabela 4. Composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtida para o instante final do regime de cultura batch da microalga <i>C. cohnii</i> ATCC 30772, no qual se registou o valor máximo do conteúdo de ácidos gordos totais, 27,6% (m/m _{biomassa seca e sem cinzas}). Os dados apresentados correspondem à média de duas análises da biomassa recolhida nesse instante.	44
Tabela 5. Rendimentos de extração em lípidos, em ADH e em ácidos gordos para biodiesel obtidos nos ensaios de extração de Soxhlet com os respetivos desvios padrão. Os valores a vermelho foram desprezados para o cálculo do valor médio.	48
Tabela 6. Matriz do planeamento experimental de acordo com a distribuição de Doehlert para dois fatores – pressão e temperatura – e as respostas avaliadas (rendimento em lípidos, em ADH e em ácidos gordos para biodiesel). Apresenta-se também o respetivo desvio padrão de cada resposta.	51
Tabela 7. Valores médios de recuperação de lípidos calculados para cada condição pressão/temperatura testada na extração supercrítica, com base no rendimento em lípidos médio obtido no método de Soxhlet.	56
Tabela 8. Coeficientes dos modelos polinomiais que representam as respostas avaliadas no planeamento experimental. Valores de F crítico, níveis de significância e coeficiente de determinação múltipla calculados na validação estatística dos modelos polinomiais. O fator 1 corresponde à pressão e o fator 2 é a temperatura.	60
Tabela 9. Recuperações de lípidos, ADH e ácidos gordos para biodiesel obtidas após 30 minutos e 1 hora de extração para cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental. Estas recuperações foram calculadas com os valores médios dos rendimentos máximos apresentados na Tabela 6: 16,89 g lípidos/100 g _{biomassa seca e sem cinzas} ; 3,5 g ADH/100 g _{biomassa seca e sem cinzas} e 5,1 g ácidos gordos p/ biodiesel/100 g _{biomassa seca e sem cinzas}	66
Tabela 10. Recuperações de lípidos, ADH e ácidos gordos para biodiesel obtidas após 1 hora e meia e 3 horas de extração para cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental. Estas recuperações foram calculadas com os valores médios dos rendimentos máximos apresentados na Tabela 6: 16,89 g lípidos/100 g _{biomassa seca e sem cinzas} ; 3,5 g ADH/100 g _{biomassa seca e sem cinzas} e 5,1 g ácidos gordos p/ biodiesel/100 g _{biomassa seca e sem cinzas}	66
Tabela 11. Rendimentos e recuperações de lípidos, de ADH e de ácidos gordos para biodiesel obtidos na execução do procedimento de fracionamento A selecionado. A primeira fração foi recolhida após 30 minutos de extração a 41,3°C e 187,5 bar e a segunda fração foi recolhida após 2 horas e meia de extração nas mesmas condições de pressão e temperatura.	68
Tabela 12. Rendimentos médios em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração de Soxhlet efetuados ao longo do tempo.	71
Tabela 13. Teores relativos dos carotenoides e carotenos identificados nos cromatogramas dos extratos lipídicos de Soxhlet.	73
Tabela 14. Rendimento de extração total de pigmentos obtido na extração supercrítica para cada condição pressão/temperatura testada experimentalmente.	77
Tabela A1. Solventes e reagentes usados neste trabalho experimental.	A

Tabela C1. Codificação dos níveis dos fatores testados experimentalmente de acordo com o planeamento experimental.	C
Tabela D1. Cálculo das variâncias associadas à análise da variância.	D
Tabela G1. Valores do conteúdo de ácidos gordos nos lípidos de cada extrato recolhido durante o processo de extração supercrítica, para cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental. Os valores apresentados correspondem à média dos resultados obtidos na análise em duplicado do respetivo extrato por GC.	J

Abreviaturas

ADH	Ácido docosahexaenóico
AG	Ácidos gordos
AGT	Ácidos gordos totais
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
COPAM	Companhia Portuguesa de Amidos
UE	União Europeia
GEE	Gases com efeito estufa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (em português)
LNEG	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
OD	Oxigénio dissolvido
RED II	<i>Renewable Energy Directive II</i> . Em português Diretiva de Energias Renováveis II

1. Introdução

Em 2018 o Secretário-Geral das Nações Unidas, António Guterres, afirmou que as alterações climáticas são "a ameaça mais sistemática para a humanidade" [1] e, de facto, nos últimos anos os seus impactos têm sido constatados à escala global, nomeadamente perturbações no setor agrícola, ondas de calor e eventos climáticos extremos, a degradação da linha costeira e o aumento do nível da água do mar [2] [3].

Todos estes impactos contribuem para a redução do crescimento económico e do potencial produtivo da economia global [2]. De acordo com a Comissão Europeia, as perdas económicas totais resultantes de fenómenos meteorológicos extremos na Europa entre 1980 e 2016 ascenderam a mais de 436 mil milhões de euros e em Portugal esse valor foi de aproximadamente 7 mil milhões de euros [3].

Se as tendências atuais persistirem, por exemplo se a quota de combustíveis fósseis não for reduzida e a procura por energia duplicar até 2050, as emissões de gases com efeito estufa (GEE) ultrapassarão substancialmente o valor que limita o aumento da temperatura média global em 2°C. Neste cenário é prevista a morte de milhões de pessoas e a extinção de aproximadamente um milhão de espécies [2].

Assim sendo, diversas iniciativas têm sido discutidas e adotadas, as quais incentivam a redução das emissões de GEE e o uso de fontes de energia renováveis e limpas no setor energético, em oposição aos combustíveis fósseis. Esse último ponto é extremamente importante tendo em consideração que o setor energético é responsável por cerca de 65% de todas as emissões de GEE e, por isso, detém a chave para evitar os piores efeitos das alterações climáticas [2].

Dentro das iniciativas adotadas destaca-se o Acordo de Paris assinado em 2016 por 195 países, incluindo Portugal, onde foi acordado limitar o aumento da temperatura média global abaixo de 2°C, idealmente 1,5°C. Para alcançar o objetivo ideal de 1,5°C é necessário atingir emissões de dióxido de carbono nulas entre 2044 e 2052 e emissões totais de GEE nulas entre 2063 e 2068, de acordo com o Relatório Especial sobre o Aquecimento Global de 1,5°C do Painel Intergovernamental sobre as Alterações Climáticas [4].

A nível da União Europeia é importante destacar a Diretiva de Energias Renováveis II (RED II em inglês) estabelecida em 2018, a qual corresponde a uma revisão da diretiva com o mesmo nome criada em 2009 [5]. Na diretiva RED II estabeleceu-se como objetivo principal o alcance de uma quota mínima de 32% de energia renovável no consumo final de energia da União Europeia (UE) até 2030 [6]. Para além disso, na diretiva RED II os Estados Membros da UE devem exigir aos fornecedores de combustível que um mínimo de 14% da energia consumida nos transportes rodoviário e ferroviário, até 2030, seja proveniente de fontes de energia renováveis [6]. Contudo, a contribuição máxima dos biocombustíveis produzidos a partir de culturas agrícolas e alimentos será congelada aos níveis de consumo de 2020, mais 1% adicional, com um limite de 7% [6]. Assim, estabeleceu-se implicitamente

uma quota mínima de 7% para os biocombustíveis avançados no setor dos transportes rodoviário e ferroviário, categoria onde se insere os biocombustíveis provenientes de algas.

A investigação da aplicação de algas como matéria-prima na produção de biocombustíveis - biodiesel, biometano, bioetanol, biocrude, entre outros – tem-se intensificado ao longo das últimas décadas com o agravamento das alterações climáticas. De todos os biocombustíveis que podem ser produzidos a partir de algas, aquele que tem sido o foco de diversos estudos de investigação trata-se do biodiesel, pois este apresenta propriedades físicas e químicas semelhantes às do gasóleo derivado do petróleo e do biodiesel de 1ª geração, cumprindo os critérios estabelecidos na Norma Internacional de biodiesel para veículos (EN14214) [5].

As algas são assim uma fonte de energia renovável de grande interesse, pois apresentam diversas vantagens relativamente às matérias-primas usadas na produção de biocombustíveis de 1ª e 2ª geração:

- Permitem obter um rendimento de óleo por unidade de área ocupada significativamente elevado. Para o milho e óleo de palma é estimado um rendimento de 172 e 5.950 L/ha, respetivamente, mas para uma microalga com 30% de lípidos (numa base de peso seco) esse valor é substancialmente superior e igual a 58.700 L/ha [5] [7].
- Possibilidade de produzir a biomassa em terras não férteis, logo não se contribui para alterações diretas ou indiretas do uso dos solos, como a desflorestação [5] [7].
- Não existe competição com o setor alimentar, conseqüentemente não se potencializa o aumento do preço dos alimentos e a insegurança alimentar [5] [7].
- As algas apresentam uma maior tolerância a uma variedade de fontes de água, sendo possível integrar a produção das mesmas em unidades de tratamento de águas residuais, combinando a produção de biocombustíveis com a remoção de contaminantes [5] [7].
- As algas permitem produzir uma vasta gama de coprodutos comercializáveis [5].
- As algas apresentam taxas de crescimento elevadas, logo é possível obter uma excelente produtividade de biomassa [5].
- A produção de algas é menos dependente das condições climáticas [5].

Apesar de as algas apresentarem um enorme potencial na produção de biocombustíveis, a comercialização destes produtos é considerada por muitos investigadores como não sustentável, devido ao elevado custo de produção envolvido [5]. Por conseguinte, é crucial explorar abordagens que permitam reduzir os custos do processo de produção de biocombustíveis provenientes de algas, utilizando matérias-primas de baixo custo e/ou coproduzindo produtos de alto valor acrescentado numa perspetiva de biorrefinaria.

As algas são consideradas como potenciais candidatas a um processo de biorrefinaria, pois são capazes de produzir múltiplos produtos. Consoante a espécie de alga usada, outros compostos, para além de lípidos, podem ser extraídos com aplicações valiosas em diferentes setores industriais, como na indústria farmacêutica e nutracêutica, as quais podem usar produtos bioativos como os ácidos gordos ω -3 e os carotenoides [5]. A biomassa residual obtida após os diversos processos de extração,

pode ser usada na agricultura ou na aquacultura como componente da ração animal ou pode ser usada na produção de biogás [5].

A abordagem da biorrefinaria permite maximizar o valor derivado de todo o processo, com um impacto ambiental mínimo, melhorando a economia do processo de produção de biocombustíveis e tornando-o sustentável do ponto de vista económico e ambiental.

1.1. Microalgas

As algas são um grupo constituído por diversos organismos aquáticos, apresentando uma enorme variedade de espécies - entre 40.000 e 100.000 [5]. As espécies constituintes deste grupo podem ser caracterizadas segundo diversos fatores, nomeadamente o seu tamanho e nesse caso surgem as microalgas e as macroalgas, sendo as primeiras o foco deste estudo.

As microalgas são organismos unicelulares ou multicelulares fotossintéticos ou heterotróficos com uma estrutura simples que podem ser encontrados em ambientes aquáticos de água fresca ou marinha, terrestres e aéreos com um tamanho entre alguns nanómetros a uma centena de micrómetros [5]. As microalgas fotossintéticas contribuem para a mitigação das emissões de dióxido de carbono, pois usam esse gás como fonte de carbono. Contudo, os sistemas de produção deste tipo de microalgas atualmente desenvolvidos não permitem alcançar facilmente elevadas concentrações de biomassa e elevadas produções de óleo devido a certos obstáculos ainda por resolver, como a limitação de luz e a acumulação de oxigénio [8] [9].

Assim, como alternativa surgem as espécies de microalgas heterotróficas, cuja produção pode ser conduzida em fermentadores convencionais, onde as condições operacionais são altamente controladas e monitorizáveis, resultando num produto final de excelente qualidade [9]. Estes sistemas de cultura são menos dispendiosos de operar e fáceis de construir, requerendo menores investimentos [9]. Para além disso, é possível obter produtividades volumétricas em biomassa e em lípidos mais elevadas, dado que a densidade energética de diferentes fontes de carbono é superior à do CO₂ [9]. Todavia, as culturas de microalgas heterotróficas também apresentam desvantagens como o número limitado de espécies capazes de crescer nestas condições, o aumento do risco de contaminação por outros organismos como resultado da aplicação de um substrato orgânico como fonte de carbono e a emissão de dióxido de carbono para a atmosfera [9].

Das diversas espécies de microalgas heterotróficas existentes na natureza destaca-se o uso da espécie estudada nesta dissertação, a *Cryptocodinium cohnii*.

1.1.1. *Cryptocodinium cohnii*

1.1.1.1. Morfologia

A *Cryptocodinium cohnii* é uma microalga marinha, heterotrófica, unicelular e membro do filo *Dinophyta* [8] [10]. Esta microalga é considerada como uma espécie complexa constituída por muitas estirpes “irmãs” que são indistinguíveis pela sua morfologia [8].

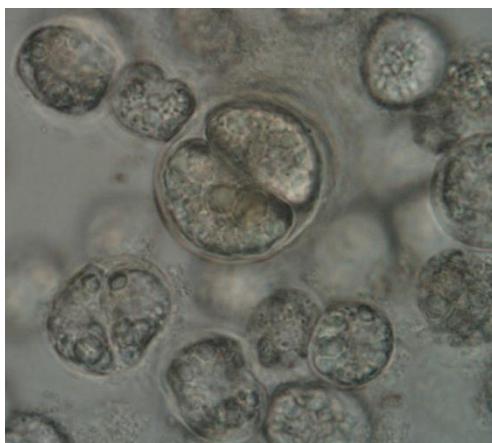


Figura 1. Fotografia microscópica da microalga *C. cohnii* obtida neste estudo (com uma ampliação de 1000X).

Esta microalga pode ser encontrada em todo o mundo, dispersas nas águas temperadas e tropicais, desde o Atlântico Norte ao mar das Caraíbas, oceano Pacífico e Índico [8]. A sua dispersão geográfica pode ser justificada pelas correntes e marés e pelo transporte das macroalgas às quais está associada, em particular o género *Fucus* [8].

A *Cryptothecodinium cohnii* pode existir em duas formas distintas - como células nadadoras ou quistos [8]. As células nadadoras possuem dois flagelos heteromórficos e heterodinâmicos distintos, como se pode observar na Figura 2. O movimento do flagelo transversal, em forma de fita, faz com que o organismo gire sobre si mesmo, promovendo a sua estabilização e propulsionando-o para a frente e o flagelo longitudinal, orientado perpendicularmente em relação ao primeiro, determina a direção do movimento da célula [8]. A presença de dois flagelos torna esta microalga mais sensível à agitação durante o processo de cultura, no entanto a transferência de oxigénio para o meio deve ser bastante eficaz dado que se trata de um microrganismo aeróbio obrigatório [8].

Os quistos de *C. cohnii* apresentam-se isolados com uma forma ovoide e podem se encontrar em estado de dormência ou serem quistos vegetativos [8].

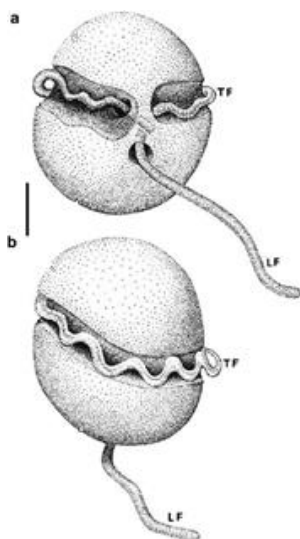


Figura 2. Representação esquemática da célula *Cryptothecodinium cohnii*, adaptada de Perret et al. (1991) [8]. a - Vista ventral. b - Vista dorsal. LF - Flagelo longitudinal. TF - Flagelo transversal.

1.1.1.2. Condições de crescimento

Relativamente às condições de crescimento, tem-se constatado que as células desta microalga são capazes de crescer em diversas fontes de carbono, incluindo glucose, ácido acético/acetato, glicerol, etanol e fontes complexas como o extrato de milho e a polpa de alfarroba [11]. No entanto, o crescimento da *C. cohnii* não foi observado em fontes de carbono como a frutose, maltose, lactose e ácido galacturónico.

A fonte de azoto pode ser igualmente diversa, incluindo fontes complexas como o extrato de levedura e sais inorgânicos como sulfato de amónio, ureia e nitrato de sódio [8].

Como a *C. cohnii* é uma microalga marinha, o cloreto de sódio e outros sais inorgânicos devem ser fornecidos ao meio de cultura. Podem ser utilizados sais marinhos naturais ou água do mar, mas um meio bem definido também pode ser uma alternativa [8]. É de notar que não existe uma concentração ideal de salinidade, mas sim uma gama ótima (16 a 29 g/L).

O pH ideal situa-se na gama de 6 a 7 e a temperatura ótima entre 25 e 30°C, sendo a produção de ácidos gordos polinsaturados favorecida por temperaturas reduzidas, pois nestas condições as células adaptam-se e aumentam a produção desses ácidos gordos, de modo a manter a fluidez da membrana celular e as suas funções. Por fim, é importante notar que a ausência de luz é preferível, uma vez que a luz parece inibir o crescimento desta microalga.

1.1.1.3. Conteúdo lipídico

Esta microalga é capaz de acumular uma quantidade significativa de lípidos, 20 a 50% do seu peso seco, com um elevado conteúdo do ácido docosahexaenóico (ADH) (até 30-50% do conteúdo de ácidos gordos totais) [8]. Dado que outros ácidos gordos polinsaturados estão presentes numa quantidade inferior a 1% do conteúdo de ácidos gordos totais, o processo de separação e concentração do ADH é mais simples e menos dispendioso e particularmente atrativo para aplicações farmacêuticas, onde se requerem graus de pureza superiores a 95% [8] [11]. A produção de ADH e lípidos é favorecida por condições que limitam o crescimento da microalga, isto é, quando as células estão em stress ou durante a fase estacionária.

Para além disso, a microalga *Cryptocodinium cohnii* também produz quantidades significativas de ácidos gordos saturados e monoinsaturados com 12 a 18 átomos de carbono, nomeadamente o ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0) e ácido oleico (18:1 ω -9), os quais podem ser utilizados na produção de biodiesel [10]. Em determinadas condições a fração destes lípidos relativamente aos ácidos gordos totais pode ser superior a 50-60% (m/m) [10].

Assim sendo, esta microalga é um exemplo adequado para o conceito de biorrefinaria, pois não só é capaz de acumular ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser convertidos em biodiesel, como sintetiza um coproduto, o ácido docosahexaenóico, que pode ser extraído, purificado e comercializado para o setor farmacêutico, alimentar ou nutracêutico.

É importante notar que esta espécie de microalga começou a ser usada comercialmente nos meados de 1990 pela empresa *Martek Biosciences*, mais tarde adquirida pela *DSM*, na produção de

um óleo rico em ADH, denominado por *DHASCO*TM, o qual era depois introduzido no leite de fórmula para bebês [12]. A empresa ainda produz o óleo *DHASCO*TM, tratando-se de um óleo nutricional composto por aproximadamente 40% de ADH derivado de microalgas [12].

1.2. Ácido docosahexaenóico

O ácido docosahexaenóico é um ácido gordo polinsaturado de longa cadeia ω -3 com 22 átomos de carbono e 6 ligações duplas (Δ 4,7,10,13,16,19) [13]. Na Figura 3 pode-se observar a estrutura tridimensional do ADH, resultante da sua natureza fortemente insaturada, a qual influencia diversas características como o seu ponto de fusão de -44°C [13].

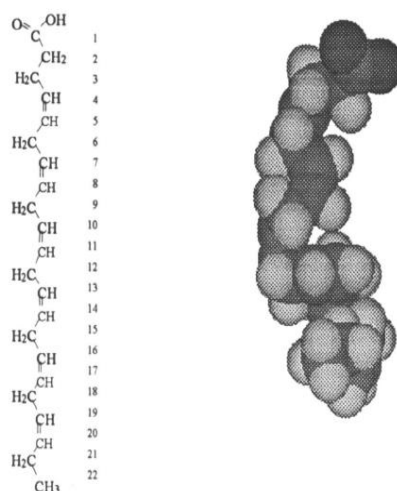


Figura 3. Representação da molécula do ácido docosahexaenóico adaptada de [14].

Nos humanos, o ADH acumula-se nas membranas dos tecidos visuais, reprodutivos e neurológicos, sendo dos ácidos gordos mais abundantes da matéria cinzenta do cérebro [11] [13]. Para além disso, o ADH também está presente no leite materno, contribuindo para o normal desenvolvimento do sistema neurológico e visual dos bebês [11] [13].

O ADH é um dos ácidos gordos ω -3 que apresenta diversos benefícios para a saúde humana, dado que contribui para a prevenção de diversas doenças, como patologias cardiovasculares, cancro e doenças neuropsiquiátricas [8] [13]. Para além disso, este ácido gordo também pode ser útil na prevenção de condições inflamatórias como a artrite e na redução da pressão arterial, evitando o desenvolvimento de hipertensão [8] [13] [15]. Todos estes benefícios do ADH atraíram o interesse das indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar.

Apesar de ser um ácido gordo importante para a saúde humana, o nosso organismo não é capaz de o sintetizar, pois a sua via de síntese parte do ácido gordo α -linolénico que os mamíferos não conseguem produzir [9] [13]. Logo, este ácido gordo é obtido pelos humanos através da sua dieta.

A fonte tradicional de ADH são os óleos de peixe, essencialmente peixes gordos como a sardinha, o salmão, o arenque e a cavala, no entanto esta fonte apresenta várias desvantagens: odor desagradável; mau gosto; pobre estabilidade oxidativa; possível contaminação do óleo de peixe com metais pesados e outros poluentes; presença de outros ácidos gordos saturados e insaturados no óleo

de peixe, que tornam o processo de concentração e purificação mais complexo e dispendioso e, por fim, a oferta destes óleos pode ser insuficiente para satisfazer o mercado, tendo em consideração a diminuição das reservas de peixe nos oceanos [8] [9] [15].

Assim, como alternativa aos óleos de peixe, surgiram os óleos extraídos de microrganismos oleaginosos, como as microalgas [9]. Estes microrganismos podem funcionar como uma fonte economicamente viável de ácidos gordos polinsaturados de longa cadeia, pois estes encontram-se maioritariamente na forma de triglicéridos, a forma mais facilmente assimilada pelo organismo humano [13]. As microalgas são particularmente adequadas para a extração e purificação de ácidos gordos polinsaturados de longa cadeia, dado a sua estável e confiável composição e porque contêm preferencialmente apenas um tipo desses ácidos gordos, o que facilita o processo de purificação [9]. Para além disso, os ácidos gordos polinsaturados de longa cadeia provenientes de culturas de microalgas são livres em colesterol e contaminantes, como metais pesados, e apresentam um sabor mais agradável [8] [9].

1.3. Extração de lípidos

1.3.1. Métodos convencionais

A extração de lípidos é uma das principais etapas entre as várias operações aplicadas na produção de biocombustíveis, contribuindo consideravelmente para o custo global de todo o processo.

Tradicionalmente, os lípidos sintetizados pelas microalgas são extraídos fisicamente através do uso de solventes orgânicos, pois trata-se de um método que apresenta uma solubilização eficiente dos lípidos intracelulares e, conseqüentemente, um rendimento de extração elevado [16]. Os solventes de extração aplicados podem ser polares (como o metanol ou etanol) ou de baixa polaridade (como o hexano ou clorofórmio). Dos diversos solventes possíveis, o menos dispendioso e muito aplicado a nível industrial e laboratorial trata-se do hexano. A extração com hexano é particularmente aplicada quando se pretende extrair lípidos para a indústria farmacêutica ou alimentar, dado que este é menos tóxico relativamente a outros solventes e permite minimizar a extração de compostos contaminantes [16].

Apesar deste método de extração ser aplicado convencionalmente tanto a nível industrial como laboratorial, o mesmo apresenta diversas desvantagens: tempos de operação são usualmente longos [17]; utilização de elevadas quantidades de solventes tóxicos, com o objetivo de alcançar rendimentos de extração elevados [17]; possível ocorrência de perdas de solvente por evaporação, o que representa um perigo ambiental [17]; contaminação da biomassa residual, restringindo o seu uso posterior e necessidade de realizar um passo prévio de secagem da biomassa de modo a tornar o processo mais eficiente, contudo tal acarreta maiores consumos energéticos e custos [17]. Este passo de secagem é necessário, pois a presença de água no meio de extração dificulta o contacto entre o solvente e os solutos, dado que a água atua como uma barreira à difusão do solvente, desfavorecendo a transferência de massa e, conseqüentemente, diminuindo a eficiência do processo [17].

Dos diversos métodos de extração com solventes existentes é importante destacar o método de Soxhlet.

1.3.1.1. Método de Soxhlet

Esta técnica de extração sólido-líquido foi desenvolvida em 1879 por Franz Ritter von Soxhlet e atualmente consiste num método referência para a extração de compostos de uma matriz sólida [18]. Na literatura é usado como termo de comparação para avaliar o desempenho de outros métodos de extração.

Este método de extração consiste no tratamento contínuo de uma amostra sólida, a qual se encontra imersa no solvente puro devido à sifonagem e condensação do solvente aquecido no balão de destilação [18]. O tratamento costuma durar 6 a 8 horas, sendo obtida uma fase líquida contendo o solvente e os compostos extraídos. A separação do solvente pode ser conseguida por evaporação do mesmo num evaporador rotativo [19].

Este método de extração é usado frequentemente a nível laboratorial dado que a sua metodologia é simples e não requer formação especializada, possibilita a extração de uma maior quantidade de óleo em relação a outros métodos e a amostra contacta com o solvente durante longos períodos, havendo a sua constante renovação [19]. Todavia, este método também apresenta diversas desvantagens, como a utilização de quantidades substanciais de solvente, produzindo-se uma maior quantidade de resíduos e os compostos de interesse podem sofrer decomposição térmica devido à elevada temperatura que se mantém aproximadamente constante ao longo do processo [19]. Para além disso, os longos tempos de extração, apesar de permitirem obter rendimentos elevados, implicam um maior consumo de energia e, conseqüentemente, custos operatórios mais elevados.

1.3.2. Métodos de extração verdes

Tendo em consideração as desvantagens associadas aos métodos de extração convencionais, surgiu a necessidade de desenvolver e investigar técnicas de extração sustentáveis que respeitassem o maior número possível dos princípios da química verde, como a minimização da produção de resíduos e o uso de solventes tóxicos, assim como a redução do consumo energético, optando-se preferencialmente por processos que recorram a temperaturas e pressões reduzidas [20].

Atualmente, os esforços de investigação relativamente a técnicas de extração consideradas verdes têm sido concentrados em duas direções paralelas, nomeadamente (1) métodos que recorrem aos solventes de extração convencionais, mas aplicam passos prévios de tratamento que permitem reduzir o consumo de solvente e a duração da extração e (2) métodos que recorrem a solventes de extração alternativos como líquidos iónicos, solventes reversíveis, líquidos expandidos por gases, fluidos pressurizados e fluidos supercríticos.

Na primeira abordagem, o tratamento prévio à extração consiste numa técnica que tem como principal objetivo a danificação e/ou rutura da parede celular das microalgas, um dos obstáculos que afeta a eficiência dos processos de extração dos lípidos [19]. A estrutura da parede celular está presente em diversas espécies de microalgas como na *Cryptocodinium cohnii* e esta impede a difusão

do solvente de extração para o interior das células, reduzindo desse modo a eficiência do processo. As técnicas sustentáveis de pré-tratamento desenvolvidas e avaliadas para a extração de lípidos sintetizados por microalgas recorrem a micro-ondas, ultrassons, pulsos de um campo elétrico, surfactantes e enzimas.

1.3.2.1. *Extração assistida por micro-ondas*

Na extração assistida por micro-ondas recorre-se a um tratamento prévio à extração, o qual consiste na aplicação de radiação micro-ondas com o objetivo de facilitar a ruptura da parede celular e, desse modo, melhorar a eficiência do processo de extração.

A radiação micro-ondas consiste em ondas eletromagnéticas de elevada frequência, entre 0,3 e 300 GHz, mas nos processos de extração é usual recorrer-se a micro-ondas com uma frequência de aproximadamente 2,45 GHz [21]. A energia contida na radiação micro-ondas provoca a rotação do dipolo das ligações hidroxilo existentes nas moléculas de água e outras moléculas polares presentes na biomassa, resultando no aumento uniforme e rápido da temperatura do meio [21]. Assim, torna-se possível a evaporação da água e a geração de pressões elevadas, as quais são exercidas sobre a parede celular danificando esta estrutura [15] [21]. Para além desse efeito, a radiação micro-ondas contribui para a migração dos iões dissolvidos, facilitando dessa forma a penetração do solvente para o interior das células [21].

Um dos fatores que influencia a eficiência do tratamento com micro-ondas consiste na potência aplicada como se comprovou no estudo de Ali *et al.* (2015), onde se aplicou a extração com etanol assistida por micro-ondas na recuperação de lípidos sintetizados pela microalga fotossintética *Nannochloropsis oculata* [22]. As amostras de biomassa húmida foram sujeitas ao tratamento com micro-ondas à temperatura ambiente durante 1, 2, 3, 4 ou 5 minutos a duas potências distintas – 635 e 1021 W – com arrefecimento forçado para controle da temperatura [22]. Os resultados experimentais demonstraram que independentemente da potência e tempo de operação aplicados, a utilização de micro-ondas induz um aumento do rendimento em óleo relativamente ao processo de extração com etanol sem pré-tratamento [22]. Para além disso, também se concluiu que, para um determinado tempo de operação, quanto maior for a potência aplicada maior é o rendimento de extração obtido, o que se deve ao alcance de temperaturas elevadas as quais, segundo o princípio de funcionamento desta técnica, favorecem a evaporação da água e a geração de altas pressões que danificam a parede celular, resultando numa extração mais eficiente [22].

As vantagens e limitações deste método, assim como as dos outros métodos de extração assistidos por pré-tratamentos, podem ser consultadas na Tabela 1. Alguns dos benefícios e desvantagens desta técnica foram verificados no estudo de Cravotto *et al.* (2008) [23]. Neste estudo aplicou-se o pré-tratamento com micro-ondas às células de *Cryptocodinium cohnii* e comparou-se os resultados obtidos com o método de extração convencional de Soxhlet, tendo-se recorrido, em ambos os métodos, a hexano como solvente de extração [23]. Estes investigadores concluíram que ao aplicar uma radiação micro-ondas de frequência 2,45 GHz às células de *C. cohnii* conseguiam obter um rendimento em óleo mais elevado em comparação com o método convencional (17,8% num sistema

fechado em oposição a 4,8%) [23]. Este rendimento de extração mais elevado foi obtido com um menor volume de solvente hexano (35 em vez de 100 mL) e em menos tempo (30 minutos em vez de 4 horas) [23]. Contudo a aplicação do tratamento com micro-ondas resultou no alcance de temperaturas mais elevadas (120°C), o que pode resultar na degradação térmica dos lípidos.

1.3.2.2. *Extração assistida por ultrassons*

Tal como na extração assistida por micro-ondas, a aplicação de um pré-tratamento de ondas ultrassónicas numa solução contendo células de microalga tem como objetivo contribuir para a rutura da parede celular, facilitando desse modo a extração dos componentes de interesse.

O princípio de rutura da parede celular associado ao tratamento com ultrassons consiste no fenómeno físico da cavitação [17]. Este fenómeno pode ser definido como a formação, crescimento e subsequente colapso de bolhas de gás, resultante da aplicação de ultrassons num meio líquido [17] [24]. As ondas ultrassónicas com uma frequência entre 20 e 100 MHz propagam-se pelo meio líquido em ciclos alternados de baixa e elevada pressão, o que resulta na formação de bolhas de gás durante os ciclos de baixa pressão e no colapso abrupto das mesmas quando a pressão aumenta [19] [24]. O colapso das bolhas de gás induz a geração de ondas de choque locais intensas, equivalentes a milhares de atmosferas, capazes de danificar a parede celular, conduzindo possivelmente à criação de poros [17]. Desta forma o solvente de extração consegue penetrar mais eficazmente as células e o conteúdo intracelular é libertado para o meio exterior.

O fenómeno da cavitação é influenciado pelas propriedades físicas do meio como a viscosidade, a pressão de vapor e a tensão superficial [19] [24]. A temperatura também afeta este fenómeno visto que altera as propriedades mencionadas. Por outro lado, a cavitação também depende da frequência dos ultrassons, sendo este fenómeno mais intenso quando se aplicam ultrassons de baixa frequência [19] [24].

No estudo de Cravotto *et al.* (2008), para além de se ter avaliado o pré-tratamento com micro-ondas, analisou-se também o efeito da aplicação de ultrassons e a combinação destes dois tratamentos no rendimento de extração do óleo sintetizado pela microalga *Cryptocodinium cohnii* [23]. Os resultados experimentais permitem concluir que o rendimento de extração máximo foi obtido na extração assistida por ultrassons, sendo este pré-tratamento mais eficaz que a aplicação de micro-ondas e a combinação dos dois [23]. Em comparação com o método convencional de Soxhlet, o tratamento com ultrassons permitiu reduzir a duração do processo de extração de 4 horas para 30 minutos e o consumo de solvente de 100 para 50 mL [23]. Para além disso, permitiu operar a temperaturas moderadas (aproximadamente 45°C), o que não induz a degradação térmica dos lípidos, tal como se comprova pela semelhança entre os perfis lipídicos obtidos com o método convencional e com a extração assistida por ultrassons [23].

1.3.2.3. *Extração assistida por pulsos de um campo elétrico*

Neste método de extração aplica-se pulsos de um campo elétrico externo como pré-tratamento, o que consiste numa técnica suave que contribui para a lise celular, podendo ser útil no conceito de

biorrefinaria aplicado a microalgas, dado que permite a extração seletiva de diversos compostos intracelulares como pigmentos, proteínas, açúcares e lípidos.

O princípio de ruptura celular associado a este método consiste no fenómeno biofísico de eletroporação ou eletropermeabilização [19]. Este fenómeno consiste no aumento da permeabilidade da membrana celular devido ao incremento do potencial transmembranar, aquando da exposição das células a um campo elétrico externo. Para um determinado potencial transmembranar, a espessura da membrana é controlada pelo equilíbrio estabelecido entre as forças elétricas compressivas e as forças elásticas de restauração naturais [25]. Com o aumento do potencial transmembranar para valores elevados, esse equilíbrio é quebrado e a membrana torna-se instável, formando-se poros transmembranares [25].

Se a área total dos poros transmembranares for reduzida em comparação com a área superficial da célula, então a eletroporação diz-se reversível pois os poros podem voltar a fechar através do rearranjo das proteínas e fosfolípidos constituintes da membrana celular [19] [26]. Contudo, se o campo elétrico aplicado apresentar uma intensidade elevada, então o número de poros e o seu diâmetro aumenta, o que resulta no incremento do rácio entre a área total dos poros transmembranares e a área superficial da célula [26]. Nestas condições a membrana não é capaz de reverter a formação dos poros e a eletroporação diz-se irreversível. Este tipo de eletropermeabilização é o desejado num processo de extração, pois facilita a penetração do solvente e a libertação dos componentes intracelulares.

De acordo com a literatura, os parâmetros que mais influenciam a eficiência deste tratamento são a intensidade do campo elétrico aplicado, a forma do pulso, a duração do tratamento, o número de pulsos aplicados, a energia específica do tratamento e o tipo de material que constitui os elétrodos colocados entre a biomassa [26] [27].

A eficácia do pré-tratamento com pulsos de um campo elétrico externo foi comprovada no estudo de Han *et al.* (2019), onde se aplicou este método e a extração assistida por ultrassons na recuperação de lípidos sintetizados pela microalga *Chlorella pyrenoidosa* [26]. Os resultados experimentais permitem concluir que a extração assistida por pulsos de um campo elétrico é o método mais eficaz, dado que obteve um rendimento de extração de lípidos 12,0% superior ao associado ao método de extração assistido por ultrassons [26]. Neste estudo também foi possível constatar o efeito da ação do campo elétrico nas células da microalga ao observar as imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento [26]. Ao analisar as imagens recolhidas, Figura 4, verifica-se que as células não tratadas apresentam uma superfície lisa, enquanto as células expostas ao pré-tratamento exibem uma superfície irregular com depressões densas [26]. Assim, conclui-se que o tratamento com pulsos de um campo elétrico externo contribui para a deformação da superfície celular, resultando no favorecimento da penetração do solvente e, conseqüentemente, na extração dos lípidos.

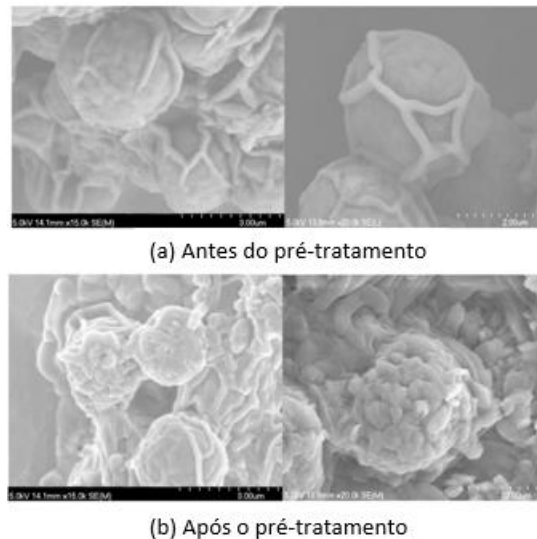


Figura 4. Imagens recolhidas por microscopia eletrónica de varrimento de células da microalga *C. pyrenoidosa* antes e após a aplicação do pré-tratamento [28].

1.3.2.4. Extração assistida por surfactantes

A aplicação de surfactantes num processo de extração tem como objetivo contribuir para a desintegração da membrana celular, facilitando desse modo a extração dos compostos de interesse [19]. Os surfactantes são compostos que se distinguem dos restantes por apresentarem na sua estrutura química dois grupos funcionais diferentes – um hidrofóbico e outro hidrofílico – o que significa que as suas moléculas são anfifílicas [28]. Estes compostos podem ser classificados como iónicos ou não iónicos consoante a carga do grupo hidrofílico e, no caso dos surfactantes iónicos, estes podem ser sub-classificados em aniónicos ou catiónicos [28].

Dos diversos tipos de surfactantes disponíveis no mercado, o mais eficiente e aplicado consiste no do tipo catiónico. A eficiência deste tipo de surfactante foi comprovada no estudo de Lai *et al.* (2016), onde se avaliou o efeito de diferentes surfactantes (catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos e não iónicos) na extração de lípidos da microalga *Scenedesmus* [28]. Os resultados experimentais demonstraram que todas as amostras tratadas com surfactantes apresentaram melhores recuperações de lípidos em comparação com as amostras de biomassa não tratadas [28]. Também se concluiu que o surfactante catiónico é dos mais eficazes, pois não só permitiu aumentar o rendimento em lípidos 16 vezes em comparação com a biomassa controlo não tratada, como foi capaz de manter a sua capacidade de melhorar a recuperação de lípidos mesmo quando se aplicou uma concentração próxima da concentração micelar crítica (CMC) [28]. Este último ponto consiste numa vantagem importante deste surfactante, dado que permite reduzir a quantidade usada deste composto, reduzindo os custos operatórios.

Segundo o artigo de Huang *et al.* (2013) existem dois tipos de interações envolvidas na adsorção das moléculas de surfactante catiónico na superfície da célula: interações eletrostáticas e hidrofóbicas [29]. No primeiro passo de adsorção estabelecem-se as interações eletrostáticas entre o grupo hidrofílico positivo do surfactante catiónico e a membrana celular, a qual apresenta uma carga geral negativa devido aos grupos funcionais constituintes (grupo carboxilo, hidroxilo, amino, fosfato, entre

outros) [29]. No segundo passo de adsorção estabelecem-se as interações hidrofóbicas entre os fosfolípidos constituintes da membrana celular e o grupo funcional hidrofóbico do surfactante, o que resulta na formação de um complexo surfactante-célula e na distorção da membrana celular [29].

A eficácia das interações que se estabelecem entre o surfactante e a membrana celular dependem da concentração micelar crítica do composto, sendo esta definida como a concentração limiar para a qual o surfactante forma uma micela, o que conduz à solubilização ou fragmentação da membrana celular [47]. Outros fatores que influenciam a eficácia do tratamento são a estrutura e composição do surfactante aplicado e a composição da membrana celular, a qual depende da espécie de microalga e do estado fisiológico das células [47].

1.3.2.5. *Extração assistida por enzimas*

A extração assistida por tratamento enzimático de uma microalga é baseada na capacidade de algumas enzimas degradarem componentes específicos da parede celular, como a celulose, hemicelulose, proteínas, entre outros, contribuindo dessa forma para a rutura parcial ou total desta estrutura e facilitando a recuperação dos produtos intracelulares de interesse [24].

Neste método de extração é possível aplicar uma combinação de enzimas distintas, algo que tem sido alvo de investigação em estudos à escala laboratorial. Maffei *et al.* (2018) investigaram os efeitos dos tratamentos enzimáticos individuais e combinados de celulase e mananase sobre *Nannochloropsis*, usando como solvente hexano:propanol (3:2 v/v) [30]. Os tratamentos enzimáticos combinados conduziram a uma recuperação de lípidos de 73% (m/m), enquanto os tratamentos individuais permitiram recuperar menos de 60% (m/m) de lípidos. De uma forma semelhante Zhang *et al.* (2018) reportaram um rendimento lipídico superior ao usar uma combinação das enzimas celulase, xilanase e pectinase nas células da microalga *Scenedesmus* [31]. Por oposição, Taher *et al.* (2014) obtiveram um menor rendimento de lípidos em biomassa húmida da microalga *Scenedesmus* usando uma combinação de enzimas (lisozima e celulase), em comparação com os tratamentos enzimáticos individuais [32]. Uma possível justificação para este resultado prende-se com a inibição da reação enzimática de uma enzima devido ao produto formado pela reação da outra enzima [32]. Deste modo, ao comparar os resultados destes estudos conclui-se que a seleção das enzimas mais adequadas é um pré-requisito muito importante na otimização deste método de extração e um procedimento relativamente complexo.

A eficiência do tratamento enzimático também é afetada pela temperatura, pH, concentração de sal, entre outros parâmetros [19]. Assim sendo, é crucial o controle das condições operatórias, de modo a garantir a maximização da atividade das enzimas e evitar a sua desativação e inibição.

Na Tabela 1 encontram-se resumidas as vantagens e limitações do método de extração assistido por enzimas.

Tabela 1. Vantagens e limitações dos métodos de extração assistidos por pré-tratamentos.

Método	Vantagens	Limitações
Micro-ondas	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do tempo de extração e consumo do solvente [33]; - Aumento do rendimento de extração [33]; - Método simples que pode ser aplicado a biomassa húmida [21]; - Possibilidade de usar solventes orgânicos menos tóxicos [33]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dificuldade do <i>scale-up</i> do processo [19]; - Aumento do consumo energético [19]; - Possível degradação da biomassa residual e dos lípidos, devido ao alcance de temperaturas elevadas [19].
Ultrassons	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do tempo de extração e consumo do solvente [33]; - Aumento do rendimento de extração [33]; - Método simples com baixo investimento [24]; - Pode ser aplicado a biomassa húmida ou seca [21]; - Aparelhos ultrassónicos podem ser operados continuamente e estão disponíveis à escala industrial [34]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento do consumo energético [24]; - Possível degradação dos lípidos por oxidação, resultante da aplicação de ultrassons durante longos períodos, o que contribui para a quebra das moléculas de água e consequente formação de radicais livres [34].
Pulsos de um campo elétrico	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do tempo de extração e consumo de solvente [19]; - Aumento do rendimento de extração [19]; - <i>Scale-up</i> relativamente simples [27]; - Pode ser aplicado a biomassa húmida ou seca [27]; - Processo não térmico, reduzindo-se o consumo de energia e os custos operatórios [27]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Custo capital elevado [19]; - Necessidade de aplicar etapas de remoção de compostos salinos da amostra, de modo a reduzir a sua condutividade elétrica. Assim, o processo é mais complexo e dispendioso quando aplicado a microalgas marinhas [19].
Surfactantes	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do consumo energético e custos operatórios, pois o processo pode ser aplicado a biomassa húmida à temperatura ambiente [17]; - Redução do tempo de extração e consumo do solvente [17]; - Surfactantes são biodegradáveis com toxicidade reduzida [17]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Processo de recuperação do surfactante é complexo e dispendioso [17]; - Informação disponível na literatura é limitada [17]; - Viabilidade técnica do <i>scale-up</i> por investigar [17].
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo consumo energético, opera-se a condições suaves [31]; - Método seletivo [19]; - <i>Scale-up</i> simples [19]; - Enzimas podem ser reutilizadas se forem imobilizadas [19]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado custo das preparações enzimáticas [19]; - Necessidade de um estudo extensivo para encontrar a enzima, ou a mistura de enzimas, mais apropriada [19].

1.3.2.6. Extração com líquidos iônicos

Neste método utiliza-se como solvente de extração líquidos iônicos, sendo estes soluções salinas constituídas por catiões orgânicos relativamente grandes acoplados a aniões inorgânicos ou orgânicos poliatômicos mais pequenos [35]. Estas soluções podem ser aplicadas a células secas ou húmidas de microalgas para extrair os lípidos acumulados no seu interior [17].

A aplicação de líquidos iônicos resulta na lise das células da microalga, dado que, devido ao seu carácter iónico e polaridade relativamente elevada, este tipo de solvente é capaz de dissolver biopolímeros recalcitrantes como a celulose [17] [35]. Como a celulose é um dos principais componentes da parede celular das microalgas, ao dissolver este polímero a parede celular fica danificada e, assim, contribui-se para a libertação dos lípidos intracelulares de interesse.

A natureza polar da maioria dos líquidos iônicos induz a formação de duas fases na presença de lípidos, podendo estes ser separados dos líquidos iônicos por diferença de densidade através de processos como a centrifugação. Se os líquidos iônicos aplicados apresentarem um carácter ligeiramente mais hidrofóbico, então os lípidos tornam-se mais solúveis nos mesmos e, nesse caso, podem ser recuperados através da adição de uma pequena quantidade de um solvente orgânico como o hexano [36].

Os líquidos iônicos são caracterizados por serem não inflamáveis e por apresentarem uma boa estabilidade térmica e eletroquímica, uma elevada condutividade e uma baixa pressão de vapor a temperaturas inferiores a 400°C, o que permite a sua recuperação e reutilização por evaporação, sendo este um dos principais benefícios do método de extração em causa [35]. Contudo, este método de extração não é aplicado a nível industrial devido ao elevado custo dos líquidos iônicos, o que se deve à elevada complexidade do processo de síntese deste tipo de solvente [17]. Outras vantagens e limitações deste método de extração podem ser consultadas na Tabela 2.

A nível laboratorial a eficácia dos líquidos iônicos na extração de lípidos foi comprovada no estudo de Kim *et al.* (2013) quando se aplicou o líquido iónico [BMIM][MeSO₄] na recuperação dos lípidos sintetizados pela microalga *Chlorella vulgaris* [36]. Este líquido iónico foi selecionado por apresentar uma baixa solubilidade para com os lípidos, mas um elevado poder de dissolução da biomassa da microalga [36]. Assim os lípidos são insolúveis na mistura aquosa do líquido iónico e por serem menos densos flutuam, podendo ser recuperados por centrifugação. Todavia, o estudo em questão optou por adicionar um pequeno volume de hexano na etapa de separação dos lípidos, de modo a garantir uma correta quantificação dos mesmos [36]. Para comparação de resultados e quantificação dos lípidos totais aplicou-se os métodos convencionais de Soxhlet e Bligh & Dyer, tendo-se usado éter dietílico como solvente de extração no primeiro método [36].

Os resultados experimentais demonstraram que a aplicação do líquido iónico se revelou como o método de extração mais eficaz, dado que se obteve um rendimento de 47 mg/g peso celular seco em oposição a 21 mg/g (Soxhlet) e 29 mg/g (Bligh & Dyer) [36]. O maior rendimento de extração pode ser justificado pela eficiente rutura da estrutura celular, resultante da ação do líquido iónico.

Como o líquido iônico selecionado apresenta uma elevada viscosidade, o que reduz a eficiência de extração, este estudo também avaliou a capacidade de as ondas ultrassônicas minimizarem este problema, através do aumento da taxa de difusão do solvente e, conseqüentemente, da velocidade de extração dos lípidos [36]. Os resultados experimentais permitem concluir que o pré-tratamento com ultrassons favoreceu o processo de extração, dado ter-se obtido um rendimento de 74 mg/g de peso celular seco. Para além disso, a irradiação de ultrassons também aumentou a taxa de difusão do solvente em 2,7 vezes, o que reduziu o tempo de operação necessário, assim como os custos operatórios [36].

1.3.2.7. *Extração com solventes reversíveis*

Este método de extração trata-se de uma técnica relativamente recente que recorre a solventes reversíveis como solvente de extração. Este tipo de solvente é considerado por muitos investigadores como uma sub-classe de líquidos iônicos capazes de alterar as suas propriedades, como a polaridade ou a miscibilidade com a água, através da adição ou remoção de um estímulo [17]. O estímulo aplicado deve consistir, preferencialmente, num composto não tóxico, benigno, barato e de fácil remoção, como o dióxido de carbono.

Na literatura são reportados dois tipos de solventes reversíveis: (1) os capazes de alterar a sua polaridade e (2) os que alteram não só a sua polaridade, assim como a sua miscibilidade na água [17].

Os solventes reversíveis do tipo (1) foram citados pela primeira vez na literatura por Jessop *et al.* e são capazes de converter a sua forma original de baixa polaridade para outra conformação com polaridade elevada, quando expostos a dióxido de carbono [17]. A remoção deste gás resulta na reversão da polaridade do solvente, o que é favorecido pelo aquecimento ou adição de um gás não ácido como o ar, azoto ou árgon à solução [17].

Os solventes reversíveis que alteram a sua polaridade podem ser categorizados em três classes. Na primeira classe inserem-se os solventes constituídos por uma base (como amidina ou guanidina) e um álcool [17]. Esta classe deve ser evitada dado que este tipo de solvente reversível é inadequado para extrações com biomassa húmida [17]. Na segunda classe estão presentes os solventes reversíveis constituídos por uma base e por uma amina [17]. E, por fim, na terceira classe insere-se os solventes reversíveis constituídos por apenas um componente, como as aminas primárias e secundárias [17]. Estas aminas podem atuar como solventes reversíveis, dado que formam sais líquidos de carbamato quando expostas a dióxido de carbono a 1 atm [17]. Ao contrário da primeira classe, as aminas primárias e secundárias são mais baratas e funcionam eficazmente na presença de água, logo podem ser aplicadas em processos de extração a partir de biomassa húmida [17].

Os solventes reversíveis que alteram a sua miscibilidade na água (tipo 2) consistem em solventes que podem ser convertidos reversivelmente entre uma forma hidrofóbica e uma hidrofílica, sendo as aminas terciárias um exemplo típico deste tipo de solvente [17]. A forma hidrofóbica é capaz de extrair os lípidos sintetizados pela microalga, sendo depois o solvente removido da fase orgânica ao adicionar água carbonada à solução, o que resulta na conversão do solvente para a sua forma hidrofílica. Após a recuperação dos lípidos extraídos, o dióxido de carbono é removido através da adição de um gás

como azoto, resultando na conversão do solvente para a sua forma hidrofóbica original [17] [37]. Note-se que a conversão do solvente de hidrofílico para hidrofóbico é favorecida pelo aquecimento da mistura e pela adição de água [17].

Um exemplo de solvente reversível do tipo (2) muito aplicado na literatura consiste na amina terciária DMCHA (em inglês N,N-Dimethylcyclohexylamine), a qual foi aplicada no estudo de Samori *et al.* (2013) [38]. Neste estudo avaliou-se a eficiência deste solvente reversível na extração e recuperação de lípidos a partir de biomassa húmida de três microalgas distintas – *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis suecica* e *Desmodesmus communis*. A aplicação de DMCHA na extração de lípidos foi comparada com o método convencional onde se recorreu a uma mistura de clorofórmio e metanol, tendo-se extraído uma maior quantidade de lípidos com o DMCHA. Por fim, é importante destacar que após a conversão do DMCHA para a sua forma hidrofílica, a eficiência de recuperação dos lípidos rondou os 70-80% e a quantidade de amina terciária que permaneceu na fração de lípidos foi cerca de 0,9% do volume total de solvente aplicado, o que indica que o processo de recuperação do solvente reversível é eficiente e, assim, este pode ser reutilizado [38].

As vantagens e limitações deste método de extração, assim como as dos outros métodos que recorrem a solventes alternativos, podem ser consultadas na Tabela 2.

1.3.2.8. *Extração com líquidos expandidos por gases*

Neste método de extração recorre-se a um solvente líquido no qual se dissolve um gás comprimido (tipicamente dióxido de carbono), o que resulta nas alterações das propriedades físicas e químicas do fluido [39]. Este tipo de solvente apresenta uma menor viscosidade e tensão superficial do que o solvente orgânico puro, logo as taxas de transferência de massa são favorecidas [40].

A capacidade de os líquidos expandidos com dióxido de carbono atuarem como solvente de extração foi avaliada no estudo de Wang *et al.* (2015) [40]. Etanol expandido com CO₂ foi aplicado na recuperação de lípidos sintetizados pela microalga *Schizochytrium* em condições de pressão e temperatura moderadas (entre 2,8 e 9 MPa e entre 313 e 323 K) [40]. Os resultados obtidos com este solvente foram comparados com o método convencional de extração recorrendo a etanol (a 1 bar e 313 K) e etanol pressurizado (a 6,9 MPa e 313 K) [40]. Ao analisar os resultados experimentais concluiu-se que o maior rendimento de extração foi obtido com a aplicação de etanol expandido com CO₂, seguido pelo etanol pressurizado e, por fim, pelo método convencional [40]. Esta observação deve-se ao facto de o etanol expandido com CO₂ apresentar uma maior difusividade e, conseqüentemente, uma taxa de transferência de massa superior à dos restantes solventes. Ao comparar os três métodos concluiu-se que uma menor quantidade de etanol e menos tempo são necessários para atingir o mesmo rendimento de extração quando se recorre a etanol expandido com CO₂ como solvente.

Este estudo também avaliou a influência da pressão, temperatura e caudal de dióxido de carbono na extração com etanol expandido [40]. Concluiu-se que o aumento do caudal de CO₂ e da pressão induz um incremento do rendimento de extração, pois nestas condições o rácio molar do gás no solvente aumenta, o que resulta na diminuição da viscosidade e tensão superficial, facilitando a

extração dos lípidos [40]. Por outro lado, o aumento da temperatura resulta na diminuição do rendimento de extração, possivelmente devido à redução do rácio molar de dióxido de carbono no solvente [40].

1.3.2.9. *Extração com solventes acelerada*

O método de extração com solventes acelerado, também denominado na literatura por extração com líquidos pressurizados, é uma das técnicas verdes mais aplicadas na obtenção de compostos bioativos a partir de fontes naturais sólidas ou semissólidas, tanto a nível laboratorial como industrial [41].

Este método de extração consiste numa técnica automatizada e rápida que utiliza solventes pressurizados a temperaturas elevadas, acima do seu ponto de ebulição normal e sempre abaixo do seu ponto crítico, sob condições em que o solvente é mantido no estado líquido durante o processo de extração [41]. Tipicamente, a temperatura que pode ser usada neste método de extração está compreendida entre 75 e 125°C, sendo 100°C o valor mais aplicado. Por outro lado, a pressão aplicada costuma estar entre 69 e 138 bar, sendo 103 bar o valor mais comum [41].

A aplicação de temperaturas elevadas permite aumentar a solubilidade dos compostos de interesse no solvente de extração e as taxas de difusão do mesmo e reduzir a viscosidade e tensão superficial do solvente [41]. A redução destas duas últimas propriedades aumenta a taxa de extração, considerando que o solvente consegue penetrar a matriz mais facilmente, alcançando áreas mais profundas e aumentando a área de contacto [41]. Para além disso, as temperaturas elevadas contribuem para a rutura das interações estabelecidas entre o soluto e a matriz (forças de van der Waals, pontes de hidrogénio, entre outras), estando este mais acessível ao solvente [41].

Ao operar a uma pressão elevada é possível aplicar neste método um solvente com um ponto de ebulição relativamente reduzido e o fluxo do solvente através do leito fixo é facilitado, dado que o solvente pressurizado é forçado a passar pelos poros da matriz da amostra, resultando num contacto mais próximo com os solutos [41].

Os benefícios deste método de extração, os quais podem ser consultados juntamente com as suas limitações na Tabela 2, foram comprovados no estudo de Tang *et al.* (2016) [42] onde se comparou o método de extração com solventes acelerado, otimizado para biomassa seca da microalga *Chlorella vulgaris*, com o método convencional recorrendo a uma mistura 2:1 (v/v) dos solventes clorofórmio e metanol [42]. Os resultados experimentais demonstraram que o método de extração com solventes acelerado permite obter eficiências de extração mais elevadas do que o método convencional e, para além disso, é possível extrair uma maior quantidade de ésteres metílicos de ácidos gordos e tipos não extraídos pelo método convencional [42].

Tabela 2. Vantagens e limitações dos métodos de extração com solventes alternativos.

Método	Vantagens	Limitações
Líquidos iônicos	<ul style="list-style-type: none"> - Solvente pode ser recuperado por evaporação e reutilizado [35]; - Solvente “designer”, i.e., as suas propriedades podem ser ajustadas [19] [35]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado custo do solvente, devido à complexidade do processo de síntese [17]; - Processo de síntese requer o uso de compostos tóxicos [17]; - Solvente com viscosidade relativamente elevada, reduzindo-se a taxa de transferência de massa [19].
Solventes reversíveis	<ul style="list-style-type: none"> - Solvente seletivo com toxicidade reduzida [19]; - Redução do tempo de extração [19]; - Solvente pode ser reutilizado [19]; - Redução do consumo energético e custos operatórios, pois o processo pode ser aplicado a biomassa húmida [37]; - Solvente pode ser aplicado em processos com múltiplas extrações de compostos distintos [37]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de informação sobre a viabilidade tecnológica do <i>scale-up</i> do processo [17]; - Recuperação do solvente pode ser incompleta, diminuindo-se a qualidade do óleo extraído [43].
Líquidos expandidos por gases	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do consumo do solvente [39]; - Aumento da seletividade do solvente para com os lípidos, por diminuição da sua polaridade [39]; - Redução do tempo de extração [40]; - Propriedades do solvente podem ser alteradas por variação da composição do gás [40]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de informação sobre as propriedades físico-químicas do solvente e eficácia deste método na extração de lípidos a partir de microalgas [40].
Fluidos pressurizados (extração com solventes acelerada)	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do tempo de extração (processo completo após 15 a 25 minutos) [41]; - Redução do consumo de solvente até 90% [41]; - Aumento do rendimento de extração [41]; - Possibilidade do <i>scale-up</i> para a escala industrial [41]. 	<ul style="list-style-type: none"> - Custos operatórios elevados [41]; - Aumento do consumo energético [41].

1.3.2.10. Extração com fluidos supercríticos

A extração supercrítica surge como uma alternativa sustentável às técnicas de extração convencionais e baseia-se no poder de solubilização dos fluidos supercríticos, sendo esse poder controlado até certo ponto pela alteração da pressão e temperatura do fluido, tornando a extração supercrítica numa técnica muito seletiva [44].

O método de extração supercrítica separa compostos solúveis de uma matriz sólida por contacto com um solvente que se encontra acima da pressão e temperatura que caracterizam o seu ponto crítico. Na Figura 5 é possível observar o diagrama pressão-temperatura do dióxido de carbono e a representação do seu ponto crítico.

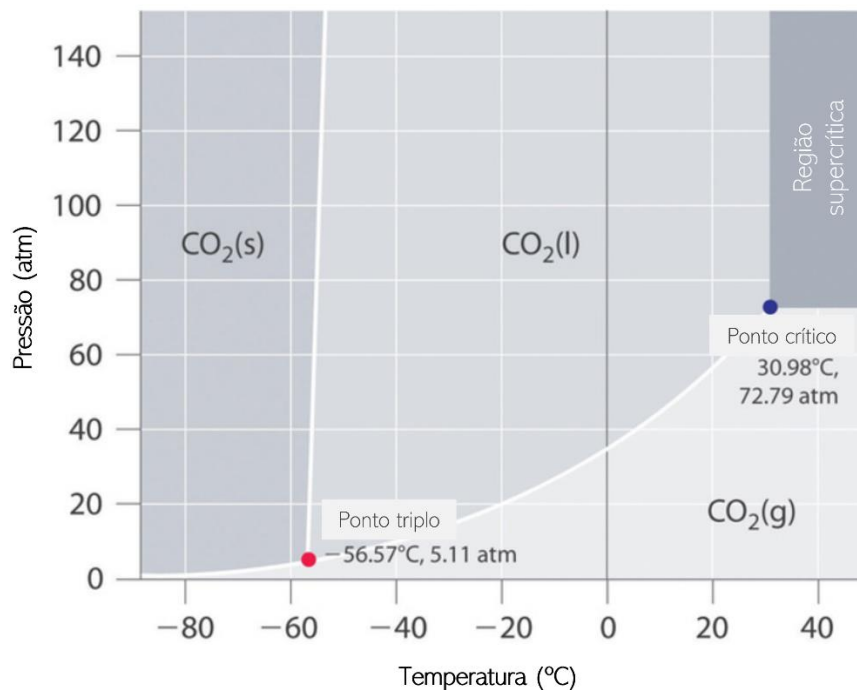


Figura 5. Diagrama pressão-temperatura do composto dióxido de carbono, adaptado de [45].

Na Figura 5 é possível observar a região supercrítica, a qual é delimitada pelo ponto crítico que pode ser definido como o valor de pressão e temperatura a partir do qual a substância pura apresenta propriedades termofísicas intermédias entre um gás e um líquido [44]. As propriedades do fluido supercrítico que devem ser destacadas são a densidade, pois esta influencia diretamente a capacidade de o fluido solubilizar os compostos de interesse [46], a viscosidade e a difusividade, dado que estas duas propriedades afetam a transferência de massa e, conseqüentemente, a cinética do processo de extração [47].

Relativamente à densidade do fluido supercrítico esta é semelhante à da fase líquida e na região do ponto crítico pequenas alterações da pressão induzem variações significativas desta propriedade, dado que a compressibilidade do fluido é superior à dos líquidos [47]. A densidade do fluido supercrítico é função da pressão e temperatura e, tipicamente, observa-se que a densidade aumenta com o incremento da pressão, a temperatura constante, e diminui com o aumento da temperatura, a pressão constante [47].

A viscosidade de um fluido supercrítico encontra-se tipicamente na gama 10^{-4} a 10^{-3} Pa.s, cerca de uma ordem de grandeza inferior ao valor comum dos líquidos, aumentando com a pressão e diminuindo com a temperatura [47]. Por outro lado, um fluido supercrítico apresenta uma difusividade superior à tipicamente associada aos líquidos e esta diminui com a pressão e aumenta com a temperatura [47]. Assim, por apresentarem baixas viscosidades e elevadas difusividades, a transferência de massa dos fluidos supercríticos é mais eficaz, sendo estes capazes de penetrar mais facilmente a matriz sólida.

A alteração das propriedades do fluido supercrítico com a pressão e temperatura foram constatadas no estudo de Couto *et al.* (2010) [46]. Nesse estudo aplicou-se a extração supercrítica com dióxido de carbono a biomassa liofilizada da microalga *C. cohnii*, tendo-se testado duas temperaturas (313 e 323 K) e três pressões (20, 25 e 30 MPa) [46].

Os resultados experimentais evidenciam dois efeitos da pressão a temperatura constante. À temperatura mais baixa de 313 K, o rendimento de extração diminuiu com o aumento da pressão, enquanto a 323 K observou-se o efeito oposto [46]. Estes resultados demonstram que em condições de temperatura constante o aumento da pressão induz dois efeitos: por um lado aumenta a densidade do fluido supercrítico e por outro diminui o coeficiente de difusão do fluido [46]. O primeiro efeito favorece a solubilidade dos solutos no solvente, enquanto o segundo reduz a capacidade de o fluido penetrar a matriz sólida, resultando na diminuição do rendimento de extração [46]. À temperatura mais baixa o segundo efeito foi dominante e a 323 K o primeiro efeito prevaleceu.

Em condições de pressão constante também se observou dois efeitos termodinâmicos distintos resultantes do aumento da temperatura. Por um lado, o aumento da temperatura, a pressão constante, diminui a densidade e a solubilidade do soluto e, por outro lado, aumenta a pressão de vapor do soluto, logo aumenta a solubilidade do mesmo no fluido supercrítico [46]. A pressões elevadas (25 e 30 MPa), a densidade do dióxido de carbono supercrítico diminui moderadamente com o aumento da temperatura, logo o efeito da pressão de vapor do soluto predominou e o rendimento de extração aumentou [46]. Mas à pressão mais baixa de 20 MPa, o primeiro efeito foi o mais significativo e por isso o rendimento de extração diminuiu com o aumento da temperatura [46].

Para além da pressão e temperatura, outros parâmetros influenciam a eficácia da extração supercrítica, nomeadamente o caudal de solvente e as características da matriz, como o tamanho e forma das partículas, a porosidade, o teor de humidade e a própria natureza da matriz [44].

O processo de extração supercrítica consiste em duas etapas – a extração e a separação do solvente do extrato [44]. Na etapa da extração um fluxo contínuo e uniforme do fluido supercrítico é alimentado ao extrator contendo um leito fixo de partículas sólidas, o que culmina na dissolução dos componentes extraíveis [44]. De seguida, na etapa de separação o solvente e os compostos extraídos saem do extrator e entram no separador onde se remove o solvente [44]. O método de remoção de solvente mais simples consiste na despressurização do fluido, o que resulta na diminuição da sua densidade e, conseqüentemente, na redução do poder de solubilização do solvente, culminando na precipitação dos compostos de interesse [44].

Diversos tipos de compostos podem ser usados na extração supercrítica, como o etano, propano, pentano, amoníaco, éter dimetílico, água e dióxido de carbono [48]. De todas estas substâncias a mais aplicada a nível laboratorial e industrial é o dióxido de carbono dado que se trata de um composto inerte, barato, não inflamável e com uma pressão e temperatura crítica moderada (31,1°C e 72,9 atm), o que diminui o consumo energético e os custos operatórios [48]. Para além disso, a sua separação dos compostos bioativos por despressurização é simples e praticamente completa, o que significa que este pode ser reciclado ao processo e torna-se possível obter um produto final de boa qualidade. Se o dióxido de carbono aplicado no método de extração corresponder ao gás residual de outras indústrias, contribui-se desse modo para a prevenção e redução da libertação de gases com efeito estufa.

No entanto, o uso de dióxido de carbono como fluido supercrítico apresenta como principais desvantagens o facto de este gás ter dificuldade em extrair compostos de matrizes sólidas com um elevado teor de humidade e possuir uma polaridade significativamente reduzida, o que significa que este fluido é apenas adequado para a extração de compostos bioativos apolares ou pouco polares, como lípidos neutros, limitando a sua utilização na recuperação de outros produtos [47]. Para resolver esta questão é possível adicionar ao dióxido de carbono supercrítico uma pequena proporção (tipicamente entre 1 e 10%) de um cosolvente [19]. Este cosolvente consiste num composto químico de maior polaridade que o dióxido de carbono, como o etanol ou metanol, o que resulta no incremento da polaridade e densidade da mistura supercrítica, expandindo-se desta forma a gama de compostos extraíveis [19]. Apesar do uso de um cosolvente contribuir para o aumento do rendimento de extração, esta abordagem dificulta a purificação dos extratos obtidos, dado ser necessário um passo extra de remoção do cosolvente.

O efeito da adição de um cosolvente foi analisado no estudo Mendes *et al.* (2005) [49], onde se pretendeu extrair os lípidos sintetizados pela cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) maxima*, em particular o ácido γ -linolénico. Assim, as células liofilizadas da microalga foram sujeitas à extração supercrítica com dióxido de carbono puro e dióxido de carbono misturado com 10% (m/m) do cosolvente etanol [49]. Para comparação dos resultados, as células liofilizadas também foram sujeitas ao método de extração convencional com os seguintes solventes orgânicos: etanol, acetona, hexano e uma mistura de clorofórmio, metanol e água [49]. Os resultados experimentais demonstraram que a recuperação de lípidos obtida por extração supercrítica com dióxido de carbono puro foi inferior ao dos métodos convencionais, assim como se obteve um menor conteúdo do ácido gordo de interesse no extrato [49]. Tais resultados eram expectáveis tendo em consideração que os lípidos sintetizados por esta microalga são maioritariamente polares [49]. Com a adição do cosolvente etanol, o rendimento de extração de lípidos e a recuperação do ácido γ -linolénico aumentaram relativamente à utilização de dióxido de carbono puro, contudo continuaram a ser inferiores aos resultados obtidos com etanol ou acetona, dado que estes solventes são mais polares e por isso têm uma maior afinidade para com os lípidos [49]. O estudo concluiu que por ajuste da temperatura e pressão da mistura dióxido de carbono supercrítico e etanol talvez fosse possível alcançar uma recuperação de lípidos superior à desses solventes orgânicos convencionais [49].

A extração supercrítica trata-se de um método atrativo para a separação de produtos biológicos, como o caso dos lípidos sintetizados pelas microalgas, dado que apresenta diversos benefícios como: recorre a fluidos não tóxicos e baratos, operados a condições de pressão e temperatura moderadas, logo consiste num processo seguro para compostos termolábeis, isto é sensíveis à degradação térmica [24]; possibilidade de obter rendimentos de extração elevados acompanhados de uma melhor seletividade [33]; possibilidade de realizar o fracionamento durante a descompressão do solvente supercrítico, usando apenas dois ou mais passos de descompressão [24]; a operação é simples, não inflamável e rápida [24]; possibilidade de *scale-up* do processo, sendo o mesmo já aplicado à escala industrial e inexistência de resíduos de solvente no produto final e na biomassa residual, podendo esta ser usada em outras aplicações [46] [24].

No entanto, a principal desvantagem deste método de extração está relacionada com o elevado custo capital, isto é, o custo do equipamento que é consideravelmente superior quando comparado com outros processos de extração [24] [43].

A eficácia da técnica de extração supercrítica na recuperação de lípidos sintetizados pela microalga *Cryptocodinium cohnii* foi analisada no estudo de Couto *et al.* (2010) [46], mencionado anteriormente. Este método de extração foi aplicado a biomassa da microalga liofilizada e os resultados obtidos foram comparados com o método convencional de Bligh & Dyer [46]. Os resultados experimentais indicam que o maior rendimento de extração (19,9% m/m) foi obtido com o método convencional, no entanto a extração supercrítica permitiu obter uma fração lipídica mais pura em ADH (72,3% a 25 MPa e 323 K, em oposição a 49,5% com o método de Bligh & Dyer) [46]. Assim, concluiu-se que a extração supercrítica é um método atrativo para aplicações farmacêuticas, dado que permite obter um extrato com uma pureza em ADH elevada. A possível aplicação de um pré-tratamento e otimização das condições de pressão e temperatura poderiam melhorar o rendimento de extração obtido, tornando-o superior ao do método convencional de Bligh & Dyer [46].

É importante notar que o trabalho apresentado nesta dissertação vem complementar o estudo de Couto *et al.* (2010) [46] e aprofundar o tema da aplicação do método de extração supercrítica à microalga *C. cohnii*, uma vez que aborda os seguintes aspetos: análise das gamas de pressão e temperatura que permitem maximizar os rendimentos de extração dos lípidos, do ADH e dos ácidos gordos para biodiesel, através de um planeamento experimental, baseado na distribuição para dois fatores de Doehlert; estudo do efeito relativo da pressão e da temperatura nos rendimentos de extração e fracionamento do óleo extraído em duas frações distintas numa perspetiva de biorrefinaria – uma primeira fração rica em ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser direcionados para a produção de biodiesel e outra fração rica no produto de alto valor acrescentado, o ADH.

Por fim, ao consultar a literatura é possível concluir que a aplicação da extração supercrítica a microalgas tem-se intensificado consideravelmente ao longo dos anos, encontrando-se uma grande variedade de estudos que se focam na extração de produtos de alto valor acrescentado – pigmentos como carotenoides e clorofilas [50] [51] [52] [53] [54], ácidos gordos polinsaturados como o ácido docosahexaenóico e o ácido γ -linolénico [46] [49] [55] [56], hidrocarbonetos [57] e compostos polifenólicos [58] – ou na recuperação de lípidos para a produção de biodiesel [32] [59] [60] [61]. Para

além disso, conclui-se também que a maioria dos estudos aplicam a extração supercrítica a microalgas autotróficas, como por exemplo à *Chlorella vulgaris* [53], à *Botryococcus braunii* [60], à *Dunaliella salina* [54] e à *Arthrospira (Spirulina) maxima* [49]. No entanto, existem outros estudos que exploram a aplicação da extração supercrítica a microalgas heterotróficas, para além da *C. cohnii* [46] [51] [55] [56].

1.4. Objetivos

O presente trabalho pretende implementar um processo simples e amigável do ambiente para a coprodução de biodiesel e produtos ω -3 de valor acrescentado (ácido docosahexaenóico), a partir da biorrefinaria da microalga *Cryptocodinium cohnii*. Para tal foi necessário proceder ao alcance dos seguintes objetivos:

- i) Análise do uso de glicerol bruto na produção de culturas de elevada densidade celular e com um elevado conteúdo de ADH num bioreator de bancada de 7 L a operar em regime *fed-batch*;
- ii) Extração dos lípidos pelo método convencional de Soxhlet e comparação com o rendimento de extração pelo processo não convencional de extração supercrítica;
- iii) Determinação dos valores dos parâmetros experimentais pressão e temperatura, do processo de extração supercrítica, que permitem maximizar o rendimento em lípidos, em ADH e em ácidos gordos que podem ser usados na produção de biodiesel, através de um planeamento experimental, baseado numa superfície de resposta (*surface response methodology*), de acordo com a distribuição para dois fatores de Doehlert;
- iv) Estudo do efeito relativo dos parâmetros experimentais do método de extração supercrítica - pressão e temperatura - nos rendimentos de extração avaliados no planeamento experimental;
- v) Fracionamento do óleo da microalga *C. cohnii* usando a extração com CO₂ supercrítico, de forma a obter duas frações distintas numa perspetiva de biorrefinaria – uma primeira fração rica em ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser direcionados para a produção de biodiesel e outra fração com uma maior abundância do produto de alto valor acrescentado, o ADH;
- vi) Análise, identificação e quantificação dos pigmentos presentes no óleo extraído através da cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria.

2. Metodologia

2.1. Materiais e Equipamento

Os materiais e reagentes usados neste trabalho encontram-se resumidos na Tabela A1 presente no Anexo A. O equipamento usado neste estudo será referido no texto conforme necessário.

2.2. Fermentação da *Cryptocodinium cohnii*

2.2.1. Condições de crescimento

A espécie *Cryptocodinium cohnii* (ATCC 30772) usada no presente estudo foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC). A microalga foi armazenada a -80°C no meio de cultura ATCC 460 com 30% (v/v) de glicerol puro.

A cultura de pré-inóculo foi preparada em erlenmeyers de 250 mL, os quais continham o meio de cultura “*starter*” composto por extrato de levedura (1,8 g/L), sal marinho (23 g/L) e glicerol puro (9 g/L). A este meio de cultura foi adicionada uma mistura de 3 antibióticos (1 mL/L), de modo a prevenir o surgimento de contaminações. Os antibióticos constituintes dessa mistura são cloranfenicol (5 mg/L), penicilina G (62 mg/L) e streptomina (100 mg/L). O meio de cultura foi inoculado com uma suspensão celular da microalga em estudo (10% v/v).

A cultura de pré-inóculo foi mantida numa incubadora estacionária a 25°C no escuro e todos os meses foram preparadas novas culturas. Esta cultura foi usada para inocular as culturas de inóculo do bioreator (10% v/v).

As culturas de inóculo do bioreator foram preparadas em erlenmeyers de 500 mL, contendo o meio de cultura constituído por extrato de levedura (2 g/L), sal marinho (25 g/L), glicerol industrial com uma pureza de 85,5% em glicerol (20 g/L), fornecido pela empresa IBEROL (Sociedade Ibérica de Biocombustíveis e Oleaginosas, S.A, Alhandra), e a mistura de antibióticos mencionada anteriormente, com a mesma concentração. Estas culturas foram incubadas no escuro a 27°C durante 7 dias e com uma agitação de 130 rpm.

O pH dos meios de cultura foi previamente ajustado para 6,5 com soluções de NaOH e HCl e os meios foram esterilizados na autoclave (AJC, modelo uniclave 88) a 121°C durante 20 minutos.

2.2.2. Fermentação no bioreator

Um volume de 300 mL (10% v/v) da cultura de inóculo foi usado para inocular o bioreator à escala laboratorial (Electrolab Biotech, modelo FerMac 360 bioreactor), contendo um volume inicial de 2,7 L do meio de cultura. Este fermentador encontrava-se equipado com duas hélices do tipo *Rushton* e quatro anteparas.

O meio de cultura era constituído por glicerol industrial (23,94 g/L), fornecido pela empresa IBEROL (Sociedade Ibérica de Biocombustíveis e Oleaginosas, S.A, Alhandra), sal marinho (25 g/L), extrato de levedura (0,5 g/L), extrato de milho (4,59 g/L), fornecido pela empresa COPAM (Companhia

Portuguesa de Amidos, S.A, São João da Talha) e a mistura de antibióticos mencionada anteriormente, com a mesma concentração.

Ao longo da fermentação o pH do meio de cultura foi medido com um eletrodo e ajustado para o valor fixado previamente de 6,5 através da adição automática de uma solução ácida de HCl 2,5 M e uma solução básica de NaOH 2,5 M. Este eletrodo foi calibrado previamente ao início da fermentação com duas soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

Para além disso, monitorizou-se a percentagem de oxigénio dissolvido (OD%) com um eletrodo e quando este parâmetro diminuía para valores inferiores a 30%, a velocidade de agitação era ajustada manualmente (100 a 275 rpm) para aumentar a transferência de oxigénio. Tendo em consideração que a OD é uma medida relativa que indica a percentagem de oxigénio em relação à saturação, foi necessário calibrar previamente o eletrodo de oxigénio.

O processo de fermentação foi conduzido com um caudal de entrada de ar de 1 g/L.h e à temperatura de 27°C, sendo esta mantida através de uma manta de aquecimento e da circulação de água de arrefecimento.

A cultura da microalga foi realizada em regime *fed-batch*, isto é, em determinados períodos da fermentação, quando o crescimento celular abrandava, introduziu-se no reator uma solução concentrada em dez vezes do meio de cultura, com o auxílio de uma bomba peristáltica, de modo a prolongar a fase ativa do crescimento, ou seja, a fase exponencial.

Após a fermentação estar concluída, a biomassa foi recuperada por centrifugação (Sigma, modelo 6-16KS) e liofilizada a -55°C durante 24 horas no liofilizador Heto Power Dry LL 3000 (Thermo Scientific), com o auxílio de uma bomba rotativa de palhetas (Vacuubrand, modelo RZ 2,5).

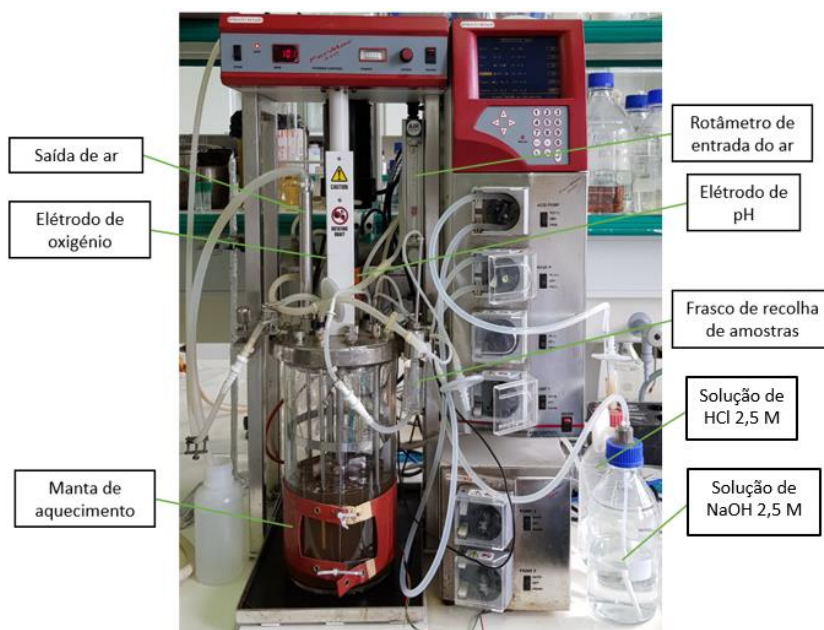


Figura 6. Montagem laboratorial da fermentação de *C. cohnii*.

2.2.3. Análise da fermentação

Ao longo da fermentação foram recolhidas duas amostras por dia da cultura, de modo a acompanhar o crescimento celular da microalga *C. cohnii*. Para além disso, retirou-se uma amostra previamente à inoculação do reator, a qual correspondeu ao branco da densidade ótica.

2.2.3.1. Densidade ótica

O crescimento celular da microalga foi acompanhado ao longo do tempo por densidade ótica, isto é, através da leitura da absorvância da suspensão a 470 nm num espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Spectronic, modelo Genesys 20). Com o aumento da concentração de biomassa ao longo do período da fermentação foi necessário realizar a diluição da suspensão celular a analisar no espectrofotómetro. Para cada análise efetuada repetiu-se a leitura da absorvância três vezes para efeitos estatísticos e ao valor médio de cada medida subtraiu-se o valor da densidade ótica correspondente ao branco, de modo a eliminar as interferências provocadas pelo meio de cultura.

2.2.3.2. Quantificação do consumo da fonte de carbono

A avaliação do consumo da fonte de carbono ao longo da fermentação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Agilent, modelo 1100 Series), recorrendo-se a uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) em combinação com uma pré-coluna de catião H⁺ (Bio-Rad). O equipamento é equipado com um detetor de dispersão de luz e um detetor de índice de refração. A eluição foi conduzida a 50°C com uma solução de ácido sulfúrico 5 mM com um caudal de 0,4 mL/min. Para determinar a concentração de glicerol no meio de cultura foi necessário estabelecer uma reta de calibração que relaciona a área do respetivo pico com a concentração desta fonte de carbono. Essa reta de calibração foi traçada através da análise por HPLC de seis soluções de glicerol com concentração conhecida.

2.2.3.3. Quantificação do azoto no meio de cultura

Para quantificar o azoto residual presente no meio de cultura introduziu-se num tubo de digestão 5 mL do sobrenadante obtido após centrifugação da amostra de suspensão celular recolhida. A massa correspondente a esse volume foi registada para o cálculo posterior da massa de azoto presente no meio de cultura. No mesmo tubo adicionou-se uma colher da mistura de catalisadores e 20 mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram colocados na Unidade de Digestão Kjeltex durante 1 hora, onde ocorreu a hidrólise das proteínas.

Com a digestão completa, os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente e, de seguida, colocados na unidade de destilação (Kjeltex System, modelo 1026 Distilling Unit). Nesta unidade colocou-se também um erlenmeyer com 50 mL de ácido bórico a 4% e duas gotas do indicador, sendo que este irá recolher os gases da destilação (NH₃). Por fim, procedeu-se à titulação, com HCl 0,1 M, da solução contida no erlenmeyer até ocorrer a mudança de cor do indicador de verde para violeta.

2.2.3.4. Observação ao microscópio

As culturas de inóculo do reator e as amostras retiradas do fermentador foram observadas ao microscópio (Olympus Corporation, modelo BX60), com o objetivo de avaliar a presença de contaminações no meio de cultura e o estado das células durante o seu crescimento. Este microscópio

está equipado com uma câmara digital. Na observação microscópica à luz visível, uma pequena porção do meio de cultura foi removida em condições estéreis e observada nas ampliações 100X e 1000X.

2.2.3.5. *Determinação dos ácidos gordos*

Para determinar o teor de ácidos gordos na biomassa recorreu-se à reação de transmetilação. Assim, foram pesados cerca de 100 mg de biomassa liofilizada e moída e esta foi transferida para tubos de ensaio sob uma atmosfera de azoto, aos quais se adicionaram 2 mL da mistura de metanol e cloreto de acetilo (19:1 (v/v)), seguidos de 0,2 mL de ácido heptadecanóico (C17:0, 5 mg/mL) como padrão interno. Os tubos bem selados foram aquecidos em banho-maria a 80°C durante 1 hora. Após o arrefecimento dos tubos de ensaio, adicionou-se 1 mL de água destilada e 2 mL de heptano, ocorrendo a separação das fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi filtrada numa coluna com sulfato de sódio anidro e algodão.

Os esteres metílicos resultantes da transmetilação dos ácidos gordos foram analisados por cromatografia gás-líquido (Bruker Scion, modelo 436-GC). O equipamento estava equipado com um detetor de ionização de chama. A separação ocorreu numa coluna capilar fundida com sílica 0,32 mm por 30 m Supelcowax 10 (Supelco), usando hélio como gás de arraste com um caudal de 3,5 mL/min. A pressão da coluna foi 13,5 psi e a sua temperatura foi programada para um valor inicial de 200°C durante 8 min, aumentando depois 4°C/min até 240°C e permanecendo a esta temperatura durante 16 minutos. As temperaturas do injetor e do detetor foram 250 e 280°C, respetivamente. O rácio split foi 1:50 durante 5 minutos e 1:10 durante o resto da análise.

A identificação dos picos e o cálculo do fator de resposta foram realizados com padrões conhecidos (GLC 459, GLC 85 e GLC 75, Nu-chek-Prep). A quantidade de cada ácido gordo foi determinada através das áreas dos respetivos picos no cromatograma, usando ácido heptadecanóico como padrão interno. Cada amostra analisada por cromatografia gás-líquido foi preparada em duplicado e injetada duas vezes no equipamento.

2.2.3.6. *Teor de humidade e cinzas*

Para determinar o teor de humidade pesaram-se rigorosamente 500 mg de biomassa em cadinhos de porcelana tarados e estes foram colocados na estufa a 100°C durante 12 horas. Os cadinhos foram pesados depois de terem arrefecido à temperatura ambiente.

Na determinação do teor de cinzas, pesaram-se rigorosamente 500 mg de biomassa seca e esta foi introduzida em cadinhos a peso constante previamente registado. Os cadinhos contendo a biomassa seca foram colocados na mufla a 550°C durante 5 horas e, após esse período, colocados no exsiccador para arrefecerem até à temperatura ambiente e serem novamente pesados.

2.3. *Métodos de extração de lípidos*

Os lípidos sintetizados pela microalga *Cryptocodinium cohnii* foram extraídos com o método convencional de Soxhlet e através do método de extração supercrítica com dióxido de carbono. A quantificação dos lípidos extraídos foi realizada por gravimetria e o perfil de ácidos gordos dos extratos

obtidos foi determinado por cromatografia gás-líquido, tendo-se recorrido previamente à reação de transmetilação, como descrito na secção 2.2.3.5.

A biomassa utilizada nos ensaios de extração foi previamente seca por liofilização e moída com recurso a um moinho de bolas (Retsch, modelo MM400). As condições de moagem foram as seguintes: em cada almofariz colocaram-se 0,5 g de biomassa liofilizada e 4 esferas metálicas. A moagem decorreu durante 3,5 minutos a uma frequência de 25,0 Hz.

Todas as experiências foram realizadas em duplicado ou triplicado, de modo a validar estatisticamente os resultados obtidos.

2.3.1. Método de extração de Soxhlet

No método de extração de Soxhlet usou-se cerca de meio grama de biomassa liofilizada e moída, a qual foi introduzida no invólucro (cartucho de celulose). Este foi acondicionado devidamente e colocado no interior do extrator de Soxhlet para dar início à extração, a qual durou 6 horas. Concluída a extração, os extratos recuperados foram filtrados a vácuo com filtros de 0,2 e 0,1 μm , de modo a remover possíveis partículas em suspensão.

Nesta extração usou-se um volume de solvente hexano de 150 mL, sendo este colocado no balão de destilação como representado no diagrama esquemático, Figura 7. Após a extração, o solvente hexano foi removido num evaporador rotativo de vácuo (Büchi, modelo R-200), de modo a concentrar os compostos extraídos e permitir a sua quantificação por pesagem.

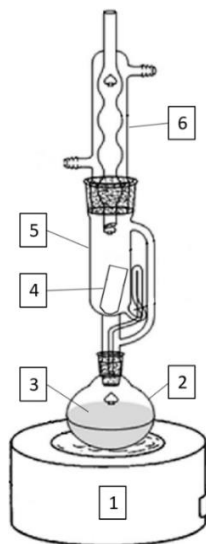


Figura 7. Diagrama esquemático do método de extração de Soxhlet. 1 - Placa de aquecimento. 2 - Balão de destilação. 3 - Solvente de extração (hexano). 4 - Cartucho de celulose contendo a amostra de biomassa. 5 - Extrator de Soxhlet. 6 - Condensador.



Figura 8. Montagem laboratorial do método de extração de Soxhlet.

2.3.2. Extração supercrítica

Com o objetivo de realizar a extração dos lípidos sintetizados pela microalga *C. cohnii* com dióxido de carbono supercrítico recorreu-se a um dos aparelhos de extração supercrítica existente no Departamento de Bioenergia e Biorrefinarias do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG).

Descrição do aparelho de extração supercrítica

Na Figura 9 encontra-se representado o diagrama esquemático do aparelho utilizado para realizar a extração supercrítica dos lípidos sintetizados pela microalga *C. cohnii*, o qual se encontra descrito de seguida.

O dióxido de carbono liquefeito provém da respetiva garrafa, 1, a qual apresenta um tubo prolongador que garante que o fluido removido se encontra no estado líquido. De seguida, o fluido passa pela válvula de não retorno, 2, e é arrefecido na serpentina com aproximadamente 2 metros de comprimento e imersa num banho de gelo, 3, com o objetivo de se assegurar que à entrada da bomba de circulação, 5, o dióxido de carbono se encontra totalmente liquefeito, evitando-se deste modo problemas de cavitação na bomba.

O fluido arrefecido passa pelo filtro de alta pressão, 4, (Whitey – 7 μm , modelo SS-4F-7) antes de entrar na bomba de circulação (Milton Roy, modelo NSI-33R). A pressão de compressão é indicada no manómetro, 6, (Omega Engineering, modelo General Service Gauge type S) existente à saída da bomba e o aumento de pressão proporcionado pela bomba é controlado pelo regulador de pressão, 7, (Tescom Corporation Series, modelo 26-1761-21). O manómetro do tipo Bourdon, 8, (Heise, modelo CM-TC) mede rigorosamente a pressão de trabalho e auxilia o ajuste do regulador de pressão.

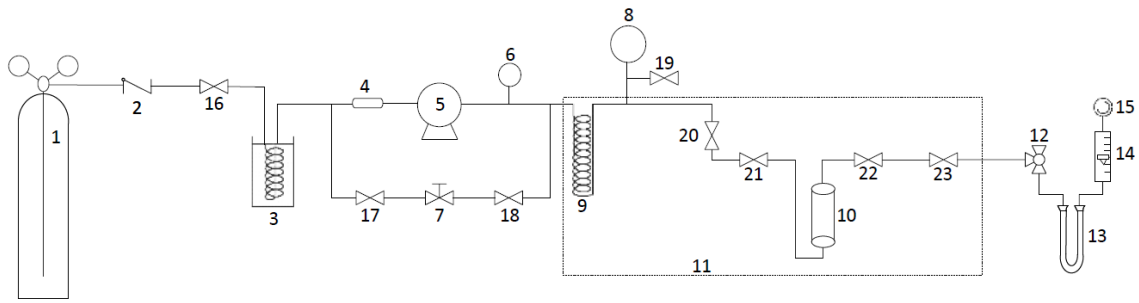


Figura 9. Diagrama esquemático do aparelho de extração supercrítica. 1 – Cilindro de gás com tubo prolongador; 2 – válvula de não retorno; 3 – serpentina arrefecida com gelo; 4 – filtro de alta pressão; 5 – bomba de circulação; 6, 8 – manómetros; 7 – regulador de pressão; 9 – permutador de calor, 10 – célula de extração; 11 – banho de água; 12 – válvula de expansão (válvula de três vias); 13 – tubo de vidro em U; 14 – rotâmetro; 15 – contador de gás; 16-23 – válvulas.

O fluido pressurizado é aquecido num permutador de calor, 9, que consiste numa serpentina com cerca de 6 metros de comprimento, assegurando-se deste modo que o fluido se encontra à temperatura de trabalho antes de atingir a célula de extração, 10. A célula de extração e a serpentina encontram-se imersas num banho com cerca de 150 L de água, construído em acrílico, isolado por placas de esferovite e termostatizado por controladores (Grant, modelo Special 240V e Julabo, modelo ED 230 V). A temperatura do banho é medida com um termómetro de resistência de platina (Comark Electronics, modelo PRA 6035), o qual se encontra ligado a uma unidade de leitura digital (Comark Electronics, modelo 6800).

A célula de extração (High Pressure Equipment, modelo MS-11) consiste num vaso em aço inoxidável do tipo ASI 316 com 5 cm³ de volume interno, colocando-se no seu interior a microalga.

Após a passagem pela célula de extração, o fluido supercrítico é expandido para a atmosfera através da válvula de três vias, 12, (High Pressure Equipment, modelo 60-15 HF4), a qual é aquecida até à temperatura do banho de água através de um fio de aquecimento ligado a um reóstato (Selecta 300W). A expansão do fluido resulta na precipitação dos compostos extraídos e na sua retenção no algodão colocado nos dois ramos do tubo em U, 13, o qual se encontra imerso em gelo. O tubo em U, assim como a válvula de três vias e a tubagem adjacente são lavados com hexano para garantir que todo o material extraído é recuperado.

O gás, após passar pelo tubo em U, entra no rotâmetro, 14, (Cole Parmer, modelo Masterflex), o qual permite monitorizar o caudal de gás a circular pelo sistema. O volume total de gás usado em cada medida é determinado por um contador de gás húmido, 15 (American Meter Company, modelo 802). O volume lido é corrigido para as condições normais de pressão e temperatura, cujo cálculo é descrito no Anexo B, e, com esta finalidade em mente, regista-se a pressão atmosférica e a temperatura ambiente com um barómetro Fortin (F. Darton, modelo U242).



Figura 10. Montagem laboratorial do aparelho de extração supercrítica presente no Departamento de Bioenergia e Biorrefinarias do Laboratório Nacional de Energia e Geologia.

Rigor das leituras da temperatura, pressão e volume do fluido

Temperatura: Para cada medida, o controlo da temperatura foi efetuado em dois pontos distintos do aparelho – no banho de água termostaticado (sonda principal) e na válvula de três vias (sonda secundária). As duas sondas de resistência de platina estão ligadas a uma unidade de leitura digital que indica o valor da temperatura com um rigor de $\pm 0,05$ K.

Pressão: O manómetro utilizado para medir a pressão relativa do sistema permite leituras do valor de pressão na gama 0 a 50,0 MPa, com um rigor de $\pm 0,05$ MPa.

Volume de gás: O volume total de gás utilizado foi medido com um contador de gás húmido, onde uma volta completa do ponteiro corresponde a 1 L de gás e a subdivisão mais pequena é 0,01 L. O rigor de leitura é então $\pm 0,005$ L. Este contador possui também um termómetro incorporado que permite efetuar leituras de temperatura na gama 273,15 a 323,15 K.

Descrição da técnica experimental

Carga da célula de extração:

A célula de extração foi preenchida com aproximadamente 1,2 g de biomassa microalgal liofilizada e moída, como descrito anteriormente (secção 2.3), tendo sido esta misturada com esferas de vidro (3 mm de diâmetro), de modo a evitar a colmatção do leito do extrator, ou seja, a formação de um bolo. A mistura foi colocada entre duas camadas (uma em cada extremidade) de algodão limpo, o que evita o arrastamento da biomassa pelo fluido de extração. O aperto usado para o fecho da célula foi de 7,5 m.kg, o qual foi necessário para evitar fugas de fluido quando a célula era utilizada.

Técnica experimental:

Primeiramente ligou-se os controladores do banho de água 4 a 5 horas antes do início de cada ensaio de modo a aquecer a água, ligando-se também a sonda de temperatura principal ao leitor para monitorizar o seu aumento.

De seguida, saturou-se o contador de gás húmido durante aproximadamente 45 minutos, sendo este passo necessário dado que o dióxido de carbono é solúvel em água. Para tal abriu-se a válvula 16, ligou-se a válvula 19 à entrada do rotâmetro e abriu-se esta válvula, deixando passar um caudal médio de 0,24 L/min (PTN) durante o tempo mencionado. Após a saturação estar completa, a entrada e a saída do contador foram colocadas em contacto com a atmosfera e o nível de água do mesmo foi verificado e, caso seja necessário, ajustado com a adição de água destilada.

Quando o banho se encontrava à temperatura desejada, ligou-se o aquecimento da válvula de três vias, para que esta atingisse a temperatura de trabalho e colocou-se todo o sistema, inclusive a célula de extração, à pressão de vapor do gás liquefeito, abrindo as válvulas 20 a 23.

Quando toda a linha se encontrava à pressão de vapor do gás liquefeito, colocou-se os sacos de gelo na tubagem à volta da bomba e junto da serpentina, 3, de modo a arrefecer a tubagem e, assim, evitar a cavitação da bomba. Este passo é necessário dado que a bomba de circulação não possui um sistema de refrigeração integrado. Com a tubagem arrefecida, ligou-se a bomba de circulação e elevou-se o seu caudal até 40 a 50% do valor máximo. Após a pressão do sistema atingir o valor operativo, abriu-se lentamente a válvula 12, até se estabelecer o caudal de CO₂, e iniciou-se a contagem do tempo.

Ao longo da extração foram recolhidos quatro extratos: após trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e ao fim de três horas de extração. Para proceder à recolha dos extratos foi necessário fechar a válvula de três vias, a válvula 22 e desligar a bomba de circulação. De seguida, removeu-se o tubo em U, abriu-se novamente a válvula de três vias e lavou-se a mesma com hexano, recolhendo-se os lípidos recuperados para um erlenmeyer. Após a secagem da válvula de três vias com argon, colocou-se um novo tubo em U e reiniciou-se a extração com a abertura da bomba e das válvulas previamente fechadas, aguardando-se a estabilização da pressão de trabalho. Antes de se retomar o processo de extração, anotou-se o tempo decorrido e o volume total de dióxido de carbono usado na medida.

O tubo em U usado em cada recolha, assim como o algodão colocado no seu interior, foram lavados com hexano de modo a recuperar os lípidos precipitados. O volume total do extrato obtido foi filtrado a vácuo com um filtro de 0,2 µm e foi concentrado no evaporador rotativo a vácuo, sendo os lípidos quantificados gravimetricamente.

2.3.2.1. *Planeamento experimental*

A metodologia baseada numa superfície de resposta (*surface response methodology*), baseada na distribuição para dois fatores de Doehlert [62], foi utilizada com o objetivo de determinar os intervalos de pressão e temperatura que maximizam os rendimentos de extração e avaliar a influência destes parâmetros na eficácia da extração supercrítica dos lípidos sintetizados pela microalga *C. cohnii*.

Assim, os fatores estudados foram a pressão e temperatura, tendo-se estabelecido para cada um limites mínimos e máximos, os quais definem o domínio experimental. Na definição do limite mínimo da temperatura pretendeu-se garantir que o solvente se encontrava no estado supercrítico, mas que se operava em condições o mais próximas possível da temperatura ambiente, de modo a minimizar o

consumo energético, logo selecionou-se o valor de 40°C. Como limite máximo optou-se pelo valor de 60°C, dado que temperaturas mais elevadas poderão promover a degradação térmica dos lípidos.

No caso da pressão selecionou-se como valor mínimo e máximo 150 e 300 bar, respetivamente. A seleção destes valores foi baseada em estudos prévios de extração supercrítica com dióxido de carbono, os quais demonstraram que valores de pressão abaixo de 150 bar resultam em rendimentos de extração muito reduzidos e valores abaixo de 300 bar garantem uma eficiente extração de compostos como lípidos. Para além disso, o valor máximo da pressão é influenciado pelas limitações do equipamento, neste caso pelo limite prático da bomba (aproximadamente 325 bar).

Com o domínio experimental definido aplicou-se a distribuição de dois fatores de Doehlert [62] para determinar as condições experimentais que teriam de ser estudadas. O planeamento consistiu em sete condições experimentais diferentes, as quais podem ser observadas na Tabela 3. Estas foram realizadas em duplicado, tendo-se obtido um total de 14 experiências. Os catorze resultados foram utilizados no tratamento estatístico de validação do planeamento de forma a obter-se um número de graus de liberdade suficiente. Nestas experiências, as respostas avaliadas foram: o rendimento em lípidos (g lípidos/100 g biomassa seca e sem cinzas); o rendimento em ADH (g ADH/100 g biomassa seca e sem cinzas) e o rendimento em ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser direcionados para a produção de biodiesel (g ácidos gordos para biodiesel/100 g biomassa seca e sem cinzas).

Tabela 3. Condições de pressão e temperatura testadas na execução do planeamento experimental, obtidas através da distribuição de dois fatores de Doehlert.

Teste	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
1	150,0	50,0
2	225,0	50,0
3	300,0	50,0
4	187,5	41,3
5	262,5	41,3
6	187,5	58,7
7	262,5	58,7

O modelo usado para expressar as respostas estudadas em todo o domínio experimental e produzir as superfícies de resposta, foi um modelo polinomial de segunda ordem:

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

Onde Y representa a resposta de cada experiência, β corresponde aos parâmetros do modelo polinomial e X é o nível do fator experimental. Neste modelo polinomial foram introduzidas representações codificadas dos níveis dos fatores experimentais, cuja determinação encontra-se descrita no Anexo C. A utilização de representações codificadas entre -1 e +1 permite utilizar no mesmo

modelo variáveis com unidades diferentes. Nesse mesmo anexo apresenta-se a descrição do cálculo matricial que permitiu estimar os parâmetros β do modelo.

Por fim, procedeu-se à validação da adequação do modelo polinomial quanto à sua representação dos conjuntos de dados, tendo sido esta efetuada através de métodos estatísticos clássicos, nomeadamente, comparando a hipótese nula com a hipótese alternativa, através do teste de Fisher de razão das variâncias [63]. Os testes envolvidos na caracterização do modelo representativo do domínio experimental foram basicamente dois: o teste estatístico para a eficácia dos parâmetros do modelo e o teste estatístico para a falta de ajuste ou desajuste do modelo. No Anexo D encontra-se a descrição dos cálculos matriciais associados às variâncias destes testes estatísticos.

2.4. Análise e quantificação de pigmentos

Para quantificar e analisar os pigmentos presentes na microalga *C. cohnii* recorreu-se ao método convencional de Soxhlet com hexano para determinar os pigmentos totais existentes na biomassa, tendo-se adotado o método descrito na secção 2.3.1. Após se sujeitar os extratos à filtração a vácuo e antes de se proceder à sua análise, o seu volume total foi medido.

Os pigmentos contidos nos extratos recolhidos foram quantificados por espectrofotometria UV/Visível, traçando o respetivo espetro entre 380 e 700 nm. O valor utilizado para a absorvidade foi de 259,2 ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$) [64], que corresponde à absorvidade do β -caroteno em hexano, ao comprimento de onda máximo de absorção. Deste modo o valor de concentração de pigmentos é expresso em equivalente de β -caroteno. O cálculo da concentração de pigmentos foi baseado na lei de Beer-Lambert, utilizando o valor de absorvância ao comprimento de onda máximo de absorção da solução de extrato (454-457 nm).

Os pigmentos presentes nos extratos foram também analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema consistiu num cromatógrafo líquido Hewlett Packard Series 1100, com um detetor UV-Vis ajustado para 457 nm (comprimento de onda máximo de absorção dos extratos). Recorreu-se a uma coluna de fase reversa, C18-Vydac 201 TP54 (250x4,6 mm). A eluição aplicada foi do tipo isocrática, sendo o eluente uma mistura de acetonitrilo e metanol (10:90 v/v, respetivamente) bombeada a um caudal de 1 mL/min. O β -caroteno nos extratos foi identificado por comparação com o tempo de retenção do composto padrão da CalBiochem. Dos restantes pigmentos detetados nos cromatogramas foi possível identificar a presença de γ -caroteno, tendo em consideração os dados existentes na literatura para os carotenoides presentes nesta microalga [65], bem como por comparação com os dados da literatura para este carotenoide em análises cromatográficas [66].

Foi também realizada uma análise dos extratos por cromatografia de camada fina, de forma a obter uma melhor identificação dos pigmentos nos extratos. Para tal usaram-se placas preparadas com sílica Gel-60G (Merck) que foram ativadas a 80°C durante 2 horas, previamente à análise. O eluente consistiu numa mistura de éter de petróleo (40-60°C), acetona e dietilamina na razão 10:4:1 (v/v/v), respetivamente. A revelação das placas foi feita por observação direta das diferentes bandas de cores obtidas, bem como por revelação sob luz a 254 e a 366 nm.

2.5. Fórmulas

Abaixo estão descritas todas as fórmulas usadas neste estudo.

2.5.1. Concentração de azoto no meio de cultura

A concentração de azoto existente no meio de cultura num determinado instante foi determinada através da Equação 2, onde K representa um fator de correção que toma o valor 0,14, $V_{titulante}$ é o volume da solução titulante, HCl, usada, F_{conv} é o fator de conversão de azoto para proteína, cujo valor é igual a 1 e, por fim, $m_{amostra}$ representa a massa de sobrenadante introduzida no tubo de digestão.

$$\text{Concentração de azoto (g/L)} = \frac{K \times (V_{titulante}) (mL)}{m_{amostra} (g)} \times F_{conv} \quad (2)$$

2.5.2. Teor de humidade e cinzas

O teor de humidade da biomassa liofilizada foi determinado através da Equação 3, onde $m_{biomassa}$ representa o peso da biomassa liofilizada introduzida no cadinho antes da secagem na estufa a 100°C e $m_{biomassa \text{ após secagem}}$ corresponde ao peso desta biomassa após ter permanecido na estufa a 100°C por 12 horas. Para determinar o valor de $m_{biomassa \text{ após secagem}}$ foi necessário descontar o valor correspondente ao peso do cadinho registado previamente.

$$\text{Teor de humidade (\% m/m)} = \frac{m_{biomassa} (g) - m_{biomassa \text{ após secagem}} (g)}{m_{biomassa} (g)} \times 100\% \quad (3)$$

O teor de cinzas da biomassa liofilizada foi determinado através da Equação 4, onde $m_{cadinho \text{ com cinzas}}$ representa o peso do cadinho com a matéria inorgânica que restou após a biomassa ter permanecido na mufla a 550°C durante 5 horas, $m_{cadinho}$ é o peso do cadinho vazio registado previamente e $m_{biomassa \text{ seca}}$ corresponde ao peso da biomassa inicial a esta determinação, isto é, é a biomassa após determinação do teor de humidade e que foi introduzida no cadinho tarado para determinação do conteúdo em cinzas.

$$\text{Teor de cinzas (\% m/m)} = \frac{m_{cadinho \text{ com cinzas}} (g) - m_{cadinho} (g)}{m_{biomassa \text{ seca}} (g)} \times 100\% \quad (4)$$

2.5.3. Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento (μ) é definida como a taxa de aumento da biomassa de uma população celular por unidade de concentração de biomassa. Esta taxa pode ser calculada a partir da Equação 5, a qual é válida para a fase exponencial onde o logaritmo natural da concentração de biomassa ao longo do tempo pode ser ajustado por uma linha reta. Na Equação 5 X representa a concentração de biomassa (em base seca) num dado instante, X_0 é a concentração de biomassa no instante inicial da fermentação e t é o tempo.

$$\ln(X) = \mu \times t + \ln(X_0) \quad (5)$$

No Anexo E pode-se observar o gráfico com os dados experimentais correspondentes à fase exponencial, a partir dos quais se determinou a taxa específica de crescimento.

2.5.4. Produtividade em biomassa

A produtividade volumétrica em biomassa, P_X , num determinado instante t foi calculada através da Equação 6, onde X representa a concentração de biomassa (em base seca) num determinado instante, t_0 é o tempo inicial e t é o tempo. O valor de produtividade apresentado foi calculado com a concentração final de biomassa.

$$P_X = \frac{X(t) - X(t_0)}{t - t_0} \quad (6)$$

2.5.5. Análise dos ácidos gordos

A massa de um determinado ácido gordo identificado no cromatograma, m_{AGi} , foi determinada através da Equação 7, onde $A_{pico\ AGi}$ corresponde ao pico registado no cromatograma para o ácido gordo em causa, $F_{resposta}$ representa o fator de resposta do respetivo ácido gordo e $A_{padrão}$ é a área do pico correspondente ao padrão interno, o ácido heptadecanóico.

$$m_{AGi} (mg) = \frac{A_{pico\ AGi} (\mu V. \min) \times F_{resposta}}{A_{padrão} (\mu V. \min)} \quad (7)$$

O teor relativo de cada ácido gordo, AG_i/AGT (% m/m), foi calculado através da Equação 8, onde $\sum m_{AGi}$ representa o somatório das massas de cada ácido gordo identificado no respetivo cromatograma, a qual foi determinada pela Equação 7.

$$AG_i/AGT (\% m/m) = \frac{m_{AGi} (mg)}{\sum m_{AGi} (mg)} \times 100\% \quad (8)$$

Os conteúdos de ácidos gordos, T_{AG} , e ADH, T_{ADH} , na biomassa foram determinados através das Equações 9 e 10, respetivamente. Nestas equações m_{bio} representa a massa de microalga usada na determinação do conteúdo de ácidos gordos em base seca e sem cinzas e m_{ADH} corresponde à massa de ácido docosahexaenóico determinada através da Equação 7.

$$T_{AG} (\% m/m) = \frac{\sum m_{AGi} (mg)}{m_{bio} (mg)} \times 100\% \quad (9)$$

$$T_{ADH} (\% m/m) = \frac{m_{ADH} (mg)}{m_{bio} (mg)} \times 100\% \quad (10)$$

As concentrações volumétricas de ácidos gordos, C_{AG} , e ADH, C_{ADH} , foram calculadas através das Equações 11 e 12, respetivamente, onde X representa a concentração de biomassa (em base seca) no instante t e T_{AG} e T_{ADH} são os teores de ácidos gordos totais e ADH, respetivamente, existentes na biomassa no mesmo instante t .

$$C_{AG} (g/L) = X(t) \times T_{AG}(t) \quad (11)$$

$$C_{ADH} (g/L) = X(t) \times T_{ADH}(t) \quad (12)$$

2.5.6. Rendimentos

O rendimento em lípidos foi determinado a partir da Equação 13, onde $m_{\text{lípidos}}$ representa a massa total de lípidos extraídos durante o processo de extração supercrítica, a qual corresponde à soma da massa de lípidos recuperada nos quatro extratos recolhidos e $m_{\text{biomassa na célula}}$ corresponde à massa de microalga colocada no interior da célula de extração em base seca e sem cinzas.

$$\text{Rendimento em lípidos (g/100 g biomassa)} = \frac{m_{\text{lípidos}}}{m_{\text{biomassa na célula}}} \times 100 \quad (13)$$

O rendimento em ADH foi determinado através da Equação 14, onde m_{ADH} representa a massa total de ácido docosahexaenóico extraída durante o processo de extração supercrítica, isto é, corresponde ao somatório das massas de ADH recuperadas nos quatro extratos recolhidos, tendo sido estas calculadas com o auxílio da Equação 7.

$$\text{Rendimento em ADH (g/100 g biomassa)} = \frac{m_{\text{ADH}}}{m_{\text{biomassa na célula}}} \times 100 \quad (14)$$

O rendimento em ácidos gordos para biodiesel foi calculado a partir da Equação 15, onde $m_{\text{AG biodiesel}}$ representa a massa total de ácidos gordos saturados e monoinsaturados identificados nos cromatogramas que podem ser direcionados para a produção de biodiesel. Os ácidos gordos considerados para a produção de biodiesel foram: ácido cáprico (10:0), ácido láurico (12:0), ácido mirísitico (14:0), ácido miristoleico (14:1), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1 ω -9), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1 ω -9), ácido araquidónico (20:0) e ácido beénico (22:0). A massa total destes ácidos gordos é obtida através do somatório das massas destes ácidos gordos recuperados nos quatro extratos recolhidos, tendo sido estas calculadas com o auxílio da Equação 7.

$$\text{Rendimento em AG para biodiesel (g/100 g biomassa)} = \frac{m_{\text{AG biodiesel}}}{m_{\text{biomassa na célula}}} \times 100 \quad (15)$$

2.5.7. Recuperação de lípidos (Soxhlet)

A recuperação de lípidos calculada no contexto do método de Soxhlet tem como objetivo permitir a comparação da massa de lípidos recuperada no processo de extração supercrítica com a quantidade extraída no método convencional de Soxhlet. Assim, esta recuperação foi calculada através da Equação 16, onde $m_{\text{lípidos ESC}}$ representa a massa total de lípidos recuperada durante a extração supercrítica, a qual corresponde ao somatório da quantidade obtida em cada extrato recolhido e $m_{\text{lípidos estimados}}$ é a estimativa da massa de lípidos existente na quantidade de microalga introduzida na célula de extração, a qual é calculada com base no rendimento em lípidos obtido no método de Soxhlet.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{m_{\text{lípidos ESC}}}{m_{\text{lípidos estimados}}} \times 100\% \quad (16)$$

O rendimento em lípidos obtido no método convencional de Soxhlet foi determinado através da Equação 17, onde $m_{\text{lípidos Soxhlet}}$ representa a massa de lípidos extraída durante a duração do método de Soxhlet, a qual foi determinada gravimetricamente, e $m_{\text{biomassa no cartucho}}$ corresponde à massa de microalga colocada no interior do cartucho em base seca e sem cinzas.

$$\text{Rendimento Soxhlet (g lípidos/100 g biomassa)} = \frac{m_{\text{lípidos Soxhlet}}}{m_{\text{biomassa no cartucho}}} \times 100 \quad (17)$$

2.5.8. Recuperações (fracionamento)

Para determinar as condições operatórias dos procedimentos que possibilitam a realização do fracionamento do óleo extraído da microalga *C. cohnii*, foi necessário calcular os valores das recuperações de lípidos, de ADH e de ácidos gordos para biodiesel obtidos para diferentes tempos de extração – 30 minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas – para todas as condições de pressão e temperatura testadas no planeamento experimental.

A recuperação de lípidos foi calculada através da Equação 18, onde $r_{\text{lípidos}}$ representa o rendimento em lípidos obtido ao fim de um certo tempo de extração em determinadas condições de pressão e temperatura testadas experimentalmente. O rendimento obtido ao fim de um determinado tempo de extração foi calculado com o auxílio da Equação 13. Para além disso, $\overline{r_{\text{máx,lípidos}}}$ corresponde ao valor médio do rendimento em lípidos total obtido nas condições de pressão e temperatura testadas experimentalmente que maximizaram esse rendimento.

$$\text{Recuperação de lípidos (\%)} = \frac{r_{\text{lípidos}}}{\overline{r_{\text{máx,lípidos}}}} \times 100\% \quad (18)$$

A recuperação de ADH foi calculada através da Equação 19, onde r_{ADH} representa o rendimento em ADH obtido ao fim de um certo tempo de extração em determinadas condições de pressão e temperatura testadas experimentalmente. O rendimento obtido ao fim de um determinado tempo de extração foi calculado com o auxílio da Equação 14. Para além disso, $\overline{r_{\text{máx,ADH}}}$ corresponde ao valor médio do rendimento em ADH total obtido nas condições de pressão e temperatura testadas experimentalmente que maximizaram esse rendimento.

$$\text{Recuperação de ADH (\%)} = \frac{r_{\text{ADH}}}{\overline{r_{\text{máx,ADH}}}} \times 100\% \quad (19)$$

A recuperação de ácidos gordos para biodiesel foi calculada através da Equação 20, onde $r_{\text{AG biodiesel}}$ representa o rendimento em ácidos gordos para biodiesel obtido ao fim de um certo tempo de extração em determinadas condições de pressão e temperatura testadas experimentalmente. O rendimento obtido ao fim de um determinado tempo de extração foi calculado com o auxílio da Equação 15. Para além disso, $\overline{r_{\text{máx,AG biodiesel}}}$ corresponde ao valor médio do rendimento em ácidos gordos para biodiesel total obtido nas condições de pressão e temperatura testadas experimentalmente que maximizaram esse rendimento.

$$\text{Recuperação de AG p/biodiesel (\%)} = \frac{r_{\text{AG biodiesel}}}{\overline{r_{\text{máx,AG biodiesel}}}} \times 100\% \quad (20)$$

2.5.9. Concentração e massa de pigmentos

A quantidade de pigmentos obtida em cada ensaio de extração supercrítica é dada pelo somatório dos pigmentos obtidos em cada extrato recolhido ao longo das três horas de extração.

Para determinar a quantidade de pigmento de cada extrato analisou-se por espectrofotometria a solução de recolha (solução de lavagem do tubo em U e do seu enchimento, da válvula de três vias e da tubagem adjacente) e utilizou-se a lei de Beer-Lambert para calcular a concentração da solução e consequentemente a massa de pigmentos. A lei de Beer-Lambert apresenta-se na Equação 21, onde A representa a absorvância da solução de recolha ao comprimento de onda do máximo de absorção do composto, l é o percurso ótico, ε é a absortividade do composto e C é a concentração do composto na solução.

$$A = \varepsilon \times C \times l \quad (21)$$

De forma a simplificar os cálculos e por que se estava na presença de uma mistura de pigmentos (β -caroteno, γ -caroteno e outros carotenóides), tratou-se a mistura como se fosse apenas β -caroteno (dado que era um dos principais pigmentos na mistura) e desta forma os resultados obtidos são em equivalentes de β -caroteno. Assim, o valor utilizado para a absortividade foi o da literatura para o β -caroteno em n-hexano, 259,2 (L.g⁻¹.cm⁻¹). O valor do percurso ótico, l , é 1 cm e a concentração da solução (g/L), em equivalentes de β -caroteno, é calculada pela Equação 21, sendo a massa de pigmentos em cada extrato (em equivalentes de β -caroteno) calculada com base no volume de solução de recolha do mesmo.

3. Resultados e Discussão

3.1. Fermentação da *Cryptocodinium cohnii*

3.1.1. Análise do crescimento celular

A evolução da concentração de biomassa (em base seca) ao longo do tempo da fermentação encontra-se ilustrada na Figura 11. O cálculo da concentração de biomassa é descrito no Anexo F.

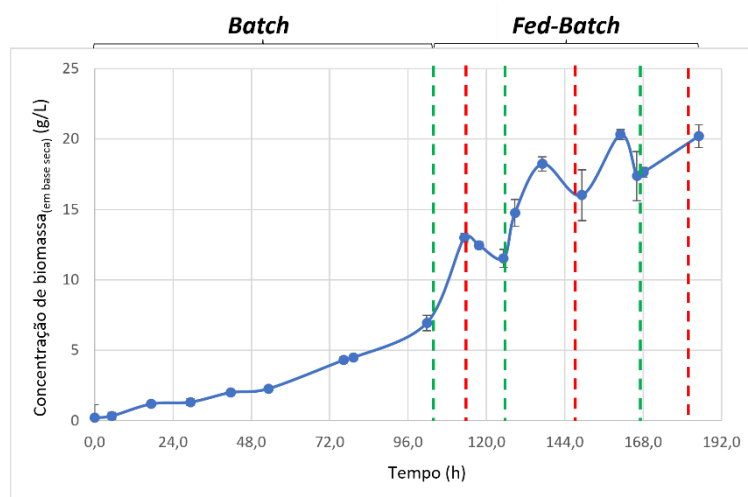


Figura 11. Evolução da concentração de biomassa (em base seca) ao longo do tempo de fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.

Ao analisar a Figura 11 verifica-se que no instante final do regime de cultura *batch* (101 horas e 45 minutos) a concentração de biomassa no meio de cultura é apenas 6,9 g/L. Neste período do crescimento celular as concentrações da fonte de carbono e de azoto no meio de cultura são reduzidas, aproximadamente 10,85 e 0,18 g/L, respetivamente, como se pode observar nas Figuras 12 e 13. Face à baixa disponibilidade destes nutrientes, as células iriam esgotar as reservas de energia, os lípidos, ou seja, entrar-se-ia na fase estacionária da proliferação celular, a qual culmina eventualmente na morte celular e na diminuição da concentração de biomassa no meio.

Assim, com o objetivo de prolongar a fase exponencial e aumentar a concentração de biomassa final obtida, introduziu-se no reator uma solução concentrada do meio de cultura através do uso de uma bomba peristáltica, iniciando-se deste modo o regime de cultura *fed-batch*. As três adições do meio de cultura concentrado encontram-se representadas nas Figuras 11, 12 e 13 através da ilustração da abertura e fecho da alimentação conectada à bomba peristáltica. A alimentação da solução concentrada do meio de cultura foi iniciada nos instantes em que se registou uma diminuição do valor da densidade ótica, o que se traduz na redução da concentração de biomassa na Figura 11.

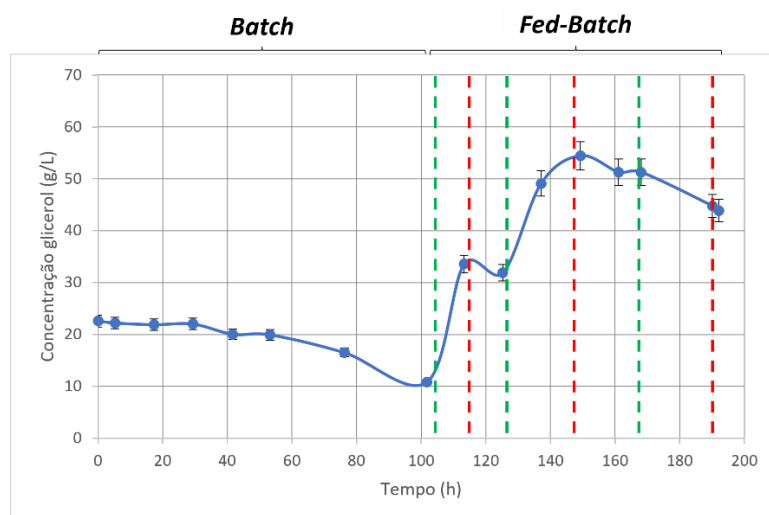


Figura 12. Evolução da concentração da fonte de carbono, glicerol bruto, ao longo do tempo de fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.

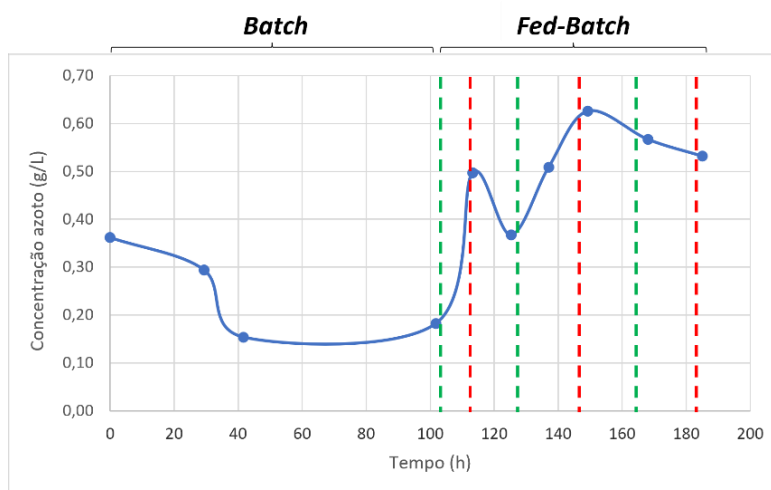


Figura 13. Evolução da concentração de azoto ao longo do tempo de fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.

Após 160 horas de fermentação nota-se que a concentração de biomassa atinge um patamar, dado que os seus valores rondam os 20 g/L, tendo a cultura atingido a fase estacionária do crescimento celular. Deste modo, terminou-se a fermentação após 185 horas, obtendo-se uma concentração final de biomassa de 20,2 g/L. A produtividade média em biomassa (P_x) foi calculada nesse instante, tendo-se obtido o valor de 0,108 g/L.h.

Os valores obtidos nesta cultura *fed-batch* com glicerol bruto são ligeiramente inferiores aos reportados por Safdar *et al.* (2017) no seu estudo de produção da microalga *C. cohnii* ATCC 30555 num bioreator à escala laboratorial de 3 L, com um meio de cultura contendo glucose como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de azoto [67]. Nestas condições, Safdar *et al.* (2017) obtiveram uma concentração máxima de biomassa igual a 23,7 g/L e uma produtividade em biomassa de 0,213 g/L.h [67]. Estes resultados podem indicar que a glucose é uma fonte de carbono mais interessante ao crescimento celular da microalga *C. cohnii* em comparação com o glicerol bruto,

contudo o uso de uma estirpe de microalga e fonte de azoto distintas não permitem assegurar a veracidade dessa afirmação. O facto de a concentração e produtividade em biomassa deste estudo serem inferiores às da fermentação com glucose também pode ser justificado pelo facto de o glicerol bruto conter impurezas que podem inibir o metabolismo das células, impedindo o seu crescimento.

De Swaaf *et al.* (2003) reportaram uma concentração final de biomassa de 83 e 109 g/L quando procederam à realização da cultura *fed-batch* da mesma estirpe de microalga, mas recorrendo a etanol [68] e ácido acético puro [69] como fonte de carbono, respetivamente. Tendo em consideração que o valor obtido na fermentação *fed-batch* com glicerol bruto é significativamente inferior aos valores reportados por de Swaaf *et al.* (2003), é possível afirmar que o etanol e ácido acético podem ser fontes de carbono mais adequadas à promoção da proliferação celular da microalga em estudo.

Embora as fontes de carbono puras como a glucose, ácido acético e etanol permitirem obter concentrações e produtividades em biomassa mais elevadas em comparação com o glicerol bruto, estes substratos são demasiado caros para serem usados à escala industrial (glucose 16 €/kg; etanol 1,82 €/kg; ácido acético 0,45 €/kg, www.alibaba.com). Para além disso, o etanol e ácido acético são compostos perigosos e por isso o seu manuseamento e transporte são mais complexos. Assim, ao utilizar glicerol bruto, um subproduto industrial, como fonte de carbono é possível tornar o processo de produção da microalga mais sustentável a nível ambiental, respeitando-se as regras da economia circular e reduzir os custos do processo, dado que a fonte de carbono é o composto mais dispendioso do meio de cultura da fermentação.

Relativamente aos parâmetros relacionados com o crescimento celular, foi possível calcular a taxa específica de crescimento com os dados da fase exponencial, tendo-se obtido o valor de $(0,023 \pm 0,002) \text{ h}^{-1}$. Este resultado é da mesma ordem de grandeza dos valores relatados em outros estudos para a *C. cohnii*, tanto para esta como para outras estirpes. Safdar *et al.* (2017) reportaram taxas específicas de crescimento entre 0,022 e $0,037 \text{ h}^{-1}$ [67], na cultura *batch* com glucose e nitrato de sódio, enquanto de Swaaf *et al.* (2003) obtiveram uma taxa de $0,047 \text{ h}^{-1}$ [68] na fermentação *fed-batch* com etanol. As diferenças entre os valores podem ser atribuídas a variações nos meios de crescimento, ou, mais provavelmente, nas diferentes estirpes utilizadas.

3.1.2. Perfil de ácidos gordos da *C. cohnii*

Ao longo do regime *fed-batch* determinou-se o teor de ácidos gordos da biomassa recolhida para análise, tendo-se identificado, com o auxílio de padrões adequados, 11 ácidos gordos distintos como se pode observar na Tabela 4. Para além desses 11 ácidos gordos, outros picos foram registados nos cromatogramas, contudo estes foram detetados em quantidades vestigiais ou encontram-se ausentes em algumas análises, logo foram agrupados e categorizados como “outros”.

Na Tabela 4 apresentam-se os ácidos gordos detetados no instante em que o conteúdo de ácidos gordos totais (AGT) atingiu o seu valor máximo, 27,6% (m/m_{biomassa seca e sem cinzas}), ou seja, no instante final do regime de cultura *batch* (101 horas e 45 minutos). Note-se que apesar de as percentagens apresentadas serem válidas para o instante em que se atingiu o valor máximo do conteúdo de ácidos

gordos, as mesmas não divergem significativamente nas restantes análises efetuadas para outros instantes da fermentação.

*Tabela 4. Composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtida para o instante final do regime de cultura batch da microalga *C. cohnii* ATCC 30772, no qual se registou o valor máximo do conteúdo de ácidos gordos totais, 27,6% (m/m_{biomassa seca e sem cinzas}). Os dados apresentados correspondem à média de duas análises da biomassa recolhida nesse instante.*

Tempo (h)		101,75
Ácido gordo		% (m/m AGT)
Cáprico	10:0	1,22 ± 0,01
Láurico	12:0	9,20 ± 0,09
Mirístico	14:0	20,16 ± 0,14
Miristoleico	14:1	1,57 ± 0,02
Palmítico	16:0	16,20 ± 0,02
Palmitoleico	16:1 ω-9	4,72 ± 0,03
Esteárico	18:0	0,71 ± 0,01
Oleico	18:1 ω-9	13,19 ± 0,12
Linoleico	18:2 ω-6	1,62 ± 0,01
α-Linolénico	18:3 ω-3	0,17 ± 0,00
Docosahexaenóico	22:6 ω-3	30,41 ± 0,32
Outros		0,85
Saturados		47,48
Polinsaturados (2 ou mais ligações duplas)		32,19
Monoinsaturados (1 ligação dupla)		19,48

Ao analisar a Tabela 4 constata-se que o ácido gordo mais abundante é o ácido docosahexaenóico com um conteúdo relativamente aos ácidos gordos totais de 30,41% (m/m AGT). Os outros ácidos gordos maioritários, com um conteúdo próximo ou superior a 10% (m/m AGT), são o ácido láurico (12:0), o ácido mirístico (14:0), o ácido palmítico (16:0) e o ácido oleico (18:1 ω-9). Estas observações estão em conformidade com as conclusões de outros autores [11] [67].

Tal como notado em outros estudos, o ácido docosahexaenóico é o único ácido gordo polinsaturado presente numa quantidade significativa, dado que os outros ácidos gordos pertencentes a este grupo possuem um conteúdo aproximadamente igual ou inferior a 1% (m/m AGT), o que torna a purificação do ADH mais simples.

Ao analisar a Tabela 4 também é possível constatar que os ácidos gordos saturados e monoinsaturados correspondem a cerca de 67% dos ácidos gordos totais, o que sugere que a microalga *C. cohnii* pode ser considerada como uma potencial fonte de óleo para a produção de biodiesel.

A Figura 14 contém a distribuição dos principais ácidos gordos presentes na microalga *C. cohnii* em dois períodos distintos do crescimento celular: fase exponencial e fase estacionária. O teor de ácidos gordos não foi analisado nas amostras recolhidas durante a fase lag, pois tipicamente a acumulação de lípidos não se inicia nesta fase do crescimento celular.

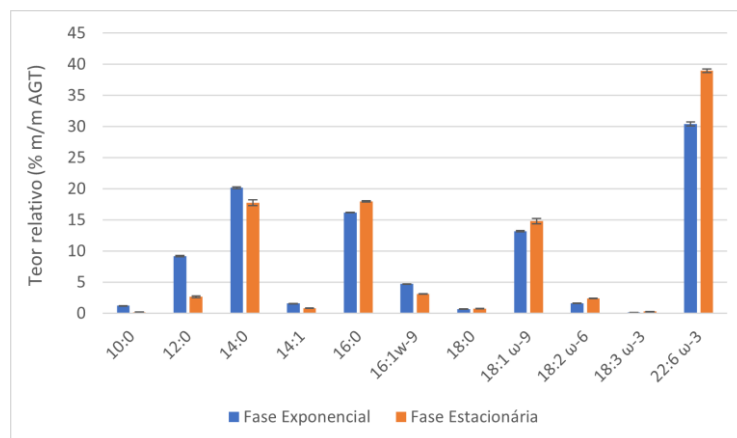


Figura 14. Representação gráfica da composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtida durante a fase exponencial e estacionária. A fase exponencial é ilustrada pelo perfil obtido no instante 101 horas e 45 minutos, enquanto o perfil após 185 horas foi selecionado para representar a fase estacionária.

Ao comparar os perfis de ácidos gordos da fase exponencial e estacionária verifica-se que o conteúdo do ácido cáprico (10:0), ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0) e ácido palmitoleico (16:1 ω-9) diminui da fase exponencial para a fase estacionária, enquanto o conteúdo de ADH e outros ácidos gordos polinsaturados aumenta. Estas observações estão em conformidade com o constatado por Safdar *et al.* (2017) [67]. Esta diferença pode ser justificada pelo facto de os ácidos gordos polinsaturados serem sintetizados a partir dos ácidos gordos saturados e monoinsaturados pela atividade das enzimas *desaturases* e *elongases*, as quais vão catalisar a introdução de ligações duplas na cadeia alifática e a alongação da cadeia do ácido gordo, respetivamente. Assim, é esperado que o aumento do teor relativo de ácidos gordos polinsaturados, como o ADH, resulte na redução do conteúdo de ácidos gordos saturados e monoinsaturados.

A comparação dos perfis obtidos neste estudo com os descritos na literatura resulta em observações notáveis. Em todos os perfis o ADH é consistentemente o ácido gordo mais abundante, alcançado no estudo de Silva *et al.* (2007) um teor de aproximadamente 50% relativamente ao total dos ácidos gordos [11]. Contudo os níveis dos restantes lípidos divergem ao longo dos diversos estudos. O ácido esteárico (18:0) apresenta um teor reduzido (no máximo 5% [67]) no perfil obtido por Safdar *et al.* (2017) e ainda mais diminuto neste estudo, com um nível inferior a 1% (m/m AGT). Por outro lado, a sua presença é mais considerável no ensaio de Silva *et al.* (2007), alcançado um teor de aproximadamente 8% [11].

Outra observação interessante trata-se do caso dos ácidos gordos palmitoleico (16:1 ω-9) e linoleico (18:2 ω-6), os quais apresentam um conteúdo relativamente ao total de ácidos gordos superior a 5% no estudo de Safdar *et al.* (2017) [67], em oposição ao que se observa neste estudo (máximo de 4,7 e 3,0% (m/m AGT) para o ácido palmitoleico e linoleico, respetivamente). É de notar também o caso

do ácido docosapentaenóico (22:5 ω -3), o qual está presente no perfil obtido no ensaio de Silva *et al.* (2007) [11], mas ausente neste estudo e na obra de Safdar *et al.* (2017) [67].

Estas observações permitem concluir que o perfil de ácidos gordos da microalga *C. cohnii* é altamente variável e depende de fatores como a estirpe utilizada, a composição do meio de cultura em termos da fonte de carbono e de azoto e a fase do crescimento em que as células se encontram.

3.1.3. Conteúdo de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo

A Figura 15 apresenta o conteúdo de ácidos gordos e ADH na biomassa (como % $m/m_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$) ao longo do tempo da fermentação. Em cada análise do conteúdo de ácidos gordos, determinou-se o teor de humidade e cinzas da biomassa a ser analisada, de modo a proceder-se à correção da massa de microalga para uma base seca e sem cinzas.

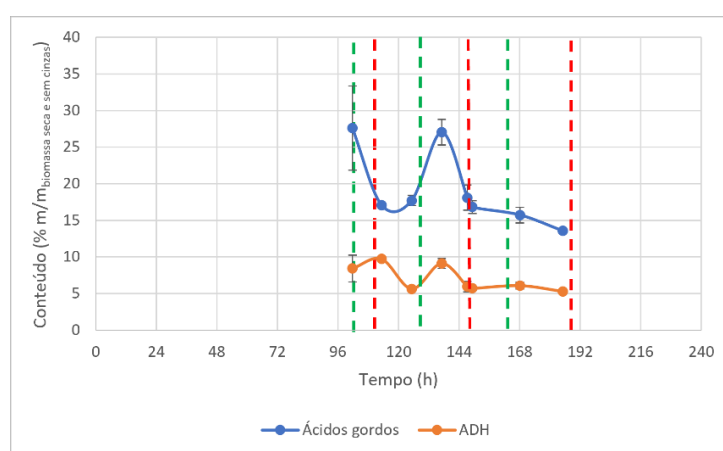


Figura 15. Evolução do conteúdo de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo da fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.

O teor de ácidos gordos na biomassa é máximo no instante 101 horas e 45 minutos, isto é, no final do regime de cultura *batch*, obtendo-se o valor 27,6% ($m/m_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$), o qual é comparável ao máximo obtido por Safdar *et al.* (2017), 26,9% ($m/m_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$) [67]. Ao analisar a evolução do conteúdo de ácidos gordos na biomassa, verifica-se que o mesmo diminui nos instantes seguintes ao fim do regime de cultura *batch*, o que se deve à baixa disponibilidade de glicerol e azoto no meio de cultura, implicando a utilização das reservas de energia, os lípidos intracelulares, para a sobrevivência e desenvolvimento das células. Com a alimentação da solução concentrada do meio de cultura, o teor de ácidos gordos na biomassa volta a aumentar, aproximando-se do valor máximo registado.

Após 140 horas de fermentação, constata-se que o conteúdo de ácidos gordos diminui progressivamente, alcançando os 13,5% ($m/m_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$) às 185 horas¹. Esta redução do teor

¹ Face ao confinamento obrigatório que ocorreu entre 21 de janeiro e 19 de abril deste ano, o trabalho laboratorial foi interrompido após a conclusão da fermentação, tendo sido retomado após o término do confinamento. Assim, optou-se por caracterizar novamente o teor de ácidos gordos da biomassa, de modo a averiguar se a mesma teria sofrido degradação durante o seu armazenamento. A transmetilação da biomassa revelou que o conteúdo relativo de cada ácido gordo permaneceu inalterado, todavia o teor de ácidos gordos totais diminuiu de 13,5 para 11,0% ($m/m_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$) (valor médio da análise em triplicado). Esta redução de 18,5% do teor de ácidos gordos comprova que a biomassa sofreu alguma degradação durante o seu armazenamento, contudo a inalteração do perfil de ácidos gordos demonstra que a degradação afetou cada ácido gordo na mesma proporção.

de ácidos gordos é observada apesar de se realizar uma última adição da solução concentrada do meio de cultura e se verificar a existência de glicerol e azoto no meio, como se pode observar nas Figuras 12 e 13. Esta observação está em concordância com o facto de o crescimento celular ter atingido a fase estacionária, a qual é caracterizada, entre outros fatores, pelo uso dos lípidos intracelulares como fonte de energia.

As observações verificadas para a evolução do conteúdo de ácidos gordos ao longo do tempo são semelhantes para o teor de ADH na biomassa, tendo-se registado o valor máximo de 9,73% ($m/m_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$), às 113 horas e 15 minutos.

3.1.4. Concentração de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo

Na Figura 16 encontra-se representada a evolução da concentração de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo da fermentação.

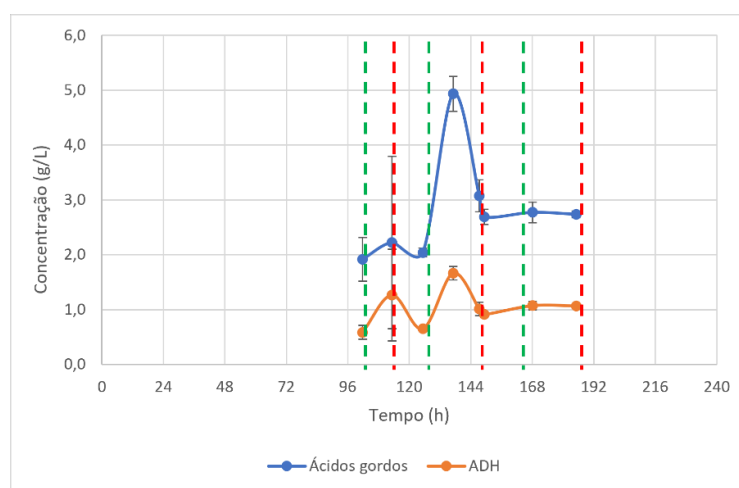


Figura 16. Evolução da concentração de ácidos gordos e ADH ao longo do tempo da fermentação. As linhas a tracejado verdes e vermelhas representam a abertura e fecho, respetivamente, da alimentação conectada à bomba peristáltica a qual permite introduzir a solução concentrada (10x) do meio de cultura para o interior do reator.

Em oposição ao conteúdo de ácidos gordos, a sua concentração é afetada pela concentração de biomassa, pelo que um teor mais elevado de ácidos gordos pode não refletir uma concentração mais elevada no meio. Isto foi observado tanto para o caso dos ácidos gordos, assim como para o ADH. Tanto a concentração de ácidos gordos como a de ADH registaram o seu máximo após 137 horas de fermentação, alcançando os 4,94 e 1,67 g/L, respetivamente.

A concentração de ADH obtida neste estudo é significativamente inferior aos valores reportados por de Swaaf *et al.* (2003) na sua cultura *fed-batch* com etanol [68] e ácido acético puro [69] (11,7 e 19 g/L, respetivamente), o que se enquadra com a observação de a concentração de biomassa ser muito mais elevada nesses ensaios em comparação com o presente estudo.

3.2. Método de extração de Soxhlet

A extração de Soxhlet com hexano foi aplicada na recuperação dos lípidos sintetizados pela microalga *C. cohnii*, de modo a ser possível comparar este processo de extração convencional com o processo “verde” da extração supercrítica. Neste método foi realizada a extração da biomassa

microalgal liofilizada e moída e os extratos obtidos foram analisados por gravimetria e por cromatografia gás-líquido (GC), tendo sido possível determinar o rendimento em lípidos totais, em ADH, em ácidos gordos totais e em ácidos gordos para biodiesel (secção 2.5.5 e 2.5.6). Para além disso, determinou-se também os perfis de ácidos gordos do extrato lipídico de Soxhlet. Na Tabela 5 apresentam-se os rendimentos em lípidos, em ADH e em ácidos gordos para biodiesel obtidos no processo de Soxhlet.

Nota: A extração por Soxhlet foi realizada várias vezes ao longo do tempo (de abril a setembro) com o intuito de verificar se a composição da fração lipídica da biomassa se mantinha inalterada, não sofrendo degradação durante o seu armazenamento. Por este motivo, apresenta-se na Tabela 5 e na Figura 17 os resultados desta análise ao longo do tempo.

Tabela 5. Rendimentos de extração em lípidos, em ADH e em ácidos gordos para biodiesel obtidos nos ensaios de extração de Soxhlet com os respetivos desvios padrão. Os valores a vermelho foram desprezados para o cálculo do valor médio.

Ensaio	Rendimento em lípidos (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Desvio padrão	Rendimento em ADH (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Desvio padrão	Rendimento em AG p/ biodiesel (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Desvio padrão
Abril	17,34	0,35	2,55	0,02	3,66	0,01
	18,04		2,50		3,64	
Agosto	17,18	0,08	2,00	0,39	4,85	0,33
	17,35		2,77		4,18	
Setembro	16,25	0,08	2,57	0,02	4,49	0,03
	16,09		2,53		4,56	
Média	16,84	0,55	2,49	0,23	4,52	0,24

Ao observar os valores obtidos para os rendimentos de extração e para os respetivos desvios padrão de cada ensaio é possível afirmar que, de uma maneira geral, os duplicados estão concordantes entre si, uma vez que a maioria dos desvios padrão se encontra abaixo de 0,1. As únicas exceções são verificadas para o rendimento em lípidos do ensaio de abril e para os rendimentos em ADH e em ácidos gordos para biodiesel do ensaio de agosto, onde os valores dos desvios padrão estão acima de 0,30. A maior discrepância entre estes duplicados poderá dever-se à degradação dos ácidos gordos durante as manipulações efetuadas na determinação do seu teor, o que afeta diretamente o cálculo do rendimento em ADH e em ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser direcionados para a produção de biodiesel.

Comparando os rendimentos em lípidos obtidos nos ensaios de abril e agosto verifica-se que estes são semelhantes. Nesta comparação desprezou-se o valor 18,04 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas} assinalado a vermelho dado que se notou a existência de pequenas partículas em suspensão no extrato, após a secagem, durante a recolha do mesmo para a posterior análise dos ácidos gordos. Estas partículas poderão corresponder a biomassa residual que não ficou retida nas etapas de filtração, prévias à

secagem, e que pela sua presença no extrato seco conduzem a um valor sobrestimado da massa de extrato e por conseguinte um rendimento de extração acima do real.

Porém, os rendimentos de extração em lípidos obtidos no ensaio de setembro estão ligeiramente abaixo dos valores alcançados em abril e agosto (redução em menos de 10%).

Assim, obteve-se um rendimento médio em lípidos para o método convencional de Soxhlet igual a 16,84 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}. No estudo de Couto *et al.* (2010) mencionado anteriormente (secção 1.3.2.10) é reportado um rendimento de extração de lípidos igual a 19,9% (m/m) para a extração da estirpe de *C. cohnii* CCMP 316 com o método convencional de Bligh and Dyer. Por outro lado, de acordo com os dados reportados na literatura, esta microalga pode apresentar um conteúdo de ácidos gordos nos lípidos de aproximadamente 70%, o que permite, com base nos resultados apresentados na secção 3.1.3, estimar que a biomassa terá 19,3 g_{lípidos totais}/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}. Deste modo, verifica-se que o rendimento médio em lípidos obtido neste estudo se encontra próximo do valor esperado para o conteúdo em lípidos desta microalga, demonstrando-se que o método de extração de Soxhlet com hexano apresenta uma elevada eficiência para este tipo de lípidos e biomassa.

No que diz respeito ao rendimento em ADH, os valores obtidos nos três ensaios são semelhantes entre si, existindo uma maior diferença nos valores obtidos em agosto. Todavia essa diferença não é significativa o suficiente para se desprezar estes valores. Deste modo, o rendimento médio em ADH do método de extração de Soxhlet toma o valor 2,49 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}.

Relativamente ao rendimento em ácidos gordos para biodiesel, os valores obtidos em agosto e setembro estão próximos, mas os de abril estão ligeiramente abaixo (redução em aproximadamente 19,3%). Esta diferença pode se dever à degradação do óleo extraído durante as manipulações efetuadas na determinação do teor de ácidos gordos, resultando em valores subestimados para as massas de ácidos gordos que podem ser direcionados para a produção de biodiesel. Assim, os valores correspondentes ao ensaio de abril foram desprezados no cálculo do valor médio deste rendimento, obtendo-se um valor igual a 4,52 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}.

3.2.1. Perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos do óleo extraído pelo método convencional de Soxhlet foi analisado por cromatografia gás-líquido e na Figura 17 podem ser observados os teores relativos dos ácidos gordos mais importantes identificados nos respetivos cromatogramas para os ensaios efetuados ao longo do tempo. Nesses cromatogramas foram registados outros picos para além dos correspondentes aos ácidos gordos apresentados na Figura 17, tendo sido estes agrupados como “outros”. No entanto, estes picos foram desprezados na análise do perfil de ácidos gordos do óleo extraído, uma vez que o seu teor relativo é inferior a 0,4% (m/m AGT).

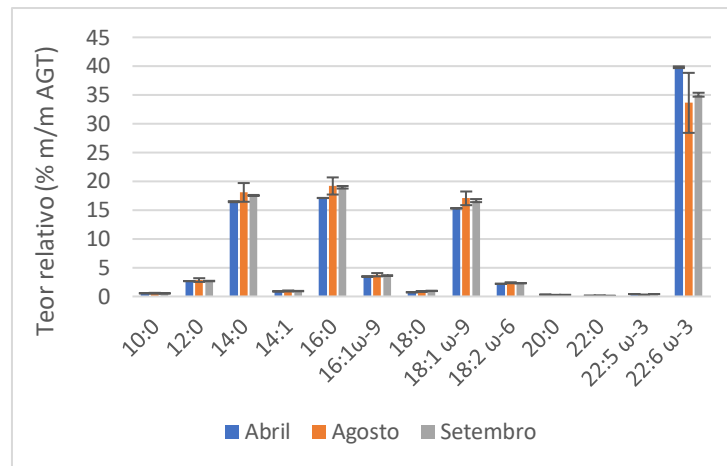


Figura 17. Representação gráfica da composição em ácidos gordos do óleo extraído pelo método de Soxhlet, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT), obtida para os ensaios efetuados ao longo do tempo.

Ao observar a Figura 17 verifica-se que os teores relativos de cada ácido gordo não variam significativamente ao longo do tempo, sendo aproximadamente semelhantes entre os três ensaios de Soxhlet efetuados. No entanto, para os ácidos mirístico (14:0), palmítico (16:0) e oleico (18:1 ω -9) verifica-se que o teor obtido no ensaio de abril é ligeiramente inferior ao de agosto e setembro, seguindo a tendência verificada para os ácidos gordos para biodiesel (o que era de esperar tendo em consideração que estes constituem a maioria destes últimos, como referido na secção 2.5.6). Pela observação da Figura 17 verifica-se também que o teor do ácido docosahexaenóico se encontra entre 35 e 40% (m/m AGT).

Apesar de se notar ligeiras diferenças nos teores de alguns dos ácidos gordos entre os ensaios efetuados, pode-se concluir que, de uma maneira geral, o perfil de ácidos gordos manteve-se constante ao longo do tempo, ou seja, a biomassa não sofreu degradação durante o seu armazenamento.

Ao analisar os perfis de ácidos gordos dos três ensaios efetuados pode-se afirmar que o ácido gordo mais abundante é o ADH (35-40% de teor relativo), sendo os outros ácidos gordos maioritários o ácido mirístico (14:0), o ácido palmítico (16:0) e o ácido oleico (18:1 ω -9), com teores relativos superiores a 15% (m/m AGT). Os restantes ácidos gordos podem ser considerados como minoritários, dado que o seu teor relativo é inferior a 5% (m/m AGT). Deste modo, verifica-se que o óleo obtido no método de extração de Soxhlet com hexano apresenta um perfil de ácidos gordos muito semelhante ao da biomassa (determinado pela transmetilação direta desta).

A determinação do perfil de ácidos gordos do óleo extraído pelo método de Soxhlet também permitiu calcular o conteúdo de ácidos gordos totais existentes nos lípidos recuperados. Verificou-se que os valores do conteúdo em ácidos gordos dos lípidos extraídos por Soxhlet, para os ensaios realizados ao longo dos vários meses, se encontravam entre 57 e 67% ($m_{AG}/m_{lipidos}$), com um valor médio de 62% ($m_{AG}/m_{lipidos}$). Ao consultar a literatura conclui-se que os valores obtidos na extração por Soxhlet, em termos do conteúdo de ácidos gordos nos lípidos, estão compreendidos no intervalo típico reportado para a biomassa de microalgas marinhas, entre 50 e 80% ($m_{AG}/m_{lipidos}$), contudo são inferiores ao valor registado no estudo de Safdar *et al.* (2017), 73% ($m_{AG}/m_{lipidos}$) [67].

Por fim, é importante notar que o rendimento em ácidos gordos totais obtido por Soxhlet foi igual a 7,2 (g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}), o qual é próximo do obtido na transmetilação da biomassa (11,0 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}). Assim, conclui-se que o método de extração de Soxhlet com hexano é eficiente na recuperação deste tipo de lípidos.

3.3. Extração supercrítica

3.3.1. Planeamento Experimental

Com o objetivo de determinar os intervalos de pressão e temperatura que permitem maximizar o rendimento da extração supercrítica dos lípidos sintetizados pela microalga *C. cohnii*, um planeamento experimental, baseado numa superfície de resposta (*surface response methodology*) de acordo com a distribuição de Doehlert, foi realizado para avaliar a influência de dois fatores - pressão (fator 1) e temperatura (fator 2) -, sobre o rendimento em lípidos, em ADH e em ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser direcionados para a produção de biodiesel.

Na Tabela 6 resume-se o conjunto dos testes experimentais realizados no âmbito do planeamento experimental e as respostas obtidas.

Tabela 6. Matriz do planeamento experimental de acordo com a distribuição de Doehlert para dois fatores – pressão e temperatura – e as respostas avaliadas (rendimento em lípidos, em ADH e em ácidos gordos para biodiesel). Apresenta-se também o respetivo desvio padrão de cada resposta.

Teste	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento em lípidos (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Desvio padrão	Rendimento em ADH (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Desvio padrão	Rendimento em AG p/ biodiesel (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Desvio padrão
1	150,0	50,0	7,52	0,27	0,82	0,29	1,84	0,39
2	150,0	50,0	8,06		1,41		2,63	
3	225,0	50,0	15,20	0,20	3,09	0,06	5,25	0,12
4	225,0	50,0	15,60		3,21		5,01	
5	300,0	50,0	14,95	0,01	2,74	0,06	4,68	0,13
6	300,0	50,0	14,93		2,86		4,94	
7	187,5	41,3	17,19	0,30	3,77	0,26	4,59	0,15
8	187,5	41,3	16,59		3,25		4,90	
9	262,5	41,3	14,01	0,28	2,35	0,18	3,99	0,40
10	262,5	41,3	14,58		2,72		4,78	
11	187,5	58,7	11,47	1,03	2,11	0,31	3,92	0,45
12	187,5	58,7	9,42		1,48		3,02	
13	262,5	58,7	16,14	0,26	2,54	0,15	3,85	0,30
14	262,5	58,7	15,63		2,84		4,45	

3.3.1.1. Análise dos resultados relativos aos lípidos totais

De modo a simplificar a análise da Tabela 6 e avaliar o efeito da variação da pressão e temperatura nas respostas de interesse, optou-se por agrupar os testes experimentais efetuados com base no critério de um dos fatores do planeamento experimental permanecer constante. Assim, por exemplo, verifica-se que os testes 1 a 6 demonstram o efeito de variar a pressão para a temperatura fixa no valor correspondente ao centro do domínio experimental (50°C).

Relativamente ao rendimento de extração em lípidos, observa-se que para a temperatura fixa no centro do domínio experimental (50°C), o aumento da pressão de 150 para 225 bar resulta num aumento do rendimento em 49,4%. Por outro lado, o aumento da pressão de 225 para 300 bar não resulta numa diferença relevante no rendimento em lípidos.

Dado que ao longo do processo de extração recolheu-se quatro extratos (E1 ao fim de 30 minutos, E2 ao fim de uma hora, E3 ao fim de uma hora e meia e E4 ao fim de três horas), torna-se importante analisar a evolução do rendimento em lípidos ao longo do tempo. Assim, representa-se na Figura 18 as curvas de extração obtidas para as três pressões testadas a 50°C. Estas curvas correspondem à média dos resultados obtidos na análise em duplicado de cada condição experimental. Ao analisar a Figura 18 nota-se que nos primeiros 90 minutos de extração o rendimento em lípidos obtido a 300 bar é superior ao alcançado a 225 bar. Tal deve-se ao facto de a solubilidade dos lípidos no solvente supercrítico ser mais elevada à pressão de 300 bar, o que significa que a cinética de extração é mais rápida, ou seja, para o mesmo tempo de extração é possível recuperar uma maior quantidade de lípidos a 300 bar comparativamente a 225 bar.

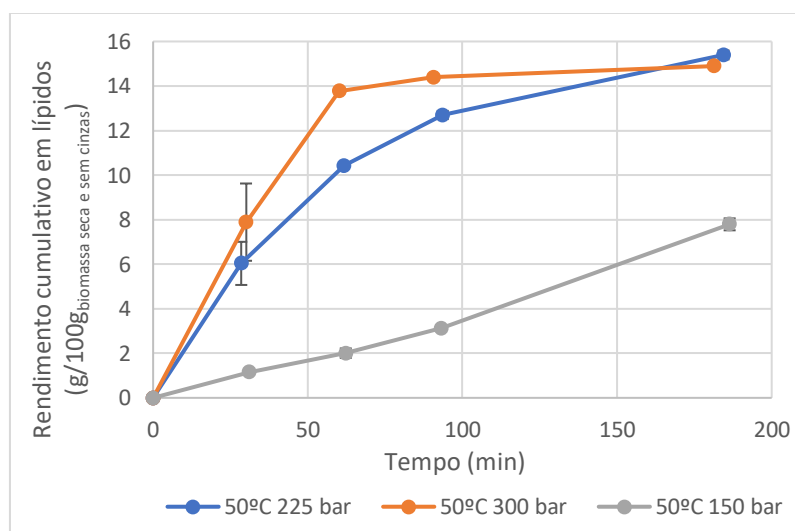


Figura 18. Representação gráfica da evolução do rendimento cumulativo em lípidos ao longo do tempo de extração para as condições em que a temperatura se encontra fixa no centro do domínio experimental (50°C) e a pressão varia de 150 para 225 e 300 bar. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cada medida específica. Os quatro pontos observados no gráfico correspondem aos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração – ao fim de trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas.

Ao analisar a Figura 18 também é possível constatar que a progressão do rendimento em lípidos ao longo do tempo de extração obtida a 50°C e 150 bar, difere da verificada para as outras duas pressões testadas a esta temperatura. De facto, em contraste com a curva a 150 bar que apresenta

uma forma completamente linear, com aumento quase proporcional do rendimento no tempo, as curvas de extração a 300 e 225 bar apresentam duas regiões distintas: numa primeira fase do processo, durante os primeiros 30 a 60 minutos, o rendimento em lípidos apresenta uma variação linear com o tempo; na segunda região, após 60 a 90 minutos, verifica-se um ligeiro decréscimo do declive da curva de extração que vai decaindo progressivamente, tendendo para um patamar. A existência de duas regiões distintas nas curvas de extração foi reportada por vários autores [70] [71] [72] [73] e pode ser interpretada considerando:

- Na fase inicial de um processo de extração em leito fixo, o mecanismo mais importante consiste na solubilidade do soluto no solvente supercrítico, uma vez que se extrai os lípidos mais acessíveis, isto é, aqueles que estão no exterior das células fragmentadas e em contacto com a fase fluida. Deste modo, o fator que limita a cinética do processo de extração é a solubilidade dos lípidos no solvente supercrítico, que é igual ao declive da curva de extração. O processo é assim controlado pelo equilíbrio de fases [71] [73].
- Na segunda fase do processo existe uma primeira etapa de transição na qual se verifica uma quebra na taxa de extração, traduzida num decréscimo do declive da curva. Nesta fase, o soluto completamente livre e acessível ao solvente foi esgotado e inicia-se a extração dos compostos que estão no interior das células fragmentadas. Após este, a extração prossegue para o soluto dentro das células intactas. O processo de extração é assim limitado pela difusão interna. É a resistência à transferência de massa, primeiro externa e depois interna, que controla a extração. A difusão do solvente supercrítico depende da sua pressão e temperatura e do caudal de solvente a circular pelo sistema. De modo a eliminar a influência do caudal de dióxido de carbono no processo de extração supercrítica, operou-se a caudais reduzidos, aproximadamente 0,24 L^{PTN}/min (0,47 g/min), garantido assim que o solvente permanecia no extrator tempo suficiente para se difundir pelas células intactas e aceder aos lípidos intracelulares.

Assim, pode-se afirmar que na extração realizada a 50°C e 150 bar as três horas de extração não foram suficientes para alcançar a etapa final do processo em que a extração é controlada pela transferência de massa, ou seja, neste tempo de extração não foi possível recuperar todos os lípidos que tinham sido libertados pelas células fragmentadas.

Ao resumir a análise da [Tabela 6](#), constata-se que os testes 7 a 10 demonstram o efeito de variar a pressão de 187,5 para 262,5 bar, à temperatura constante de 41,3°C, verificando-se que o aumento da pressão produz uma redução média de 15,4% do rendimento em lípidos. Nos testes 11 a 14, à temperatura constante de 58,7°C, a mesma variação da pressão resulta num aumento médio de 34% do rendimento em lípidos. As curvas de extração obtidas nestas condições operatórias encontram-se ilustradas na [Figura 19](#).

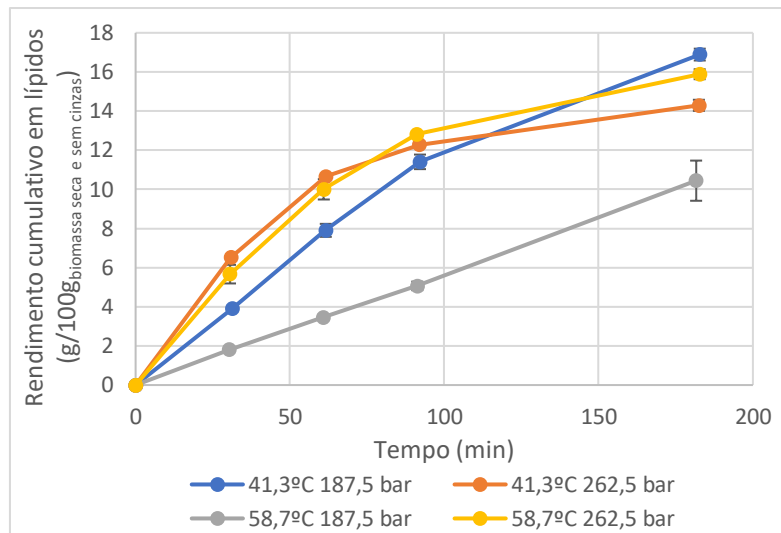


Figura 19. Representação gráfica da evolução do rendimento cumulativo em lípidos ao longo do tempo de extração. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cada medida específica. Estas curvas correspondem à média dos resultados obtidos na análise em duplicado de cada condição experimental. Os quatro pontos observados no gráfico correspondem aos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração – ao fim de trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas.

Ao observar a Figura 19 verifica-se que para 41,3°C, o rendimento de extração obtido a 262,5 bar foi superior ao alcançado a 187,5 bar durante os primeiros 90 minutos de extração, o que se deve ao facto de a densidade do dióxido de carbono supercrítico ser mais elevada a 262,5 bar, logo a solubilidade dos lípidos no solvente é maior a esta pressão e, conseqüentemente, a cinética do processo de extração é mais rápida. Nesta figura também se verifica que a curva de extração a 58,7°C e 187,5 bar apresenta a mesma variação do rendimento em lípidos com o tempo da curva a 50°C e 150 bar representada na Figura 18, ou seja, nestas condições de pressão e temperatura, durante as 3 horas de extração, o processo é sempre controlado pela solubilidade, não se esgotando todo o soluto libertado pelas células fragmentadas e, como tal, o processo não atinge a etapa de controlo por difusão interna. De facto, a 58,7°C e 187,5 bar a densidade do dióxido de carbono supercrítico é menor que nas restantes condições reportadas na Figura 19 e como tal é de esperar que a solubilidade dos compostos seja menor.

Analisando a Figura 19 verifica-se que a curva nas condições 58,7°C e 187,5 bar apresenta um comportamento linear até, pelo menos um rendimento em lípidos de 10 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}. Por outro lado, por observação das Figuras 18 e 19 verifica-se que a alteração no regime que controla a extração, isto é, a zona do gráfico em que se verifica a quebra na curva de extração, se inicia na gama 10-12 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}, do que se pode inferir que o pré-tratamento de moagem da biomassa, nas condições realizadas, permite que se atinja um grau de, pelo menos, 60 a 70% de células fragmentadas.

É também de referir que, ao analisar os três grupos de testes mencionados, conclui-se que o aumento da pressão apresenta dois efeitos a temperatura constante, tal como se verificou no estudo de Couto *et al.* (2010) [46]. A temperaturas elevadas (50 e 58,7°C), o aumento da pressão resulta no incremento do rendimento de extração de lípidos, uma vez que se induz o aumento da densidade do solvente e, conseqüentemente, a sua capacidade de solubilizar os compostos de interesse. Contudo,

a temperaturas reduzidas (41,3°C), a variação da pressão para valores elevados resulta na redução do rendimento de extração, dado que o efeito da diminuição do coeficiente de difusão prevalece, o que significa que se reduz a capacidade do dióxido de carbono supercrítico se difundir pelo interior dos poros da matriz sólida.

É importante notar que os testes 7 a 14 também podem ser analisados da perspetiva em que a pressão se encontra fixa e, nesse caso, verifica-se que quando a pressão toma o valor de 187,5 bar, a alteração da temperatura de 41,3 para 58,7°C resulta na redução em 37,9% do rendimento em lípidos (testes 7, 8, 11 e 12). Contudo, à pressão fixa de 262,5 bar, a mesma variação da temperatura produz um aumento ligeiro em 10% do rendimento em lípidos (testes 9, 10, 13 e 14). A esta condição de pressão, observa-se na [Figura 19](#) que a cinética do processo de extração é semelhante a 41,3 e 58,7°C, uma vez que se recupera sensivelmente a mesma massa de lípidos para um determinado tempo de extração. Tal observação pode se dever ao facto da densidade do dióxido de carbono supercrítico a 41,3°C e 262,5 bar ser apenas ligeiramente superior (em 8,8%) à registada à mesma pressão, mas a 58,7°C.

Assim, ao analisar os testes 7 a 14 da perspetiva em que a pressão se mantém constante conclui-se que o aumento da temperatura também exerce dois efeitos termodinâmicos distintos [46]. À pressão mais elevada de 262,5 bar, o efeito que prevalece perante o aumento da temperatura é o incremento da pressão de vapor do soluto, uma vez que nestas condições a densidade do dióxido de carbono supercrítico diminui moderadamente com o aumento da temperatura. Para a pressão mais reduzida de 187,5 bar, o efeito predominante, resultante do aumento da temperatura, consiste na redução da densidade do solvente supercrítico e, conseqüentemente, da sua capacidade de solubilizar os lípidos. Pode então dizer-se que a pressão de inversão (em inglês *crossover pressure*) para este sistema será entre 187,5 e 262,5 bar, pelo que acima de 262,5 bar tem-se um aumento do rendimento com o aumento da temperatura para cada valor de pressão e abaixo de 187,5 bar verificar-se-á uma diminuição do rendimento com o aumento da temperatura, a cada valor de pressão.

3.3.1.2. *Comparação da extração supercrítica com o método de Soxhlet*

Tal como se mencionou anteriormente, o método de extração de Soxhlet foi aplicado com o objetivo de comparar a extração supercrítica a este método convencional, no que diz respeito à sua eficiência de extração dos lípidos totais. Assim, foram calculados os valores de recuperação de lípidos para cada condição pressão/temperatura testada experimentalmente no âmbito do planeamento experimental. Estas recuperações de lípidos foram determinadas através da Equação 16 descrita na [secção 2.5.7](#) e os resultados obtidos podem ser observados na [Tabela 7](#).

Tabela 7. Valores médios de recuperação de lípidos calculados para cada condição pressão/temperatura testada na extração supercrítica, com base no rendimento em lípidos médio obtido no método de Soxhlet.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Recuperação de lípidos (%)
150,0	50,0	46,3
225,0	50,0	91,4
300,0	50,0	88,4
187,5	41,3	100,3
262,5	41,3	84,9
187,5	58,7	62,0
262,5	58,7	94,3

Ao analisar a Tabela 7, verifica-se que a recuperação de lípidos depende consideravelmente das condições de pressão e temperatura aplicadas no processo de extração supercrítica, uma vez que os seus valores variam entre 46 e 100%. Com a exceção das extrações a 50°C/150 bar e a 58,7°C/187,5 bar, as restantes condições testadas permitem recuperar mais de 80% dos lípidos que seriam extraídos pelo método de Soxhlet aliás, no caso da extração a 41,3°C e 187,5 bar é possível recuperar uma quantidade de lípidos ligeiramente superior pela extração supercrítica do que com o método de Soxhlet, como evidencia o valor de recuperação ligeiramente acima de 100%. Apesar de o hexano apresentar um poder de solubilização superior ao do dióxido de carbono, este solvente orgânico não possui a viscosidade e a difusividade que o dióxido de carbono supercrítico dispõem em determinadas condições de pressão e temperatura, logo era esperado que os valores de recuperação de lípidos fossem elevados.

Assim comprova-se que, em determinadas condições de pressão e temperatura, a extração supercrítica permite obter um rendimento de extração de lípidos superior ao método convencional de Soxhlet. Esta conclusão é particularmente importante tendo em consideração que esta técnica consiste num processo de extração mais sustentável do ponto de vista ambiental, dado que reduz o tempo de extração necessário e usa menores volumes de solventes orgânicos tóxicos. Para além disso, também é importante notar que o valor de recuperação de lípidos superior a 100% foi alcançado para valores de pressão e temperatura reduzidos, o que beneficia significativamente a aplicação desta técnica na extração dos lípidos sintetizados pela microalga *C. cohnii*.

3.3.1.3. *Análise dos resultados relativos ao ADH e ácidos gordos para biodiesel*

Relativamente ao rendimento em ADH e em ácidos gordos para biodiesel apresentados na Tabela 6, constata-se que estes apresentam as mesmas tendências e variações verificadas para o rendimento em lípidos nas condições de pressão e temperatura analisadas anteriormente. Nota-se apenas as seguintes exceções: para a temperatura fixa em 41,3°C, o aumento da pressão de 187,5 para 262,5 bar não resulta numa diferença relevante do rendimento em ácidos gordos para biodiesel, registando-se uma diminuição muito ligeira (em 7,6%) deste rendimento, no entanto a redução é mais acentuada para as outras duas respostas avaliadas (15,3% para os lípidos e 27,6% para o ADH). Para a pressão de 262,5 bar, o aumento da temperatura de 41,3 para 58,7°C resultou numa diminuição muito ligeira (em

5,5%) do rendimento em ácidos gordos para biodiesel, enquanto a mesma variação de temperatura induziu aumentos ligeiros do rendimento em lípidos e em ADH (10 e 5,6%, respetivamente).

Apesar da existência destas duas exceções para o rendimento em ácidos gordos para biodiesel, pode-se afirmar que as duas principais conclusões apresentadas para a influência da pressão e da temperatura são válidas para as três respostas analisadas neste planeamento experimental.

Por fim, para concluir a análise da *Tabela 6*, é necessário examinar os valores dos desvios padrão obtidos para cada resposta avaliada nos catorze testes experimentais efetuados. Ao observar esses desvios conclui-se que a maioria dos valores são elevados (acima de 0,1), o que indica que existe uma discrepância relevante entre os duplicados de cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental.

A biomassa microalgal usada neste trabalho apresentava um baixo conteúdo de lípidos totais e conseqüentemente de ácidos gordos, logo a massa de óleo recuperada em cada extrato recolhido ao longo do processo de extração é reduzida (entre 5 e 88 mg), o que significa que pequenos desvios que se possam verificar na pesagem dos extratos geram um erro significativo no cálculo do resultado final e, assim, podem originar a discrepância verificada entre os duplicados da *Tabela 6* relativamente ao rendimento em lípidos. Uma maneira de minimizar este problema passaria pela utilização de uma maior quantidade de biomassa microalgal e, conseqüentemente, a obtenção de uma massa de lípidos mais elevada em cada extrato recolhido. No entanto, a disponibilidade de biomassa microalgal é limitada e por isso não foi possível realizar o trabalho com quantidades superiores. Por outro lado, como se trabalha com pequenas quantidades de lípidos, qualquer degradação que possa ocorrer pode contribuir com uma diferença significativa no resultado final. Em particular, a determinação dos ácidos gordos envolve diversas etapas com muita manipulação dos lípidos extraídos, pelo que o cumulativo de alguma degradação que possa ocorrer, acaba por afetar consideravelmente o cálculo da massa de cada ácido gordo e, conseqüentemente, do rendimento em ADH e em ácidos gordos que podem ser usados na produção de biodiesel. Este ponto permite assim justificar os desvios consideráveis existentes entre os duplicados da *Tabela 6* no que diz respeito aos dois rendimentos mencionados.

3.3.1.4. Análise das superfícies de resposta

Na *Figura 20* encontram-se representadas as superfícies de resposta obtidas para o rendimento em lípidos (*Figura 20 (a)*), em ADH (*Figura 20 (b)*) e em ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser usados na produção de biodiesel (*Figura 20 (c)*), dentro dos limites do domínio experimental.

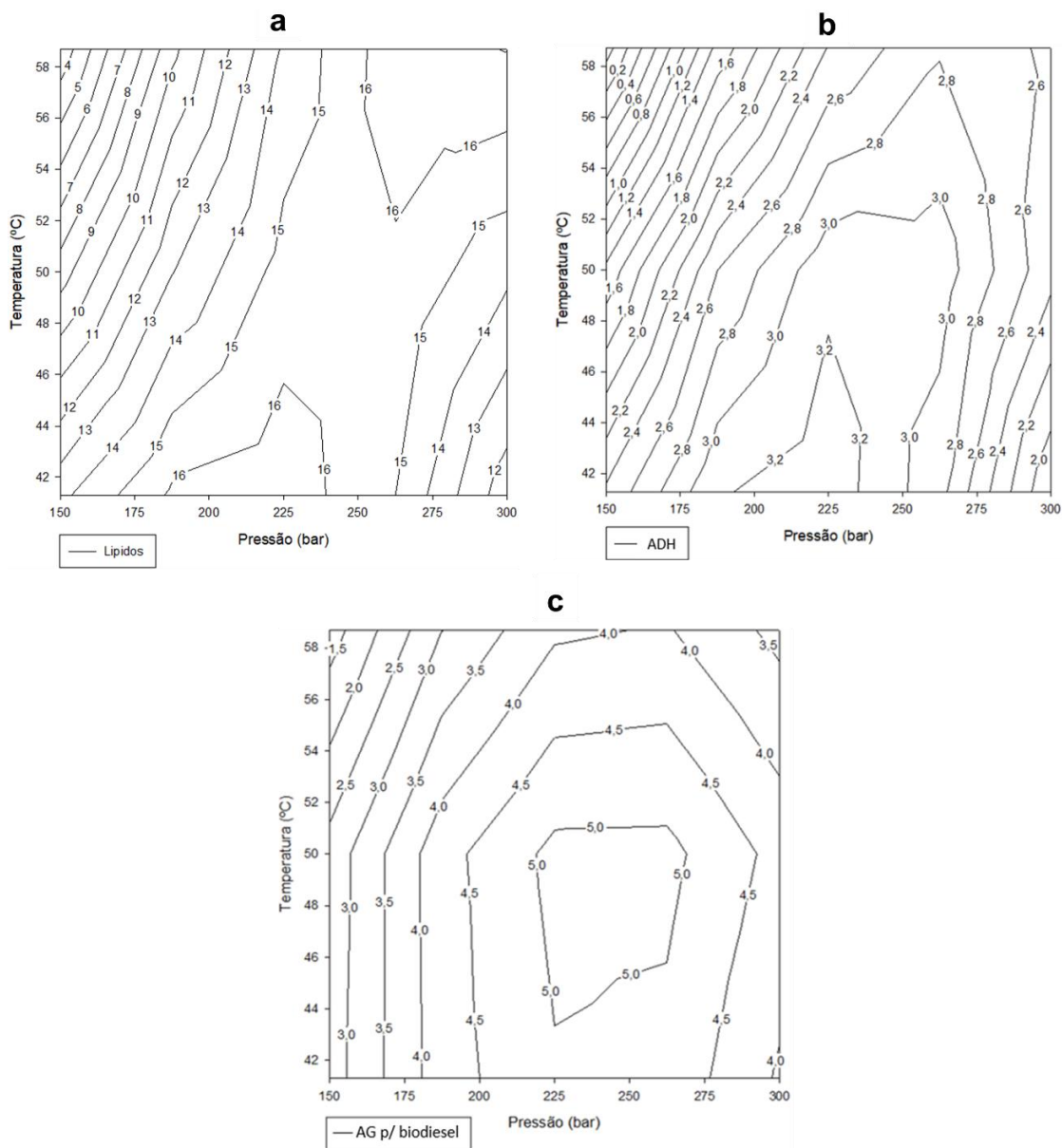


Figura 20. Superfícies de resposta para o rendimento em lípidos ($\text{g}/100 \text{g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$) (a); para o rendimento em ADH ($\text{g}/100 \text{g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$) (b) e para o rendimento em ácidos gordos para biodiesel ($\text{g}/100 \text{g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$) (c), obtidos no planeamento experimental para os fatores pressão (150 a 300 bar) e temperatura (40 a 60°C).

Ao observar a Figura 20 (a) verifica-se que a tendência geral da distribuição das curvas de iso-resposta toma a forma de linhas com uma ligeira inclinação relativamente a linhas verticais, o que indica que a variação do rendimento em lípidos é mais acentuada ao longo das abcissas do que das ordenadas, ou seja, o aumento da temperatura não exerce um efeito tão considerável no rendimento em lípidos quando comparado ao incremento da pressão.

Nesta Figura 20 (a), assim como na Figura 20 (b), também se verifica que para pressões reduzidas, inferiores a 250 bar, o rendimento de extração em lípidos diminui com o aumento da temperatura, mas para pressões mais elevadas observa-se o efeito oposto. Esta observação está em concordância com o constatado na análise dos resultados experimentais e com a conclusão dos dois efeitos termodinâmicos exercidos pelo aumento da temperatura a pressão constante.

As superfícies de isoiresposta correspondentes ao valor máximo do rendimento em lípidos, 16 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}, são obtidas em duas áreas distintas do gráfico: a primeira é registada para valores de pressão entre 187,5 e 240 bar e temperaturas entre 40 e 46°C e a segunda área encontra-se abrangida por pressões entre 250 e 300 bar e por temperaturas entre 52 e 60°C. Perante a existência de duas gamas de pressão e temperatura que permitem maximizar o rendimento em lípidos, a escolha das condições de trabalho deve abranger a análise de outros fatores, nomeadamente económicos, energéticos e ambientais. Assim, do ponto de vista energético é preferível operar a condições de pressão e temperatura mais reduzidas, ou seja, deve-se optar pelos valores compreendidos na primeira área mencionada. Para além disso, ao operar a condições de pressão e temperatura mais suaves reduz-se os custos operatórios e torna-se o processo mais sustentável a nível ambiental.

Na Figura 20 (b), a tendência geral da distribuição das curvas de isoiresposta toma a forma de linhas diagonais, o que indica que ambos os fatores apresentam uma influência semelhante no rendimento em ADH. Para valores de pressão mais elevados, a partir de 250 bar, a inclinação das curvas de isoiresposta diminui, apresentado estas uma tendência de verticalização. Esta observação indica que nestas condições de pressão, o aumento da temperatura não produz um efeito tão significativo no rendimento em ADH em comparação com a variação da pressão.

A superfície de isoiresposta correspondente ao valor máximo do rendimento em ADH, 3,2 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}, é obtida nos quadrantes inferiores para valores de pressão intermédios, entre 190 e 235 bar, e temperaturas reduzidas, entre 40 e 47°C.

Por fim, ao analisar a Figura 20 (c) constata-se que nos quadrantes inferiores a tendência geral da distribuição das curvas de isoiresposta toma a forma de linhas verticais, o que indica que o aumento da temperatura não induz um efeito considerável no rendimento em ácidos gordos para biodiesel. Contudo, nos quadrantes superiores, para valores de temperatura elevados, verifica-se que as curvas de isoiresposta apresentam uma ligeira inclinação, indicando que a influência de ambos os fatores na resposta de interesse se aproxima.

A superfície de isoiresposta correspondente ao valor máximo do rendimento em ácidos gordos para biodiesel, 5,0 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}, é obtida no quadrante inferior direito, isto é, para valores de temperatura reduzidos e pressões intermédias a elevadas. Assim, a superfície de isoiresposta máxima é abrangida por pressões entre 225 e 270 bar e por temperaturas entre 43 e 51°C.

3.3.1.5. *Análise dos parâmetros do planeamento experimental*

Os dados obtidos a partir do planeamento experimental foram posteriormente usados para uma análise de regressão linear através de um modelo polinomial. Os parâmetros ou coeficientes derivados para cada modelo polinomial (β_0 a β_{22}) encontram-se apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Coeficientes dos modelos polinomiais que representam as respostas avaliadas no planejamento experimental. Valores de F crítico, níveis de significância e coeficiente de determinação múltipla calculados na validação estatística dos modelos polinomiais. O fator 1 corresponde à pressão e o fator 2 é a temperatura.

	Modelo	Rendimento em lípidos	Rendimento em ADH	Rendimento em ácidos gordos p/ biodiesel
Coeficientes do modelo	β_0	15,4	3,15	5,13
	β_1	2,86	0,51	0,82
	β_2	-1,40	-0,52	-0,6
	β_{12}	4,64	0,94	0,27
	β_{11}	-4,03	-1,19	-1,61
	β_{22}	-0,02	-0,37	-0,91
Validação do modelo	Eficácia dos parâmetros	22,16	5,39	3,97
	Nível de significância (α), F(5, 8)	0,01	0,02	0,04
	Desajuste	15,38	15,55	14,60
	Nível de significância (α), F(1, 7)	0,006	0,006	0,007
R²	Coeficiente de determinação múltipla	0,93	0,77	0,71

Os parâmetros β dos modelos polinomiais usados para estimar as respostas têm os seguintes significados: β_0 representa a resposta no centro do domínio experimental; β_1 e β_2 indicam a importância relativa dos fatores pressão e temperatura, respectivamente, na resposta estudada; o parâmetro de interação, β_{12} , indica como o efeito de um fator é dependente do nível do outro fator e, por fim, os valores de β_{11} e β_{22} determinam a maneira como a superfície de resposta se dobra para baixo (valores negativos) ou para cima (valores positivos) quadraticamente.

Ao analisar os coeficientes do modelo polinomial relativo ao rendimento em lípidos verifica-se que o valor de β_1 é significativamente superior ao de β_2 , indicando que a pressão apresenta uma influência muito superior à temperatura. Esta tendência não é observada de forma tão acentuada na distribuição das superfícies de resposta, Figura 20 (a), uma vez que estas curvas não tomam a forma de linhas perfeitamente verticais, apresentando sim uma ligeira inclinação.

Ainda analisando os coeficientes individuais de cada fator, pode-se afirmar que o valor ligeiramente negativo de β_2 indica que a temperatura pode apresentar uma influência negativa na resposta, algo que se verifica na Figura 20 (a) para valores reduzidos de pressão, isto é, nos quadrantes inferior e superior esquerdo. O termo de interação, β_{12} , deste modelo polinomial é elevado, indicando que os dois fatores devem ser controlados simultaneamente durante o processo de extração de lípidos.

Relativamente ao modelo polinomial que representa o rendimento em ADH, os valores de β_1 e β_2 são semelhantes face ao valor de β_0 , o que significa que ambos os fatores, pressão e temperatura,

apresentam uma influência semelhante na resposta em causa, tal como se pode comprovar na análise da tendência geral da distribuição das curvas de isoresposta. No entanto, estes valores não evidenciam a tendência de verticalização apresentada pelas superfícies de isoresposta para valores de pressão superiores a 250 bar. O valor de β_2 é ligeiramente negativo, o que indica que a temperatura pode apresentar uma influência negativa na resposta, facto que na Figura 20 (b) se verifica no extremo esquerdo do gráfico.

O termo de interação, β_{12} , deste modelo polinomial é superior aos coeficientes β de cada fator experimental, logo a interação entre a pressão e temperatura é significativa e estes dois parâmetros devem ser controlados em simultâneo durante o processo de extração, de modo a garantir uma eficiente recuperação do ácido docosahexaenóico.

No modelo polinomial que representa o rendimento em ácidos gordos para biodiesel, o valor de β_1 é superior ao valor de β_2 , indicando que a pressão apresenta uma influência mais considerável em comparação com a temperatura no rendimento em ácidos gordos que podem ser direcionados para a produção de biodiesel. Esta observação está em conformidade com o constatado nos quadrantes inferiores do gráfico das superfícies de resposta, mas não permite justificar a ligeira inclinação que as linhas de superfície de isoresposta apresentam nos quadrantes superiores da Figura 20 (c).

Ao analisar isoladamente o valor de β_2 verifica-se que este é ligeiramente negativo, o que indica que a temperatura pode exercer um impacto negativo no rendimento em ácidos gordos para biodiesel, como se verifica na Figura 20 (c).

O valor do parâmetro de interação, β_{12} , deste modelo polinomial é ligeiramente inferior aos valores dos coeficientes β de cada fator, o que indica que a interação entre a pressão e a temperatura pode não apresentar uma influência tão significativa na resposta em causa como a variação individual de cada fator. Contudo, a interação entre os fatores não deve ser desprezada e, por isso, tanto a pressão como a temperatura devem ser controladas em simultâneo, de modo a garantir o sucesso do processo de extração na recuperação de ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser direcionados para a produção de biodiesel.

Ao examinar os valores de β_1 e β_2 de todos os modelos polinomiais verifica-se que a tendência geral consiste no facto de β_1 ser superior a β_2 , o que significa que para as respostas estudadas a pressão tem uma influência mais considerável comparativamente à temperatura. O rendimento em ADH não segue esta tendência, uma vez que ambos os fatores apresentam uma influência semelhante na resposta.

No caso do termo de interação, β_{12} , a tendência geral observada consiste no facto de a interação entre a pressão e a temperatura apresentar uma influência considerável na resposta de interesse e esse impacto ser mais significativo na resposta do que a variação individual de cada fator, dado o termo de interação ser superior aos coeficientes β individuais. Assim, conclui-se que no processo de extração supercrítica dos lípidos sintetizados pela microalga *C. cohnii* ambos os fatores estudados neste planeamento experimental devem ser controlados em simultâneo.

3.3.1.6. Validação estatística dos modelos polinomiais

De modo a validar os modelos polinomiais quanto à sua representação dos conjuntos de dados, procedeu-se à realização de dois testes estatísticos baseados no teste de Fisher de razão das variâncias [63]: o teste para a eficácia dos coeficientes e o teste para a falta de ajuste ou desajuste do modelo.

No primeiro teste estatístico, os coeficientes dos modelos são testados de forma a determinar o nível de representação dos resultados obtidos nas experiências efetuadas para as condições definidas no domínio experimental. Este teste avalia o nível de significância da quantidade de variância nos dados que foram contabilizados pelos coeficientes β do modelo. A hipótese nula deste teste é construída no pressuposto de que os parâmetros β_1 a β_{p-1} não afetam a resposta (isto é, o modelo não representa as respostas), o que corresponde a um resultado igual a β_0 . Assim, a hipótese nula (H_0) assume a forma: $H_0 = \beta_1 = \dots = \beta_{p-1} = 0$. A hipótese alternativa (H_a) toma a forma: $H_a = Y_i = \beta_0 + \beta_1(X) + \dots + \beta_{p-1}(X)$, ou seja, considera o modelo na sua forma completa e representativa das respostas. A rejeição da hipótese nula (para $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$) implica que pelo menos uma certa quantidade de variância foi representada pelos coeficientes do modelo e, dependendo do nível de significância, estes podem representar o efeito dos fatores analisados no planeamento experimental.

No segundo teste estatístico, é aplicada uma abordagem semelhante para testar o nível a que o modelo se ajusta aos dados e os representa. Neste teste avalia-se duas variâncias distintas: a variância devido à falta de ajuste (do inglês *lack of fit*, lof), S_{lof}^2 , e a variância devido à incerteza puramente experimental, S_{pe}^2 . Se o modelo não expressar adequadamente os dados, então a estimativa da variância devido à falta de ajuste é diferente da variância devido à incerteza puramente experimental, ou seja, $S_{lof}^2 > S_{pe}^2$. Se o modelo for adequado, então S_{lof}^2 e S_{pe}^2 são estimativas adequadas da variância devido à incerteza puramente experimental e não existe uma diferença significativa entre as mesmas. Nessas condições, a hipótese nula (H_0) assume a forma $H_0 = S_{lof}^2 - S_{pe}^2 = 0$ e a hipótese alternativa (H_a) é descrita pela expressão $H_a = S_{lof}^2 - S_{pe}^2 > 0$. Em modelos adequados, a hipótese nula não pode ser rejeitada no nível de confiança especificado. Caso a hipótese nula não seja aceite, então há uma quantidade significativa de variância nos dados medidos que não é explicada pelo modelo.

A Tabela 8 apresenta os valores de $F_{\text{calculado}}$ e $F_{\text{crítico}}$ correspondentes aos testes de eficácia dos coeficientes e validação dos modelos, com os graus de liberdade de acordo com Deming e Morgan, (1987) [63]. Nessa tabela observam-se também os níveis de significância (α) determinados de acordo com o auxílio da ferramenta disponível em [74]. O teste estatístico para a eficácia dos coeficientes, mostrou que o nível de significância para o qual a hipótese nula pode ser rejeitada situa-se entre 0,01 e 0,04 para as respostas rendimento em lípidos, rendimento em ADH e rendimento em ácidos gordos que podem ser direcionados para a produção de biodiesel. Relativamente ao teste estatístico para a falta de ajuste ou desajuste do modelo, verifica-se que em todas as respostas os níveis de confiança dos modelos para a aceitação da hipótese nula apresentam resultados inferiores a 0,007.

Deste modo, nestas condições de validação, os modelos foram utilizados para estudar o peso relativo dos fatores nas respostas, a sua interação e produzir superfícies de resposta que permitem visualizar a distribuição de cada resposta avaliada no domínio experimental.

3.3.2. Perfil de ácidos gordos das curvas de extração

As quatro recolhas de óleo ao longo do processo de extração permitiram não só acompanhar a evolução do rendimento em lípidos ao longo do tempo e traçar as respetivas curvas de extração, assim como possibilitaram o estudo da composição em ácidos gordos de cada extrato, permitindo concluir se o perfil é influenciado pelo tempo de extração decorrido.

Ao analisar os perfis ao longo do tempo para cada teste de extração efetuado no âmbito do planeamento experimental, os quais podem ser consultados no Anexo G, verifica-se que, de uma maneira geral, o teor relativo de cada ácido gordo é aproximadamente semelhante entre perfis, logo a tendência verificada para uma curva de extração é válida para as restantes curvas. Deste modo, optou-se por analisar detalhadamente a variação do perfil de ácidos gordos com o tempo de uma única curva de extração, neste caso a obtida a 41,3°C e 187,5 bar, Figura 21.

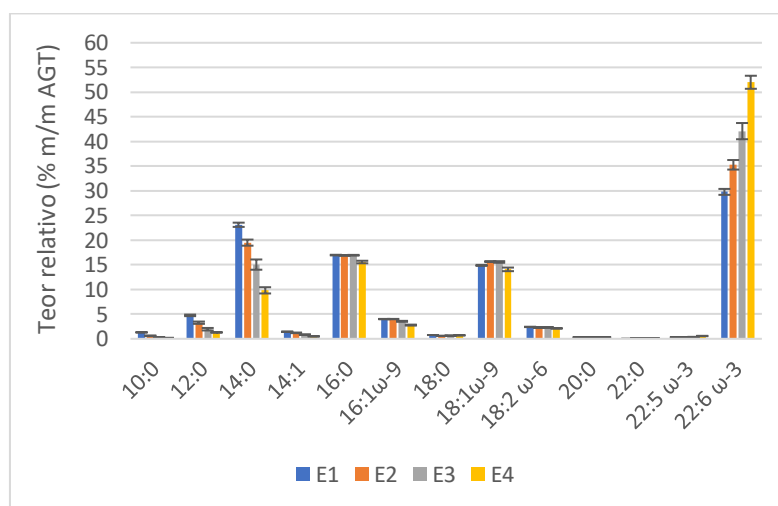


Figura 21. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 41,3°C e 187,5 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas.

Note-se que na Figura 21 apenas se apresenta o teor relativo dos ácidos gordos mais importantes identificados nos cromatogramas, no entanto registou-se a presença de outros picos cuja identificação não foi possível com os padrões usados. Deste modo, estes picos foram agrupados como “outros” e desprezados na análise apresentada de seguida, uma vez que o seu conteúdo relativo é inferior a 1% (m/m AGT).

Ao examinar os teores relativos dos ácidos gordos para os quatro extratos recolhidos (E1 a E4) conclui-se que o ácido gordo mais abundante é o ADH, apresentando um conteúdo relativamente aos ácidos gordos totais entre 30 e 52% (m/m AGT). Os outros ácidos gordos maioritários são o ácido mirístico (14:0), o ácido palmítico (16:0) e o ácido oleico (18:1 ω-9) com um teor relativo superior a 10% (m/m AGT). Os restantes ácidos gordos podem ser considerados como minoritários dado que

apresentam conteúdos relativos inferiores a 5% (m/m AGT). Estas observações são concordantes com o verificado na análise do perfil de ácidos gordos do óleo extraído pelo método convencional de Soxhlet.

Analisando a Figura 21 verifica-se que o teor relativo de alguns ácidos gordos saturados e monoinsaturados, nomeadamente do ácido cáprico (10:0), ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido miristoleico (14:1), ácido palmítico (16:0) e ácido oleico (18:1 ω -9), diminui do extrato E1 para o E4, ou seja, diminui ao longo do tempo de extração. Por outro lado, o teor de ADH aumenta do extrato recolhido ao fim de 30 minutos (E1) para o recuperado ao fim de 3 horas de extração (E4), notando-se que no extrato E1 o teor de ADH é aproximadamente 30% (m/m AGT), mas para o E4 o seu valor é superior a 50% (m/m AGT). Esta observação pode ser justificada pelo facto de o ácido docosahexaenóico, assim como outros ácidos gordos polinsaturados da *C. cohnii*, estarem maioritariamente associados aos fosfolípidos da membrana celular. Deste modo, na fase inicial do processo de extração o solvente supercrítico extrai preferencialmente os ácidos gordos que se encontram dispersos no citoplasma da célula, iniciando-se mais tarde a extração dos ácidos gordos associados à membrana, como o ADH, e por isso o seu teor relativo aumenta ao longo do tempo de extração.

Na produção de biodiesel é preferível utilizar um óleo que apresente um elevado conteúdo de ácidos gordos saturados e monoinsaturados, mas um baixo teor de ácidos gordos polinsaturados como o ADH pois, dessa forma, simplifica-se o processo de isolamento desse tipo de ácidos gordos e garante-se o cumprimento de uma das normas estabelecidas na Norma Internacional de biodiesel para veículos, a qual exige que o conteúdo de ácidos gordos polinsaturados seja inferior a 1%. Assim, pode-se afirmar que o óleo resultante da junção dos extratos E1 e E2 é adequado para a produção de biodiesel, dado que cumpre os requisitos mencionados.

Relativamente ao óleo obtido nas últimas duas horas de extração, conclui-se que a sua aplicação poderá ser adequada para as indústrias farmacêutica e nutracêutica, dado que apresenta um teor relativo de ADH elevado, o que simplifica consideravelmente a purificação deste ácido gordo ω -3 e, assim, garante-se o alcance dos níveis de pureza exigidos por estas indústrias.

A determinação do perfil de ácidos gordos dos extratos recolhidos ao longo da extração supercrítica também permitiu calcular o conteúdo de ácidos gordos totais existentes nos lípidos recuperados para cada condição testada experimentalmente no âmbito do planeamento experimental. Verificou-se que a maioria dos valores do conteúdo em ácidos gordos nos lípidos dos extratos recolhidos se encontravam entre 50 e 70% ($m_{AG}/m_{lipidos}$), sendo possível observar os resultados obtidos na Tabela G1 do Anexo G. Assim, tal como se verificou para o extrato lipídico de Soxhlet, os valores obtidos para este conteúdo estão compreendidos no intervalo típico reportado para a biomassa de microalgas marinhas, entre 50 e 80% ($m_{AG}/m_{lipidos}$), mas são inferiores ao valor registado no estudo de Safdar *et al.* (2017), 73% ($m_{AG}/m_{lipidos}$) [67].

3.3.3. Fracionamento do óleo extraído

Um dos principais objetivos deste trabalho consiste no estudo da aplicação da extração supercrítica no fracionamento do óleo extraído da microalga *C. cohnii* em duas frações distintas: uma primeira fração rica em ácidos gordos saturados e monoinsaturados que podem ser direcionados para a produção de biodiesel e uma segunda fração com uma maior abundância do produto de alto valor acrescentado, o ácido docosahexaenóico.

Assim, os gráficos de distribuição das superfícies de resposta foram analisados com o objetivo de encontrar duas gamas de pressão e temperatura distintas – uma que maximizasse o rendimento em ADH, mas minimizasse a extração de ácidos gordos para biodiesel e outra que apresentasse o efeito oposto. Ao observar as Figuras 20 (b) e (c) verifica-se que o intervalo de pressão e temperatura que maximiza o rendimento de extração de ADH está compreendido na gama de condições operatórias que maximizam o rendimento em ácidos gordos para biodiesel. Ou seja, as condições de pressão e temperatura que garantem uma eficiente extração de ADH, também permitem recuperar uma elevada quantidade de ácidos gordos apropriados para a produção do biocombustível. Assim, concluiu-se que a análise exclusiva destes gráficos não seria suficiente para determinar as condições operatórias que possibilitam a realização do fracionamento desejado.

Contudo, na secção anterior (3.3.2) verificou-se que o perfil de ácidos gordos varia com o tempo de extração, dado que os dois primeiros extratos (E1 e E2) apresentam um conteúdo relativo de ácidos gordos saturados e monoinsaturados elevado, o que os torna adequados para a produção de um biocombustível, nomeadamente biodiesel, enquanto os últimos dois extratos (E3 e E4) exibem uma maior abundância do produto de alto valor acrescentado, o ADH. Assim, conclui-se que para realizar o fracionamento do óleo extraído da microalga *C. cohnii* nas duas frações mencionadas anteriormente era necessário ter em consideração a influência do tempo no processo de extração, para além da pressão e temperatura.

Deste modo, determinou-se os valores médios dos rendimentos máximos em lípidos (16,89 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}), em ADH (3,5 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}) e em ácidos gordos para biodiesel (5,1 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}) obtidos na matriz do planeamento experimental, Tabela 6. Com estes valores calculou-se as recuperações destes compostos para cada extrato recolhido de todas as condições experimentais testadas, as quais podem ser observadas nas Tabelas 9 e 10. A definição destas recuperações e a expressão usada no seu cálculo foram descritas na secção 2.5.8.

Ao analisar os valores obtidos para estas recuperações pretendia-se determinar em que extratos foi possível alcançar simultaneamente uma recuperação de ácidos gordos para biodiesel elevada e uma recuperação de ADH reduzida, pois, assim, encontra-se as condições operatórias de pressão, temperatura e tempo que permitem obter a primeira fração desejada. Para além disso, também se pretendia determinar as condições operatórias que permitem obter recuperações de ADH elevadas, as quais seriam utilizadas na obtenção da segunda fração descrita anteriormente.

Tabela 9. Recuperações de lípidos, ADH e ácidos gordos para biodiesel obtidas após 30 minutos e 1 hora de extração para cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental. Estas recuperações foram calculadas com os valores médios dos rendimentos máximos apresentados na Tabela 6: 16,89 g lípidos/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}; 3,5 g ADH/100 g_{biomassa seca e sem cinzas} e 5,1 g ácidos gordos p/ biodiesel/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Após 30 minutos de extração			Após 1 hora de extração		
		Rec. lípidos (%)	Rec. ADH (%)	Rec. AG p/ biodiesel (%)	Rec. lípidos (%)	Rec. ADH (%)	Rec. AG p/ biodiesel (%)
150,0	50,0	7	-	-	11	-	-
150,0	50,0	7	-	-	13	-	-
225,0	50,0	41	31	36	62	56	43
225,0	50,0	30	16	43	62	54	72
300,0	50,0	36	34	40	81	76	88
300,0	50,0	57	52	73	82	79	93
187,5	41,3	24	15	11	45	36	37
187,5	41,3	23	18	29	49	48	64
262,5	41,3	39	27	39	64	51	61
262,5	41,3	38	33	48	63	57	73
187,5	58,7	11	5	11	20	10	21
187,5	58,7	11	4	10	21	10	22
262,5	58,7	31	21	29	56	44	53
262,5	58,7	36	24	36	62	53	63

Tabela 10. Recuperações de lípidos, ADH e ácidos gordos para biodiesel obtidas após 1 hora e meia e 3 horas de extração para cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental. Estas recuperações foram calculadas com os valores médios dos rendimentos máximos apresentados na Tabela 6: 16,89 g lípidos/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}; 3,5 g ADH/100 g_{biomassa seca e sem cinzas} e 5,1 g ácidos gordos p/ biodiesel/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Após 1,5 horas de extração			Após 3 horas de extração		
		Rec. lípidos (%)	Rec. ADH (%)	Rec. AG p/ biodiesel (%)	Rec. lípidos (%)	Rec. ADH (%)	Rec. AG p/ biodiesel (%)
150,0	50,0	18	5	10	45	23	36
150,0	50,0	19	7	15	48	40	51
225,0	50,0	74	68	88	90	88	102
225,0	50,0	76	70	85	92	91	98
300,0	50,0	85	-	-	88	78	91
300,0	50,0	86	-	-	88	81	96
187,5	41,3	65	59	59	102	107	90
187,5	41,3	70	72	84	98	93	95
262,5	41,3	72	58	69	83	67	78
262,5	41,3	73	66	82	86	77	93
187,5	58,7	29	16	31	68	60	76
187,5	58,7	31	19	34	56	42	59
262,5	58,7	76	62	68	96	72	75
262,5	58,7	75	66	74	93	81	87

Analisando as Tabelas 9 e 10 com os critérios mencionados anteriormente, verifica-se que existem cinco procedimentos de fracionamento distintos que podem ser aplicados:

- Procedimento A
 - A primeira fração é obtida a 41,3°C e 187,5 bar e é recolhida após 30 minutos de extração. Assim, recupera-se 23% dos lípidos, 15 a 18% do ADH e 11 a 29% dos ácidos gordos para biodiesel.

- A segunda fração é obtida a 41,3°C e 187,5 bar e é recolhida após 2,5 horas de extração. Assim, recupera-se 75 a 78% dos lípidos, 69 a 84% do ADH e 61 a 84% dos ácidos gordos para biodiesel.
- Procedimento B
 - A primeira fração é obtida a 50°C e 225 bar e é recolhida após 30 minutos de extração. Assim, recupera-se 30 a 41% dos lípidos, 16 a 31% do ADH e 36 a 43% dos ácidos gordos para biodiesel.
 - A segunda fração é obtida a 50°C e 225 bar e é recolhida após 2,5 horas de extração. Assim, recupera-se 49 a 62% dos lípidos, 47 a 75% do ADH e 55 a 66% dos ácidos gordos para biodiesel.
- Procedimento C
 - A primeira fração é obtida a 50°C e 225 bar e é recolhida após 30 minutos de extração. Assim, recupera-se 30 a 41% dos lípidos, 16 a 31% do ADH e 36 a 43% dos ácidos gordos para biodiesel.
 - A segunda fração é obtida a 41,3°C e 187,5 bar e é recolhida após 2,5 horas de extração. Assim, recupera-se 57 a 72% dos lípidos, 62 a 91% do ADH e 47 a 59% dos ácidos gordos para biodiesel.
- Procedimento D
 - A primeira fração é obtida a 58,7°C e 187,5 bar e é recolhida após 1,5 horas de extração. Assim, recupera-se 29 a 31% dos lípidos, 16 a 19% do ADH e 31 a 34% dos ácidos gordos para biodiesel.
 - A segunda fração é obtida a 41,3°C e 187,5 bar e é recolhida após 3 horas de extração. Assim, recupera-se 67 a 73% dos lípidos, 74 a 91% do ADH e 56 a 64% dos ácidos gordos para biodiesel.
- Procedimento E
 - A primeira fração é obtida a 58,7°C e 187,5 bar e é recolhida após 1,5 horas de extração. Assim, recupera-se 29 a 31% dos lípidos, 16 a 19% do ADH e 31 a 34% dos ácidos gordos para biodiesel.
 - A segunda fração é obtida a 50°C e 225 bar e é recolhida após 3 horas de extração. Assim, recupera-se 59 a 63% dos lípidos, 69 a 75% do ADH e 64 a 71% dos ácidos gordos para biodiesel.

De modo a seleccionar o procedimento mais adequado dentro dos cinco possíveis apresentados, é necessário proceder à sua análise tendo em consideração três critérios diferentes: (1) a viabilidade técnica do procedimento, (2) os valores de recuperação de ácidos gordos para biodiesel da primeira fração e de ADH da segunda fração e (3) os custos energéticos e económicos.

Do ponto de vista da viabilidade técnica, os procedimentos mais fáceis de executar são o A e o B, uma vez que não é necessário alterar a pressão e/ou temperatura ao longo do processo. Os restantes procedimentos requerem reduções da temperatura e pressão ou o aumento da pressão a meio do processo de extração. A redução da temperatura de trabalho implicaria laboratorialmente a remoção

de parte da água quente contida no banho e a sua substituição por água fria e possivelmente gelo, de modo a diminuir rapidamente a temperatura do banho de água. Contudo este processo pode ser demorado e exige o consumo adicional de água, o que torna o método menos sustentável a nível ambiental. Para além disso, este passo tornaria o processo industrial mais complexo e, por isso, os procedimentos que requerem reduções da temperatura de trabalho devem ser evitados.

A alteração da pressão operatória (redução ou aumento) ao longo do processo de extração não é tão problemática como a redução da temperatura, tanto a nível laboratorial como industrial. No equipamento de extração usado neste estudo apenas implicaria a utilização do regulador de pressão. Todavia, este passo também aumenta a complexidade do método de extração logo, se possível, deve ser evitado.

Analisando apenas os valores de recuperação de ácidos gordos para biodiesel da primeira fração e de ADH da segunda fração e não atendendo às condições operacionais de pressão e temperatura, conclui-se que o procedimento D é o mais favorável. Contudo, este procedimento requer a redução da temperatura em 17,4°C, o que aumenta consideravelmente a complexidade do processo.

Dos procedimentos cuja execução é mais simples, aquele que apresenta valores de recuperação de ácidos gordos para biodiesel na primeira fração e de ADH na segunda fração mais próximos dos obtidos em D trata-se do procedimento A. O procedimento A também é preferível ao B e ao D, dado que se opera a condições de pressão e temperatura mais reduzidas e o tempo de extração necessário é apenas 3 horas (em oposição às 4,5 horas do procedimento D), o que culmina em menores custos energéticos e económicos, tendo-se assim em consideração o terceiro critério mencionado. Deste modo, optou-se por realizar o procedimento de fracionamento A e os resultados obtidos para os rendimentos e recuperações encontram-se resumidos na Tabela 11, enquanto os perfis de ácidos gordos das duas frações recolhidas podem ser observados na Figura 22.

Tabela 11. Rendimentos e recuperações de lípidos, de ADH e de ácidos gordos para biodiesel obtidos na execução do procedimento de fracionamento A selecionado. A primeira fração foi recolhida após 30 minutos de extração a 41,3°C e 187,5 bar e a segunda fração foi recolhida após 2 horas e meia de extração nas mesmas condições de pressão e temperatura.

Fração	Rendimento		Rendimento		Rendimento	
	em lípidos (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Recuperação lípidos (%)	em ADH (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Recuperação ADH (%)	em AG p/ biodiesel (g/100 g biomassa seca e sem cinzas)	Recuperação AG p/ biodiesel (%)
1	3,62	21	0,44	13	1,39	27
2	10,69	63	2,25	64	3,33	65
Total	14,31	84	2,69	77	4,72	92

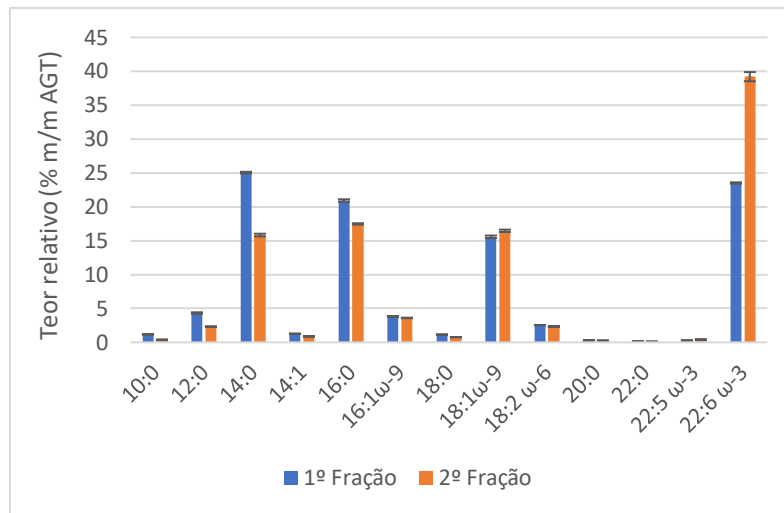


Figura 22. Representação gráfica da composição em ácidos gordos das duas frações obtidas na execução do procedimento de fracionamento A selecionado, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). A primeira fração foi recolhida após 30 minutos de extração a 41,3°C e 187,5 bar e a segunda fração foi recolhida após 2 horas e meia de extração nas mesmas condições de pressão e temperatura.

Ao analisar a Tabela 11 verifica-se que a primeira fração do processo de fracionamento, obtida nos primeiros 30 minutos de extração, apresentou um rendimento em lípidos totais de 3,62 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}, o que corresponde a recuperar 21% dos lípidos existentes na biomassa. Esta fração apresenta uma concentração de ácidos gordos para biodiesel de 38% (m/m), verificando-se que foi possível recuperar 27% destes ácidos gordos. Por outro lado, verifica-se que a quantidade de ADH extraída na primeira fração corresponde apenas a 13% do total de ADH na biomassa e o extrato obtido apresenta uma concentração de ADH nos lípidos de 12% (m/m).

Ao analisar o perfil de ácidos gordos do óleo da primeira fração, Figura 22, verifica-se que, apesar de o ácido gordo mais abundante não corresponder ao ADH, o seu teor relativo é elevado e por isso este ácido gordo deve ser removido antes de se ponderar a utilização do óleo restante na produção de um biocombustível. Esse óleo restante, sem ADH, apresenta um elevado teor de ácidos gordos saturados, em particular o ácido mirístico, o que indica que a transesterificação direta deste óleo pode resultar num biodiesel cujas propriedades não obedecem às especificações estabelecidas na norma internacional de biodiesel para veículos (EN14214), nomeadamente no que diz respeito a propriedades de frio.

Assim, uma alternativa mais viável consiste na adição do óleo restante (em proporções a estudar) a óleos com um conteúdo reduzido de ácidos gordos saturados, como óleo de soja ou óleo alimentar usado, obtendo-se uma mistura com características mais favoráveis para ser usada na produção de biodiesel. No entanto, poderá ser ainda mais viável a aplicação do óleo restante (sem ADH) na produção de biocombustíveis substitutos do gasóleo ou da gasolina por hidrogenação catalítica.

No que diz respeito à segunda fração, esta foi obtida após 2,5 horas de extração e apresentou um rendimento em lípidos totais de 10,69 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}. Nesta segunda fração o rendimento em ADH foi de 2,25 g/100 g_{biomassa seca e sem cinzas}, o que corresponde a recuperar 64% do ADH existente

na biomassa. Por outro lado, a concentração de ADH nos lípidos que constituem a segunda fração é de 21% (m/m).

Assim pode-se inferir que o procedimento de fracionamento realizado permitiu obter uma primeira fração com reduzida concentração de ADH e uma segunda fração que mantém uma maior abundância do ácido docosahexaenóico relativamente aos outros ácidos gordos, como se comprova na análise da Figura 22. A observação do perfil de ácidos gordos da segunda fração permite concluir que o ácido gordo mais abundante é claramente o ADH com um teor relativo aproximadamente igual a 40% (m/m AGT), enquanto os outros ácidos gordos maioritários - o ácido mirístico (14:0), o ácido palmítico (16:0) e o ácido oleico (18:1 ω -9) - apresentam teores relativos entre 15 e 17% (m/m AGT). Os restantes ácidos gordos podem ser considerados como minoritários, uma vez que o seu conteúdo relativo é inferior a 5% (m/m AGT).

Deste modo, é possível afirmar que o procedimento A é eficaz no fracionamento do óleo extraído da microalga *C. cohnii*, possibilitando a obtenção das duas frações mencionadas anteriormente. Assim, como este procedimento é dos mais simples de executar, apresenta diversas vantagens tanto do ponto de vista económico como energético e provou ser eficaz na realização do fracionamento pretendido, optou-se por não experimentar um dos outros procedimentos apresentados.

Por fim, conclui-se que através deste estudo foi possível comprovar a favorabilidade da aplicação do método de extração supercrítica numa biorrefinaria, dado que este permite efetuar, por meio de procedimentos sem grande complexidade, o fracionamento do óleo recuperado da microalga *C. cohnii*, possibilitando a produção de um biocombustível e a obtenção de um produto de alto valor acrescentado, o qual torna o processo mais sustentável a nível económico.

3.4. Pigmentos da *Cryptocodinium cohnii*

A observação dos extratos lipídicos obtidos no método de extração de Soxhlet com hexano e na extração supercrítica com dióxido de carbono permite notar que estes apresentam uma coloração amarela alaranjada, sendo esta tanto mais intensa quanto maior for a concentração de pigmentos na amostra. Na Figura 23 encontram-se representadas as quatro tonalidades distintas observadas para os extratos recolhidos nos dois métodos de extração testados.

Assim, procedeu-se à análise dos extratos lipídicos por espectrofotometria UV/Visível e por cromatografia líquida de alta eficiência com o objetivo de identificar os pigmentos presentes no óleo extraído da microalga *C. cohnii*. Os espetros e cromatogramas obtidos podem ser observados no Anexo H.

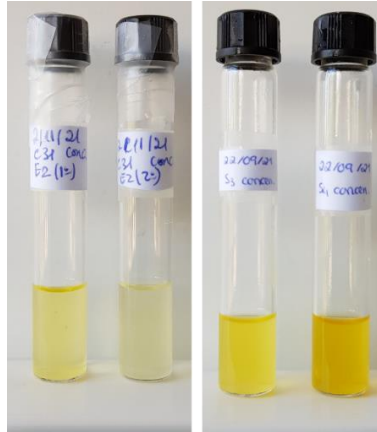


Figura 23. Tipos de tonalidades distintas observadas para os extratos recolhidos na extração convencional de Soxhlet e durante a extração supercrítica.

3.4.1. Conteúdo de pigmentos totais da microalga

Para determinar o conteúdo de pigmentos totais da microalga *C. cohnii* recorreu-se ao método de extração de Soxhlet com hexano aplicado a biomassa microalgal liofilizada e moída. O extrato obtido foi analisado por espectrofotometria UV/Visível e o teor de pigmentos totais da microalga foi calculado pela lei de Beer-Lambert e expresso em equivalentes de β -caroteno. Na Tabela 12 apresentam-se os rendimentos médios em pigmentos totais obtidos no método de extração de Soxhlet.

Tabela 12. Rendimentos médios em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração de Soxhlet efetuados ao longo do tempo.

Ensaio	Rendimento médio em pigmentos totais	
	($\mu\text{g/g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$)	
Abril	72,28	
Junho	62,08	
Agosto	40,68	
Setembro	32,37	

Ao analisar a Tabela 12 verifica-se que o rendimento médio em pigmentos totais obtido pelo método de Soxhlet diminui progressivamente ao longo do tempo, sendo máximo no ensaio efetuado em abril e mínimo no ensaio realizado em setembro. Assim, no período de 5 meses constata-se que o rendimento médio em pigmentos totais diminui em aproximadamente 55%.

Esta redução pode ser justificada pela degradação dos pigmentos durante o armazenamento da microalga e durante as manipulações associadas ao método de extração de Soxhlet que precedem a análise dos extratos por espectrofotometria. De facto, estes compostos sofrem facilmente degradação por ação da luz, oxigénio e temperatura, pelo que a sua manipulação exige alguns cuidados como manter as amostras em atmosfera inerte, em ambiente escuro e a baixas temperaturas. Apesar de todos os cuidados poderá existir alguma degradação, o que resulta em valores subestimados do rendimento em pigmentos.

Deste modo, considera-se que o resultado obtido no ensaio de abril é o que se encontra mais próximo do valor real do conteúdo de pigmentos totais da microalga *C. cohnii*, dado que a degradação destes compostos aumenta consideravelmente ao longo do período de armazenamento da biomassa.

Na literatura é possível encontrar outros estudos de análise do conteúdo de pigmentos totais desta microalga. Withers and Tuttle (1979) estudaram a produção de carotenoides pela *C. cohnii* na presença e ausência de luz e utilizando diversos tipos de inibidores no crescimento celular, reportando que para culturas sem inibidor cultivadas sobre luz visível ou no escuro o rendimento em pigmentos totais é igual a 83 ou 28 $\mu\text{g/g}$ biomassa seca e sem cinzas, respetivamente [65].

No estudo de Sun *et al.* (2019) analisou-se a acumulação de carotenoides na estirpe *C. cohnii* SUN sujeita a diversas condições de intensidade luminosa durante o crescimento celular. Na ausência de luz obteve-se um rendimento em pigmentos totais igual a 12,55 $\mu\text{g/g}$ biomassa seca e sem cinzas [75]. Zhang *et al.* efetuaram um estudo semelhante para a estirpe *C. cohnii* ATCC 30556, verificando que a presença de luz durante o crescimento celular da microalga resulta num rendimento em pigmentos totais de 53 $\mu\text{g/g}$ biomassa seca e sem cinzas, enquanto a fermentação no escuro rende apenas 12 $\mu\text{g/g}$ biomassa seca e sem cinzas [76].

De modo a facilitar a comparação do valor experimental com os da literatura, resume-se na Figura 24 os rendimentos em pigmentos totais da *C. cohnii* mencionados anteriormente.

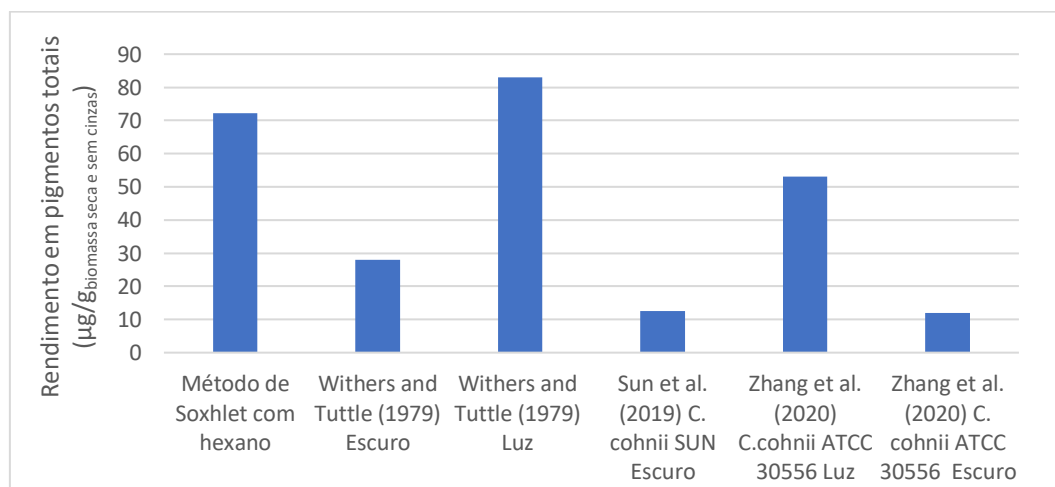


Figura 24. Rendimento em pigmentos totais da microalga *C. cohnii* obtido no método de Soxhlet com hexano testado neste estudo e reportados na literatura por outros autores.

Ao analisar a Figura 24 verifica-se que o rendimento em pigmentos totais obtido no método de Soxhlet com hexano é próximo do reportado por Withers and Tuttle (1979) e por Zhang *et al.* (2020) para outras estirpes de *C. cohnii* cultivadas sobre luz visível. Por outro lado, é interessante notar que o rendimento obtido neste estudo é consideravelmente superior aos valores reportados para biomassa resultante de uma fermentação no escuro, o que pode indicar que as restantes condições de cultura aplicadas na fermentação favorecem a acumulação de pigmentos na *C. cohnii*.

A observação da Figura 24 também permite afirmar que o rendimento em pigmentos totais da microalga *C. cohnii* é altamente variável e depende de fatores como a estirpe utilizada e as condições

de cultura aplicadas durante a fermentação da microalga, nomeadamente a presença ou ausência de luz.

3.4.2. Análise dos carotenoides presentes no óleo extraído

O extrato lipídico obtido no método de extração de Soxhlet com hexano também foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com o objetivo de identificar os carotenoides presentes no óleo extraído.

A análise dos estudos de outros autores, nomeadamente o de Withers and Tuttle (1979), permite concluir que a estirpe usual da microalga *C. cohnii* acumula maioritariamente β -caroteno e γ -caroteno (na presença ou ausência de luz), mas que a presença de inibidores no crescimento celular ou a alteração de certas condições de cultura podem resultar na síntese de outros tipos de carotenos [65].

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

Na Tabela 13 apresentam-se os teores relativos dos carotenoides registados nos cromatogramas dos extratos lipídicos de Soxhlet em relação ao total de pigmentos e ao total de carotenos.

Tabela 13. Teores relativos dos carotenoides e carotenos identificados nos cromatogramas dos extratos lipídicos de Soxhlet.

Carotenoides	% (m/m pigmentos totais)	% (m/m carotenos)
Outro	5,23	-
β-caroteno	31,4	33,1
γ-caroteno	31,3	33,0
Outro caroteno	19,9	21,0
Minor carotenos	12,2	12,9

Ao observar a Tabela 13 verifica-se que os pigmentos maioritários presentes no óleo extraído por Soxhlet são o β -caroteno e o γ -caroteno com teores de 31% relativamente ao total de pigmentos. Para além disso, registou-se nos cromatogramas a presença de um pico correspondente a um carotenoide mais polar e picos com tempos de retenção superiores ao do β -caroteno cuja identificação não foi possível efetuar, por isso considerou-se com base na informação disponível na literatura que esses correspondem a outros tipos de carotenos [65]. Dentro desses destaca-se o correspondente ao “outro caroteno” dado que este apresenta um teor relativo aproximadamente igual a 20% (m/m pigmentos totais), o qual é próximo dos teores de β -caroteno e γ -caroteno. Os restantes picos correspondem a carotenos que individualmente apresentam um conteúdo relativamente ao total de pigmentos muito reduzido, logo estes foram agrupados e categorizados como “minor carotenos”, apresentando globalmente um teor relativo de 12% (m/m pigmentos totais) o qual continua a ser significativamente inferior à contribuição do β -caroteno e do γ -caroteno.

A análise da Tabela 13 também permite afirmar que os pigmentos presentes no extrato lipídico de Soxhlet são maioritariamente carotenos, dado que o seu conteúdo relativamente ao total de pigmentos é aproximadamente igual a 95%. Para além disso, os carotenos acumulados preferencialmente pela *C. cohnii* nas condições de cultura testadas são o β -caroteno e o γ -caroteno, dado que apresentam um teor global de 66% (m/m) relativamente ao total de carotenos.

No estudo de Withers and Tuttle (1979) conclui-se que as células de *C. cohnii* resultantes de uma fermentação no escuro acumulam quantidades mais significativas de γ -caroteno do que de β -caroteno, dado que o seu teor relativamente ao total de pigmentos é 60 e 40% (m/m), respetivamente, o que corresponde a uma razão β -caroteno/ γ -caroteno de 0,67 [65]. Por outro lado, no estudo de Sun *et al.* (2019) verificou-se que a estirpe *C. cohnii* SUN cultivada no escuro acumula preferencialmente β -caroteno em oposição a γ -caroteno, como comprova a análise dos seus teores relativos, 73,5% e 24,3% (m/m pigmentos totais), respetivamente. Neste estudo conclui-se que a razão β -caroteno/ γ -caroteno diminui com o aumento da intensidade luminosa aplicada na etapa de fermentação, passando de 3 (fermentação no escuro) para 0,45 (fermentação com intensidade luminosa máxima).

Assim, conclui-se que os resultados experimentais obtidos neste estudo opõem-se aos reportados por outros autores, dado que o β -caroteno e o γ -caroteno são acumulados na mesma proporção pelas células da *C. cohnii*, o que corresponde a um valor da razão β -caroteno/ γ -caroteno igual a 1. Estas observações indicam que o tipo de carotenoides acumulados preferencialmente pela *C. cohnii* depende consideravelmente da estirpe em estudo e das condições de cultura aplicadas na etapa de produção da microalga.

3.4.3. Pigmentos extraídos pela extração supercrítica

Os extratos lipídicos obtidos durante o processo de extração supercrítica também foram analisados por espectrofotometria UV/Visível, de modo a quantificar o rendimento de extração de pigmentos obtido em cada extrato e, assim, analisar a evolução do mesmo ao longo do tempo. Nas Figuras 25 e 26 encontram-se representadas as curvas de extração relativas ao rendimento em pigmentos de cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental.

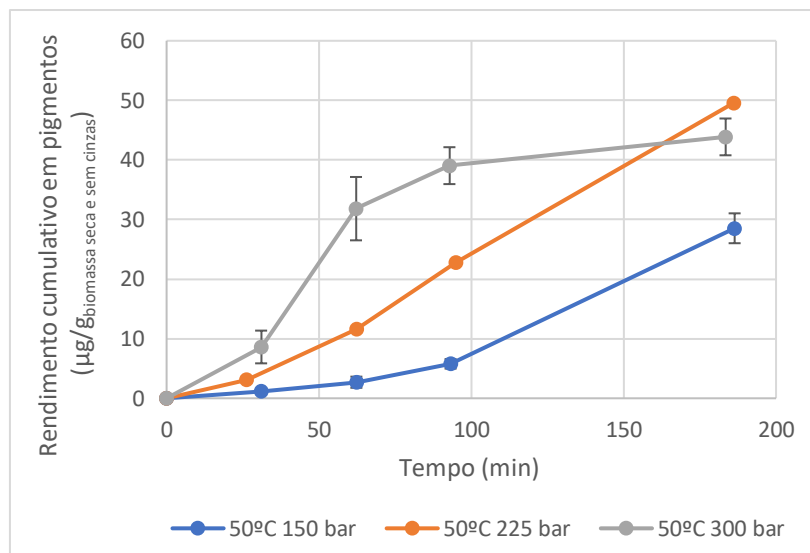


Figura 25. Representação gráfica da evolução do rendimento cumulativo em pigmentos ao longo do tempo de extração para as condições em que a temperatura se encontra fixa em 50°C e a pressão varia de 150 para 225 e 300 bar. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cada medida específica. Os quatro pontos observados no gráfico correspondem aos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração – ao fim de trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas.

Na Figura 25 verifica-se que, à temperatura fixa de 50°C, a variação da pressão de 150 para 225 bar resulta no aumento em 42,4% do rendimento total de pigmentos, enquanto a variação de 225 para 300 bar resulta na redução muito ligeira (em aproximadamente 11%) do rendimento. Estas observações são coincidentes com as verificadas para o rendimento em lípidos e em ácidos gordos.

Relativamente à evolução do rendimento em pigmentos ao longo do tempo, nota-se que a cinética de extração a 300 bar é mais rápida do que a verificada a 225 bar, dado que nos primeiros 90 minutos de extração o rendimento obtido à pressão mais elevada é superior ao alcançado à pressão intermédia. Tal observação deve-se ao facto de a solubilidade dos pigmentos no solvente supercrítico ser mais elevada a 50°C e 300 bar.

Na Figura 25 também se nota que as curvas de extração a 50°C e 150 ou 225 bar apresentam uma variação linear do rendimento em pigmentos com o tempo, em oposição à curva a 50°C e 300 bar que possui as duas regiões mencionadas anteriormente na secção 3.3.1.1. Deste modo, pode-se afirmar que nas duas primeiras condições pressão/temperatura mencionadas as três horas de extração não foram suficientes para garantir a recuperação de todos os pigmentos que tinham sido libertados pelas células fragmentadas, ou seja, a extração foi sempre controlada pela solubilidade dos compostos no solvente supercrítico. Estas observações diferem das verificadas para o rendimento em lípidos, pois nesse caso apenas a curva a 50°C e 150 bar apresenta uma forma completamente linear.

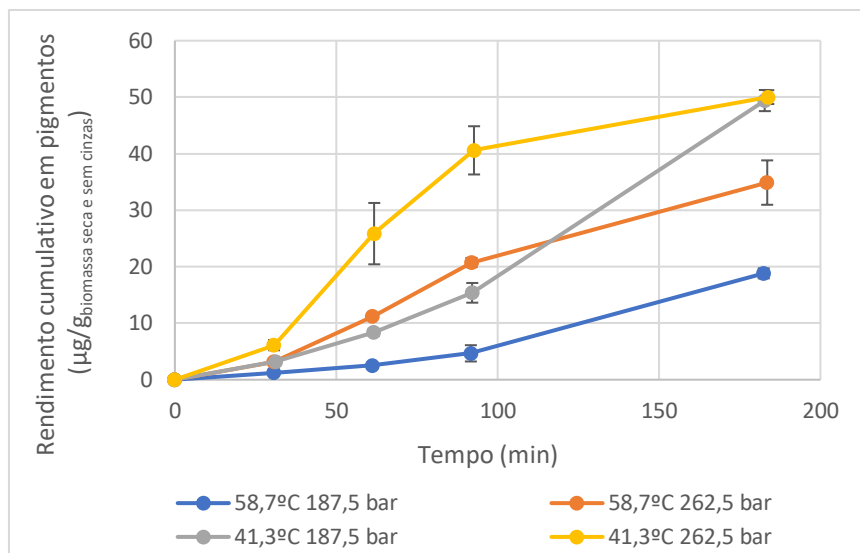


Figura 26. Representação gráfica da evolução do rendimento cumulativo em pigmentos ao longo do tempo de extração. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de cada medida específica. Os quatro pontos observados no gráfico correspondem aos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração – ao fim de trinta minutos, uma hora, uma hora e meia e três horas.

Ao observar as curvas de extração representadas na Figura 26 nota-se que, à temperatura fixa de 58,7°C, o aumento da pressão de 187,5 para 262,5 bar resulta no aumento em 46% do rendimento total de pigmentos, mas que à temperatura de 41,3°C a mesma variação da pressão não resulta numa diferença relevante no rendimento em causa. O comportamento do rendimento em pigmentos a 41,3°C difere do notado para o rendimento em lípidos e em ácidos gordos, dado que estes diminuíam com o aumento da pressão a esta temperatura.

Apesar de o rendimento total de pigmentos ser aproximadamente igual a 41,3°C e 187,5 ou 262,5 bar, verifica-se que a cinética de extração é mais rápida a 262,5 bar, uma vez que nos primeiros 90 minutos de extração o rendimento em pigmentos é superior nestas condições de pressão e temperatura.

Ao analisar as curvas de extração representadas na Figura 26 da perspetiva em que a pressão se encontra fixa nota-se que a 187,5 e 262,5 bar o aumento da temperatura de 41,3 para 58,7°C resulta na redução do rendimento total em pigmentos em 62 e 30%, respetivamente. Deste modo, pode-se afirmar que a 262,5 bar o comportamento do rendimento em pigmentos difere do verificado para o rendimento em lípidos e em ácidos gordos, uma vez que estes aumentam ligeiramente com o incremento da temperatura a esta pressão.

Na Figura 26 também se nota que as curvas de extração não apresentam o mesmo comportamento relativamente à evolução do rendimento em pigmentos ao longo do tempo, dado que as curvas a 41,3 ou 58,7°C e 262,5 bar apresentam as duas regiões mencionadas na secção 3.3.1.1, enquanto nas curvas a 41,3 ou 58,7°C e 187,5 bar o rendimento em pigmentos varia linearmente com o tempo, o que indica que nas três horas de extração o processo é sempre controlado pela solubilidade dos pigmentos no solvente supercrítico. Estas observações diferem das verificadas para o rendimento

em lípidos, pois nesse caso apenas a curva a 58,7°C e 187,5 bar apresenta uma forma completamente linear.

O rendimento total em pigmentos obtido por extração supercrítica para cada condição pressão/temperatura testada experimentalmente pode ser comparado com o conteúdo de pigmentos totais determinado pelo método de extração convencional de Soxhlet. Na Tabela 14 apresentam-se os rendimentos totais de extração de pigmentos obtidos para cada condição pressão/temperatura de extração supercrítica.

Tabela 14. Rendimento de extração total de pigmentos obtido na extração supercrítica para cada condição pressão/temperatura testada experimentalmente.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento total de pigmentos
		($\mu\text{g/g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$)
150,0	50,0	28,53
225,0	50,0	49,55
300,0	50,0	43,87
187,5	41,3	49,40
262,5	41,3	50,01
187,5	58,7	18,82
262,5	58,7	34,89

A análise da Tabela 14 permite verificar que o rendimento total de pigmentos obtido no método de extração supercrítica depende consideravelmente das condições de pressão e temperatura aplicadas durante o processo, uma vez que os seus valores variam entre 18,82 e 50,01 $\mu\text{g/g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$. Contudo, para a maioria das condições de pressão e temperatura testadas experimentalmente é possível obter um rendimento total em pigmentos compreendido no intervalo 40 a 50 $\mu\text{g/g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$.

Ao observar a Tabela 14 também se nota que as condições de temperatura e pressão que maximizam o rendimento de extração total de pigmentos são 41,3°C e 262,5 bar, alcançando-se um rendimento igual a 50,01 $\mu\text{g/g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$. Comparando este valor com o conteúdo de pigmentos totais da biomassa estimado por Soxhlet, 72,28 $\mu\text{g/g}_{\text{biomassa seca e sem cinzas}}$, verifica-se que nas melhores condições de pressão e temperatura a extração supercrítica permite recuperar aproximadamente 69% dos pigmentos presentes na microalga *C. cohnii*. Deste modo, é possível concluir que as condições de pressão e temperatura testadas experimentalmente durante o processo de extração supercrítica não apresentam uma elevada eficiência na recuperação dos pigmentos acumulados pelas células da microalga *C. cohnii*.

4. Conclusões e perspetivas futuras

No presente trabalho pretendia-se avaliar a aplicação da extração supercrítica com dióxido de carbono na extração e fracionamento dos lípidos sintetizados pela microalga marinha heterotrófica *Cryptocodinium cohnii*, de modo a desenvolver um processo simples e amigável do ambiente para a coprodução de biocombustíveis e produtos ω -3 de valor acrescentado, o ácido docosaheptaenóico.

A produção da microalga *C. cohnii* num bioreator de bancada de 7 L a operar em regime *fed-batch* com glicerol bruto como fonte de carbono resultou numa concentração final de biomassa igual a 20,2 g/L e um conteúdo de ADH na biomassa de 5,3% (m/m_{biomassa seca e sem cinzas}). Estes valores são inferiores aos reportados por outros estudos de síntese desta microalga com fontes de carbono puras (glucose, ácido acético e etanol). Assim, conclui-se que o uso de glicerol bruto não resultou na produção de culturas de elevada densidade celular e com um elevado conteúdo de ADH, no entanto este substrato é preferível às fontes de carbono puras dado que se trata de um subproduto industrial de custo reduzido, o que resulta na redução dos custos do processo e no cumprimento dos princípios da economia circular, favorecendo-se deste modo a sustentabilidade do processo de produção da microalga *C. cohnii*.

Posteriormente, a biomassa obtida na fermentação com glicerol bruto foi aplicada no processo de otimização do método de extração supercrítica, no qual se procedeu à variação da pressão e temperatura de trabalho, de modo a identificar as condições operatórias que maximizam os rendimentos de extração globais de lípidos, de ADH e de ácidos gordos apropriados para a produção de biodiesel. Nesse processo de otimização recorreu-se a um planeamento experimental baseado numa superfície de resposta, desenvolvido através da distribuição espacial de dois fatores de Doehlert. Esta abordagem permitiu concluir que em condições de pressão e temperatura reduzidas a intermédias, isto é, entre 187,5 e 250 bar e entre 40 e 50°C, é possível maximizar os rendimentos de extração avaliados.

O planeamento experimental também permitiu avaliar o impacto relativo da pressão e temperatura nos rendimentos de extração, concluindo-se que, globalmente, a interação entre a pressão e a temperatura apresenta uma influência significativa nos rendimentos, logo estes parâmetros operacionais devem ser controlados em simultâneo, contudo a variação da pressão induz um impacto mais considerável no rendimento do que a variação da temperatura.

Ao comparar o processo de extração supercrítica com o método convencional de Soxhlet, relativamente ao rendimento total de lípidos, conclui-se que, em determinadas condições de pressão e temperatura, a extração supercrítica permite obter um rendimento de extração de lípidos superior ao método de Soxhlet. Esta conclusão é extremamente importante tendo em consideração que a extração supercrítica pode ser considerada como um processo mais sustentável do ponto de vista ambiental.

Neste estudo também se demonstrou a favorabilidade de aplicar a extração supercrítica na biorrefinaria da microalga *C. cohnii*, uma vez que se executou o fracionamento do óleo extraído em

duas frações distintas – uma primeira fração rica em ácidos gordos saturados e monoinsaturados cuja aplicação na produção de um biocombustível é adequada e uma segunda fração com uma maior abundância do composto ω -3 de valor acrescentado, o ADH. Ao realizar a extração a 41,3°C e 187,5 bar e ao recolher o óleo em dois instantes distintos, primeiro ao fim de 30 minutos e depois ao fim de 2,5 horas, obteve-se uma primeira fração com uma concentração de ácidos gordos saturados e monoinsaturados de 38% (m/m) e de ADH de 12% (m/m) e uma segunda fração com uma concentração de ADH de 21% (m/m), o que corresponde a uma recuperação de 64% do ADH existente na biomassa. Assim, por meio de um processo de extração sustentável e sem grande complexidade é possível coproduzir um biocombustível e um produto de alto valor acrescentado que pode tornar o processo de produção do biocombustível economicamente viável.

Para além disso, avaliou-se a extração dos pigmentos acumulados pela microalga *C. cohnii* nas condições de crescimento testadas, verificando-se que a extração por Soxhlet permitiu obter um rendimento em pigmentos totais, em equivalentes de β -caroteno, de 72,28 $\mu\text{g/g}$ biomassa seca e sem cinzas com uma composição de 31,4% (m/m) em β -caroteno e 31,3% (m/m) em γ -caroteno. Na extração supercrítica o rendimento máximo em pigmentos totais foi 50,01 $\mu\text{g/g}$ biomassa seca e sem cinzas obtido a 41,3°C e 262,5 bar, o que corresponde a uma recuperação de aproximadamente 69% dos pigmentos extraídos por Soxhlet.

Por fim, indica-se de seguida outras abordagens de trabalho que poderão ser desenvolvidas, promovendo-se a continuidade da exploração da microalga *Cryptocodinium cohnii* como uma fonte de óleo para a produção de um biocombustível e produtos ω -3 de valor acrescentado:

- Aprofundar a otimização das condições de cultura na produção da microalga *C. cohnii* com glicerol bruto como fonte de carbono, com o objetivo de obter uma maior densidade celular e uma biomassa com um teor mais elevado de ADH;
- Explorar o uso de outras fontes de carbono de baixo custo na produção da microalga *C. cohnii*;
- Avaliar a possibilidade de se aplicar o óleo da primeira fração obtida no procedimento de fracionamento na produção de biocombustíveis substitutos do gásóleo ou da gasolina por hidrogenação catalítica, após remoção do ácido docosahexaenóico existente nesse óleo;
- Analisar a atividade antioxidante e antimicrobiana da segunda fração obtida no procedimento de fracionamento, com o objetivo de avaliar o seu potencial uso pelas indústrias farmacêutica e nutracêutica;
- E executar um planeamento experimental onde se avalia o efeito da pressão e do tempo nos rendimentos de extração de lípidos, de ADH e de ácidos gordos para biodiesel, à temperatura fixa de 41,3°C, de modo a otimizar o procedimento de fracionamento. Neste planeamento, o domínio experimental da pressão e do tempo seria 125 a 200 bar e 30 minutos a 2,5 horas, respetivamente.

5. Referências

- [1] S. Segupta, "Biggest Threat to Humanity? Climate Change, U.N. Chief Says," *The New York Times*, 29 Março 2018. [Online]. Available: <https://www.nytimes.com/2018/03/29/climate/united-nations-climate-change.html>. [Acedido em Julho 2021].
- [2] BP, "Energy Outlook: 2020 edition," 2020.
- [3] M. d. A. e. T. Energética, "Roteiro para a Neutralidade Carbónica 2050," 2019.
- [4] P. I. s. a. A. Climáticas, "Relatório Especial sobre o Aquecimento Global de 1,5°C," 2018.
- [5] S. Rocca, A. Agostini, J. Giuntoli e L. Marelli, "Biofuels from algae: technology options, energy balance and GHG emissions; Insights from a literature review EUR 27582," 2015.
- [6] I. C. o. C. Transportation, "Final recast Renewable Energy Directive for 2012-2030 in the European Union," 2018.
- [7] I. Rawat, R. R. Kumar, T. Mutanda e F. Bux, "Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production," *Applied Energy*, vol. 103, pp. 444-467, 2013.
- [8] A. Mendes, A. Reis, R. Vasconcelos, P. Guerra e T. L. d. Silva, "Crypthecodinium cohnii with emphasis on DHA production: a review," *Journal of Applied Phycology*, vol. 21, nº 2, pp. 199-214, 2009.
- [9] T. L. d. Silva, P. Moniz, C. Silva e A. Reis, "The Dark Side of Microalgae Biotechnology: A Heterotrophic Biorefinery Platform Directed to w-3 Rich Lipid Production," *Microorganisms*, vol. 7, nº 12, pp. 1-21, 2019.
- [10] T. Taborda, P. Moniz, A. Reis e T. L. d. Silva, "Evaluating low-cost substrates for Crypthecodinium cohnii lipids and DHA production, by flow cytometry," *Journal of Applied Phycology*, vol. 33, nº 1, pp. 263-274, 2021.
- [11] A. Mendes, P. Guerra, V. Madeira, F. Ruano, T. L. d. Silva e R. Alberto, "Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga Crypthecodinium cohnii CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, nº 9, pp. 1209-1215, 2007.
- [12] J. Wynn, P. Behrens, A. Sundararajan, J. Hansen e K. Apt, "Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates," em *Single Cell Oils: Microbial and Algal Oils*, 2ª ed., AOCs Press, 2010, pp. 115-219.
- [13] P. C. Calder, "Docosahexaenoic Acid," *Annals of Nutrition and Metabolism*, vol. 69, nº 1, pp. 8-21, 2016.
- [14] D. J. Kyle, "The Large-Scale Production and Use of a Single-Cell Oil Highly Enriched in Docosahexaenoic Acid," em *Omega-3 Fatty Acids*, vol. 788, American Chemical Society, 2001, pp. 92-107.
- [15] F. J. Barba, N. Grimi e E. Vorobiev, "New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae," *Food Engineering Reviews*, vol. 7, nº 1, pp. 45-62, 2015.

- [16] S. Vasistha, A. Khanra, M. Clifford e M. P. Rai, "Current advances in microalgae harvesting and lipid extraction processes for improved biodiesel production: A review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 137, 2012.
- [17] J. Harris, K. Viner, P. Champagne e P. G. Jessop, "Advances in microalgal lipid extraction for biofuel production: a review," *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 12, pp. 1118-1135, 2018.
- [18] A. Zygler, M. Slominska e J. Namiesnik, "Soxhlet extraction and new developments such as Soxtec," *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, vol. 2, pp. 65-82, 2012.
- [19] H. Sati, M. Mitra, S. Mishra e P. Baredar, "Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review," *Algal Research*, vol. 38, pp. 1-12, 2019.
- [20] P. T. Anastas e M. M. Kirchhoff, "Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry," *Accounts of Chemical Research*, vol. 35, n° 9, pp. 686-694, 2002.
- [21] R. Kapoore, T. Butler, J. Pandhal e S. Vaidyanathan, "Microwave-assisted extraction for microalgae: From biofuels to biorefinery," *Biology*, vol. 7, n° 1, pp. 1-25, 2018.
- [22] M. Ali e I. A. Watson, "Microwave treatment of wet algal paste for enhanced solvent extraction of lipids for biodiesel production," *Renewable Energy*, vol. 76, pp. 470-477, 2015.
- [23] G. Cravotto, L. Boffa, S. Mantegna, P. Perego, M. Avogadro e P. Cintas, "Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 15, n° 5, pp. 898-902, 2008.
- [24] P. Mercer e R. Armenta, "Developments in oil extraction from microalgae," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 113, n° 5, pp. 539-547, 2011.
- [25] R. Zhang, X. Gu, G. Xu e X. Fu, "Improving the lipid extraction yield from *Chlorella* based on the controllable electroporation of cell membrane by pulse electric field," *Bioresource Technology*, vol. 330, 2021.
- [26] S.-F. Han, W. Jin, Q. Yang, A. E.-F. Abomohra, X. Zhou, R. Tu, C. Chen e G.-J. Xie, "Application of pulse electric field pretreatment for enhancing lipid extraction from *Chlorella pyrenoidosa* grown in wastewater," *Renewable Energy*, vol. 133, pp. 233-239, 2019.
- [27] M. Goettel, C. Eing, C. Gusbeth, R. Straessner e W. Frey, "Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae," *Algal Research*, vol. 2, n° 4, pp. 401-408, 2013.
- [28] Y. S. Lai, F. D. Francesco, A. Aguinaga, P. Parameswaran e B. E. Ritmann, "Improving lipid recovery from *Scenedesmus* wet biomass by surfactant-assisted disruption," *Green Chemistry*, vol. 18, n° 5, pp. 1319-1326, 2016.
- [29] W.-C. Huang e J.-D. Kim, "Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of microalgal biomass," *Bioresource Technology*, vol. 149, pp. 579-581, 2013.
- [30] G. Maffei, M. P. Braccialle, A. Broggi, A. Zuurro, M. L. Santarelli e R. Lavecchia, "Effect of an enzymatic treatment with cellulase and mannanase on the structural properties of *Nannochloropsis* microalgae," *Bioresource Technology*, vol. 249, pp. 592-598, 2018.
- [31] Y. Zhang, X. Kong, Z. Wang, Y. Sun, S. Zhu, L. Li e P. Lv, "Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp.," *Renewable Energy*, vol. 125, pp. 1049-1057, 2018.
- [32] H. Taher, S. Al-Zuhair, A. H. Al-Marzouqi, Y. Haik e M. Farid, "Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production," *Biomass and Bioenergy*, vol. 66, pp. 159-167, 2014.

- [33] S. P. M. Ventura, B. P. Nobre, F. Ertekin, M. Hayes, M. Vaquero-García, F. Vieira, M. Koc, L. Gouveia, M. R. Aires-Barros e A. M. F. Palavra, "Extraction of value-added compounds from microalgae," em *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-products*, Woodhead Publishing, 2018, pp. 461-483.
- [34] J. A. Gerde, M. Montalbo-Lomboy, L. Yao, D. Grewell e T. Wang, "Evaluation of microalga cell disruption by ultrasonic treatment," *Bioresource Technology*, vol. 125, pp. 175-181, 2012.
- [35] S.-A. Choi, J.-S. Lee, Y.-K. Oh, M.-J. Jeong, S. W. Kim e J.-Y. Park, "Lipid extraction from *Chlorella vulgaris* by molten-salt/ionic liquid mixtures," *Algal Research*, vol. 3, nº 1, pp. 44-48, 2014.
- [36] Y.-H. Kim, S. Park, M. H. Kim, Y.-K. Choi, Y.-H. Yang, H. J. Kim, H. Kim, H.-S. Kim, K.-G. Song e S. H. Lee, "Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* using [BMIM][MeSO₄]," *Biomass and Bioenergy*, vol. 56, pp. 99-103, 2013.
- [37] A. Cicci, G. Sed, P. G. Jessop e M. Bravi, "Circular extraction: An innovative use of switchable solvents for the biomass biorefinery," *Green Chemistry*, vol. 20, nº 17, pp. 3908-3911, 2018.
- [38] C. Samorì, D. L. Barreiro, R. Vet, L. Pezzolesi, D. W. F. Brillman, P. Galletti e E. Tagliavini, "Effective lipid extraction from algae cultures using switchables solvents," *Green Chemistry*, vol. 15, nº 2, pp. 353-356, 2013.
- [39] M. Herrero e E. Ibáñez, "Green processes and sustainability: An overview on the extraction of high added-value products from seaweeds and microalgae," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 96, pp. 211-216, 2015.
- [40] H.-C. Wang, W. Klinthong, Y.-H. Yang e C.-S. Tan, "Continuous extraction of lipids from *Schizochytrium* sp. by CO₂-expanded ethanol," *Bioresource Technology*, vol. 189, pp. 162-168, 2015.
- [41] M. A. Mottaleb e S. D. Sarker, "Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation," em *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*, vol. 864, Humana Press, 2012, pp. 75-87.
- [42] Y. Tang, R. J. N. Zhang, N. Sharif, M. J. Betenbaugh e F. Wang, "Efficient lipid extraction and quantification of fatty acids from algal biomass using accelerated solvent extraction (ASE)," *RSC Advances*, vol. 6, nº 35, pp. 127-134, 2016.
- [43] Y. Du, B. Schuur, S. R. A. Kersten e D. W. F. Brillman, "Opportunities for switchable solvents for lipid extraction from wet algal biomass: An energy evaluation," *Algal Research*, vol. 11, pp. 271-283, 2015.
- [44] T. J. Bruno, C. A. N. d. Castro, J.-F. P. Hamel e A. A. F. Palavra, "Supercritical Fluid Extraction of Biological Products," em *Recovery Processes for Biological Materials*, John Wiley & Sons, 1993, pp. 302-354.
- [45] "Chemistry LibreTexts," Agosto 2020. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_General_Chemistry_\(Petrucci_et_al.\)/12%3A_Intermolecular_Forces%3A_Liquids_And_Solids/12.4%3A_Phase_Diagrams](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_General_Chemistry_(Petrucci_et_al.)/12%3A_Intermolecular_Forces%3A_Liquids_And_Solids/12.4%3A_Phase_Diagrams). [Acedido em Setembro 2021].
- [46] R. M. Couto, Simões, A. Reis, T. L. d. Silva, V. H. Martins e Y. Sánchez-Vicente, "Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*," *Engineering in Life Sciences*, vol. 10, nº 2, pp. 158-164, 2010.
- [47] L. P. Cunico e C. Turner, "Supercritical Fluids and Gas-Expanded Liquids," em *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, F. Pena-Pereira e M. Tobiszewski, Edits., Elsevier, 2017, pp. 155-214.

- [48] F. Temelli, "Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 47, n° 3, pp. 583-590, 2009.
- [49] R. L. Mendes, A. D. Reis, A. P. Pereira, M. T. Cardoso, A. F. Palavra e J. P. Coelho, "Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid (GLA) from the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima*: experiments and modeling," *Chemical Engineering Journal*, vol. 105, n° 3, pp. 147-151, 2005.
- [50] M. D. Macías-Sánchez, J. M. Fernandez-Silva, F. G. Acién-Fernández, M. C. Céron García e E. Molina Grima, "Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*," *Food Chemistry*, vol. 123, n° 3, pp. 928-935, 2010.
- [51] Z. Wu, S. Wu e X. Shi, "Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*," *Food Process Engineering*, vol. 30, n° 2, pp. 174-185, Abril 2007.
- [52] B. Nobre, F. Marcelo, R. Passos, L. Beirão e A. Palavra, "Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*," *European Food Research and Technology*, vol. 223, pp. 787-790, Março 2006.
- [53] R. L. Mendes, H. L. Fernandes, J. P. Coelho, E. C. Reis, J. M. S. Cabral, J. M. Novais e A. F. Palavra, "Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*," *Food Chemistry*, vol. 53, n° 1, pp. 99-103, 1995.
- [54] M. D. Macías-Sánchez, C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L. M. Lubián e O. Montero, "Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*," *Talanta*, vol. 77, n° 3, pp. 948-952.
- [55] S. Tang, C. Qin, H. Wang, S. Li e S. Tian, "Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 57, n° 1, pp. 44-49, 2011.
- [56] A. Zinnai, C. Sanmartin, I. Taglieri, G. Andrich e F. Venturi, "Supercritical fluid extraction from microalgae with high content of LC-PUFAs. A case of study: Sc-CO₂ oil extraction from *Schizochytrium sp.*," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 116, pp. 126-131, Outubro 2016.
- [57] R. L. Mendes, H. L. Fernandes, J. A. P. Coelho, J. M. S. P. A. M. F. Cabral e J. M. Novais, "Supercritical carbon dioxide extraction of hydrocarbons from the microalga *Botryococcus braunii*," *Journal of Applied Phycology*, vol. 6, pp. 289-293, junho 1994.
- [58] B. Klejdus, J. Kopecký, L. Benesová e J. Vacek, "Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species," *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, n° 5, pp. 763-771, Janeiro 2009.
- [59] J.-M. Char, J.-K. Wang, T.-J. How e Q. Chien, "Biodiesel Production from Microalgae through Supercritical Carbon," *Journal of the Japan Institute of Energy*, vol. 90, pp. 369-373, 2011.
- [60] A. Santana, S. Jesus, M. A. Larrayoz e R. M. Filho, "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Algal Lipids for the Biodiesel Production," *Procedia Engineering*, vol. 42, pp. 1755-1761, 2012.
- [61] L. Soh e J. Zimmerman, "Biodiesel production: the potential of algal lipids extracted with supercritical carbon dioxide," *Green Chemistry*, vol. 13, n° 6, pp. 1422-1429, Junho 2011.
- [62] D. H. Doehlert, "Uniform Shell Designs," *Journal of the Royal Statistical Society Series*, vol. 93, n° 3, pp. 231-239, Novembro 1970.
- [63] S. N. Deming e S. L. Morgan, *Experimental design: a chemometric approach*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987.
- [64] K. S. Rowan, *Photosynthetic Pigment of Algae*, Nova Iorque: Cambridge University Press, 1989.

- [65] N. W. Withers e R. C. Tuttle, "Carotenes from mutants of the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*," *The Journal of Protozoology*, vol. 26, pp. 135-138, 1979.
- [66] P. Gupta e Y. S. R. Sreelaksmi, "A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography," *Plant Methods*, vol. 11, nº 5, pp. 1-12, 2015.
- [67] W. Safdar, M. Shamoan, X. Zan, J. Haider, H. R. Sharif, M. Shoaib e Y. Song, "Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii* under different nitrogen source and concentration," *AMB Express*, vol. 7, nº 85, 2017.
- [68] M. E. de Swaaf, J. T. Pronk e L. Sijtsma, "Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol," *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 61, pp. 40-43, 2003.
- [69] M. E. de Swaaf, L. Sijtsma e J. T. Pronk, "High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 81, pp. 666-672, 2003.
- [70] H. Sovová, "Rate of the vegetable oil extraction with supercritical carbon dioxide - Modelling of extraction curves," *Chemical Engineering Science*, vol. 49, nº 3, pp. 409-414, 1993.
- [71] H. Sovová, "Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 33, pp. 35-52, 2005.
- [72] A. Mouahid, C. Crampon, S. A. Toudji e E. Badens, "Supercritical CO₂ Extraction of neutral lipids from microalgae: experiments and modelling," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 77, pp. 7-16, 2013.
- [73] H. Sovová, B. P. Nobre e A. M. Palavra, "Modelling of the kinetics of supercritical fluid extraction of lipids from microalgae with emphasis on extraction desorption," *Materials*, vol. 9, nº 423, pp. 1-19, 2016.
- [74] S. Trek, "F Distribution Calculator," [Online]. Available: <https://stattrek.com/online-calculator/f-distribution.aspx>. [Acedido em 20 Setembro 2021].
- [75] D. Sun, Z. Zhang, Y. Zhang, K. W. Cheng e F. Chen, "Light induces carotenoids accumulation in a heterotrophic docosahexaenoic acid producing microalga, *Cryptocodinium* sp. SUN," *Bioresource Technology*, nº 276, pp. 177-182, 2019.
- [76] Z. Zhang, D. Sun e F. Chen, "Comparative transcriptome analysis revealing the mechanisms underlying light-induced total fatty acid and carotenoid accumulation in *Cryptocodinium* sp. SUN," *Algal Research*, nº 47, pp. 1-9, 2020.
- [77] N. Draper e H. Smith, *Applied regression analysis*, Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1966.

Anexos

Anexo A - Reagentes e solventes

Tabela A1. Solventes e reagentes usados neste trabalho experimental.

Nome	Fórmula química	Pureza (%)	Marca	Aplicação
Hexano	C ₆ H ₁₄	95	Fisher Chemical	Soxhlet; ESC
Metanol para análise	CH ₃ OH	99,9	Merck	Análise dos ácidos gordos
Dióxido de carbono liquefeito	CO ₂	99,998 (N48)	Air Liquide	ESC
Sulfato de sódio anidro	Na ₂ SO ₄	99	Merck	Análise dos ácidos gordos
Cloreto de acetilo	C ₂ H ₃ ClO	98,5	Panreac	Análise dos ácidos gordos
Heptano	C ₇ H ₁₆	99,93	Fisher Scientific	Análise dos ácidos gordos
Acetona	C ₃ H ₆ O	≥ 99,5	Sigma Aldrich	Extração de pigmentos
Etanol absoluto anidro	C ₂ H ₅ OH	≥ 99,9	Group Carlo Erba	Extração de pigmentos
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	≥ 97%	Merck	Teor de azoto
Metanol para HPLC	CH ₃ OH	≥ 99,9	Honeywell	Análise de pigmentos
Acetonitrilo	CH ₃ CN	≥ 99,9	Honeywell	Análise de pigmentos
Padrão β-caroteno		≥ 97%	Calbiochem	Análise de pigmentos
Extrato de levedura			HiMedia	Meio de cultura
Sal marinho			OceanusIberia	Meio de cultura
Extrato de milho			COPAM	Meio de cultura
Glicerol industrial			Iberol	Meio de cultura

Anexo B – Cálculo do volume de dióxido de carbono corrigido

Durante o ensaio experimental registou-se o volume de gás que passa pelo contador de gás húmido às condições de pressão e temperatura do contador na altura do trabalho. Para obter o volume de gás utilizado em cada medida corrigido para as condições de pressão e temperatura normais recorreu-se à Equação 22, onde ΔV é o volume de gás medido no contador, $T_{contador}$ é a temperatura de saída do gás do contador e $P_{gás\ contador}$ corresponde à pressão do gás à saída do contador.

$$V_{corrigido\ PTN} = \Delta V \times \frac{P_{gás\ contador}}{760} \times \frac{273,15}{T_{contador}} \quad (22)$$

A pressão do gás à saída do contador foi determinada através da Equação 23, onde P_{atm} é a pressão atmosférica lida no barómetro, $C_{p\ atm}$ é a correção à pressão atmosférica para a temperatura de 273,15 K, valor retirado da literatura para cada par $P_{atm}/T_{ambiente}$, Δh_{man} representa a altura de água do tubo no copo presente no exterior (e o valor de 13,6 é a densidade do mercúrio, a qual é utilizada para converter mmH₂O em mmHg), e, por fim, $P_{H_2O}^{sat, T_{contador}}$ é a pressão de saturação da água à temperatura de saída do gás no contador, a qual pode ser consultada na literatura.

$$P_{gás\ contador} = (P_{atm} - C_{p\ atm}) + \frac{\Delta h_{man}}{13,6} - P_{H_2O}^{sat, T_{contador}} \quad (23)$$

Anexo C – Cálculo dos parâmetros do modelo polinomial

Para determinar os parâmetros β dos modelos polinomiais foi necessário proceder à codificação dos vários níveis de cada fator experimental. A codificação dos níveis permite obter o planeamento experimental, o qual é simétrico em relação ao centro que corresponde ao valor médio dos limites mínimo e máximo dos fatores e toma o valor zero. As distâncias do centro a qualquer um dos extremos são normalizadas à unidade, ou seja, o intervalo do centro para o limite superior é igual a +1 e para o limite inferior é igual a -1. As vantagens da codificação dos níveis dos fatores foram descritas na sua totalidade por Deming and Morgan (1987) [63].

A transformação dos níveis dos fatores, Z_i , em unidades codificadas, F_i , foi obtida através da Equação 24, onde Z_i^0 representa o valor real do fator no centro do planeamento experimental e ΔZ_i ou F_i são as unidades codificadas.

$$F_i = \frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \quad (24)$$

Na Tabela C1 encontra-se o resultado da codificação dos níveis de cada fator experimental.

Tabela C1. Codificação dos níveis dos fatores testados experimentalmente de acordo com o planeamento experimental.

Teste	Valores reais		Valores codificados	
	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Pressão	Temperatura
1	150,0	50	-1	0
2	225,0	50	0	0
3	300,0	50	1	0
4	187,5	41,3	-0,5	-0,866
5	262,5	41,3	0,5	-0,866
6	187,5	58,7	-0,5	0,866
7	262,5	58,7	0,5	0,866

A estimativa dos parâmetros β dos modelos polinomiais consiste simplesmente numa solução matricial para equações lineares simultâneas, Equação 25. Nesta equação, Y representa a matriz com as respostas obtidas experimentalmente e F os valores codificados dos fatores.

$$Y = F \times \beta \leftrightarrow \beta = 1/F \times Y \quad (25)$$

Note-se que a matriz F não pode ser multiplicada diretamente pela Y , uma vez que o número de colunas da matriz $1/F$ é diferente do número de linhas da Y . Assim, o cálculo dos parâmetros β depende da realização da transformação demonstrada por Draper and Smith (1966) [77], Equação 26, onde F' representa a matriz transposta de F .

$$\beta = (F'F) \times F'Y \quad (26)$$

Anexo D – Cálculo das variâncias da análise estatística

Tal como mencionado anteriormente, a validação da adequação dos modelos polinomiais quanto à sua representação do conjunto de dados foi efetuada através do teste de Fisher de razão de variâncias. Assim, a partir da matriz das respostas experimentais, Y , foi possível calcular diferentes tipos de variâncias, as quais encontram-se resumidas na Tabela D1.

Tabela D1. Cálculo das variâncias associadas à análise da variância.

Variâncias	Álgebra	Quantidades derivadas dos resultados
Soma total dos quadrados $SS_T = \sum_{i=1}^n Y^2$	$Y'Y$	Matriz das respostas experimentais $Y = \begin{bmatrix} y_{11} \\ \vdots \\ y_{1n} \end{bmatrix}$
Variância devido à média $SS_{\text{mean}} = \sum_{i=1}^n \bar{Y}^2$	$\bar{Y}'\bar{Y}$	Matriz da média das respostas $\bar{Y} = \begin{bmatrix} \bar{y}_1 \\ \vdots \\ \bar{y}_1 \end{bmatrix}$
Variância corrigida para a média $SS_{\text{corr.}} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$	$C'C$	Matriz das repostas corrigidas com a média $C = Y - \bar{Y} = \begin{bmatrix} y_{11} - \bar{y}_1 \\ \vdots \\ y_{1n} - \bar{y}_1 \end{bmatrix}$
Variância devido aos fatores $SS_{\text{fact.}} = \sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	$F'F$	Matriz da contribuição dos fatores $F = \hat{Y} - \bar{Y} = \mathbf{X}\mathbf{B} - \bar{Y} = \begin{bmatrix} y_{11} - \bar{y}_1 \\ \vdots \\ y_{1n} - \bar{y}_1 \end{bmatrix}$
Variância dos residuais $SS_{\text{resid.}} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2$	$R'R$	Matriz dos residuais $R = Y - \hat{Y} = Y - \mathbf{X}\hat{\mathbf{B}} = \begin{bmatrix} y_{11} - \hat{y}_{11} \\ \vdots \\ y_{1n} - \hat{y}_{1n} \end{bmatrix}$
Variância devido ao desajuste $SS_{\text{lof}} = \sum_{i=1}^n (\bar{Y}_i - \hat{Y}_i)^2$	$L'L$	Matriz dos desvios devido ao desajuste $L = \mathbf{J} - \hat{\mathbf{Y}} = \mathbf{J} - \mathbf{X}\hat{\mathbf{B}} = \begin{bmatrix} \bar{y}_{11} - \hat{y}_{11} \\ \vdots \\ \bar{y}_{1n} - \hat{y}_{1n} \end{bmatrix}$
Variância devido à incerteza experimental $SS_{\text{pe}} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y}_i)^2$	$P'P$	Matriz dos desvios puramente experimentais $P = Y - \mathbf{J} = \begin{bmatrix} y_{11} - \bar{y}_{11} \\ \vdots \\ y_{1n} - \bar{y}_{1n} \end{bmatrix}$

Anexo E – Cálculo da taxa específica de crescimento

A Figura E1 ilustra o logaritmo natural da concentração de biomassa ao longo do tempo e na Figura E2 encontram-se representados os pontos experimentais considerados para a fase exponencial, a partir dos quais se calculou a taxa específica de crescimento.

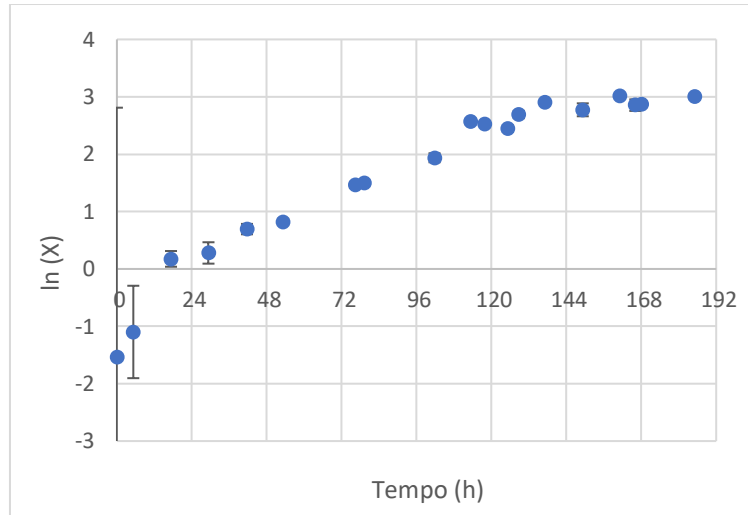


Figura E1. Logaritmo natural da concentração de biomassa ao longo do tempo de fermentação.

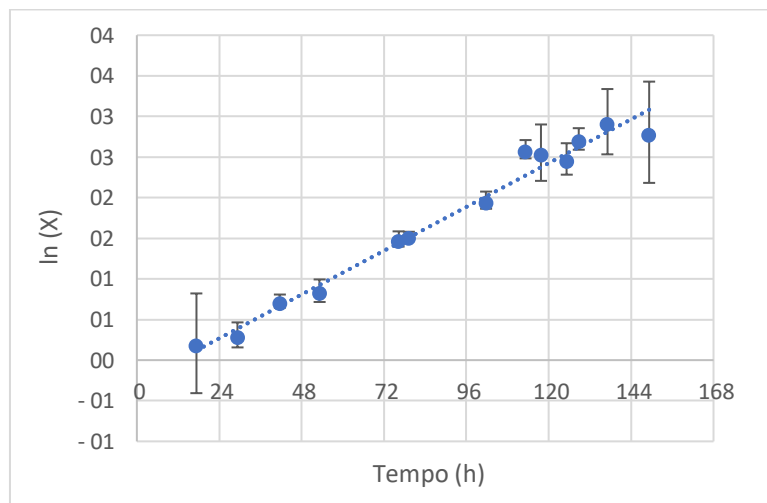


Figura E2. Logaritmo natural da concentração de biomassa para o período de duração da fase exponencial. Por ajuste linear aos dados experimentais representados obteve-se a equação da reta $y = (0,023 \pm 0,002) \times x - (0,3 \pm 0,2)$, com um coeficiente de correlação múltipla (R^2) de 0,978.

Anexo F – Cálculo da concentração de biomassa

Tal como mencionado na secção 2.2.3.1 o crescimento celular foi acompanhado ao longo do tempo por densidade ótica, isto é, através de leituras da absorvância da suspensão celular recolhida do bioreator.

Assim, de modo a apresentar a evolução da concentração de biomassa (em base seca) ao longo do tempo foi necessário estabelecer uma correlação entre a densidade ótica e a concentração de biomassa da suspensão celular. Para tal preparou-se diversas diluições de uma solução mãe, cuja concentração celular era conhecida, e para cada diluição registou-se o valor de densidade ótica e determinou-se a massa de biomassa corrigida para uma base seca.

Na Figura F1 encontra-se representada a reta de calibração que relaciona a concentração de biomassa com a densidade ótica da suspensão celular.

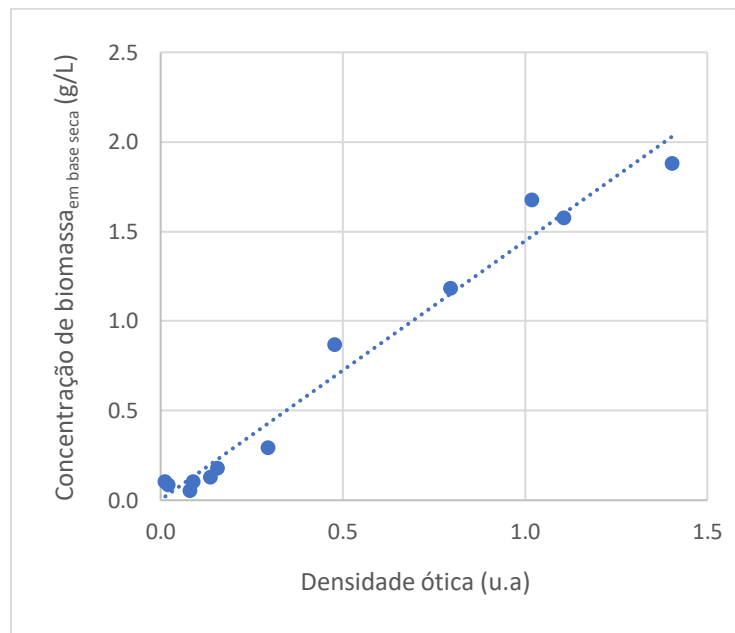


Figura F1. Representação gráfica da reta de calibração que permite relacionar a concentração de biomassa (em g/L) com a densidade ótica da suspensão celular. Através de um ajuste linear aos dados experimentais obteve-se a equação da reta $y = (1,4 \pm 0,2) \times x + (0 \pm 1)$ com um coeficiente de correlação múltipla (R^2) de 0,976.

Anexo G – Perfis de ácidos gordos das curvas de extração

Nas Figuras G1 a G6 é possível observar os perfis de ácidos gordos obtidos para os quatro extratos recolhidos ao longo do processo de extração supercrítica para cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental.

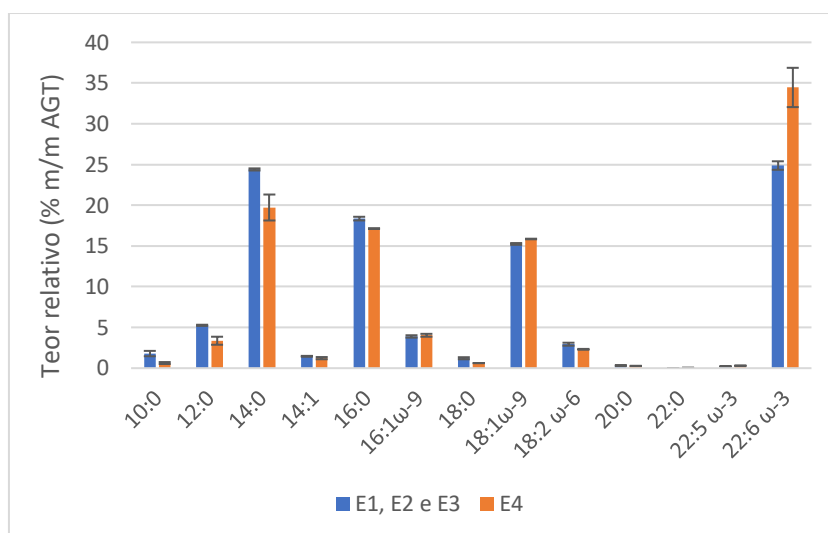


Figura G1. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 50°C e 150 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. Nesta extração não foi possível analisar os extratos E1, E2 e E3 individualmente, uma vez que a quantidade de lípidos existente em cada um destes extratos era inferior ao limite de sensibilidade do equipamento de cromatografia gás-líquido. Assim, juntou-se esses três extratos e determinou-se o perfil de ácidos gordos ao fim de uma hora e meia de extração. O extrato E4 foi recolhido ao fim de 3 horas de extração.

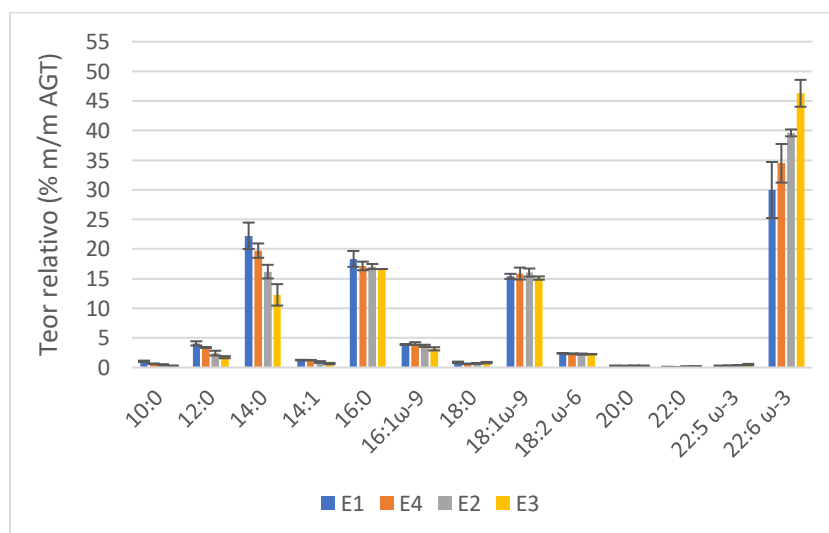


Figura G2. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 50°C e 225 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas.

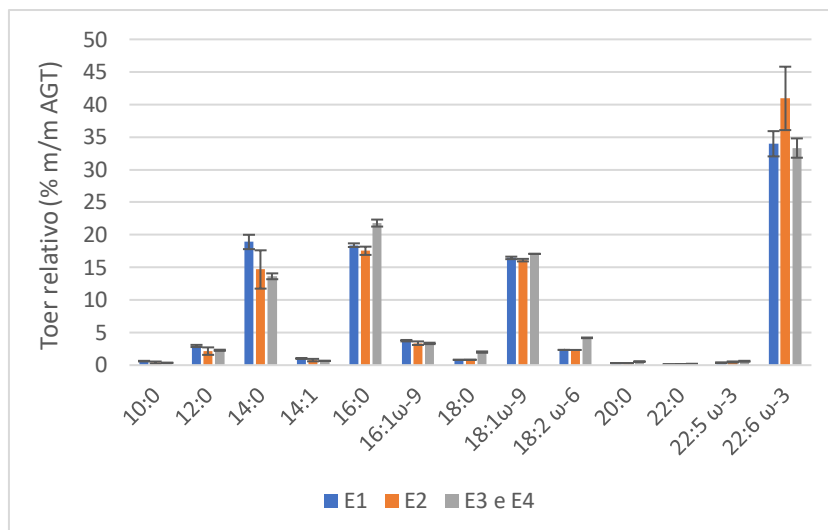


Figura G3. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 50°C e 300 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. Nesta extração não foi possível analisar os extratos E3 e E4 individualmente, uma vez que a quantidade de lípidos existente em cada um destes extratos era inferior ao limite de sensibilidade do equipamento de cromatografia gás-líquido. Assim, juntou-se esses dois extratos e determinou-se o perfil de ácidos gordos das últimas duas horas de extração. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos e o E2 ao fim de 1 hora de extração.

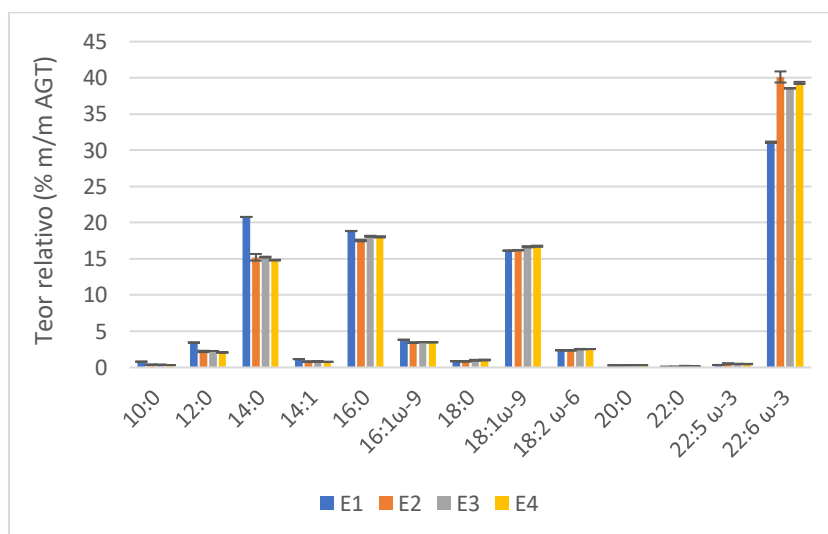


Figura G4. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 41,3°C e 262,5 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas.

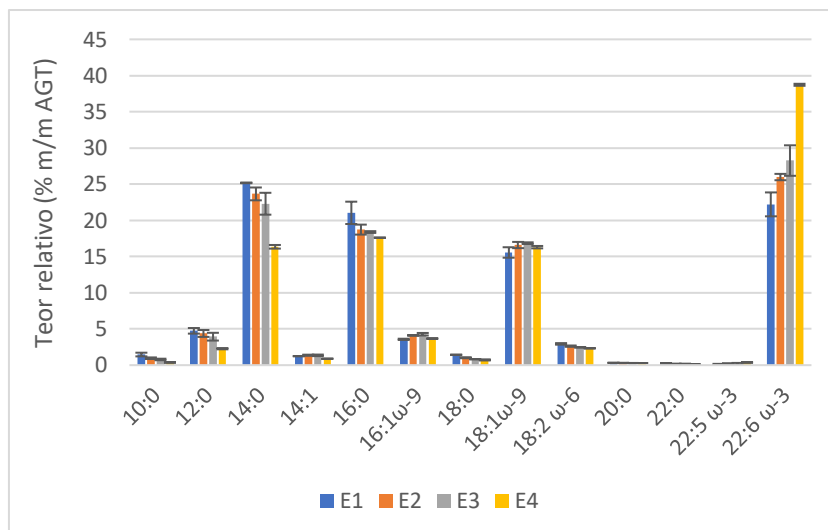


Figura G5. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 58,7°C e 187,5 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas.

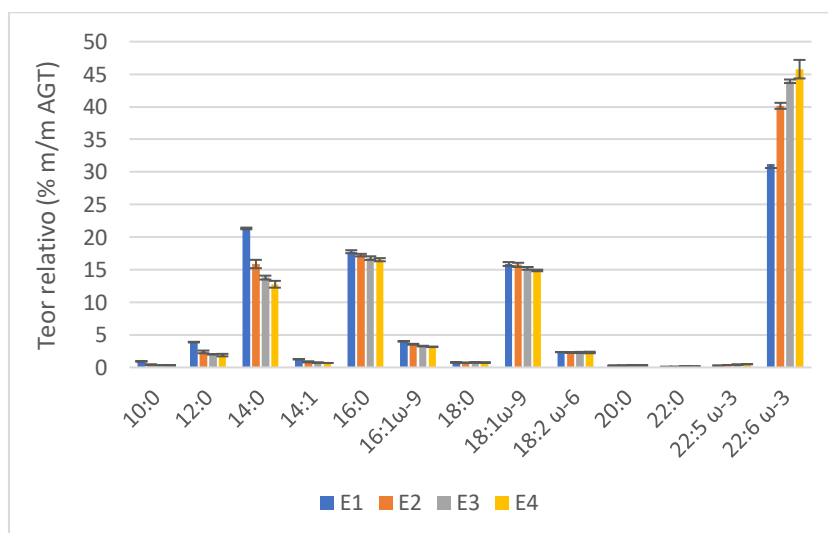


Figura G6. Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos quatro extratos recolhidos durante o processo de extração supercrítica a 58,7°C e 262,5 bar, como percentagem do total de ácidos gordos (% m/m AGT). Os teores relativos apresentados correspondem à média dos valores obtidos na análise em duplicado desta condição experimental. O extrato E1 foi recolhido ao fim de 30 minutos, o E2 ao fim de 1 hora, o E3 ao fim de uma hora e meia e o E4 ao fim de 3 horas.

Na Tabela G1 é possível observar os valores obtidos para o conteúdo de ácidos gordos nos lípidos de cada extrato recolhido durante o processo de extração supercrítica, para cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental. Os valores apresentados para cada extrato correspondem à média dos resultados obtidos na análise em duplicado do respetivo extrato por cromatografia gás-líquido (GC).

Tabela G1. Valores do conteúdo de ácidos gordos nos lípidos de cada extrato recolhido durante o processo de extração supercrítica, para cada condição pressão/temperatura testada no âmbito do planeamento experimental. Os valores apresentados correspondem à média dos resultados obtidos na análise em duplicado do respetivo extrato por GC.

Condições	E1	E2	E3	E4
50°C / 150 bar		33,79		75,21
50°C / 225 bar	60,77	68,29	53,06	55,17
50°C / 300 bar	66,19	59,88	*	
41,3°C / 187,5 bar	56,08	62,75	64,98	58,96
41,3°C / 262,5 bar	59,12	58,93	57,08	52,44
58,7°C / 187,5 bar	57,54	52,60	59,02	75,55
58,7°C / 262,5 bar	70,01	69,59	57,41	47,28

* Não foi possível analisar os ácidos gordos deste extrato por quantidade insuficiente de extrato

Anexo H – Análise dos pigmentos da microalga

Na Figura H1 observa-se o espectro do extrato lipídico recolhido após 3 horas de extração supercrítica a 41,3°C e 187,5 bar. Deste modo, pretende-se ilustrar o tipo de espectros obtidos na análise dos extratos lipídicos de Soxhlet e de extração supercrítica por espectrofotometria UV/Visível.

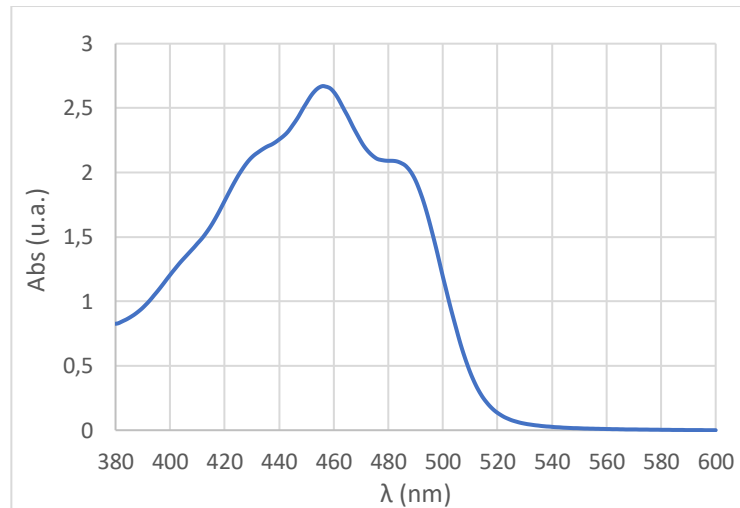


Figura H1. Espectro do extrato lipídico (em hexano) recolhido após 3 horas de extração supercrítica a 41,3°C e 187,5 bar.

Ao comparar a Figura H1 com a Figura H2, na qual se representa o espectro da solução padrão de β-caroteno, verifica-se que no espectro do extrato obtido por extração supercrítica é possível observar a presença do pico do β-caroteno ao comprimento de onda máximo de absorção de 450 nm.

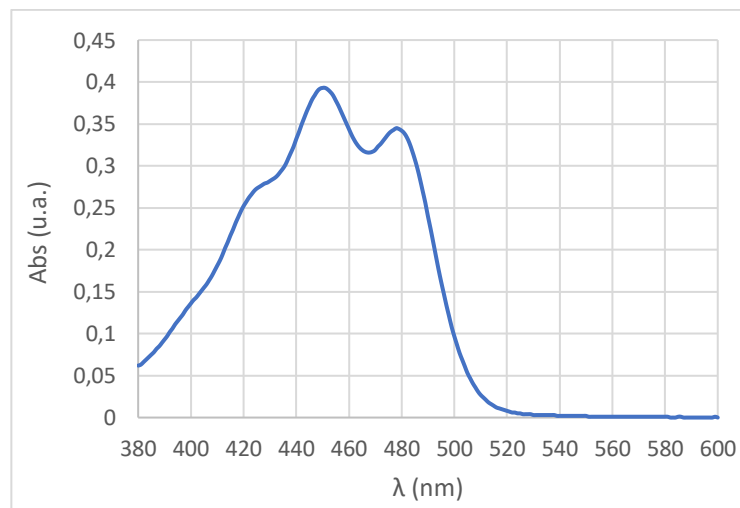


Figura H2. Espectro da solução padrão de β-caroteno (em hexano).

As Figuras H3 a H5 ilustram os cromatogramas de HPLC obtidos para a solução padrão do β-caroteno e para os extratos lipídicos recolhidos no método de extração convencional de Soxhlet e durante o processo de extração supercrítica.

Neste sistema de HPLC os compostos são eluídos por ordem de polaridade, ou seja, dos mais polares para os menos polares. Assim, na Figura H4 nota-se a presença de alguns pigmentos mais polares no extrato lipídico obtido no método de Soxhlet que no cromatograma correspondem aos picos com um tempo de retenção inferior a 15 minutos, sendo estes possivelmente carotenoides oxigenados. Nos extratos de Soxhlet a composição destes pigmentos pode chegar a 30 a 50% do total de pigmentos. Por outro lado, a análise de HPLC dos extratos supercríticos (exemplo na Figura H5) demonstrou que a maioria dos pigmentos pertence à gama mais apolar, correspondendo a compostos da família dos carotenos, e que estes constituem 80 a 100% dos pigmentos nos extratos.

É de notar que o tempo de retenção do padrão β -caroteno variou de 15 minutos a 28-30 minutos, ao longo de 6 meses de análise, e por isso nos cromatogramas apresentados nas Figuras H4 e H5 o β -caroteno corresponde ao pico a 24 minutos.

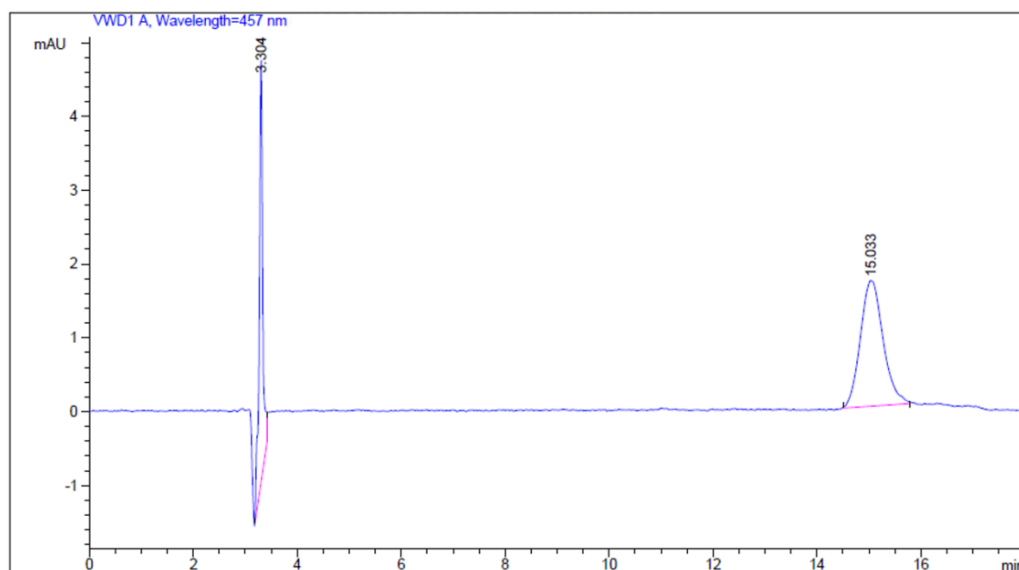


Figura H3. Cromatograma de HPLC da solução padrão de β -caroteno (em hexano).

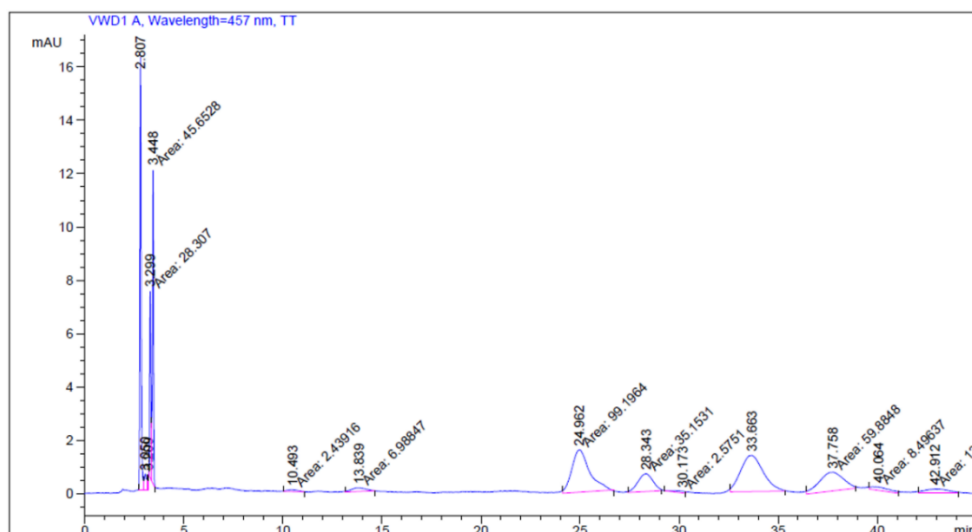


Figura H4. Cromatograma de HPLC do extrato lipídico (em hexano) recolhido no método de extração convencional de Soxhlet.

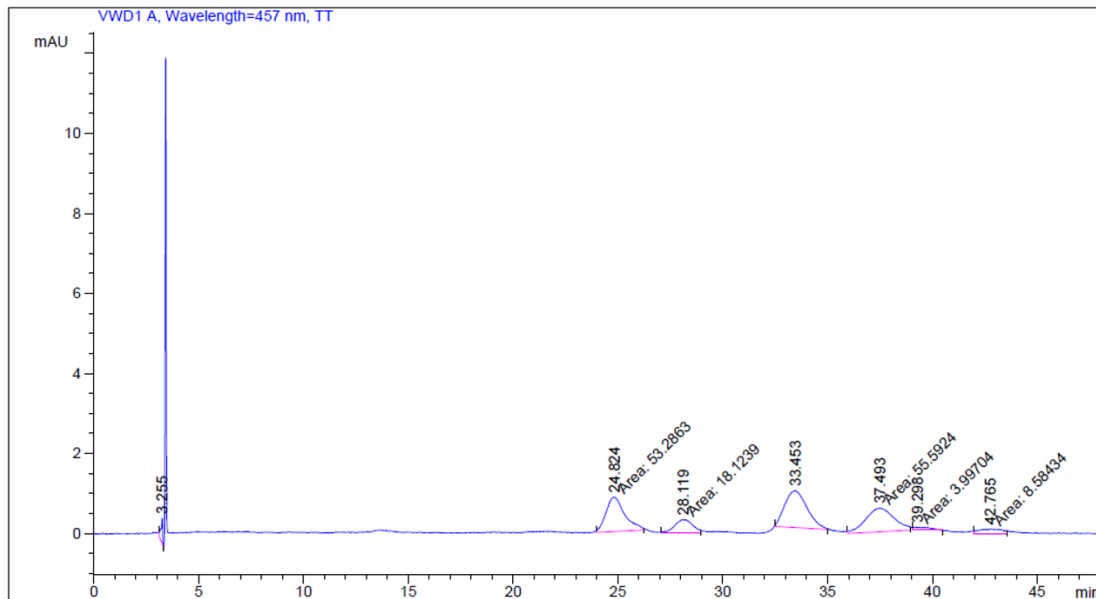


Figura H5. Cromatograma de HPLC do extrato lipídico (em hexano) recolhido após uma hora de extração supercrítica a 41,3°C e 262,5 bar.

Tal como mencionado anteriormente os extratos lipídicos recolhidos no método convencional de Soxhlet e durante a extração supercrítica foram analisados por cromatografia de camada fina, tendo-se recorrido a placas de sílica gel. Nas Figuras H6 e H7 pode-se observar a revelação da placa de cromatografia de camada fina sob luz a 254 e 366 nm, respetivamente.

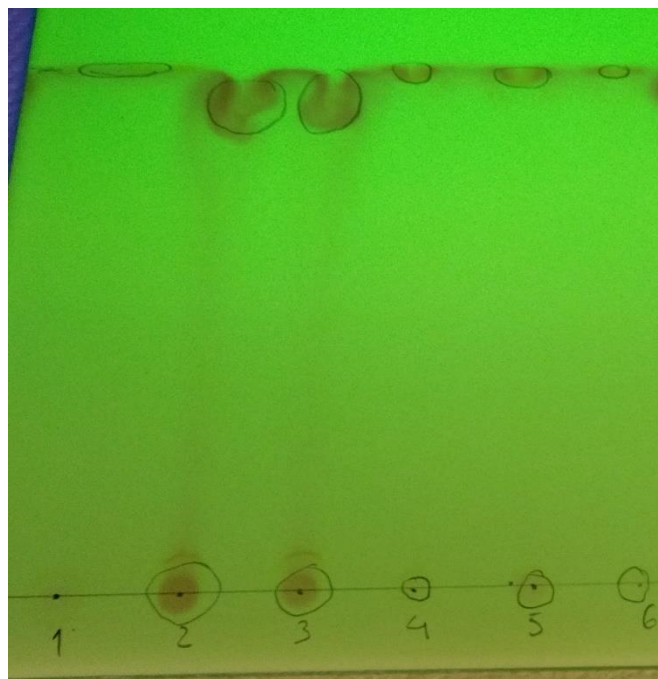


Figura H6. Revelação da placa de sílica gel sob luz a 254 nm, resultante da análise de cromatografia de camada fina. Amostra 1 - solução padrão de β -caroteno; amostras 2 e 3 – extrato lipídico de Soxhlet; amostra 4 – extrato lipídico recolhido após 3 horas de extração a 50°C e 225 bar; amostra 5 - extrato lipídico recolhido após 1 hora de extração a 41,3°C e 262,5 bar; amostra 6 - extrato lipídico recolhido após 1 hora de extração a 50°C e 300 bar.

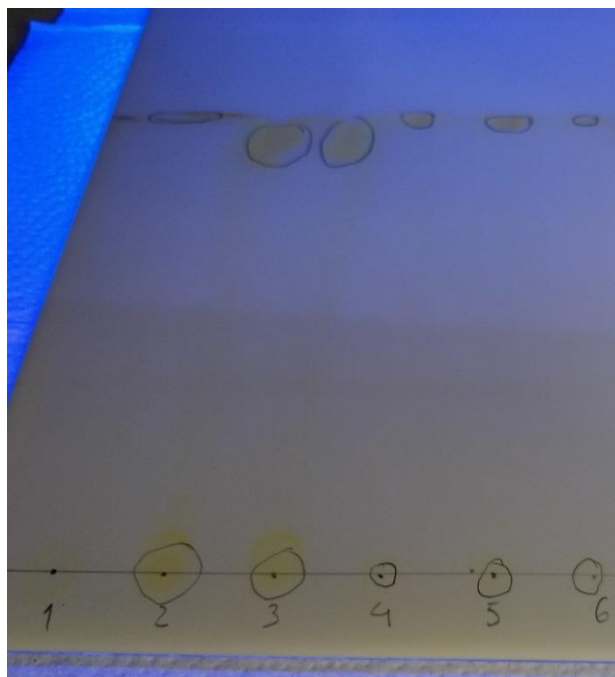


Figura H7. Revelação da placa de sílica gel sob luz a 366 nm, resultante da análise de cromatografia de camada fina. Amostra 1 - solução padrão de β -caroteno; amostras 2 e 3 – extrato lipídico de Soxhlet; amostra 4 – extrato lipídico recolhido após 3 horas de extração a 50°C e 225 bar; amostra 5 - extrato lipídico recolhido após 1 hora de extração a 41,3°C e 262,5 bar; amostra 6 - extrato lipídico recolhido após 1 hora de extração a 50°C e 300 bar. A frente do solvente ficou a 12,5 cm da linha de base. Nos extratos lipídicos de Soxhlet identificou-se duas bandas que se encontram a 12,1 e 11,3 cm da linha de base. Na amostra 5 a banda identificada encontra-se a 12 cm da linha de base.

Ao observar as Figuras H6 e H7 verifica-se que os extratos lipídicos recolhidos durante a extração supercrítica apresentam uma banda curta que se encontra à mesma distância da linha de base da banda correspondente à solução padrão de β -caroteno. Deste modo, é possível identificar a presença do β -caroteno nestes extratos lipídicos.

Por outro lado, nos extratos lipídicos de Soxhlet nota-se a presença de uma banda ligeiramente arrastada na mesma posição da banda correspondente à solução padrão de β -caroteno. Esta banda arrastada pode corresponder à sobreposição de diversas bandas de carotenos distintos, cuja separação não foi possível efetuar com o eluente utilizado na análise cromatográfica. Assim, pode-se afirmar que os extratos lipídicos de Soxhlet são constituídos por β -caroteno e por outros tipos de carotenos que possuem um fator de retenção semelhante ao do β -caroteno.

Anexo I – Contribuição do trabalho

O presente estudo exposto ao longo desta dissertação de mestrado foi submetido e aceite para comunicação oral no congresso internacional EIFS2022 - 2nd Iberic Meeting on Supercritical Fluids - realizado de 28 de fevereiro a 2 de março de 2022, em Coimbra, Portugal.