



TÉCNICO
LISBOA

Síntese de ómega-3 e ácidos gordos para a produção de biodiesel pela microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* e estudo de métodos sustentáveis para a sua extração

Clara Picão Fernandes Marques Henriques

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Orientadores:

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

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

Júri

Presidente: Professora Maria Joana Neiva Correia

Orientador: Dr^a Maria Beatriz Nobre

Vogal: Dr^a Patrícia Moniz

Maior 2022

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer o financiamento 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 produção de biocombustíveis e compostos ómega-3, da microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* biorrefinaria sustentável” e pelo financiamento: UIDB/00100/2020 e UIDP/00100/2020 e LA/P/0056/2020.

Agradeço também às minhas orientadoras, Dr^a Maria Beatriz Pinto Pereira Palma Nobre e Dr^a Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva, por todo o apoio prestado e todo o conhecimento transmitido ao longo destes meses de trabalho.

À Dr^a Patrícia Moniz, queria agradecer a sua paciência, simpatia e incansável vontade de ajudar. Ao Dr. Roseiro, pela disponibilidade na realização da matriz experimental e análise estatística. Agradeço também às técnicas e auxiliares de laboratório Graça Conceição e Natércia Sousa pelo apoio no trabalho laboratorial. E a todo o restante pessoal do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, pelo auxílio constante e experiência de vida partilhada, que fez com que a participação neste projeto me fizesse crescer não só a nível profissional e académico, como a nível pessoal.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família e aos meus amigos pelo apoio incondicional, não só durante a realização da dissertação, como ao longo de todo o meu percurso académico.

Resumo

Neste estudo procedeu-se à fermentação da microalga *Cryptocodinium cohnii*, realizando-se 3 ensaios num biorreator sob o regime fed-batch, com o intuito de produzir elevadas concentrações de ácido docosahexaenóico e ácidos gordos para a produção de biodiesel. Utilizou-se como fontes de carbono glicose, melação de cana e glicerol bruto.

No ensaio I, a concentração de ácidos gordos obtida foi reduzida (13,5% (m/m)), possivelmente devido a condições de limitação de oxigénio. No ensaio II a hidrólise do melação não foi completa, originando um meio pobre em fonte de carbono e não permitindo o crescimento da biomassa. Para além disso, ocorreu uma contaminação por leveduras. No ensaio III obteve-se uma concentração de biomassa de 18,65 g/L, com uma produtividade média de 0,114 g/(L.h) e um teor de ADH de 7,52 % (m/m).

Utilizou-se a biomassa do ensaio III para estudar os métodos de extração acelerada com solventes (ASE) e extração supercrítica (ESC) na recuperação dos lípidos acumulados pela mesma.

Para estudar o método de ASE, realizou-se um planeamento experimental, variando os fatores temperatura e tempo de extração, de forma a maximizar o rendimento em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel. Utilizando hexano como solvente, a condição que obteve os maiores rendimentos foi de 40 °C e 11 minutos. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel foram, respetivamente, 26,35, 21,37, 8,18 e 13,05 g/100 g de biomassa seca e sem cinzas. Utilizando etanol, obteve-se os maiores rendimentos para 140 °C e 11 minutos - 18,96, 7,28 e 11,56 g/100 g de biomassa seca e sem cinzas, em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel, respetivamente.

Para o estudo do método de ESC, realizaram-se 5 ensaios com diferentes condições de pressão e temperatura. Obteve-se o maior rendimento em lípidos a 300 bar e 41,3 °C - 22,40 g/100g biomassa seca e sem cinzas. Os rendimentos mais elevados em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel - 18,39, 7,08 e 11,20 g/100g biomassa seca e sem cinzas, respetivamente - foram obtidos a 300 bar e 60 °C.

No estudo dos métodos para a recuperação dos lípidos, foi possível quantificar os pigmentos totais sintetizados pela *C. cohnii*. Obteve-se o maior conteúdo de pigmentos totais - 121,37 µg/g de biomassa seca e sem cinzas - utilizando o método de ASE com hexano, a 115 °C e 19 minutos.

Por fim, foram estimados parâmetros físicos da fração para a produção de biodiesel do ensaio I, tendo-se confirmado que estão dentro dos limites definidos pela Norma Europeia EN 14214.

Palavras-chave: *Cryptocodinium cohnii*, ácido docosahexaenóico, biodiesel, extração acelerada com solventes, extração supercrítica.

Abstract

In this study, the microalgae *Cryptocodinium cohnii* was cultivated under the fed-batch regime, in order to produce high concentrations of docosahexaenoic acid (DHA) and fatty acids (FA) for biodiesel production. Three assays were performed, using glucose, sugar cane molasses and crude glycerol as carbon sources. In the assay I the fatty acid concentration obtained was very low (13.5% (m/m)), possibly due to oxygen limiting conditions. In trial II, the hydrolysis of molasses was not complete, resulting in a poor medium in carbon source and not allowing the growth of biomass. Furthermore, a yeast contamination occurred. In test III a biomass concentration of 18.65 g/L was obtained, with an average yield of 0.114 g/(L.h) and a DHA content of 7.52 % (m/m).

The biomass from trial III was used to study the accelerated solvent extraction (ASE) and supercritical extraction (SCE) methods in the recovery of lipids accumulated by the microalgae.

To study the ASE method, an experimental planning was performed, varying the factors temperature and extraction time, in order to maximize the yield in lipids, total FA, ADH and FA for biodiesel production. Using hexane as solvent, the condition that obtained the highest yields was 40 °C and 11 minutes. The yields in lipids, TFA, ADH and FA for biodiesel production were 26.35, 21.37, 8.18 and 13.05 g/100 g of dry and ash free biomass, respectively. When using ethanol, the highest yields were obtained at 140 °C and 11 minutes - 18.96, 7.28 and 11.56 g/100 g of dry and ash free biomass in TFA, DHA and FA for biodiesel production, respectively.

For the study of the SCE method, 5 assays with different pressure and temperature conditions were performed. The highest yield in lipids was obtained at 300 bar and 41.3 °C - 22,40 g/100g dry and ash free biomass. The highest yields in TFA, DHA and FA for biodiesel production - 18.39, 7.08 and 11.20 g/100g dry and ash free biomass, respectively - were obtained at 300 bar and 60 °C.

In the study of the methods for the lipids recovery, it was possible to quantify the total pigments synthesized by *C. cohnii*. The highest total pigment content - 121.37 µg/g dry and ashless biomass - was obtained in the ASE method with hexane, at 115 °C and 19 minutes.

Finally, physical parameters of the biodiesel fraction from trial I were estimated and confirmed to be within the limits defined by the European Standard EN 14214.

Keywords: *Cryptocodinium cohnii*, docosahexaenoic acid, biodiesel, accelerated solvent extraction, supercritical extraction.

Conteúdo

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Figuras	xv
Lista de Símbolos	xvii
1 Introdução	1
1.1 Microalga <i>Cryptocodinium cohnii</i>	1
1.1.1 Morfologia	1
1.1.2 Condições de crescimento	2
1.2 ADH	3
1.3 Biodiesel	4
1.3.1 Definição	4
1.3.2 Biodiesel e sustentabilidade	4
1.3.3 Especificações do biodiesel	5
1.4 Fontes de carbono de baixo custo	6
1.4.1 Melaço de cana	6
1.4.2 Glicerol bruto	6
1.5 Citometria de Fluxo	8
1.6 Extração acelerada com solventes	10
1.7 Extração supercrítica	12
1.8 Objetivos	14
2 Materiais e métodos	15
2.1 Reagentes e equipamento	15
2.2 Fermentação	15
2.2.1 Condições de crescimento	15
2.2.2 Fonte de carbono	16
2.2.3 Fermentação no biorreator	16
2.2.4 Densidade óptica	18

2.2.5	Citometria de fluxo	18
2.2.6	Observações microscópicas	19
2.2.7	Quantificação do consumo da fonte de carbono	19
2.2.8	Quantificação do azoto	19
2.2.9	Determinação de humidade e cinzas	20
2.2.10	Determinação do perfil de ácidos gordos	20
2.2.11	Cálculo dos parâmetros cinéticos	21
2.3	Métodos de extração de lípidos	23
2.3.1	Método de extração em Soxhlet	23
2.3.2	Extração acelerada com solventes	24
2.3.3	Extração supercrítica	27
2.4	Pigmentos da <i>Cryptocodinium cohnii</i>	31
2.5	Avaliação da fração para produção de biodiesel	32
3	Resultados e Discussão	33
3.1	Fermentações da <i>Cryptocodinium cohnii</i>	33
3.1.1	Ensaio I	33
3.1.2	Ensaio II	39
3.1.3	Ensaio III	44
3.2	Extração dos lípidos	49
3.2.1	Método de extração em Soxhlet	49
3.2.2	Extração acelerada com solventes	50
3.2.3	Extração supercrítica	63
3.3	Pigmentos	69
3.3.1	Extração por Soxhlet	69
3.3.2	Extração por ASE	69
3.3.3	Extração por ESC	71
3.4	Estimativas dos parâmetros físicos da fração para biodiesel	73
4	Conclusões e trabalho futuro	74
	Bibliografia	77
A	Reagentes e solventes	83
B	Equações utilizadas na ESC	85
B.1	Cálculo do volume de dióxido de carbono corrigido	85
B.2	Cálculo da pressão do gás à saída do contador	85
C	Fotografias do microscópio	86
D	Fotografia da contaminação	87

Lista de Tabelas

2.1	Condições de temperatura e duração da extração testadas na execução do planeamento experimental obtidas através da distribuição de dois fatores de Doehlert.	26
2.2	Codificação dos níveis dos fatores testados de acordo com o planeamento experimental.	27
3.1	Composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtido para a <i>C. cohnii</i> no ensaio I.	37
3.2	Composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtido para a <i>c. cohnii</i> no ensaio II.	42
3.3	Parâmetros cinéticos calculados para o crescimento da <i>C. cohnii</i> no ensaio III, de acordo com as expressões presentes na secção de materiais e métodos.	46
3.4	Composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtido para a <i>c. cohnii</i> no ensaio III.	47
3.5	Resultados obtidos pelo método de extração por Soxhlet com os diferentes solventes utilizados. Os resultados obtidos para o hexano e acetona são a média de 2 ensaios, enquanto que para o etanol são a média de 3 ensaios. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e ácidos gordos para produção de biodiesel apresentam-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.	49
3.6	Resultados preliminares obtidos pelo método de extração acelerada com os diferentes solventes utilizados, a 120 °C e com 2 ciclos de 3 minutos. Foi usada terra diatomácea nos ensaios em que se refere apenas o solvente (hexano, etanol e acetona). Todos os ensaios foram realizados em duplicado, com exceção do ensaio com hexano e terra diatomácea. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel apresentam-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.	51
3.7	Resultados preliminares obtidos pelo método de extração acelerada com o solvente hexano, a 120 °C, com um ciclo e com esferas. O rendimento apresenta-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.	51
3.8	Matriz do planeamento experimental organizado segundo a distribuição de Doehlert para os fatores temperatura e tempo de extração e respostas obtidas, usando hexano como solvente. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel apresentam-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.	52

3.9	Matriz do planeamento experimental organizado segundo a distribuição de Doehlert para os fatores temperatura e tempo de extração e respostas obtidas, usando etanol como solvente. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel apresentam-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.	55
3.10	Coeficientes do modelo polinomial que representam as respostas avaliadas no planeamento experimental usando hexano como solvente e validação do modelo. O fator 1 corresponde à temperatura e o fator 2 ao tempo.	61
3.11	Coeficientes do modelo polinomial que representam as respostas avaliadas no planeamento experimental usando etanol como solvente e validação do modelo. O fator 1 corresponde à temperatura e o fator 2 ao tempo.	62
3.12	Rendimentos em AGT, ADH e ácidos gordos para a produção de biodiesel obtidos para os ensaios de ESC, em gramas por 100 gramas de biomassa seca e sem cinzas.	66
3.13	Rendimentos (valor médio de duplicados) em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração por Soxhlet para os diferentes solventes estudados, em microgramas de pigmentos totais por grama de biomassa seca e sem cinzas.	69
3.14	Rendimento (média de duplicados) em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração acelerada para os diferentes solventes estudados, a 120 °C, com 2 ciclos de 3 minutos, em microgramas de pigmento por grama de biomassa seca e sem cinzas.	69
3.15	Rendimento em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração acelerada com hexano, a 120°C e com 1 ciclo, em microgramas de pigmento por grama de biomassa seca e sem cinzas.	70
3.16	Rendimento (média das duas repetições na matriz experimental) em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração acelerada com hexano e 1 ciclo, para cada condição de temperatura e tempo de extração, em microgramas de pigmento por grama de biomassa seca e sem cinzas.	70
3.17	Rendimento (média das duas repetições) em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração acelerada com etanol e 1 ciclo, para cada condição de temperatura e tempo de extração, em microgramas de pigmento por grama de biomassa seca e sem cinzas.	71
3.18	Valores obtidos para os parâmetros de biodiesel a partir do grau de saturação e sua comparação com os requeridos na norma Europeia EN 14214.	73
A.1	Reagentes químicos e solventes utilizados neste trabalho.	84

Lista de Figuras

1.1	Fotografia microscópica da <i>Cryptocodinium cohnii</i> , obtida no ensaio II deste estudo.	1
1.2	Representação esquemática da microalga <i>Cryptocodinium cohnii</i>	2
1.3	Estrutura química do ácido docosahexaenóico.	3
1.4	Reação de transesterificação de um triglicérido com um álcool, originando ésteres de ácidos gordos e glicerol.	4
1.5	Gráfico com a representação das células de acordo com o seu tamanho e complexidade.	9
1.6	Diagrama do citómetro de fluxo utilizado no presente estudo.	9
1.7	Diagrama pressão-temperatura do dióxido de carbono. [60]	13
2.1	Biorreator utilizado nas fermentações.	17
2.2	Diagrama do método de extração de Soxhlet.	23
2.3	Esquema do sistema do método de extração acelerada com solventes.	24
2.4	Equipamento utilizado na extrações aceleradas com solventes.	25
2.5	Equipamento de extração supercrítica utilizado nos ensaios realizados.	28
2.6	Diagrama do equipamento de extração supercrítica utilizado. 1 - garrafa de dióxido de carbono; 2 - válvula de não retorno; 3 - serpentina arrefecida com gelo; 4 - filtro de alta pressão; 5 - bomba de circulação; 6,7 - manómetros; 8 - regulador de pressão; 9 - permutador de calor; 10,11 - célula de extração; 12 - válvula de expansão (válvula de 3 vias); 13 - tubo de vidro em U; 14 - rotâmetro; 15 - contador de gás; 16 - banho de água; 17-26 - válvulas.	28
3.1	Contagem de células obtida no citómetro de fluxo e absorvância corrigida lida no espectrofotómetro no ensaio I.	34
3.2	Peso seco obtido para a absorvância e para o citómetro de fluxo no ensaio I.	34
3.3	Gráficos relativos a condições do meio, ao longo do ensaio I.	35
3.4	Concentração de azoto no meio ao longo do ensaio I.	36
3.5	Teor de ácidos gordos e ADH na biomassa (seca e sem cinzas) ao longo do tempo no ensaio I (%m/m).	37
3.6	Porcentagem de células em cada subpopulação ao longo do ensaio I, como descrito na introdução - citometria de fluxo.	38

3.7	Contagem de células obtida no citômetro de fluxo e absorvância corrigida lida no espectrofotômetro no ensaio II.	39
3.8	Peso seco obtido para a absorvância e para o citômetro de fluxo no ensaio II.	39
3.9	Concentração de glicose, frutose e sacarose no meio, ao longo do ensaio II.	40
3.10	Concentração de azoto no meio ao longo do ensaio II.	41
3.11	Teor de ácidos gordos e ADH na biomassa (seca e sem cinzas) ao longo do tempo no ensaio II (% m/m).	41
3.12	Porcentagem de células em cada subpopulação ao longo do ensaio II, como descrito na introdução - citometria de fluxo.	43
3.13	Evolução da absorvância e peso seco ao longo do tempo no ensaio III.	44
3.14	Concentração de glicerol no meio ao longo do ensaio III.	45
3.15	Porcentagem de oxigênio dissolvido e velocidade de agitação ao longo do ensaio III. . . .	45
3.16	Teor de ácidos gordos e de ADH na biomassa (seca e sem cinzas) ao longo do tempo no ensaio III (% m/m).	46
3.17	Porcentagem de células em cada subpopulação ao longo do ensaio III, como descrito na introdução - citometria de fluxo.	48
3.18	Perfil de ácidos gordos do óleo extraído por Soxhlet com hexano.	50
3.19	Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para os fatores temperatura e tempo de extração, usando hexano como solvente.	58
3.20	Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para os fatores temperatura e tempo de extração, usando etanol como solvente.	60
3.21	Rendimento cumulativo em lípidos ao longo do tempo de extração, nas várias condições de extração supercrítica realizadas.	64
3.22	Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos extratos recolhidos ao longo dos ensaios de ESC, como porcentagem de AGT.	67
3.23	Rendimento cumulativo em pigmentos ao longo do tempo de extração, nas 5 condições de extração supercrítica realizadas.	72
3.24	Perfil de ácidos gordos da fração obtida para biodiesel, da biomassa do ensaio I, após separação por complexação com ureia.	73
C.1	Fotografia microscópica da <i>Cryptocodinium cohnii</i> , obtida no ensaio II deste estudo, ao 3º dia de fermentação, com ampliação x1000.	86
C.2	Fotografia microscópica da <i>Cryptocodinium cohnii</i> , obtida no ensaio II deste estudo, ao 3º dia de fermentação, com ampliação x100.	86
D.1	Fotografia da biomassa do ensaio II contaminada com leveduras, após centrifugação. . .	87
E.1	Espectro do extrato lipídico obtido por ASE com hexano.	88
E.2	Espectro da solução padrão do β -caroteno em hexano.	88

Lista de Símbolos

μm	Micrómetros
ω -3	Ómega 3
<i>C. cohnii</i>	<i>Cryptothecodinium cohnii</i>
ADH	Ácido docosahexanóico
AG	Ácidos gordos
AGT	Ácidos gordos totais
ASE	<i>Accelerated solvent extraction</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	<i>Average unsaturation</i>
CFDA	<i>Carboxyfluorescein diacetate</i>
COPAM	Companhia portuguesa de amidos
CSL	<i>Corn steep liquor</i>
DO	Densidade óptica
ESC	Extração supercrítica
EU	<i>European Union</i>
FAMES	<i>Fatty acid methyl esters</i>
FL	<i>Fluorescence</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GC	<i>Gas chromatography</i>
GLI	Glicose
HPH	<i>High-pressure homogenization</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>

LNEG Laboratório nacional de energia e geologia

OD Oxigénio dissolvido

PBS *Phosphate-buffered saline*

PI *Propidium iodide*

SSC *Side scatter*

YE *Yeast extract*

Capítulo 1

Introdução

1.1 Microalga *Cryptocodinium cohnii*

1.1.1 Morfologia

A microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* é um dinoflagelado heterotrófico não fotossintético, que pode ser encontrado em águas tropicais e temperadas pelo mundo inteiro [1], estando representada na figura 1.1.

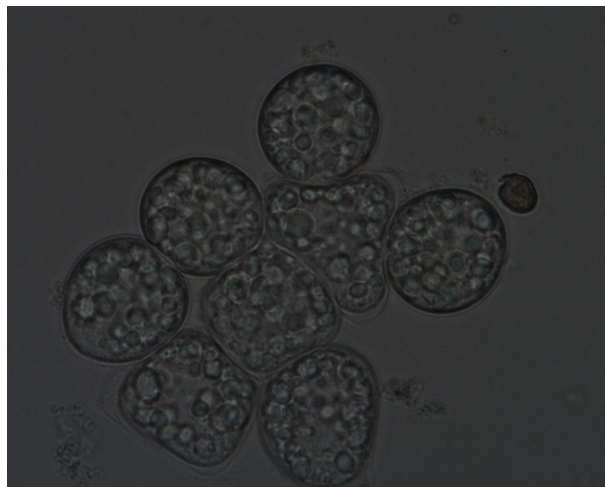


Figura 1.1: Fotografia microscópica da *Cryptocodinium cohnii*, obtida no ensaio II deste estudo.

É um organismo unicelular, em que a célula pode ter duas formas: cistos não móveis ou *swimming cells*, ou seja, células capazes de se mover, uma vez que apresentam dois flagelos diferentes. Um é achatado - proporcionando uma força propulsora e giratória - e o outro é longitudinal - atuando como guia de direção. Este tipo de célula pode ser observado na figura 1.2. Os cistos não móveis podem permanecer num estágio dormente ou dividir-se em 2, 4 ou 8 células-filhas [2].

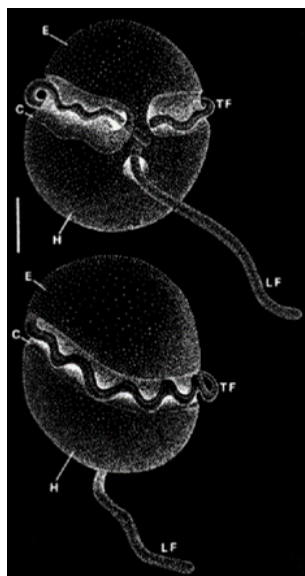


Figura 1.2: Representação esquemática da microalga *Crypthecodinium cohnii*.

A microalga *C. cohnii* é um organismo oleaginoso capaz de acumular quantidades significativas de lípidos (20-50% do seu peso seco), com uma fração elevada do ácido docosahexaenóico (ADH), um ácido gordo poli-insaturado (PUFA) do grupo dos ómega-3, sendo assim facilitada a sua purificação e uso industrial. Dependendo das condições de cultivo, cerca de 70% dos lípidos são neutros - triglicéridos ricos em ADH (de 30 a 45% do total de ácidos gordos). Os restantes ácidos gordos presentes em maior quantidade são o ácido cáprico (10:0), láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0), linoléico (18:2w6) e oléico (18:1w9) [3] [4] [5] [6] [7].

1.1.2 Condições de crescimento

O crescimento da *C. cohnii* tem sido estudado, de modo a otimizar a acumulação de biomassa e lípidos, podendo ocorrer em biorreatores de larga escala ou pequenos balões, em condições de fed-batch ou batch [8] [9].

De acordo com a fonte de carbono, foi observado que a microalga cresce em glicose, ácido acético, etanol, glicerol puro, sacarose, galactose e fontes complexas, como melão de cana, xarope de alfarroba, *whey* com extrato de milho e glicerol bruto, sendo estes resíduos provenientes da atividade industrial. Foi observado que a *C. cohnii* não consome maltose, arabinose, frutose, aldose, ramnose e ácido galacturónico [10] [11] [12] [13].

Relativamente à fonte de azoto, tem sido comprovado que as espécies crescem numa grande diversidade de meios de cultura, nomeadamente extrato de levedura, sulfato de amónia ($(NH_4)_2SO_4$), ácido glutâmico (NH_4HCO_3), ureia ($(NH_2)_2CO$), nitrato de potássio (KNO_3), entre outros [9] [10].

Dado que a *C. cohnii* é uma espécie marinha, é necessário que o meio contenha um sal, podendo ser usado cloreto de sódio ou outros sais inorgânicos como nitrato de sódio - $NaNO_3$ - ou sais de magnésio, por exemplo. Observou-se que a salinidade ideal é de 16 a 29 g/L de cloreto de sódio [14].

Foi observado que a gama de temperatura ótima é de 25 a 30 °C e a de pH entre 6 e 7, sendo que

a pH 6,5 a alga atinge a velocidade máxima de crescimento.

Verificou-se também que a ausência de luz é a condição preferencial, uma vez que esta atrasa o crescimento da microalga, e que uma agitação moderada é favorável para um fornecimento de oxigênio mais eficiente [7] [10].

1.2 ADH

O ácido docosahexaenóico (ADH, 22:6) é um ácido gordo poli-insaturado (PUFA) com 22 átomos de carbono e 6 ligações duplas, sendo a primeira delas na posição 3, contando a partir do grupo metilo terminal - figura 1.3 . Esta característica classifica-o como um ácido gordo ômega-3.

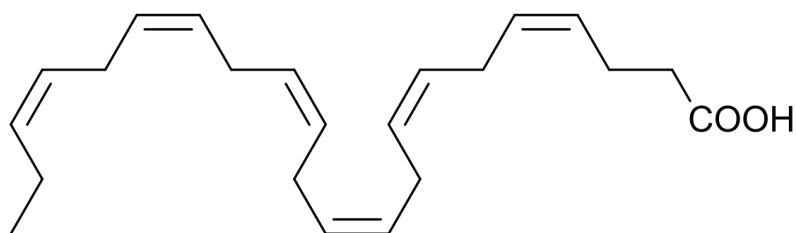


Figura 1.3: Estrutura química do ácido docosahexaenóico.

O ADH é sintetizado por algas e microalgas, sendo progressivamente acumulado em organismos ao longo da cadeia alimentar. O ser humano tem a capacidade de sintetizar apenas a partir do ácido gordo α -linolénico (18:3 ω -3), no entanto com uma eficiência reduzida [15]. Desta forma, a sua presença deve-se maioritariamente à ingestão de alimentos como peixes (essencialmente peixes gordos como salmão, sardinha, cavala e arenque), crustáceos e moluscos, ou suplementos alimentares [16].

Nos seres humanos está presente em maior quantidade no cérebro e no coração [17]. Diversos estudos têm demonstrado que o ADH tem um papel fundamental no desenvolvimento do ser humano durante a gravidez e a lactação [18]. Para além disso, é verificada uma correlação entre a ingestão de peixe - e por conseguinte de ADH - e o desenvolvimento cognitivo, menor incidência de doenças cardiovasculares e depressão e menor risco de doenças visuais. Estudos demonstram também que o ADH parece ter propriedades antitumorais e anti-cancerígenas e prevenir diabetes [19] [20].

Dado que a fonte alimentar predominante é de origem animal, os vegetarianos e veganos têm dificuldade na ingestão de ADH [21]. Mesmo as fontes existentes para os omnívoros já são limitadas, uma vez que a pesca global atingiu a sua exploração máxima [22].

Desse modo, é necessário o aumento da produção de suplementos dietéticos como óleo de algas, já presentes no mercado por diversas indústrias [23]. As algas e microalgas apresentam a particularidade de produzir PUFAs na forma de triglicéridos, a forma mais assimilável pelos humanos, sendo estes facilmente extraíveis [24]. Para além disso são isentas de colesterol, metais pesados e de odor [7], sendo estes dois últimos característicos dos peixes.

1.3 Biodiesel

1.3.1 Definição

O biodiesel é o nome dado ao biocombustível constituído por estéres alquílicos de cadeia longa, derivados de matérias-primas renováveis como óleos vegetais, gordura animal ou resíduos industriais (por exemplo óleos reciclados), compostos por triglicéridos (ou triacilgliceróis ou triglicerídeos). É produzido com o propósito de ser uma alternativa ecologicamente amigável ao combustível à base de petróleo [25] [26].

O processo de produção consiste em reagir os triglicéridos com um álcool, na presença de um catalisador e a uma elevada temperatura - reação de transterificação - originando uma mistura de ésteres de ácidos gordos e glicerol - figura 1.4. Podem ser utilizados alcóois como etanol, butanol, propanol, iso-propanol ou metanol, sendo este último o mais comum. Nesse caso os ésteres de ácidos gordos originados são chamados de FAMEs (*fatty acid methyl esteres*) [27].

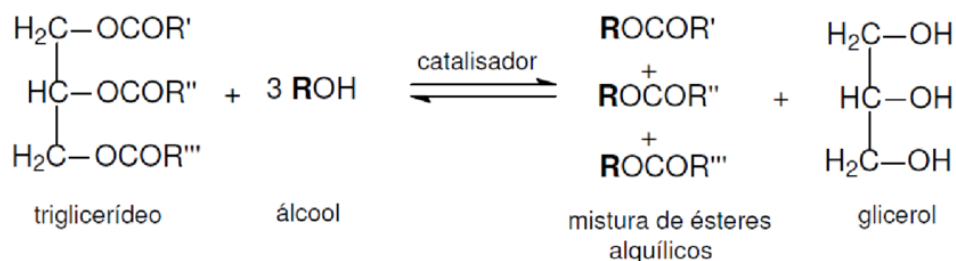


Figura 1.4: Reação de transterificação de um triglicérido com um álcool, originando ésteres de ácidos gordos e glicerol.

1.3.2 Biodiesel e sustentabilidade

O biodiesel e os combustíveis derivados do petróleo apresentam características químicas semelhantes, podendo ser utilizado em sua substituição total, com determinada proporção ou com pequenas modificações, reduzindo a emissão de dióxido de carbono para a atmosfera e, conseqüentemente, o impacto ambiental.

Apesar destes fatores positivos, existem diversos inconvenientes. A pegada de carbono da produção do biodiesel a partir de óleos vegetais é facilmente aumentada através do transporte, matérias-primas (o metanol é maioritariamente produzido a partir do petróleo) e formação de produtos secundários. Para além disso, existem diversos impactos sociais associados aos óleos vegetais, no fornecimento de comida e preços, e preocupações ambientais com a redução no gasto de água e qualidade do solo [28] [29].

Estes inconvenientes levaram a que se procurasse alternativas renováveis para a produção de biodiesel.

Recentemente, as microalgas emergiram como uma matéria-prima promissora, uma vez que têm a capacidade de produzir quantidades significativas de lípidos. Por outro lado, apresentam uma taxa es-

pecífica de crescimento superior às culturas terrestres, atingindo-se elevados rendimentos de fermentação, e a vantagem do seu cultivo ser arável [30] [29].

1.3.3 Especificações do biodiesel

O aumento da produção de biodiesel ao longo dos últimos anos levou a que a União Europeia estabelecesse certos requerimentos nas propriedades dos FAMES que o constituem, descritas na Norma Europeia EN 14214. Um dos critérios importantes para que o biodiesel possa ser utilizado em substituição do combustível derivado do petróleo é que o produto final não contenha qualquer resíduo químico, como por exemplo um produto secundário ou catalisador [31]. Propriedades como a viscosidade, número de cetano, *flashpoint*, densidade, índice de iodo, gravidade específica, entre outras, devem estar dentro de certas gamas [32].

A viscosidade consiste numa medida de resistência ao escoamento de um líquido, tendo influência na operação da injeção do combustível no equipamento e dispersão do mesmo. Está relacionada com a insaturação dos ácidos gordos, sendo que, a uma maior insaturação, corresponde menor viscosidade. Se o combustível não apresentar viscosidade suficiente, compromete a integridade mecânica dos motores; se fôr demasiado viscoso, apresenta menor eficiência de combustão. A gravidade específica é o peso de uma substância em comparação com a água, a uma temperatura constante especificada (normalmente quatro graus Celsius), estando por isso também relacionado com a facilidade de escoamento. Assim, a União Europeia definiu um intervalo de valores para estes dois parâmetros.

O número de cetano está relacionado com a facilidade de auto-combustão de um fluido. Quanto maior fôr o comprimento dos ácidos gordos e quanto mais saturações tiverem, maior este número, e maior é a sua capacidade de combustão. Apresenta, por isso, um valor mínimo requerido.

O índice de iodo verifica a insaturação do óleo, permitindo avaliar a tendência para a oxidação (degradação) do combustível [33]. Quanto maior a insaturação, maior o índice de iodo, existindo por isso um limite máximo para esta propriedade.

A existência de ligações duplas na estrutura química dos FAMES tem um impacto negativo na estabilidade oxidativa do biodiesel, pelo que a norma europeia EN 14213 definiu um limite máximo de 12% de ácido linolénico (C18:3) [34].

1.4 Fontes de carbono de baixo custo

De forma a reduzir os custos do processo de produção de biomassas de microalgas e, consequentemente, a produção de biodiesel a partir destas ser uma alternativa competitiva, tem-se estudado alternativas à glicose.

São de particular interesse fontes de carbono que sejam resíduos industriais de baixo custo, como por exemplo o melaço de cana, um produto secundário da indústria açucareira, o glicerol bruto proveniente da indústria do biodiesel e um efluente proveniente da indústria do vinagre. Os dois primeiros foram testados neste trabalho como fontes de carbono para o crescimento da microalga *Cryptocodinium cohnii*, em comparação com a glicose.

1.4.1 Melaço de cana

O melaço é um fluido escuro e viscoso, proveniente do refinamento do açúcar obtido a partir da cana de açúcar e do açúcar proveniente da beterraba.

O melaço consiste numa mistura de açúcar que não foi extraído, água, vitaminas e minerais [35]. É um produto com baixo valor, uma vez que apresenta diversas impurezas, sendo apenas utilizado como ração para gado, propagação de leveduras ou aromatizante. Eventualmente pode ser utilizado na produção de bioetanol, mas são necessárias destilarias especializadas [36]. Para além disso, é um produto de difícil armazenamento e apresenta flutuações de preço frequentes, limitando o comércio internacional [37].

Desta forma, o melaço poderá ser considerado uma fonte de carbono viável no crescimento de microorganismos como a microalga *Cryptocodinium cohnii*. Uma vez que o açúcar que constitui o melaço é maioritariamente a sacarose, é necessário que seja previamente hidrolisada em frutose e glicose, visto que a *C. cohnii* tem esta última como substrato preferencial [38].

O primeiro estudo utilizando melaço como única fonte de carbono foi realizado recentemente (2019) [39], tendo sido comparado com a glicose, acetato, glicerol puro e glicerol bruto. Verificou-se o maior rendimento de crescimento (0,4 g de biomassa seca por g de fonte de carbono) e a maior concentração de ADH (9,4 g por 100 g de biomassa seca). Anteriormente apenas tinha sido estudado como fonte de carbono suplementar [13].

O melaço utilizado neste estudo foi fornecido pela Sidul Açúcares (Santa Iria da Azóia, Portugal).

1.4.2 Glicerol bruto

O glicerol bruto - $C_3H_8O_3$ - é o principal produto secundário da indústria de biodiesel, tal como é possível verificar pela figura 1.4.

É um fluido castanho escuro, extremamente viscoso e alcalino. O preço do glicerol bruto tem decrescido ao longo dos anos [40], devido à sua purificação ser um processo complicado, uma vez que o glicerol puro apresenta um elevado ponto de ebulição. Deste modo, é essencial gerir a sua produção, com o intuito de ter um desperdício nulo. O facto de ser praticamente metade de uma molécula de

glicose ($C_6H_{12}O_6$) possibilita que as células o utilizem por uma via metabólica semelhante, sendo por isso um substrato viável.

A pureza do glicerol bruto pode variar entre os 20 e os 95%, dependendo dos processos utilizados para extrair os lípidos para biodiesel e recuperar o metanol, bem como dos catalisadores utilizados na transesterificação [41]. Para além de glicerol, o glicerol bruto é constituído por água (até 15%), sais (até 5%), metanol (até 10%) [42] e quantidades mais reduzidas de cinzas e sabões.

No trabalho mencionado anteriormente, onde se estudou o melaço como fonte de carbono, também se avaliou o glicerol bruto como substrato, tendo-se obtido resultados bastante satisfatórios. Comparativamente com as restantes fontes de carbono estudadas, atingiu-se a maior concentração de lípidos (14,7 g por 100 g de biomassa seca) e uma elevada concentração de ADH (6,6 g por 100 g de biomassa seca).

Estes fatores levam a que se considere o glicerol bruto como um substrato promissor no cultivo da microalga *Cryptocodinium cohnii*.

O glicerol bruto utilizado neste estudo foi fornecido pela Iberol - Sociedade ibérica de biocombustíveis e oleaginosas (Alhandra, Portugal).

1.5 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica eficaz que permite avaliar detalhadamente o desenvolvimento de culturas, tanto o seu crescimento como outras características fisiológicas, sendo exemplos as atividades enzimática e respiratórias, o pH intracelular e a integridade da membrana das células. É por isso um método de controlo de culturas mais eficiente que os tradicionais, como a densidade óptica e a contagem de células [2].

O citómetro de fluxo é um aparelho que possui um feixe de luz por onde as células que estão suspensas num determinado fluido passam individualmente. A densidade de células é avaliada pela intensidade do sinal óptico produzido, sendo possível distinguir o tamanho relativo das partículas da amostra e a sua complexidade.

Normalmente são também usados corantes fluorescentes que se acumulam seletivamente em compartimentos ou organelos da célula, ou alteram as suas propriedades por meio de reações químicas. Ao absorverem a luz do laser e reemitirem-no a um comprimento de onda mais elevado, permitem a análise das restantes características para além da densidade de células [43] [44] [45].

Esta avaliação rigorosa das culturas em tempo real permite compreender a resposta das células a determinadas condições operacionais e conseguir alterá-las se necessário, possibilitando uma melhor evolução das culturas.

Tipicamente, um citómetro de fluxo é composto por:

- Uma fonte de luz
- Sistema de fluidos hidráulicos
- Filtros ópticos
- Detetores de sinais (de dispersão e fluorescência)
- Unidade eletrónica de processamento da informação

O sistema de fluidos hidráulicos permite a formação de uma corrente de passagem de apenas uma célula a uma velocidade elevada. Quando esta atravessa o laser, diferentes sinais são emitidos, cada um relacionado com parâmetros celulares diferentes, permitindo a sua avaliação.

O sistema óptico compreende filtros ópticos que separam as emissões de cada partícula, de acordo com certos comprimentos de onda. Dele fazem parte 5 detetores de sinais: FSC, SSC, FL1, FL2 e FL3, sendo os últimos três detetores de fluorescência e os restantes de dispersão. Os sinais recolhidos por estes detetores são processados e enviados para um computador.

O detetor FSC permite obter informação acerca do tamanho da célula, enquanto que o SSC avalia a sua complexidade. Os dados obtidos no computador são apresentados graficamente, consoante os eixos pretendidos, obtendo-se diferentes regiões, com uma certa densidade de pontos, em que cada ponto corresponde a uma célula [46]. A figura 1.5 corresponde a um exemplo desses gráficos, que representa as células de acordo com o seu tamanho (FSC) e complexidade (SSC). A região R-1 corresponde a células maiores e mais complexas.

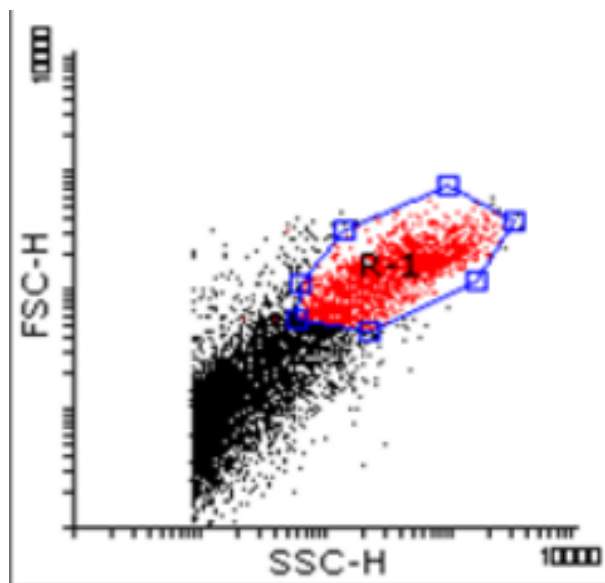


Figura 1.5: Gráfico com a representação das células de acordo com o seu tamanho e complexidade.

O diagrama da figura 1.6 [47] ilustra o funcionamento de um citómetro de fluxo.

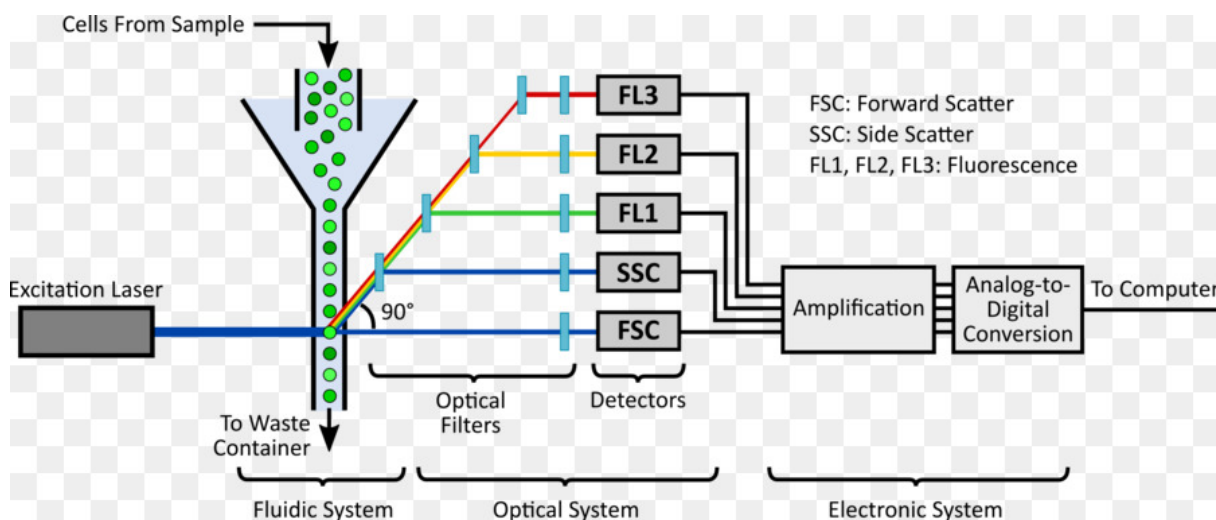


Figura 1.6: Diagrama do citómetro de fluxo utilizado no presente estudo.

No presente estudo, para além da contagem de células como medida de concentração de biomassa, foram utilizados dois corantes: diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI). O CFDA é um corante não fluorescente que entra na célula por difusão para avaliação do seu estado fisiológico. É de seguida hidrolisado por ação de esterases, para dar origem a um produto fluorescente ficando retido nas células com a membrana intacta, através da ligação a resíduos de amina. Ou seja, quando uma célula é corada com CFDA, significa que a sua atividade enzimática está ativa e que a sua membrana celular está intacta, uma vez que o produto fluorescente resultante da ação das esterases ficou retido no seu interior. Para avaliar a integridade da membrana é então utilizado o segundo corante, PI. Este liga-se às moléculas de DNA das células e não é permeável à sua membrana celular. Assim, uma célula corada com PI, significa que a mesma tem a membrana danificada/permeabilizada [44] [46].

1.6 Extração acelerada com solventes

A extração acelerada com solventes (ASE) é uma técnica de extração de lípidos e outros compostos de interesse ecologicamente amigável muito utilizada na indústria, tendo sido introduzida em 1995. Consiste num método rápido e eficiente que utiliza solventes pressurizados a altas temperaturas, acima do seu ponto de ebulição e abaixo do seu ponto crítico. Desta forma, o solvente permanece no estado líquido durante o processo [48]. Tem sido estudada a optimização deste método, variando os parâmetros operacionais envolvidos, nomeadamente:

- Solvente ou mistura de solventes
- Número de ciclos estáticos de extração
- Tempo de cada ciclo estático
- Temperatura
- Tempo de pré-aquecimento
- Tamanho da célula extratora
- Quantidade de amostra
- Pré-tratamento da amostra

Os solventes utilizados variam entre hexano, etanol, acetona, isopropanol, isobutanol, éter metil terc-butilico entre outros, todos considerados 'amigos do ambiente', sendo também frequente a mistura de solventes [49] [50]. O clorofórmio e o metanol, apesar de muito tóxicos, são permitidos por legislação para alguns produtos.

É necessário que a pressão seja elevada de forma a que o solvente seja forçado a passar pelo leito fixo do extrator e com contacto próximo, facilitando o seu fluxo, e para que o ponto de ebulição do solvente possa ser relativamente reduzido, assegurando que se mantém no estado líquido. As pressões estão compreendidas normalmente entre 70 e 140 bar, sendo o valor de pressão mais utilizado de aproximadamente 103 bar (1500 psi) [48] [51].

Relativamente à temperatura, costuma variar entre 25 e 200 °C, dependendo do tipo de composto a remover e do solvente utilizado [52] [53]. Temperaturas elevadas permitem aumentar a solubilidade dos compostos bioativos e as taxas de difusão dos solventes. Para além disso, a viscosidade e tensão superficial dos mesmos são diminuídas, permitindo uma maior penetração na matriz da amostra e, consequentemente, facilitando a extração [48].

O tempo de extração consiste no produto do número de ciclos pelo tempo de cada ciclo, sendo que um ciclo corresponde a uma passagem de solvente fresco pela célula extratora. Este método é eficiente uma vez que é extremamente mais rápido que os métodos tradicionais, sendo que a extração fica completa após 5 a 30 minutos. Para além disso, consome uma baixa quantidade de solvente comparativamente com outros métodos de extração (20-25 mL) e tem a capacidade de extrair um elevado tipo e quantidade de lípidos [54].

De forma a aumentar a eficiência da extração, é frequente a amostra sofrer um pré-tratamento. São exemplos de pré-tratamento a moagem (para redução do tamanho da partícula) e a homogeneização a alta pressão - HPH (para quebra da parede celular e libertação de componentes intracelulares) [55].

Atingem-se rendimentos elevados, tendo-se observado um rendimento de 46% com uma mistura de 2-Metiltetraidrofurano e etanol (1:3), a 120 °C e 15 minutos, na extração de lípidos da biomassa da alga *Nannochloropsis* [49]. Este método foi também utilizado na extração de lípidos de leveduras oleaginosas, como a *Rhodospordium toruloides* e *Cryptococcus curvatus*, onde se conseguiu extrair 96% e 99% dos lípidos, em 30 e 15 minutos, respetivamente. Utilizou-se como solvente uma mistura de clorofórmio e metanol a uma temperatura de 105 °C em ambas as espécies [56].

Apesar de ser um método com diversas vantagens apresenta limitações, como elevados custos operatórios e consumo energético [48].

1.7 Extração supercrítica

A extração supercrítica (ESC) é uma técnica de separação baseada no poder de dissolução ou solubilização de fluidos supercríticos, que consistem em fluidos que estão acima do seu ponto crítico. O ponto crítico é definido como o valor de pressão e de temperatura a partir do qual a substância pura apresenta propriedades termofísicas intermédias entre um gás e um líquido [57].

A seletividade da solvatação pode ser controlada até certo ponto através da pressão e temperatura escolhida para o fluido, mudando desta forma a sua densidade. Observa-se que, normalmente, mantendo a temperatura constante, a densidade aumenta com o aumento da pressão. A pressão constante e com o aumento da temperatura, a densidade diminui.

Outras propriedades como a difusividade e a viscosidade são relevantes na decisão do solvente na medida em que afetam a cinética da extração, por influenciarem a transferência de massa. A viscosidade de um fluido supercrítico é inferior à dos líquidos, diminui com a temperatura e aumenta com a pressão, apresentando normalmente um valor compreendido entre 10^{-4} e 10^{-3} Pa.s. Relativamente à sua difusividade, é superior à dos líquidos, diminuindo com a pressão e aumentando com a temperatura. Ambos os fatores contribuem para uma transferência de massa mais eficiente [58].

O processo de extração compreende duas etapas distintas. A primeira consiste na extração do composto de interesse, em que se alimenta um fluxo contínuo e uniforme do fluido supercrítico escolhido ao extrator, que contém um leito fixo de partículas sólidas. Após a dissolução do composto de interesse no fluido, estes saem do extrator, para se dar a separação - a segunda etapa. Esta é a etapa onde o fluido será removido, através da despressurização, que diminui a sua densidade. Deste modo, o poder de solubilização do fluido diminui e o composto de interesse precipita [57].

Este método tem sido muito utilizado em alternativa aos métodos tradicionais de extração com solventes uma vez que apresenta diversas vantagens. O facto de se operar a temperaturas moderadas permite a separação de substâncias sensíveis à degradação térmica. Por outro lado, diversos fluidos baratos e não tóxicos são possíveis de ser utilizados, sendo o mais comum o dióxido de carbono, que é ainda não corrosivo, não inflamável, relativamente inerte do ponto de vista químico e ambientalmente amigável.

Para além disso, apresenta ainda uma baixa temperatura crítica (31,1 °C), baixa pressão crítica (72,9 atm ou 73,6 bar) e é facilmente removido dos extratos. É por isso o fluido mais escolhido para extração de compostos de elevado valor como lípidos, antioxidantes e carotenóides [59]. No entanto, apresenta algumas desvantagens. O facto de apresentar uma polaridade reduzida torna-o adequado apenas para a extração de compostos apolares ou pouco polares. Por outro lado, apresenta dificuldade em extrair compostos de matrizes com um teor de humidade mais elevado [58].

O diagrama pressão-temperatura do dióxido de carbono está representado na figura 1.7, onde é possível observar a localização do seu ponto crítico e a sua região supercrítica.

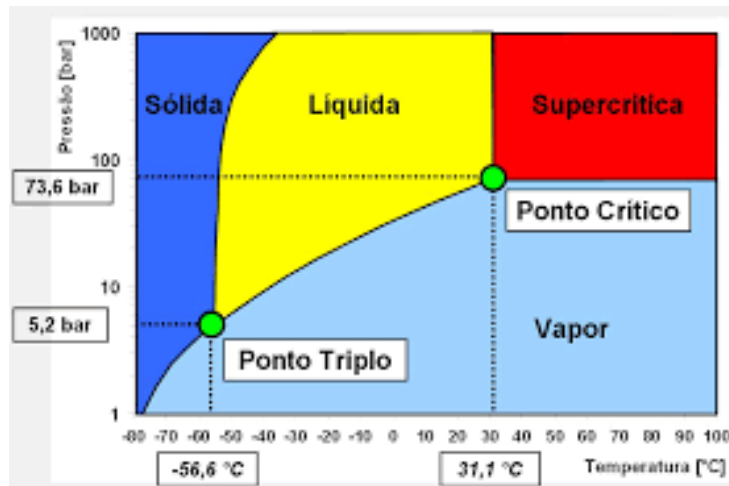


Figura 1.7: Diagrama pressão-temperatura do dióxido de carbono. [60]

O principal inconveniente deste processo reside no custo do equipamento, que é significativamente superior ao de outros processos de extração [61] [62].

A aplicação deste método tem crescido ao longo dos últimos anos na extração de compostos bioativos de microalgas. Estão presentes na literatura diversos artigos relativos à extração de pigmentos (carotenóides e clorofilas) [63], lípidos como ADH [64], ácido linolénico [65] ou ácidos gordos para biodiesel [66], polifenóis [67] e hidrocarbonetos [68].

1.8 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo produzir culturas de elevada concentração celular da microalga *Cryptothecodinium cohnii*, com alto conteúdo de lípidos intracelulares, tendo em vista a obtenção do ácido docosahexaenóico (ADH) e de ácidos gordos para a produção de biodiesel. De seguida estudou-se a extração da fração lipídica da biomassa produzida utilizando técnicas verdes.

Na primeira parte do estudo procedeu-se à optimização da fermentação da microalga, com o principal intuito de testar fontes de carbono mais sustentáveis em comparação com a glicose, utilizando-se um biorreator de bancada de 7 L operado em regime fed-batch.

Para além da glicose, foi estudado o desenvolvimento das células em glicerol bruto e melação de cana de açúcar como fontes de carbono, monitorizando as culturas em tempo real através da densidade celular, citometria de fluxo, observação microscópica, percentagem de oxigénio dissolvido, quantificação da concentração residual de fonte de carbono no meio, teor de lípidos e perfil de ácidos gordos.

Na segunda parte do trabalho pretendeu-se estudar e otimizar o processo de extração dos lípidos da biomassa microalgal produzida, por recurso a técnicas de extração consideradas mais verdes e ambientalmente sustentáveis. Com este propósito, para a biomassa produzida em maior abundância e com maior conteúdo em ácidos gordos, foram testadas as técnicas de extração supercrítica e de extração acelerada por solventes. Os resultados de ambas as técnicas foram comparados com o processo de extração convencional por Soxhlet, que neste trabalho foi considerado o processo de referência para quantificação lipídica da biomassa microalgal.

Os estudos de extração supercrítica avaliaram o efeito da pressão e da temperatura de trabalho no rendimento da extração em termos de lípidos, ácidos gordos totais, ADH e ácidos gordos para biodiesel. Para tal, realizaram-se estudos de extração até 380 bar e temperaturas entre 40 e 60 °C.

Por outro lado, o estudo da tecnologia de extração acelerada por solventes incidiu na optimização de dois dos parâmetros experimentais com mais relevância no processo, tempo de extração e temperatura, de forma a obter o maior rendimento em lípidos, ácidos gordos totais, ADH e ácidos gordos para a produção de biodiesel. Para esse efeito, recorreu-se a um planeamento experimental com base numa superfície de resposta e de acordo com a distribuição para dois fatores de Doehlert. O estudo foi realizado para dois solventes de polaridades distintas, de forma a avaliar o efeito do solvente na extração.

Comparou-se também a concentração de pigmentos no óleo extraído nos três métodos.

Capítulo 2

Materiais e métodos

2.1 Reagentes e equipamento

Os reagentes e solventes utilizados no trabalho experimental estão presentes na tabela A.1, no Apêndice A. O equipamento utilizado será mencionado ao longo do texto.

2.2 Fermentação

2.2.1 Condições de crescimento

Inicialmente, células da *Cryptocodinium cohnii* (American Type Culture Collection 30772) foram mantidas em culturas *starter*, em *erlenmeyers* de 250 mL, contendo 150 mL de meio composto por sal marinho (23 g/L), extrato de levedura (1,8 g/L) e glicose (9 g/L). Este meio foi esterilizado numa autoclave (Uniclave 88, A. J. Costa LDA, Portugal) a 121 °C por 20 minutos, sendo de seguida inoculado com uma suspensão celular da *C. cohnii* (10% v/v). Estas culturas foram mantidas no escuro a 25 °C, sendo re-inoculadas mensalmente no mesmo meio.

As culturas de inóculo (cultura que é inoculada ao biorreator) foram preparadas em *erlenmeyers* de 500 mL, contendo 135 mL de meio de cultura (composto por 2 g/L de extrato de levedura, 25 g/L de sal marinho e 20 g/L da fonte de carbono, conforme o ensaio realizado) e 15 mL de *starter*. Foram incubadas a 27 °C e 110 rpm (incubador Unitrom Infors, Suíça), durante os 7 dias anteriores ao início da fermentação. De modo a prevenir contaminações de bactérias, foi ainda adicionada uma solução (1 mL por cada litro de meio inóculo) constituída por três antibióticos: cloranfenicol, penicilina G e streptomina, com concentrações de 5, 62 e 100 mg/L, respetivamente. Este meio foi esterilizado por filtração.

O pH de ambos os meios de cultura foi previamente ajustado para 6,5 com soluções de NaOH e HCl, antes de serem esterilizados. A medição do pH foi feita com uma sonda (Mettler) e um potenciómetro (Consort, modelo C3021).

2.2.2 Fonte de carbono

Relativamente à fonte de carbono, no ensaio I utilizou-se glicose monohidratada, no ensaio II melação de cana previamente hidrolisado e no ensaio III glicerol bruto.

O melação de cana foi fornecido pela Sidul Açúcares (Santa Iria da Azóida, Portugal) e foi previamente hidrolisado de modo a hidrolisar a sacarose em glicose e frutose. Para isso, foi-lhe adicionado água destilada (na proporção de 1:1 em volume) e de seguida HCl até atingir-se pH 3. Esta mistura ficou em agitação a 50 °C por 24 horas. Após a hidrólise, adicionou-se NaOH até se atingir pH 6,5.

O glicerol bruto foi fornecido pela Iberol (Sociedade ibérica de biocombustíveis e oleaginosas, S.A, Alhandra) e tinha um teor de glicerol de 81,6 % (m/m).

2.2.3 Fermentação no biorreator

Os três ensaios foram realizados num biorreator de 7 L (Electrolab Biotech, modelo FerMac 360), sob o regime fed-batch, sendo o mais utilizado na indústria, uma vez que tem a vantagem de prolongar a fase exponencial de crescimento da microalga, atingindo-se uma maior densidade de células. Sempre que se verificava o abrandamento do crescimento celular, introduziam-se 'pulsos de nutrientes', consistindo em soluções de 300 mL de meio de cultura concentrado em 10 vezes (ou apenas com fonte de carbono), previamente centrifugados e esterilizados na autoclave.

O biorreator continha um volume inicial de 2,7 L de meio de cultura, ao qual se adicionaram 300 mL de inóculo. O meio de cultura, previamente centrifugado para remoção de possíveis resíduos, era composto por 27 g/L de sal marinho, 0,5 g/L de extrato de levedura, 5,5 g/L de extrato de milho e fonte de carbono. O meio de cultura do ensaio I tinha 20 g/L de glicose, no ensaio II 20 g/L de melação hidrolisado e no ensaio III 24,52 g/L de glicerol bruto, de modo a equivaler a 20 g/L de glicerol puro. Antes da inoculação, o reator com o meio de cultura foi esterilizado nas mesmas condições acima descritas.

No fermentador - figura 2.1 - estava acoplado um rotor, onde no meio eixo estavam fixas duas turbinas de *Rushton*, um rotâmetro de entrada do ar (caudal de 1 g/L.h), uma abertura para saída do ar, um termómetro, uma manta de aquecimento (sendo 27 °C o *set-point*) e um módulo controlado do pH, temperatura e oxigénio dissolvido.



Figura 2.1: Biorreator utilizado nas fermentações.

Quando se verificava um aumento ou descida do valor de pH definido (6,5), o sistema introduzia automaticamente HCl 2,5 M ou NaOH 2,5 M, respetivamente. O elétrodo de pH foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

O oxigénio dissolvido foi medido através do elétrodo de oxigénio que dá leituras de percentagem de oxigénio dissolvido, tendo sido por isso necessário calibrar o elétrodo de oxigénio previamente. Quando esta medida descia para valores inferiores a 30%, aumentava-se a agitação, de forma a manter leituras de oxigénio dissolvido acima desse valor, e assim evitar condições de limitação de oxigénio. A taxa de agitação foi variada entre 100 a 300 ou 400 rpm.

Durante os três ensaios foram recolhidas amostras (duas a cinco amostras diárias), à chama para garantir condições estéreis, sendo em cada momento analisadas ao microscópio, por espectrofotometria e citometria de fluxo. As amostras foram centrifugadas (Sigma, modelo 2-16K, Sartorius), utilizando-se o sobrenadante para posterior determinação do azoto e fonte de carbono residual (ficou no congelador a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser analisado). A biomassa centrifugada foi liofilizada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (liofilizador Heto Power Dry LL 3000, Thermo Scientific) para posterior análise de ácidos gordos e determinação do teor de humidade e cinzas na biomassa.

Após as fermentações estarem concluídas, a biomassa (total) foi centrifugada (Sigma, modelo 6-16KS) e liofilizada com o mesmo liofilizador e temperatura utilizados nas amostras recolhidas, mas por 48 horas (uma vez que eram quantidades consideravelmente superiores).

2.2.4 Densidade óptica

De forma a acompanhar o crescimento da microalga, a densidade óptica de todas as amostras recolhidas, bem como do meio antes da inoculação (correspondente ao branco), foi lida em triplicado no espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Spectronic, modelo Genesys 20), a 470 nm. Uma vez que, segundo a lei de Lambert-Beer, a absorvância não pode ter valores superiores a 0,6, as suspensões foram diluídas adequadamente antes de serem analisadas. Mediu-se também a absorvância dos pulsos antes de os adicionar, de forma a corrigir os valores de absorvância seguintes.

Com os valores de densidade óptica devidamente corrigidos (correção para a diluição e subtração do valor do branco ou pulso) determinou-se os respetivos pesos secos (g/L) para cada instante, através da correlação entre a absorvância e o peso seco, anteriormente estabelecida - equação 2.1, .

$$Peso\ Seco\ (g/L) = (1,0889 \times DO) - 0,2497 \quad (2.1)$$

2.2.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para determinar a autofluorescência das células, como método adicional de controlo do crescimento da microalga, e também para analisar o estado fisiológico das células, nomeadamente a integridade da sua membrana e a sua atividade enzimática. Utilizaram-se para essas análises os corantes PI e CFDA, respetivamente.

Neste trabalho foi utilizado um citómetro CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences, USA). O equipamento contém três lasers com diferentes comprimentos de onda: um violeta com 405 nm, um azul com 488 nm e um vermelho com 638 nm, sendo que a cada um corresponde uma gama de comprimentos de onda.

Antes de serem analisadas, as amostras recolhidas foram sonicadas (Transsonic T 660/H, Elma) por 10 segundos, de forma a desfazer eventuais agregados de células e garantir a sua análise individual.

Para medir a autofluorescência diluiu-se a amostra com solvente PBS (*Phosphate-buffered saline*) num tubo para citómetro, de modo a que o número de eventos por segundo fosse de 200 a 500, para um volume total de 500 µL. Para medir o estado fisiológico utilizou-se outro tubo, ao qual se adicionou o mesmo volume de amostra, 3 µL de CFDA e 2 µL de PI, e o restante de PBS para perfazer os 500 µL. Todas as medições foram feitas em triplicado, sendo que as amostras coradas foram analisadas após 15 minutos de incubação no escuro, para assegurar a penetração dos corantes nas células.

A autofluorescência das células foi analisada através dos detetores FSC-A e SSC-A. Para as amostras coradas, foi utilizado o FITC-A para o CFDA e o PC5.5-A para o PI. Os dados foram analisados no *software* CityExpert 2.4.

A autofluorescência das células é dada pelo número de células por unidade de volume, tendo sido utilizada para determinar o peso seco da amostra através da correlação 2.2, anteriormente estabelecida.

$$Peso\ Seco\ (g/L) = (0,0000009 \times Celulas/mL) - 0,4133 \quad (2.2)$$

2.2.6 Observações microscópicas

As amostras recolhidas ao longo da fermentação, bem como as culturas *starter* e de inóculo, foram observadas ao microscópio (Olympus corporation, Japão, modelo BX60) sob luz visível, de modo a controlar a existência de possíveis contaminações e avaliar o crescimento das células. Foram tiradas fotografias, estando uma presente acima em 1.1 e duas delas presentes no Apêndice C.

2.2.7 Quantificação do consumo da fonte de carbono

Para determinar a concentração da fonte de carbono no meio de fermentação (glicerol, glicose, frutose e sacarose, dependendo da experiência) as amostras recolhidas foram centrifugadas de modo a recolher-se o sobrenadante. Este foi filtrado e injetado numa coluna de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Agilent, modelo 1100 Series) -, equipado com um detetor de dispersão e um detetor de índice de refração. Recorreu-se as colunas Aminex HPX-87H e HPX-87P (Bio-Rad).

Antes de injetar as amostras, foram estabelecidas as correlações que relacionam a áreas dos picos com a concentração das respetivas fontes de carbono no meio de cultura, através da análise por HPLC de soluções de glicerol, glicose, frutose e sacarose de concentração conhecida.

De modo a ter-se uma noção qualitativa imediata da concentração de glicose no meio (uma vez que os resultados por HPLC não o eram), o seu teor foi avaliado através de tiras de deteção rápida (Roche), que em contacto com a amostra retirada do reator, apresentam uma tonalidade a que corresponde um certo intervalo de concentração de glicose.

Na fermentação em que a fonte de carbono era o glicerol, utilizou-se um kit (Glycerol GK Assay Procedure, Megazyme) para determinar a sua concentração no meio, seguindo-se o procedimento descrito no mesmo. Assim foi possível decidir a que momentos da fermentação era necessário injetar um pulso.

2.2.8 Quantificação do azoto

Em algumas das amostras retiradas ao longo das fermentações (as mesmas em que se procedeu à análise dos ácidos gordos) foi quantificado o azoto residual do sobrenadante obtido após centrifugação. Foi seguido o método Kjeldahl [69].

Adicionou-se cerca de 5 mL de cada amostra, em duplicado, para um tubo de digestão. Na hotte juntou-se a cada tubo 20 mL de ácido sulfúrico 95-97% e cerca de 1 g de mistura de catalisador (930 g de sulfato de potássio, 30 g de óxido de titânio, 30 g de cobre e 10 g de ácido esteárico), de modo a converter o azoto em sulfato de amónio. Colocaram-se os tubos no digestor (Unidade de digestão Kjeltec) e a hidrólise das proteínas deu-se por 2 horas, sob aquecimento.

Após os tubos serem arrefecidos à temperatura ambiente (cerca de 1 hora), adicionou-se a cada um, cuidadosamente e na hotte, 100 mL de água destilada seguido de 50 mL de solução de NaOH 50% (m/m), originando amoníaco. Procedeu-se à sua destilação numa unidade de destilação (Tecator Kjeltec System, modelo 1026 Distilling Unit), sendo esta recolhida num *erlenmeyer* contendo 50 mL de

ácido bórico 4% (m/m) e uma gota de indicador de pH (2 g de vermelho de metilo e 1 g de azul de metileno, dissolvidos em 100 mL de álcool etílico 95% (v/v)).

Para quantificar o amoníaco presente em cada *erlenmeyer*, realizou-se uma titulação com ácido clorídrico (0,1 M), que, na presença de indicador de pH, muda de azul claro para azul arroxeadado a pH 5,4.

A equação 2.3 permitiu calcular a percentagem de azoto em cada amostra, sendo V o volume de ácido clorídrico utilizado em cada titulação, em litros, e m a massa de amostra de sobrenadante utilizada, em gramas.

$$\text{Azoto (g/L)} = \frac{0,14 \times V}{m} \quad (2.3)$$

2.2.9 Determinação de humidade e cinzas

De modo a corrigir-se o peso da biomassa usada na quantificação dos lípidos das amostras, foram determinadas as percentagens de humidade e de cinzas presentes nas mesmas. Para isso, pesou-se em duplicado, cerca de 100 mg de biomassa liofilizada para cadinhos de porcelana previamente tarados. De seguida foram colocados durante 24 horas numa estufa a 100 °C e pesados novamente, após arrefecimento no exsiccador à temperatura ambiente.

Para a quantificação das cinzas, os cadinhos foram posteriormente colocados numa mufla a 550 °C por 3 horas, sendo arrefecidos no exsiccador para serem pesados.

A percentagem de humidade foi então calculada através da equação 2.4 e a percentagem de cinzas através da equação 2.5.

$$\text{Humidade (\%m/m)} = \frac{m_{\text{cadinho+biomassa}} - m_{\text{cadinho}}}{m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (2.4)$$

$$\text{Cinzas (\%m/m)} = \frac{m_{\text{cadinho+cinza}} - m_{\text{cadinho}}}{m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (2.5)$$

2.2.10 Determinação do perfil de ácidos gordos

A cromatografia gasosa foi usada para determinar o perfil de ácidos gordos das amostras recolhidas ao longo das fermentações e das biomassas finais. Foi também utilizada na análise de todos os óleos extraídos da biomassa do ensaio III. A análise cromatográfica é feita aos ésteres metílicos dos ácidos gordos e, por esse motivo, é necessário transformar os mono, di e triglicéridos presentes nas amostras nos seus respetivos derivados de ácidos gordos não polares, recorrendo para tal à reação de transesterificação.

Na transesterificação direta da biomassa utilizaram-se, aproximadamente, 100 mg de biomassa liofilizada, previamente moída. Na determinação dos ácidos gordos a partir do óleo extraído, utilizaram-se 15 a 20 mg de óleo. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Como referido, a biomassa a utilizar foi previamente submetida a moagem, a qual foi realizada num moinho de bolas (Retsch, modelo MM400), colocando em cada almofariz aproximadamente 0,5 g de

biomassa liofilizada juntamente com 4 esferas metálicas (AISI 316) de 1 cm de diâmetro. A moagem foi realizada a 25 Hz, durante 3 minutos e 30 segundos. A transterificação procedeu-se da seguinte forma: a cada amostra, colocada num tubo de ensaio, adicionaram-se 0,2 mL de ácido heptadecanóico como padrão interno (C17:0, 5 mg/mL) e 2 mL de solução de metanol/cloreto de acetil (19:1 v/v), previamente preparada num banho de gelo, uma vez que a reação é fortemente exotérmica. Os tubos de ensaio com as amostras e os reagentes foram colocados sob atmosfera inerte (azoto), fechados e no escuro, de forma a evitar a degradação dos lípidos. A reação procedeu durante uma hora a 80 °C, colocando os tubos em banho de água aquecido a esta temperatura.

Após o arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente, foi-lhes adicionado 1 mL de água destilada e 2 mL de n-heptano, para haver separação das fases aquosa e orgânica. Recolheu-se a fase orgânica para *vials*, com o auxílio de pipetas de pasteur, fazendo passar sob um filtro de algodão hidrófilo e sulfato de sódio anidro, de forma a reter partículas em suspensão e remover água ou fase aquosa que possam ter sido co-extraídas.

As amostras foram analisadas num cromatógrafo gasoso (modelo SCION GC 436, Buker Alemanha), equipado com um detetor de ionização de chama. A temperatura do injetor foi de 250 °C e do detetor 280 °C. A pressão da coluna capilar foi de 13,5 psi e a sua temperatura foi de 200 °C nos 8 minutos iniciais, aumentando (4°C por minuto) até 240 °C, na qual permaneceu durante 16 minutos. Utilizou-se uma coluna capilar fundida com sílica, com 0,32 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento (Supelcowax 10, Supelco) e com um caudal de gás de arraste (hélio) de 3,5 mL/min.

Os ácidos gordos presentes foram identificados de acordo com o seu tempo de retenção, comparativamente com os dos padrões conhecidos (GLC 459, GLC 85 e GLC 75, Nu-Check-Prep). A sua quantificação foi determinada através das áreas dos seus picos relativamente à área do padrão interno, de acordo com a equação 2.6.

$$m_{AGi} = \frac{A_{AGi}}{A_{(17:0)}} \times FR_{AGi} \quad (2.6)$$

onde m_{AGi} é a massa do ácido gordo, A_{AGi} é a área do seu pico, $A_{(17:0)}$ é a área do pico do padrão interno e FR_{AGi} o fator de resposta do ácido gordo.

2.2.11 Cálculo dos parâmetros cinéticos

Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento - v_{max} - é a taxa de crescimento da biomassa na fase exponencial, utilizando-se para o seu cálculo apenas os pontos pertencentes a esta fase. É determinada através da equação 2.7, em que PS_0 corresponde ao peso seco da biomassa aquando da inoculação.

$$\ln(\text{Peso Seco}) = v_{max}t + \ln(PS_0) \quad (2.7)$$

Produtividade média volumétrica

A produtividade média (ou global) em biomassa do processo - $P_{Amedia}(t)$ - é dada pela equação 2.8, sendo onde X_{final} a concentração de biomassa no instante final, $X_{inicial}$ a concentração de biomassa no instante inicial e t o tempo total da cultura. A produtividade instantânea é calculada pela equação 2.9.

$$P_{Amedia}(t) = \frac{X_{final} - X_{inicial}}{t} \quad (2.8)$$

$$P_A(t_2) = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \quad (2.9)$$

Composição em ácidos gordos

Relativamente à composição em ácidos gordos, foram utilizadas três equações. A equação 2.10 calcula a percentagem de cada ácido gordo nos AGT - $\%AG_i$ (m_{AG_i}/m_{AGT}) - sendo que m_{AG_i} é a massa do ácido gordo i e m_{AGT} é a massa total de ácidos gordos.

$$\%AG_i(m_{AG_i}/m_{AGT}) = \frac{m_{AG_i}}{m_{AGT}} \times 100 \quad (2.10)$$

A percentagem de AGT na biomassa é calculada através da equação 2.11, sendo m_{AGT} a massa total de ácidos gordos e $m_{biomassa}$ a massa de biomassa seca e sem cinzas.

$$\%AGT(m_{AGT}/m_{biomassa}) = \frac{m_{AGT}}{m_{biomassa}} \quad (2.11)$$

A produtividade volumétrica em ácidos gordos totais foi determinada através da equação 2.12, sendo Pm_x a produtividade volumétrica média em biomassa e $\%AGT$ ($m_{AGT}/m_{biomassa}$) a percentagem de ácidos gordos totais na biomassa seca e sem cinzas.

$$P_{AGT} = Pm_x \times \frac{\%AGT(m_{AGT}/m_{biomassa})}{100} \quad (2.12)$$

A equação 2.12 calcula também a produtividade em ADH.

2.3 Métodos de extração de lípidos

Os lípidos sintetizados pela microalga *Cryptocodinium cohnii* no ensaio III (fermentação com glicerol como fonte de carbono) foram extraídos por vários métodos, a saber: por extração convencional em Soxhlet, através de extração acelerada com solventes (ASE) e por extração supercrítica (ESC) com dióxido de carbono. Os ácidos gordos dos óleos extraídos, após quantificação, foram analisados por cromatografia gasosa, como mencionado anteriormente.

Recorreu-se ao método em Soxhlet com hexano como solvente para quantificar o conteúdo da biomassa em lípidos totais. Esta análise foi também feita para a biomassa dos ensaios I e II.

2.3.1 Método de extração em Soxhlet

A extração dos lípidos da biomassa preparada no ensaio III foi realizada pelo método convencional por Soxhlet e testando 3 solventes diferentes: hexano, etanol e acetona. Tal como já referido, a biomassa preparada nos ensaios I e II foi também submetida a extração em Soxhlet, de forma a quantificar os lípidos totais presentes na biomassa, mas nestes casos utilizou-se como solvente hexano.

Para cada ensaio, pesou-se, em duplicado, cerca de 0,5 g de biomassa liofilizada, previamente moída no moinho de bolas (como descrito anteriormente) para um cartucho de celulose, tapando-o com algodão embebido em solvente. Colocou-se o cartucho num tubo extractor de Soxhlet e utilizou-se cerca de 140-150 mL de solvente em cada balão de destilação. O tempo de extração foi de 6 horas. Na figura 2.2 apresenta-se a representação esquemática do método por Soxhlet.

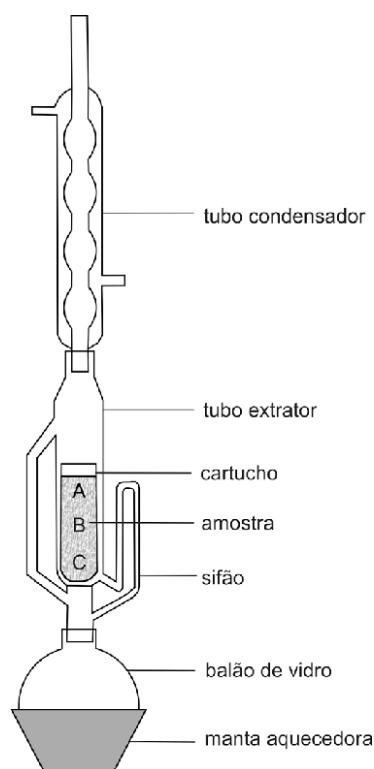


Figura 2.2: Diagrama do método de extração de Soxhlet.

Terminada a extração, a solução com o extrato lipídico foi filtrada sob vácuo, usando sequencialmente filtros de 0,2 e 0,1 μm de porosidade, de modo a remover alguma biomassa que pudesse estar em suspensão. De seguida, a solução com extrato foi concentrada num evaporador rotativo de vácuo (Buchi, modelo R-100), de forma a evaporar completamente o solvente e assim ser possível quantificar gravimetricamente os lípidos extraídos. O extrato lipídico concentrado foi colocado sob atmosfera inerte (com azoto) e tapado da luz, de forma a evitar a degradação dos compostos. Após 1 hora de secagem na estufa a 30 $^{\circ}\text{C}$, para evaporação completa de algum solvente que restasse no balão de concentração, o extrato foi colocado no exsiccador para poder estabilizar a peso constante.

A equação 2.13 permitiu calcular a percentagem de lípidos obtida em cada extração, sendo $m_{biomassa}$ a massa da biomassa corrigida, ou seja, retirando a humidade e as cinzas previamente determinadas.

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{m_{balao+lipidos} - m_{balao}}{m_{biomassa}} \times 100 \quad (2.13)$$

O perfil de ácidos gordos de cada ensaio foi analisado por cromatografia gasosa, como descrito em 2.2.10.

2.3.2 Extração acelerada com solventes

O método de extração acelerada com solventes (ASE) foi estudado como potencial método para a extração de lípidos da biomassa da *C. cohnii*, preparada no ensaio III, dadas as vantagens inerentes a este método e que foram anteriormente enunciadas em 1.6, em particular o facto de ser uma técnica considerada verde, que necessita de uma pequena quantidade de biomassa, tempo de extração reduzido e pouco volume de solvente, permitindo obter rendimentos semelhantes aos da extração por Soxhlet. Na figura 2.3 encontra-se a representação esquemática do equipamento de extração ASE.

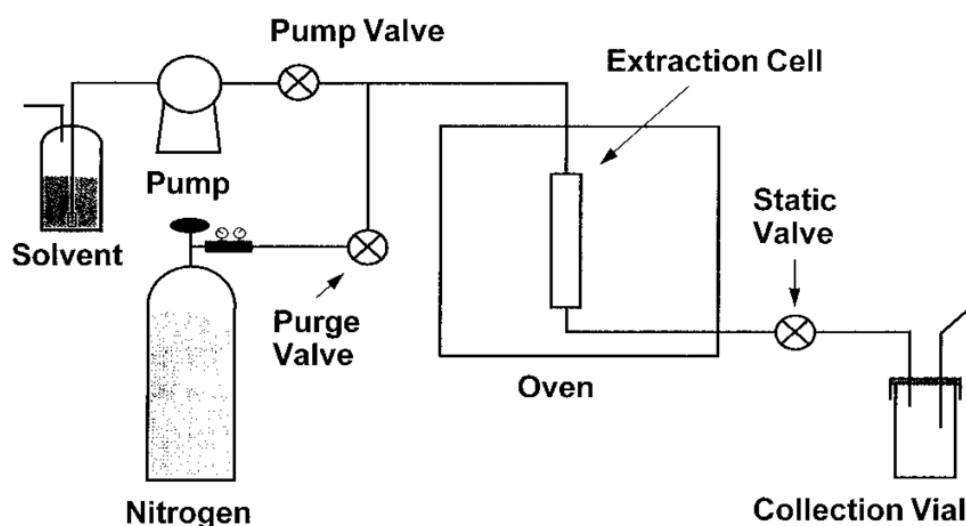


Figura 2.3: Esquema do sistema do método de extração acelerada com solventes.

Iniciou-se o estudo de extração ASE com alguns ensaios preliminares, de forma a escolher quais as condições a implementar no desenho experimental. Para tal, foram testados alguns solventes (hexano, etanol e acetona), números de ciclos (1 e 2) e duração de ciclos (3, 6 e 26 minutos).

Utilizou-se um aparelho Dionex ASE 150, da Thermo Scientific, presente na figura 2.4, ligado a uma garrafa de azoto (gás de pressurização).



Figura 2.4: Equipamento utilizado na extrações aceleradas com solventes.

Os ensaios preliminares foram realizados utilizando cerca de 250 mg de biomassa liofilizada e previamente moída no moinho de bolas (mesmas condições acima descritas). Para evitar colmatção do leite, misturou-se a biomassa com terra diatomácea (cerca de 0,5 g) nos primeiros ensaios realizados e nos restantes com esferas de vidro (cerca de 5 g) de 0,3 mm de diâmetro, uma vez que estas são reutilizáveis após lavagem, ao contrário do primeiro enchimento. Colocaram-se nas extremidades da célula extratora (5 mL de volume interno) algodão hidrófilo e filtros de celulose, de forma a evitar o arraste de partículas sólidas pelo solvente. A pressão de trabalho foi de aproximadamente 10 MPa (valor pré-estabelecido para este modelo de equipamento).

Relativamente aos restantes parâmetros que podem ser ajustados no método de extração por ASE, estes foram mantidos em todos os ensaios preliminares, bem como no desenho experimental utilizado, e constam nos seguintes: volume de lavagem de 60%, tempo de purga 30 segundos e tempo de pré-aquecimento de 1 minuto.

Após a extração, cada solução contendo o extrato lipídico foi filtrada e o extrato concentrado, seguindo o procedimento descrito anteriormente para o método por Soxhlet. A equação utilizada para quantificar os lípidos foi a equação 2.13.

Tal como no método por Soxhlet, todos os extratos foram analisados por cromatografia gasosa, conforme descrito em 2.2.10, de forma a determinar e o perfil de ácidos gordos de cada um.

Planeamento experimental

Após os diversos ensaios preliminares foi possível definir as condições para fazer o desenho do planeamento experimental. Assim, definiu-se um planeamento experimental para os solventes hexano e etanol, de forma a determinar os intervalos de temperatura e tempo de extração que maximizam os rendimentos em lípidos, ácidos gordos totais, ADH e ácidos gordos para produção de biodiesel (as quatro respostas avaliadas). Foi utilizada uma metodologia baseada numa superfície de resposta, com distribuição para dois fatores de Doehlert [70]. Definiu-se para a temperatura o limite mínimo de 40 °C e o limite máximo de 140 °C. Para o fator tempo de extração, selecionou-se como limite mínimo e máximo 2 e 20 minutos, respetivamente. Considerou-se apenas 1 ciclo de extração.

Com este domínio experimental foi então aplicada a distribuição de Doehlert, determinando-se as condições dos ensaios a serem realizados. Foram definidas 7 condições diferentes - tabela 2.1 - tendo-se realizado 14 ensaios, uma vez que a matriz experimental foi elaborada com a repetição de cada ensaio.

Tabela 2.1: Condições de temperatura e duração da extração testadas na execução do planeamento experimental obtidas através da distribuição de dois fatores de Doehlert.

Teste	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	90	11
2	140	11
3	40	11
4	115	19
5	65	3
6	115	3
7	65	19

Para se obter um número de graus de liberdade suficiente, os resultados obtidos foram utilizados no tratamento estatístico de validação do planeamento experimental.

O modelo que produz as superfícies de resposta é um modelo polinomial de segunda ordem - equação 2.15. Y é a resposta de cada experiência, β os parâmetros do modelo polinomial e X corresponde ao nível do fator experimental.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (2.14)$$

Neste modelo introduziram-se representações codificadas dos níveis dos fatores experimentais, uma vez que apresenta vantagens descritas por Deming e Morgan [71], como utilizar no mesmo modelo variáveis com unidades diferentes. Esta codificação possibilita a obtenção de um planeamento experimental que apresenta uma simetria em relação ao centro, que assume o valor zero. Cada extremo dista uma unidade do centro, ou seja, o limite mínimo corresponde a -1 e o máximo a +1.

A transformação dos níveis dos 2 fatores em unidades codificadas foi feita através da equação 2.15, onde F_i corresponde a essa transformação, Z_i aos níveis, Z_i^0 ao valor real do fator no centro do planeamento e ΔZ_i às unidades codificadas.

$$F_i = \frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \quad (2.15)$$

O resultado da codificação dos níveis de cada fator experimental está presente na tabela 2.2.

Tabela 2.2: Codificação dos níveis dos fatores testados de acordo com o planeamento experimental.

Teste	Temperatura real (°C)	Tempo real (min)	Temperatura codificada	Tempo codificado
1	90	11	0	0
2	140	11	1	0
3	40	11	-1	0
4	115	19	0,5	0,87
5	65	3	-0,5	-0,87
6	115	3	0,5	-0,87
7	65	19	-0,5	0,87

Os parâmetros β são obtidos através da equação 2.16, consistindo numa solução matricial para equações lineares. Y representa a matriz com as respostas obtidas experimentalmente e F os valores codificados presentes na tabela 2.2.

$$Y = F \times \beta \leftrightarrow \beta = 1/F \times Y \quad (2.16)$$

Uma vez que a matriz $1/F$ não tem o mesmo número de colunas que o número de linhas da matriz Y , a matriz $1/F$ não pode ser multiplicada diretamente pela Y . Deste modo, é necessário realizar a transformação demonstrada por Draper e Smith (1966) [72] - equação 2.17 - onde F' é a matriz transposta de F .

$$\beta = (F'F) \times F'Y \quad (2.17)$$

Por fim verificou-se a validação da adequação do modelo polinomial quanto à sua representação do conjunto de dados através de um método estatístico - o teste de Fisher de razão das variâncias. Efetuou-se o teste estatístico para a eficácia dos parâmetros e o teste estatístico para o desajuste do modelo [71].

2.3.3 Extração supercrítica

Para realizar os ensaios de extração supercrítica foi utilizado o aparelho existente no Laboratório Nacional de Energia e Geologia - LNEG - do departamento de bioenergia e biorrefinarias, e presente na figura 2.5.



Figura 2.5: Equipamento de extração supercrítica utilizado nos ensaios realizados.

A figura 2.6 consiste num diagrama esquemático deste equipamento, para uma melhor compreensão do seu funcionamento.

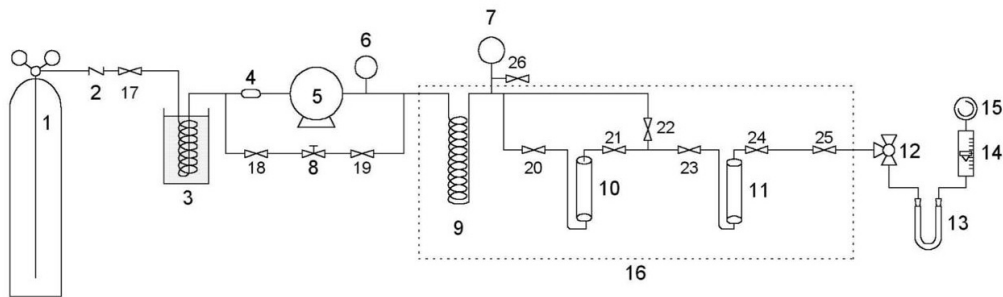


Figura 2.6: Diagrama do equipamento de extração supercrítica utilizado. 1 - garrafa de dióxido de carbono; 2 - válvula de não retorno; 3 - serpentina arrefecida com gelo; 4 - filtro de alta pressão; 5 - bomba de circulação; 6,7 - manómetros; 8 - regulador de pressão; 9 - permutador de calor; 10,11 - célula de extração; 12 - válvula de expansão (válvula de 3 vias); 13 - tubo de vidro em U; 14 - rotâmetro; 15 - contador de gás; 16 - banho de água; 17-26 - válvulas.

O aparelho encontra-se ligado a uma garrafa de dióxido de carbono liquefeito (1), que apresenta um tubo prolongador, assegurando que o CO_2 sai no estado líquido. Este passa por uma válvula de não retorno (2) e é arrefecido numa serpentina (3) com 2 metros de comprimento e imersa num banho de gelo, de forma a garantir que entra na bomba (5) totalmente liquefeito.

A bomba utilizada neste equipamento é uma bomba Milton Roy, modelo NSI-33R, sendo que o dióxido de carbono antes de entrar na mesma é filtrado por um filtro de alta pressão (4) de 7 μ m

(modelo SS-4F-7, Whitey). A pressão na bomba é regulada pelo regulador de pressão (7) (modelo 26-1761-21 da Tescom Corporation Series) e é indicada por um manómetro (6) (modelo General Service gauge tipo S da Omega engineering). O aparelho possui também um manómetro (8) (tipo Bourdon, modelo CM-TC da Heise) que mede rigorosamente a pressão a que se encontra o sistema, com um rigor de $\pm 0,05$ MPa, permitindo leituras de 0 a 50,0 MPa.

Após sair da bomba, o fluido pressurizado é aquecido até à temperatura de trabalho numa serpentina com 6 metros de comprimento (9), entrando de seguida na célula de extração (10). Esta consiste num vaso de aço inoxidável ASI 316, com um volume interno de 5 cm^3 , no qual se coloca a biomassa (cerca de 1,2 g) liofilizada e moída no moinho de bolas. Perfez-se o leito com esferas de vidro (aproximadamente 5 g) com cerca de 0,3 mm de diâmetro, de forma a evitar a sua colmatção (formação de um bolo). Em cada extremidade do interior da célula colocou-se algodão, de forma a impedir arraste de biomassa pelo fluido. O extrator foi apertado (7,5 m.kg), evitando qualquer fuga de fluido.

A serpentina e a célula extratora encontram-se imersas num banho de água (16), termostaticado (controladores Special 240V da Grant e ED 230V da Julabo), sendo a sua temperatura medida com uma sonda de resistência de platina (modelo PRA 6035 da Comark Electronics). A temperatura é indicada no leitor digital (Comark Electronics, modelo 6800) com um rigor de $\pm 0,05$ K.

O fluido sai da célula de extração e é expandido para uma pressão perto da atmosférica, originando a precipitação dos compostos extraídos. A expansão é feita por meio de uma válvula de três vias (12) (modelo 60-15 HF4, High pressure equipment). Esta válvula está à temperatura do banho de água, sendo aquecida por um fio de aquecimento ligado a um reóstato (Selecta, 300W). Os compostos ficam retidos na válvula de três vias, no algodão previamente inserido num tubo em U (13), imerso em gelo, e na tubagem que se encontra entre eles. Para recuperá-los na sua totalidade são feitas diversas lavagens com um solvente apropriado (hexano).

Após expansão para o tubo em U, o dióxido de carbono passa por um rotâmetro (14) (Cole Parmer, modelo Masterflex), que permite controlar o caudal de gás. O volume de gás utilizado em cada extração é medido num contador de gás húmido (15) (modelo 802, American Meter Company). Neste contador, uma volta completa do ponteiro corresponde a 1 L de gás e a sua menor divisão é 0,01 L, correspondendo a uma incerteza de $\pm 0,005$ L. O volume medido tem de ser corrigido para as condições normais de pressão e temperatura, através das equações presentes no Apêndice B. Para esse cálculo foi necessário a medição da temperatura ambiente e pressão atmosférica, através de um barómetro (F. Darton, modelo U242). O contador mencionado mede também a temperatura do gás, na gama de 273,15 a 323,15 K.

Técnica experimental

Após a preparação da célula extratora e a sua colocação no local devido, enche-se o banho de água. De seguida ligam-se os controladores do mesmo para iniciar o aquecimento.

Uma vez que o dióxido de carbono é solúvel em água, previamente a cada ensaio de ESC, procede-se à saturação do contador de gás húmido durante 45 minutos, fazendo passar fluido pelas válvulas devidas: 17 e 26. Após este procedimento, o nível de água no contador é ajustado.

Após o banho de água atingir a temperatura de trabalho, coloca-se todo o sistema à pressão de vapor do dióxido de carbono, abrindo as válvulas 22 a 25 e pode iniciar-se o ensaio.

Com toda a tubagem devidamente arrefecida na zona de compressão, de forma a garantir a liquefação do dióxido de carbono, inicia-se o trabalho, ligando a bomba e regulando o seu caudal para cerca de 40% do valor máximo. Quando todo o sistema atinge a pressão de trabalho definida, abre-se a válvula de três vias, estabelecendo-se o caudal de dióxido de carbono (aproximadamente 0,12 g/min) e inicia-se a extração.

São recolhidos 4 extratos ao longo do tempo de extração. O primeiro, o segundo e o terceiro extratos são recolhidos sequencialmente, após 30 minutos de extração. O quarto extrato é recolhido após 3 horas de extração, ou seja, 1,5 h após a recolha do terceiro extrato.

Para a recolha de cada extrato, fecha-se a válvula de três vias e a válvula que sucede a célula de extração (21) e desliga-se a bomba, parando momentaneamente a extração. O tubo em U é substituído e a válvula de 3 vias e tubagem adjacente é lavada com o solvente apropriado (hexano). Após estes procedimentos, recomeça-se a extração, ligando a bomba e reiniciando novamente a circulação de dióxido de carbono pelo sistema, prosseguindo com o ensaio para a obtenção do extrato seguinte.

Os quatro tubos em U e correspondente algodão de enchimento, utilizados para a recolha de cada extrato, são lavados com o solvente apropriado (hexano), de forma a recuperar os lípidos precipitados. Esta solução é adicionada à solução de lavagem da válvula de três vias, correspondente a cada extrato. Cada um é filtrado a vácuo com um filtro de 0,2 μm e concentrado no evaporador rotativo a vácuo mencionado anteriormente. Após a concentração, o extrato, sob atmosfera inerte (em azoto) e tapado da luz, é colocado na estufa a 30 °C, durante 1 hora, de forma a permitir uma melhor secagem do hexano. De seguida, os extratos são colocados no exsiccador, para total secagem e pesagem rigorosa.

Tal como nos métodos de Soxhlet e ASE, a percentagem de lípidos de cada extrato foi determinada pela equação 2.13 e procedeu-se a análise do perfil de ácidos gordos, como descrito em 2.2.10.

2.4 Pigmentos da *Cryptocodinium cohnii*

Para quantificar os pigmentos presentes em cada extrato lipídico recolhido, recorreu-se à espectrofotometria UV/Visível, após a sua filtração a vácuo e medição de volume. Traçou-se o espectro entre 380 e 700 nm e utilizou-se a lei de Lamber-Beer para determinar a concentração no extrato e, consequentemente, a massa de pigmentos - equação 2.18. A corresponde à absorvância da solução ao comprimento de onda do máximo de absorção do composto (neste caso 454-457 nm), l ao percurso óptico, ε à absortividade do composto e C à sua concentração na solução.

$$A = \varepsilon \times C \times l \quad (2.18)$$

O valor utilizado para a absortividade foi de 259,2 L/(g.cm) em hexano e 262,0 L/(g.cm) em etanol e acetona, correspondendo às absortividades do β -caroteno ao comprimento de onda máximo de absorção [73]. Apesar de o extrato conter uma mistura de carotenóides, considerou-se que este era o único pigmento para facilitar os cálculos, por ser o mais abundante. Desta forma, os resultados são em equivalentes de β -caroteno.

2.5 Avaliação da fração para produção de biodiesel

Como foi mencionado anteriormente, o biodiesel para ser comercializado na união europeia tem de apresentar características físicas dentro de certas gamas de valores.

Assim, o óleo da microalga foi caracterizado em termos de vários índices de avaliação para biodiesel. Para tal, procedeu-se à separação da fração monoinsaturada e saturada da poli-insaturada e depois calcularam-se alguns parâmetros através do perfil de ácidos gordos obtido da fração para biodiesel.

A separação das frações foi feita através da complexação com ureia [74]. O primeiro passo consistiu na transesterificação com etanol (mesmo procedimento que na secção 2.2.11 mas utilizando etanol em vez de metanol), de forma a extrair os ácidos gordos da biomassa. De seguida adicionaram-se 5 mL de solução de etanol e ureia (1,3 g de ureia por cada 50 mL de etanol) por cada 150 µL de óleo obtido.

A mistura de óleo e solução de etanol e ureia foi agitada e aquecida até ficar transparente, ficando no congelador (-18 °C) durante a noite. Separou-se a fração cristalizada (complexos de ureia), que correspondem aos ácidos gordos para biodiesel, da não cristalizada (ácidos poli-insaturados) através de filtração a vácuo. De seguida foram adicionados a cada fração hexano e água destilada, de forma a separar a fração lipídica da não lipídica. As frações lipídicas são recolhidas para 2 balões previamente tarados e o perfil de ácidos gordos é analisado por cromatografia gasosa.

Através do cálculo da insaturação média - AU (*average unsaturation*) - foram estimados os parâmetros viscosidade, gravidade específica, número de cetano e índice de iodo, recorrendo às equações 2.20, 2.21, 2.22 e 2.23, anteriormente determinadas e presentes na literatura [75]. A insaturação média - equação 2.19 - baseia-se no perfil de ácidos gordos, sendo N o número de ligações duplas do ácido gordo insaturado e C_i a sua concentração nos ácidos gordos totais, em fração mássica.

$$AU = \sum N \times C_i \quad (2.19)$$

$$Viscosidade = -0,6316AU + 5,2065 \quad (2.20)$$

$$Densidade\ relativa = 0,0055AU + 0,8726 \quad (2.21)$$

$$Numero\ de\ cetano = -6,6684AU + 62,876 \quad (2.22)$$

$$Indice\ de\ iodo = 74,373AU + 12,71 \quad (2.23)$$

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Fermentações da *Cryptocodinium cohnii*

Foram realizadas três fermentações de acordo com os métodos descritos anteriormente, estudando três diferentes fontes de carbono: glicose, melão de cana e glicerol bruto. A microalga foi cultivada num biorreator de 7 L, com um volume útil de 3 L, em regime fed-batch e sob o controlo constante da temperatura, pH e oxigénio dissolvido. Analisou-se o crescimento da biomassa e a produção de lípidos e ácidos gordos.

3.1.1 Ensaio I

No ensaio I foi utilizada como fonte de carbono glicose, sob as condições descritas anteriormente na secção de Materiais e métodos.

O crescimento celular foi controlado em tempo real recorrendo ao espectrofotómetro e ao citómetro. A evolução da absorvância lida pelo primeiro e a contagem de células detetada pelo segundo ao longo do tempo está representada na figura 3.1. Os traços verticais correspondem aos pulsos adicionados ao longo da fermentação e a sua composição, consistindo em soluções concentradas (10x) do meio de cultura ou de apenas alguns constituintes. GLI corresponde a glicose, YE a extrato de levedura e CSL a extrato de milho.

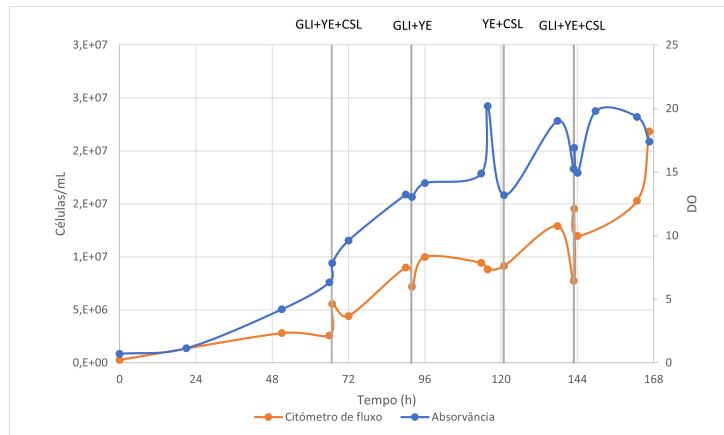


Figura 3.1: Contagem de células obtida no citômetro de fluxo e absorvância corrigida lida no espectrofotômetro no ensaio I.

A absorvância e a contagem de células foram convertidas em concentração de biomassa, através das respectivas correlações (presentes em 2.2.4 e 2.2.5). A evolução do peso seco ao longo da fermentação encontra-se na figura 3.2.

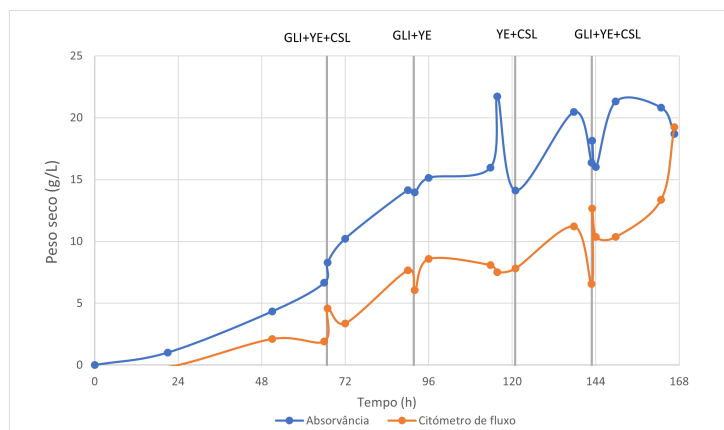


Figura 3.2: Peso seco obtido para a absorvância e para o citômetro de fluxo no ensaio I.

A contagem de células ao longo da fermentação pelo citômetro de fluxo serviu como método adicional para acompanhar o seu crescimento relativo. Para calcular o peso seco não foi eficiente, possivelmente por a correlação utilizada ter sido calculada em ensaios anteriores e não ser adequada para esta biomassa. Assim, utilizar-se-á apenas os valores de peso seco obtidos a partir da correlação peso seco versus absorvância.

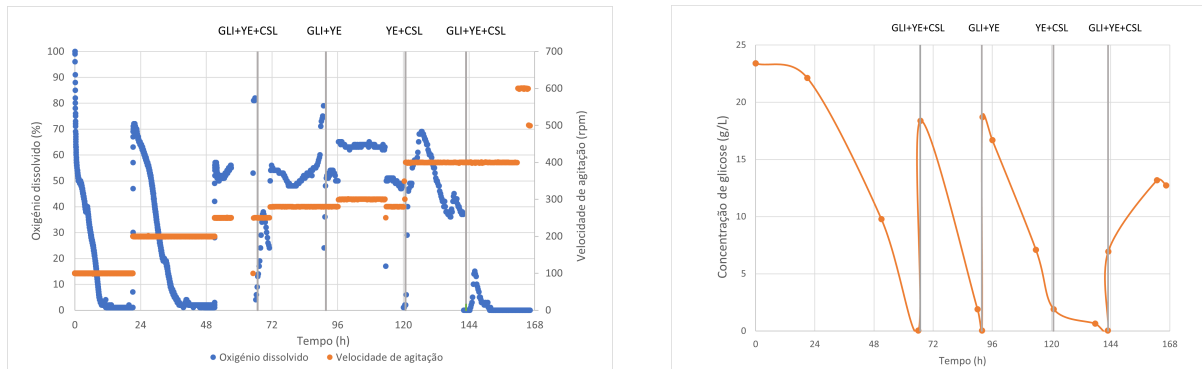
Ao observar-se a figura 3.2, é possível verificar que, após a inoculação, a cultura mostra um crescimento exponencial. Passadas 66 horas, atinge-se uma concentração de biomassa de 6,65 g/L, segundo a correlação obtida para a densidade óptica, correspondendo a uma taxa específica de crescimento de $0,035 \text{ h}^{-1}$.

Nesse instante, verificou-se pelas tiras de glicose (mencionadas em 2.2.7), que a concentração desta era muito reduzida ou nula, e, pelos dados fornecidos pelo sistema computacional, que a % de oxigênio dissolvido estava a subir (gráfico a) da figura 3.3), ou seja, as células não estavam a crescer.

De forma a evitar que as células utilizassem como substrato os lípidos das suas reservas e a pro-

longar o seu crescimento, decidiu-se adicionar um pulso, iniciando-se um regime fed-batch. O pulso continha glicose, extrato de milho e extrato de levedura, de forma a assegurar condições de excesso de nutrientes às células.

De facto, no gráfico b) da figura 3.3 (obtido posteriormente à fermentação, através de análise por HPLC) é possível comprovar que, ao longo deste período de tempo, a concentração de glicose no meio decresceu rapidamente até atingir o valor de 0.



(a) Percentagem de oxigénio dissolvido e velocidade de agitação.

(b) Concentração de glicose no meio.

Figura 3.3: Gráficos relativos a condições do meio, ao longo do ensaio I.

Uma vez adicionado o 1º pulso, verificou-se que a % de oxigénio dissolvido desceu abruptamente. Assim, para aumentar a sua disponibilidade, subiu-se a agitação.

No instante $t = 91,8$ horas verificou-se novamente que a concentração de glicose era reduzida, adicionou-se um segundo pulso, apenas constituído por glicose e extrato de levedura. A partir desta adição, a densidade óptica apresentou aumentos ligeiros, indicando que as células não estavam a multiplicar-se mas a produzir lípidos. Este resultado era expectável, uma vez que as células atingiram a fase estacionária do seu crescimento, passando a utilizar o carbono em excesso para armazenar material lipídico como mecanismo de sobrevivência.

No instante $t = 120$ horas a densidade óptica diminuiu, no entanto, verificou-se que o meio ainda continha glicose e que o oxigénio dissolvido estava a diminuir. Ou seja, as células estavam ativas metabolicamente mas não estavam a crescer, servindo de fonte de outros nutrientes. Assim, adicionou-se um pulso constituído por extrato de levedura e extrato de milho (fontes de azoto, vitaminas e minerais). De facto, observando a figura 3.4, a concentração de azoto no meio neste instante era de 0,03 g/L, ou seja, praticamente nula. Aumentou-se novamente a agitação de forma a elevar a disponibilidade de oxigénio.

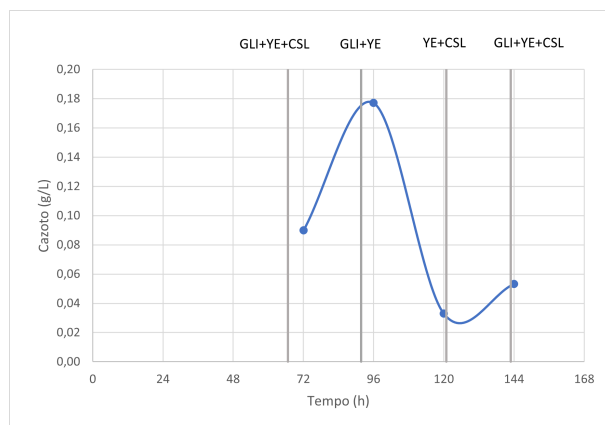


Figura 3.4: Concentração de azoto no meio ao longo do ensaio I.

No instante $t = 142$ horas verificou-se a inexistência de glicose no meio e uma diminuição da densidade óptica. Desta forma, decidiu-se adicionar um pulso completo, garantindo todos os nutrientes necessários. A figura 3.4 confirma que as células também careciam de fonte de azoto, tendo apenas disponível no meio 0,05 g/L.

No instante $t = 166,6$ horas decidiu-se terminar a fermentação, dado que a densidade óptica começou a diminuir e o meio continha carbono - 12,7 g/L. Atingiu-se uma concentração final de biomassa de 18,7 g/L.

A percentagem de lípidos totais na biomassa final, obtida por Soxhlet, foi de 16,8% (m/m). Este corresponde ao valor corrigido sem humidade e cinzas, que foram de 7,7 e 6,8 %, respetivamente.

Observando o gráfico da figura 3.5, verifica-se que a concentração de ácidos gordos diminuiu no final da fermentação, atingindo o valor de 13,5%. Na amostra anterior analisada, correspondente ao instante $t = 144$ horas, a concentração de ácidos gordos era de 16,5%, possivelmente devido às condições de limitação em oxigénio que existiram no final da fermentação (é possível observar no gráfico a) da figura 3.3 que a % de oxigénio dissolvido era zero). Contudo, uma vez que esta microalga é sensível à tensão de corte, não foi possível aumentar a taxa de agitação [76]. Teria então sido mais vantajoso terminar a fermentação poucas horas após a inoculação do último pulso, quando o peso seco atingiu o máximo de 21,3 g/L e a concentração de ácidos gordos era superior, mas não tendo a informação em tempo real da produção de lípidos, não foi tomada essa decisão.

Safar *et al.* (2017) realizaram um estudo de produção da microalga *C. cohnii* num biorreator de 3 L, com glicose como fonte de carbono, tendo atingido uma concentração máxima de biomassa de 23,7 g/L, um valor ligeiramente superior ao atingido neste ensaio [9].

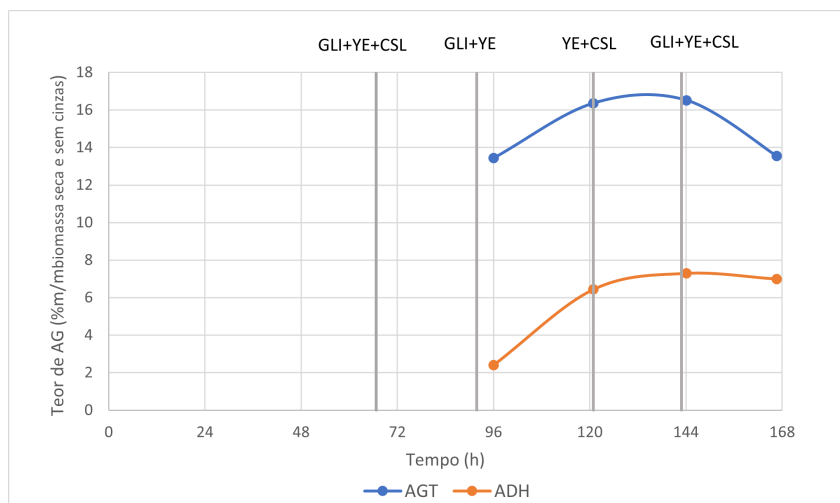


Figura 3.5: Teor de ácidos gordos e ADH na biomassa (seca e sem cinzas) ao longo do tempo no ensaio I (%m/m).

Relativamente à evolução do teor de ADH na biomassa, foi aumentando durante a fermentação, como era esperado. Ao longo do seu crescimento, as microalgas têm a tendência para diminuir a concentração dos ácidos gordos saturados de cadeia mais curta, sintetizando ácidos gordos poli-insaturados, como o ADH, a partir destes [77]. Apesar de no final da fermentação o teor de ADH na biomassa seca ter estabilizado em 7%, a percentagem deste nos AGT era de 51,6 %, decrescendo significativamente a concentração dos ácidos láurico, mirístico e palmítico.

Jiang *et al.* reportou no seu estudo de fermentação da *C. cohnii*, utilizando glicose como fonte de carbono, uma concentração de 7,8% de ADH (m/m), um valor próximo do obtido neste ensaio [6].

A tabela 3.1 mostra a evolução do perfil de ácidos gordos neste ensaio I.

Tabela 3.1: Composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtido para a *C. cohnii* no ensaio I.

Tempo (h)	96,00	120,92	144,08	166,58
Cáprico - 10:0	0,91±0,08	0,79±0,00	0,53±0,02	0,89±0,05
Láurico - 12:0	7,21±0,37	6,95±0,02	4,56±0,03	3,55±0,16
Mirístico - 14:0	21,79±0,25	20,95±0,05	18,56±0,10	13,57±0,51
Miristoleico - 14:1	0,56±0,00	0,00±0,12	0,00±0,00	0,00±0,00
Palmítico - 16:0	19,31±0,28	17,88±0,00	17,50±0,07	17,59±0,45
Palmitoleico - 16:1w9	1,98±0,01	2,28±0,00	2,13±0,01	1,40±0,01
Estearico - 18:0	0,44±0,01	0,34±0,00	0,41±0,02	0,57±0,05
Oléico - 18:1w9	11,00±0,25	10,97±0,01	11,67±0,02	10,32±0,32
Linoléico - 18:2w6	0,07±0,01	0,06±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
ADH - 22:6w3	36,46±0,15	39,39±0,11	44,13±0,22	51,60±0,10
Outros	0,29	0,39	0,52	0,50
Saturados	49,65	46,91	41,56	36,17
Poli-insaturados	36,53	39,45	44,13	51,60
Monoinsaturados	13,82	13,64	14,31	12,23

Como mencionado nos materiais e métodos, a citometria de fluxo foi utilizada para monitorizar a viabilidade celular, recorrendo aos corantes CFDA e PI, que analisam a atividade enzimática e a integridade da membrana, respetivamente. A figura 3.6 mostra a evolução das 4 subpopulações de células existentes ao longo da fermentação.

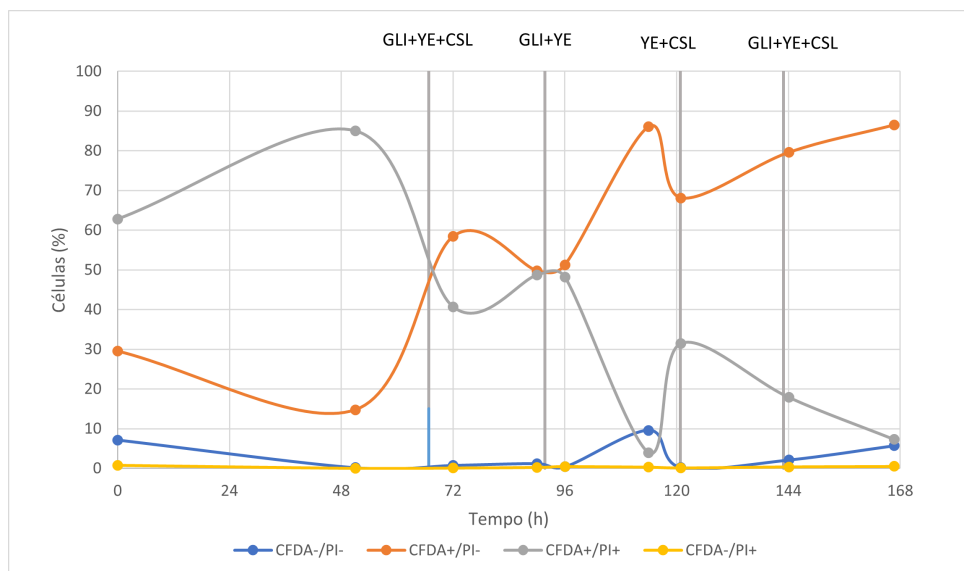


Figura 3.6: Percentagem de células em cada subpopulação ao longo do ensaio I, como descrito na introdução - citometria de fluxo.

A linha azul representa a evolução da subpopulação de células com a membrana intacta mas sem atividade enzimática, sendo possível observar que foi sempre bastante reduzida. A linha amarela corresponde à subpopulação com a membrana permeabilizada e sem atividade enzimática, tendo sido inexistente durante toda a fermentação. A linha laranja representa a evolução da subpopulação de células com atividade enzimática e com a membrana intacta, não se iniciando como a população dominante mas aumentando progressivamente ao longo do ensaio, atingindo o valor de 86,5%, o que é bastante satisfatório. Por fim, a subpopulação com atividade enzimática mas membrana permeabilizada - linha cinzenta - foi decrescendo ao longo da fermentação, terminando com apenas 7,3% das células.

É possível concluir que as células não estiveram expostas a condições adversas que prejudicassem a sua atividade enzimática e a sua integridade celular.

3.1.2 Ensaio II

No segundo ensaio realizado utilizou-se como fonte de carbono melão de cana previamente hidrolisado, sob as condições descritas em materiais e métodos. A evolução da densidade óptica lida no espectrofotómetro e da contagem de células medida pelo citómetro de fluxo está presente na figura 3.7. Os traços verticais correspondem aos pulsos adicionados ao longo da fermentação, consistindo em soluções concentradas do meio de cultura.

Neste ensaio não houve registo dos dados relativos à percentagem de oxigénio dissolvido e a velocidade agitação, pelo que não está presente o gráfico com a sua evolução.

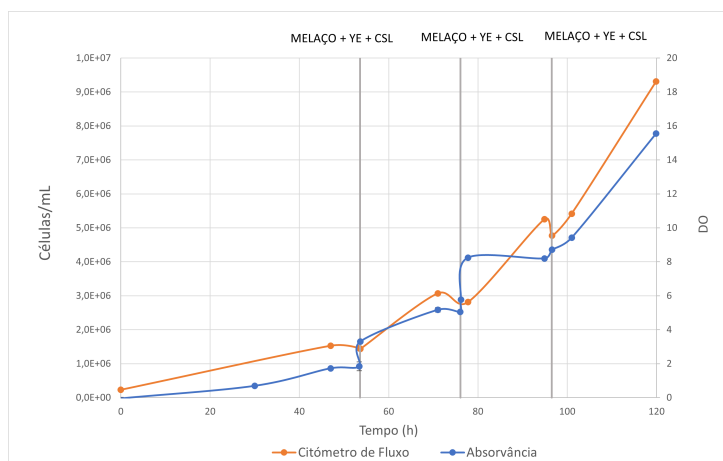


Figura 3.7: Contagem de células obtida no citómetro de fluxo e absorvância corrigida lida no espectrofotómetro no ensaio II.

Os gráficos acima foram convertidos em peso seco da biomassa, ao longo do tempo, através das respetivas correlações, estando representados na figura 3.8.

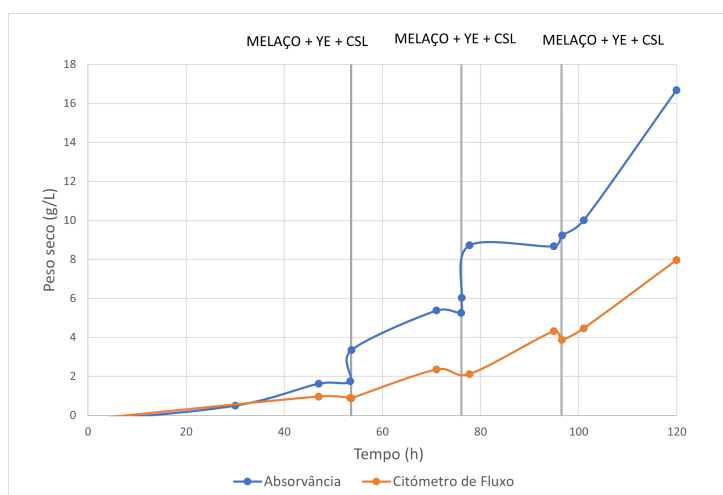


Figura 3.8: Peso seco obtido para a absorvância e para o citómetro de fluxo no ensaio II.

Tal como no ensaio I, a contagem de células obtida pelo citómetro foi utilizada apenas para acompanhar o crescimento relativo da biomassa. Desta forma, apenas se utilizará os valores de peso seco obtidos para a densidade óptica.

Observando a figura 3.8, verifica-se que a cultura apresentou um crescimento lento até ao instante $t = 47$ horas, estabilizando até ao instante $t = 53,42$ horas, onde a concentração de biomassa era de apenas 1,75 g/L. Dessa forma, decidiu-se adicionar o primeiro pulso.

De facto, observando o gráfico da figura 3.9, conclui-se que a concentração de glicose era muito baixa desde o início da fermentação (de apenas 3,38 g/L, quando se pretendia cerca de 20 g/L), tendo sido consumida na sua totalidade. O gráfico permite concluir que a hidrólise da sacarose em glicose e frutose não foi completa, originando uma concentração de glicose bastante reduzida e comprometendo o crescimento da biomassa e a acumulação de lípidos. Apesar de haver estudos que reportam o crescimento da *C. cohnii* na presença de sacarose, a estirpe ATCC 30772 não o consome.

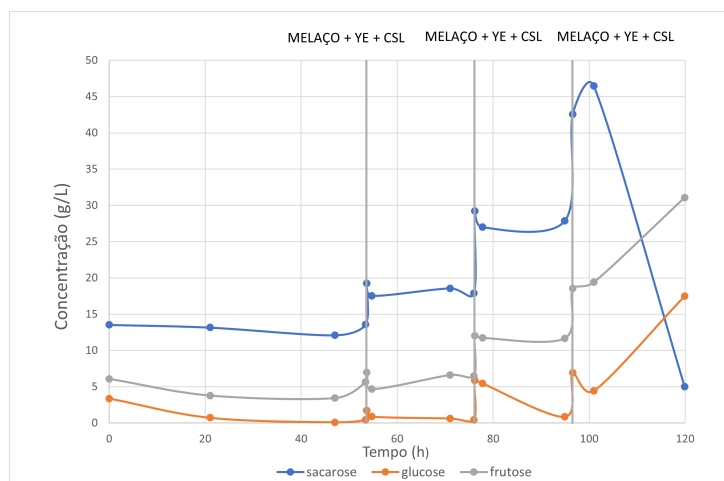


Figura 3.9: Concentração de glicose, frutose e sacarose no meio, ao longo do ensaio II.

Após a adição do 1º pulso, verificou-se que o crescimento da biomassa permanecia bastante reduzido. Do instante $t = 71$ h ao $t = 76$ h o peso seco manteve-se constante, dado que a concentração de glicose no meio era nula. Desta forma, adicionou-se um segundo pulso, novamente com todos os nutrientes. Observou-se um elevado crescimento celular, passando de uma concentração de biomassa de 5,25 g/L para 8,73 g/L, do instante $t = 76$ h até ao $t = 77,75$ h. Passadas 94,92 horas de fermentação observou-se novamente uma diminuição na concentração de biomassa, adicionando-se um terceiro pulso.

É de notar que na figura 3.9 se observa um aumento da concentração de glicose e frutose do penúltimo para o último ponto, quando a adição do último pulso foi antes de ambos. Por vezes, quando a amostra é colhida logo após a adição do pulso, a cultura não está completamente homogénea, e as concentrações de fontes de carbono na amostragem seguinte são superiores. As elevadas concentrações de glicose e frutose neste último ponto revelam que a hidrólise do melado utilizado no último pulso foi muito mais eficiente que a dos dois primeiros e que a do melado do meio de cultura inicial.

Passadas 119 horas de fermentação, observou-se a amostra retirada do biorreator no microscópio e detetou-se a presença de uma contaminação de leveduras. Uma vez que estas consomem todas as fontes de carbono presentes no meio e apresentam uma taxa específica de crescimento muito superior à da *C. cohnii*, não se tornou possível continuar a fermentação. O valor de peso seco obtido de 16,83

g/L é então de biomassa de microalga e de levedura, podendo ser observada uma fotografia do seu aspeto no Apêndice D.

Ao longo da fermentação retiraram-se duas amostras para análise de concentração de azoto residual e concentração de ácidos gordos e ADH na biomassa microalgal, para além da amostra final. Os gráficos das figuras 3.10 e 3.11 mostram essa evolução, respetivamente.

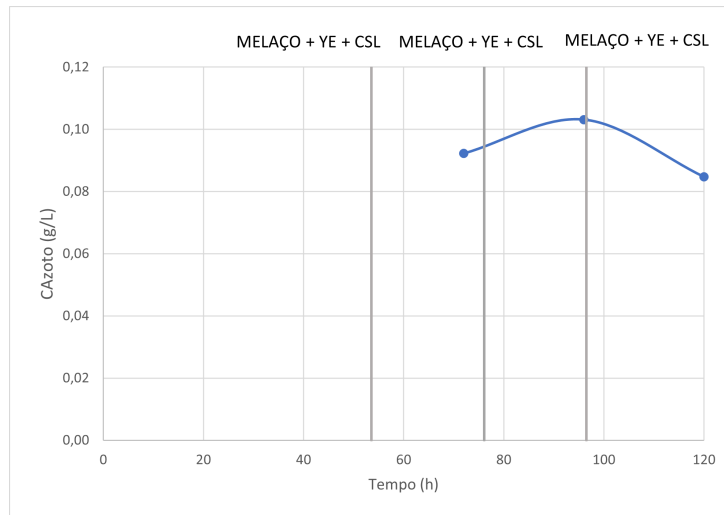


Figura 3.10: Concentração de azoto no meio ao longo do ensaio II.

Observando o gráfico da figura 3.10, conclui-se que a concentração de azoto no meio de cultura era reduzida nos três pontos analisados, pelo que, para além da escassez de glicose, também comprometeu o crescimento da biomassa.

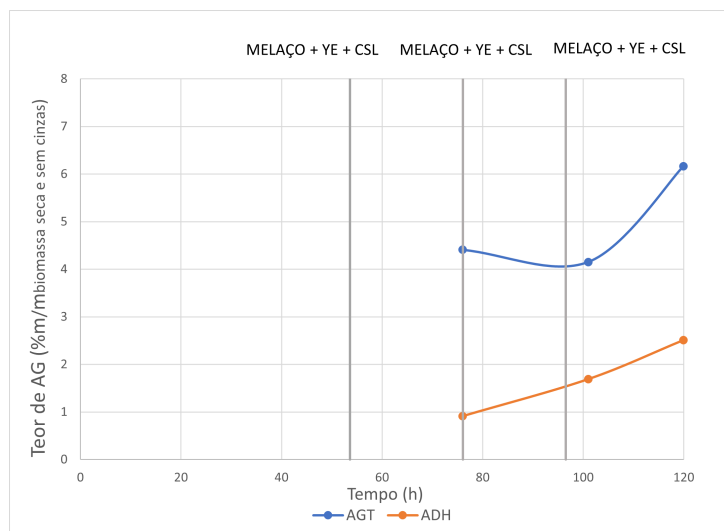


Figura 3.11: Teor de ácidos gordos e ADH na biomassa (seca e sem cinzas) ao longo do tempo no ensaio II (% m/m).

Através da análise da figura 3.11, verifica-se que o teor de ácidos gordos totais e ADH na biomassa final foi de 6,2 e 2,5% (m/m), respetivamente, sendo valores bastante reduzidos. De facto, no estudo reportado por Taborda [39], utilizando melaço como fonte de carbono, obteve-se um teor máximo de AGT e ADH na biomassa de 17,1 e 9,4%, respetivamente. Contudo, neste estudo o ensaio foi realizado

num *Erlenmeyer* de 500 mL, em vez de num biorreator operado em regime fed-batch.

Determinou-se também o teor de lípidos totais presentes na biomassa final (seca e sem cinzas), através do método de Soxhlet com hexano, tendo-se obtido apenas 7,5% (m/m).

O facto de a hidrólise do melão não ter sido eficaz e, conseqüentemente, a concentração de glicose não ter sido a pretendida, impossibilitou o crescimento exponencial da biomassa e a sua posterior acumulação de lípidos. Para além disso, o aparecimento da contaminação de leveduras obrigou a que a fermentação terminasse ao fim de 119 horas, sendo que a duração média é de pelo menos 160 horas.

Analisou-se a evolução do perfil de ácidos gordos das três amostras, estando presente na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtido para a *c. cohnii* no ensaio II.

Tempo (h)	76,00	101,00	119,92
Cáprico - 10:0	3,99±0,12	5,00±1,83	3,67±0,13
Láurico - 12:0	5,66±0,15	3,92±0,90	6,99±0,09
Mirístico - 14:0	14,77±0,16	12,93±0,39	13,28±0,18
Miristoleico - 14:1	0,10±0,01	0,05±0,06	0,08±0,00
Palmitico - 16:0	20,83±0,41	22,79±0,01	21,82±0,06
Palmitoleico - 16:1w9	0,16±0,22	0,00±0,00	0,00±0,00
Esteárico - 18:0	1,52±0,05	1,48±0,07	1,54±0,02
Oléico - 18:1w9	7,98±0,24	8,61±0,24	8,83±0,02
Linoléico - 18:2w6	3,42±0,08	3,83±0,25	2,68±0,05
ADH - 22:6w3	41,01±0,77	40,64±0,17	40,73±0,05
Outros	0,56	0,75	0,38
Saturados	46,77	46,12	47,30
Poli-insaturados	44,43	44,47	43,41
Monoinsaturados	8,80	9,41	9,29

Pela observação da tabela conclui-se que a percentagem de ADH nos AGT não aumenta ao longo do tempo, como se costuma observar. Na verdade, o perfil de ácidos gordos não se alterou de forma significativa durante a fermentação, possivelmente porque esteve quase sempre em carência de glicose, não se podendo desenvolver da forma habitual. A microalga começa a sintetizar ácidos gordos poli-insaturados (essencialmente ADH) a partir dos saturados e monoinsaturados quando passa da fase exponencial para a estacionária, não se tendo observado a ocorrência dessas fases neste ensaio.

A viabilidade celular foi analisada recorrendo ao citómetro de fluxo e aos corantes CFDA e PI. A evolução das 4 subpopulações de células ao longo deste ensaio encontra-se representada na figura 3.12.

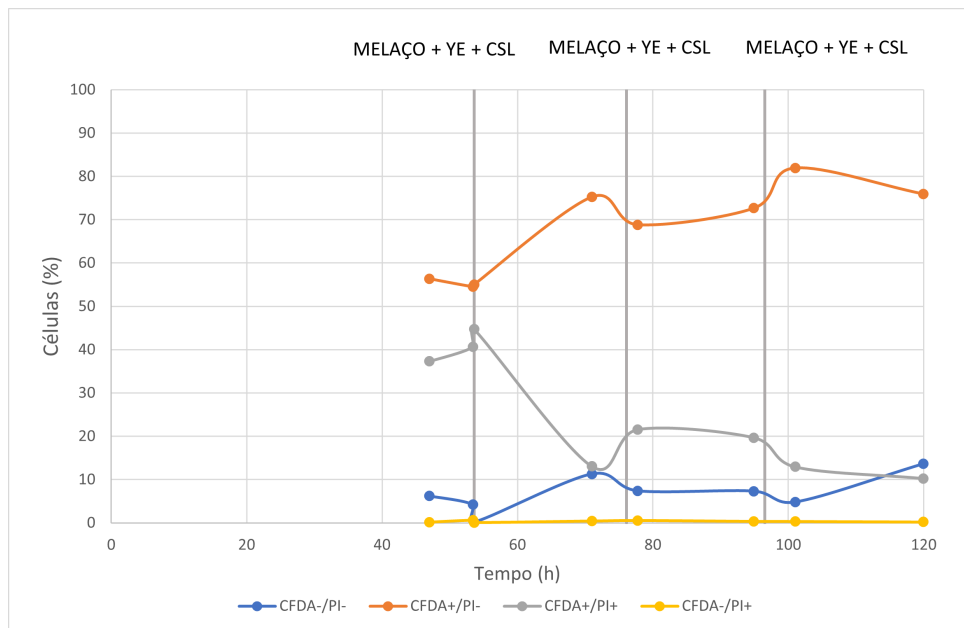


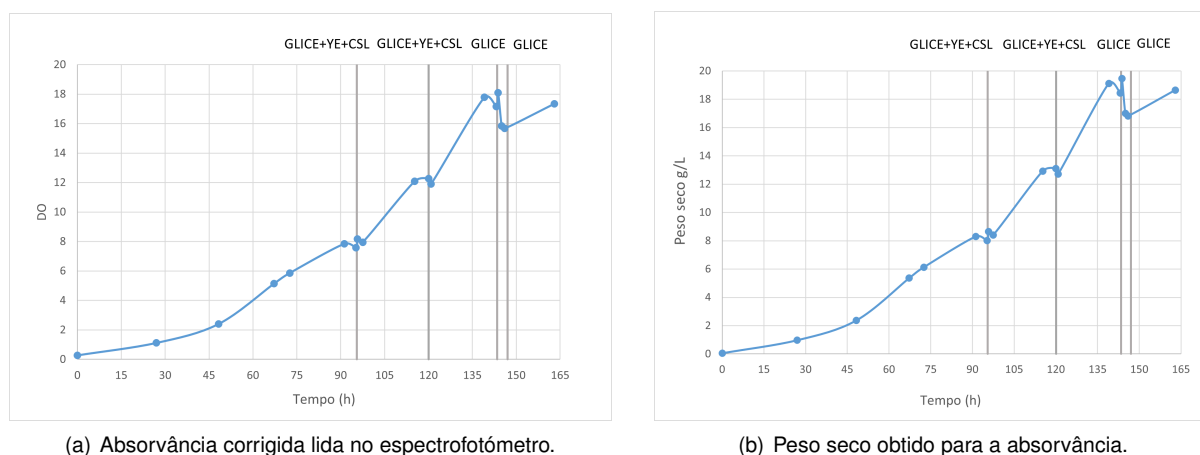
Figura 3.12: Percentagem de células em cada subpopulação ao longo do ensaio II, como descrito na introdução - citometria de fluxo.

As linhas azul e amarela mostram que a percentagem de células sem atividade enzimática (CFDA negativo) foi bastante reduzida ao longo de toda a fermentação, tendo todas elas a membrana intacta. A subpopulação representada pela linha laranja - com atividade enzimática e membrana intacta - foi a predominante em todo o ensaio, crescendo de cerca de 58 para 76%. Por fim, relativamente às células com atividade enzimática mas membrana permeabilizada, apresentavam uma percentagem considerável no início da fermentação (38%), no entanto, a mesma foi decrescendo, terminando com apenas 10%.

Assim, pode concluir-se que não houve condições adversas que tivessem prejudicado o metabolismo das células.

3.1.3 Ensaio III

No último ensaio realizado utilizou-se glicerol bruto desligado como fonte de carbono. Neste, apenas se recorreu ao citômetro de fluxo para análise da viabilidade celular, uma vez que não se obtiveram resultados fidedignos para a contagem de células. Os gráficos da evolução da absorvância e do peso seco obtido a partir da mesma encontram-se na figura 3.13. Os traços verticais representam os pulsos adicionados e a sua respetiva composição, sendo que GLICE corresponde a glicerol, YE (*Yeast extract*) a extrato de levedura e CSL (*Corn steep liquor*) a extrato de milho.



(a) Absorvância corrigida lida no espectrofotómetro.

(b) Peso seco obtido para a absorvância.

Figura 3.13: Evolução da absorvância e peso seco ao longo do tempo no ensaio III.

Verifica-se que, até às 67,25 horas de fermentação, o crescimento da biomassa foi exponencial, com uma taxa específica de crescimento de $0,043 \text{ h}^{-1}$. Desse instante até às 95,25 horas o crescimento abrandou, atingindo-se uma concentração de peso seco de 8,01 g/L. Com o auxílio do kit de glicerol mencionado em 2.2.7, verificou-se que a concentração de fonte de carbono era muito baixa ou nula. De forma a prolongar o crescimento celular, inoculou-se um pulso com glicerol, extrato de levedura e extrato de milho. O gráfico da figura 3.14, obtido posteriormente por HPLC, permite concluir o esgotamento do glicerol no meio nesse instante.

Quando se verificou abrandamento do crescimento celular, após 120 horas de fermentação, adicionou-se um segundo pulso, novamente com os três constituintes.

No instante $t = 143,17\text{h}$ observou-se uma baixa concentração de glicerol no meio, podendo ser confirmado pela figura 3.14. Dessa forma, um terceiro pulso apenas com glicerol foi adicionado. Esta adição teve por objetivo induzir a síntese de lípidos de reserva, uma vez, quando um nutriente que não seja o carbono esgota, as células canalizam-no para a produção de lípidos intracelulares e não para a divisão celular.

Um último pulso de glicerol foi inoculado no instante $t = 147\text{h}$, uma vez que o método de quantificação de glicerol detetou uma concentração baixa do mesmo e observou-se uma pequena diminuição da densidade ótica. No entanto, verifica-se pela figura 3.14, que houve um erro no procedimento, na medida em que nesse instante o glicerol residual era de 18,51 g/L. Como a concentração da fonte de carbono era demasiado elevada (30,87 g/L), a biomassa não cresceu como esperado por inibição pelo substrato, terminando-se a fermentação após 164 horas, com uma concentração de peso seco de 18,65 g/L.

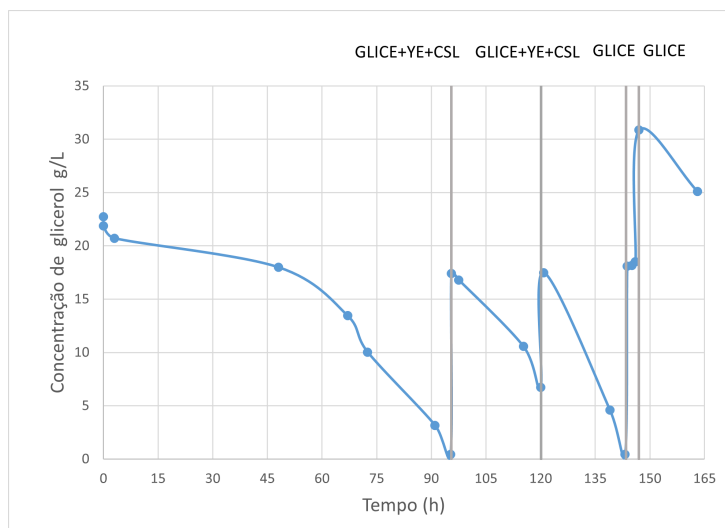


Figura 3.14: Concentração de glicerol no meio ao longo do ensaio III.

A produtividade média em biomassa foi calculada nesse instante, obtendo-se 0,114 g/(L.h). Este resultado foi bastante superior ao reportado no estudo de Daio [78], em que se obteve uma produtividade média de 0,07 g/(L.h), e semelhante ao obtido por Bento [79] - 0,108 g/(L.h), em ambos utilizando glicerol bruto como fonte de carbono.

A produtividade máxima em biomassa foi de 1,27 g/L, no instante $t=95,75h$, ou seja, logo após a inoculação do 1º pulso, confirmando que a *C. cohnii* estava em carência de fonte de carbono.

A concentração máxima de biomassa foi de 19,46 g/L, passadas 143,75 horas, ou seja, após a inoculação do 3º pulso.

A figura 3.15 mostra a evolução da percentagem de oxigénio dissolvido e a velocidade de agitação ao longo do tempo, registada pelo módulo de controlo. Quando se verificou leituras de oxigénio dissolvido abaixo de 30%, aumentou-se a velocidade agitação, tendo esta variado entre 100 e 300 rpm.

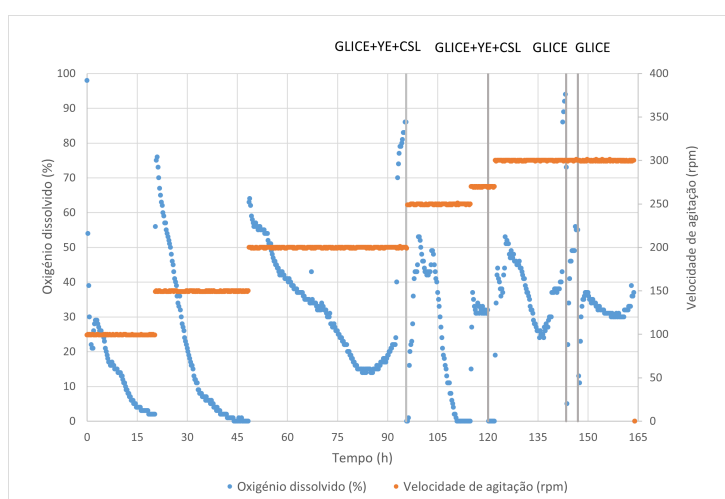


Figura 3.15: Percentagem de oxigénio dissolvido e velocidade de agitação ao longo do ensaio III.

Foram recolhidas 3 amostras durante a fase estacionária, para além da final, para análise da evolução da concentração de ácidos gordos e da sua composição. A partir das 96 horas, a percen-

tagem de ácidos gordos na biomassa variou entre 15,02 e 18,80 e a de ADH entre 5,22 e 7,52, com produtividades médias de 0,02114 e 0,00855 g/(L.h), respetivamente. A evolução da concentração de AGT e ADH na biomassa encontra-se representada na figura 3.16.

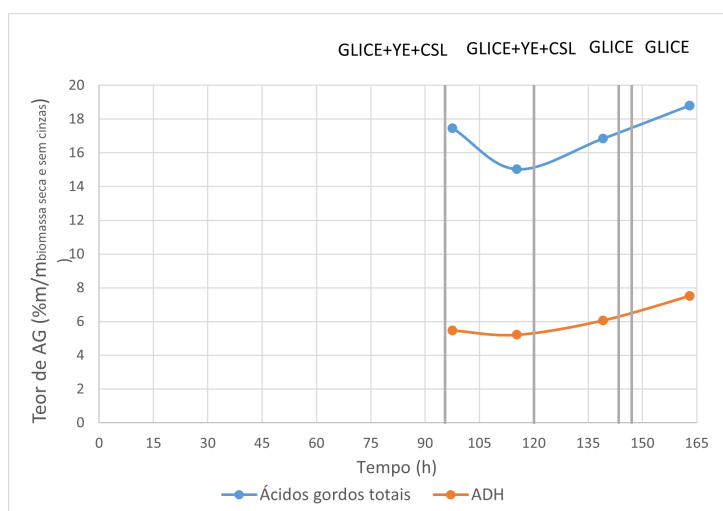


Figura 3.16: Teor de ácidos gordos e de ADH na biomassa (seca e sem cinzas) ao longo do tempo no ensaio III (% m/m).

Apesar de ter havido decréscimo das concentrações de AGT e ADH no instante $t = 115,25$ horas, possivelmente por escassez de oxigénio como se pode observar pela figura 3.15, a *C. cohnii* retornou à acumulação de lípidos após aumento da agitação, tendo-se atingido os valores mais elevados no final da fermentação.

A tabela 3.3 resume os parâmetros cinéticos calculados para este ensaio.

Tabela 3.3: Parâmetros cinéticos calculados para o crescimento da *C. cohnii* no ensaio III, de acordo com as expressões presentes na secção de materiais e métodos.

Parâmetro cinético	Valor	Unidade
Taxa específica de crescimento	0,043	h^{-1}
Concentração máxima de biomassa	19,46	g/L
Produtividade máxima em biomassa	1,27	g/(L.h)
Produtividade média em biomassa	0,114	g/(L.h)
Teor de AGT na biomassa	15,02 - 18,80	$\%m_{AGT}/m_{biomassa}$
Produtividade média em AGT	0,02114	g/(L.h)
Concentração máxima de ADH na biomassa	7,52	$\%m_{ADH}/m_{biomassa}$
Produtividade média em ADH	0,00855	g/(L.h)
Teor de ADH nos AGT	31,45 - 40,02	$\%m_{ADH}/m_{AGT}$

A evolução do perfil de ácidos gordos, desde o instante $t = 97,50$ h até ao final da fermentação está presente na tabela 3.4.

Tabela 3.4: Composição em ácidos gordos, como percentagem do total de ácidos gordos (%m/m AGT), obtido para a *C. cohnii* no ensaio III.

Tempo (h)	97,50	115,25	139,08	164,00
Cáprico - 10:0	1,23±0,23	0,65±0,43	0,87±0,06	0,76±0,03
Láurico - 12:0	10,26±1,03	7,71±0,75	8,54±1,10	6,92±0,12
Mirístico - 14:0	21,38±1,04	19,48±0,04	21,60±1,35	20,42±0,15
Miristoleico - 14:1	1,74±0,18	1,21±0,12	1,30±0,19	1,08±0,01
Palmítico - 16:0	16,26±0,15	17,39±1,77	15,97±0,41	15,29±0,15
Palmitoleico - 16:1w9	4,02±0,10	3,37±0,03	3,15±0,23	2,74±0,02
Esteárico - 18:0	0,64±0,03	0,77±0,28	0,47±0,05	0,51±0,00
Oléico - 18:1w9	11,70±0,52	13,53±2,25	11,35±0,40	11,55±0,11
Linoléico - 18:2w6	0,11±0,28	0,77±0,44	0,33±0,02	0,26±0,01
ADH - 22:6w3	31,45±2,62	34,60±3,63	36,11±1,97	40,02±0,02
Outros	0,55	0,52	0,30	0,44
Saturados	49,77	46,00	47,45	43,90
Poli-insaturados	32,21	35,37	36,44	40,28
Monoinsaturados	18,02	18,63	16,11	15,82

Como é possível observar, a concentração de ADH nos AGT vai aumentando progressivamente na fase estacionária, atingindo o valor final de 40,02%. Por outro lado, a percentagem de ácidos gordos saturados e monoinsaturados vai diminuindo.

Foi mencionado anteriormente que, a partir da fase estacionária, a microalga *C. cohnii* apresenta a tendência de sintetizar ADH a partir dos ácidos gordos saturados e monoinsaturados [77]. Para além disso, um estudo reportou que a falta de alguns nutrientes no meio induz mudanças no perfil de ácidos gordos. Mais especificamente, que a falta de azoto provoca uma diminuição na síntese de ácidos gordos saturados e um aumento de ácidos poli-insaturados, como o ADH [80]. De facto, os dois últimos pulsos inoculados eram constituídos apenas por glicerol, tendo-se omitido o extrato de levedura (fonte de azoto).

É de notar também que, tanto nesta biomassa como na do ensaio I, a percentagem de ácido linoléico (18:2) é praticamente nula. Por outro lado, na do ensaio II era cerca de 3% e no trabalho de Safdar *et al* [9], onde se estudou o impacto de variar a fonte de azoto no perfil de ácidos gordos, foi observada uma percentagem de 10% de ácido linoléico nos AGT utilizando hidrogenocarbonato de amónia (NH_4HCO_3), na fase de acumulação de lípidos.

Relativamente ao ácido docosapentaenóico (22:5 w-3), não esteve presente no perfil de ácidos gordos da microalga em nenhum dos três ensaios, tendo sido observado no perfil obtido por Silva *et al*, com a utilização de polpa de alfarroba como fonte de carbono [11].

Estas observações permitem concluir que o perfil de ácidos gordos da *C. cohnii* pode apresentar diferenças conforme as fontes de carbono e de azoto utilizadas e as suas concentração no meio, bem como a fase de crescimento em que as células se encontram.

Por fim, analisou-se a viabilidade celular através da citometria de fluxo, utilizando os corantes CFDA e PI. A figura 3.17 mostra a evolução da percentagem de células em cada subpopulação, de acordo com o estado da sua membrana e a sua atividade enzimática.

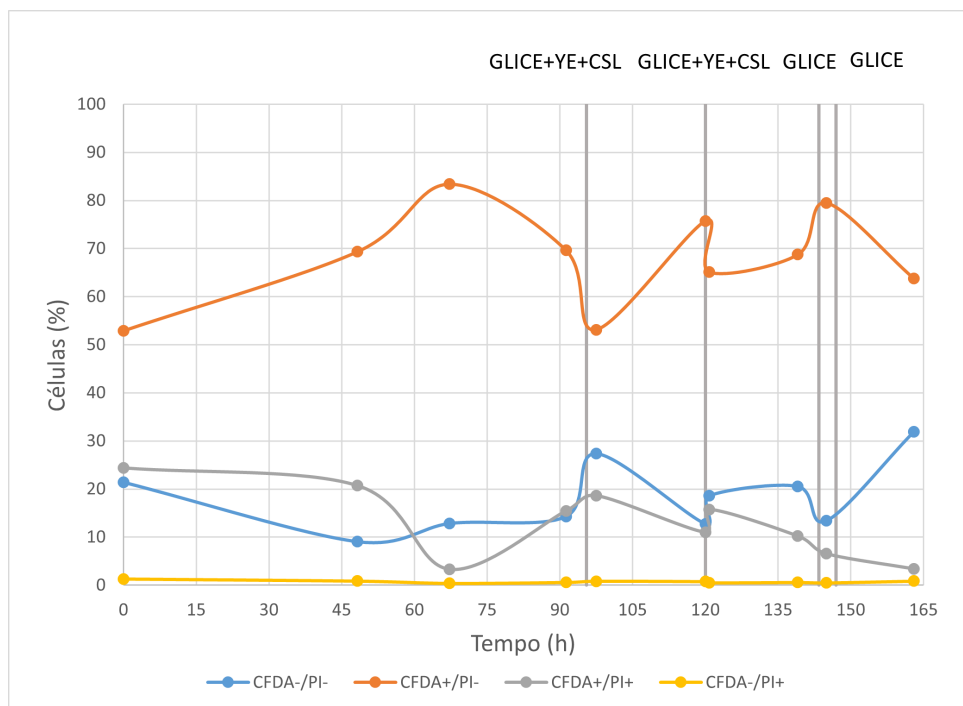


Figura 3.17: Percentagem de células em cada subpopulação ao longo do ensaio III, como descrito na introdução - citometria de fluxo.

Tal como nos ensaios I e II, a percentagem de células com membrana permeabilizada e sem atividade enzimática (curva amarela) foi nula ao longo de toda a fermentação.

A subpopulação com membrana permeabilizada e atividade enzimática (curva cinzenta) iniciou-se como a segunda subpopulação dominante, com cerca de 24,4% das células, tendo decrescido ao longo do tempo, terminando o ensaio com apenas 6,5%.

As células com membrana intacta e actividade enzimática foram sempre a subpopulação dominante, variando entre 52,9 e 83,4%. Após a inoculação do último pulso, a percentagem destas células no meio diminui de 79,5 para 63,8%, tendo aumentado a percentagem de células com membrana intacta mas sem atividade enzimática, atingindo o valor de 31,9%, o mais elevado de toda a fermentação. Estes resultados sugerem que a atividade enzimática das células ficou comprometida pela excessiva concentração de glicerol no meio.

3.2 Extração dos lípidos

Dos três ensaios de cultura da microalga realizadas, verificou-se que o ensaio III foi o que permitiu obter maior quantidade de biomassa, a qual apresentou elevado conteúdo em lípidos e ácidos gordos (superior ao dos outros ensaios), assim como menor teor em humidade e cinzas, após centrifugação e liofilização (1,9 e 5,5%, respetivamente). Por essas razões, esta foi a biomassa utilizada para realizar os estudos de extrações de lípidos, com os vários métodos propostos para esta etapa de processamento *downstreaming* da microalga *C. cohnii*.

3.2.1 Método de extração em Soxhlet

De forma a avaliar os rendimentos dos métodos verdes de extração acelerada com solventes e extração supercrítica, procedeu-se inicialmente à extração de Soxhlet, o método convencional.

Realizaram-se, em duplicado, ensaios com hexano, etanol e acetona, dado que no método ASE se utilizaram estes três solventes. Determinou-se o rendimento em lípidos totais (como descrito em 3.2.1), em ácidos gordos totais (AGT), ADH e ácidos gordos para produção de biodiesel (através da análise dos extratos por cromatografia gasosa, descrito em 2.2.10). A tabela 3.5 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3.5: Resultados obtidos pelo método de extração por Soxhlet com os diferentes solventes utilizados. Os resultados obtidos para o hexano e acetona são a média de 2 ensaios, enquanto que para o etanol são a média de 3 ensaios. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e ácidos gordos para produção de biodiesel apresentam-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.

Solvente	Rendimento em lípidos	Rendimento em AGT	Rendimento em ADH	Rendimento em AG para produção de biodiesel
Hexano	20,61±0,55	18,46±0,96	6,99±0,45	11,35±0,50
Etanol	29,65±0,39	21,88±0,13	8,38±0,01	13,36±0,12
Acetona	26,36±0,41	15,96±0,19	5,96±0,26	9,88±0,05

Pela tabela é possível observar que os desvios padrão dos resultados obtidos são, de modo geral, baixos, concluindo-se que os duplicados estão concordantes. O maior desvio é para o rendimento em AGT obtido na extração com hexano, sendo que, durante a realização do método, poderá ter ocorrido degradação dos ácidos gordos de um dos duplicados, resultando num valor subestimado.

Observa-se também que o rendimento em lípidos é consideravelmente superior para o etanol e acetona. Na verdade, devido à sua polaridade, estes solventes extraem outros compostos não lipídicos (complexos de proteínas e hidratos de carbono), pelo que o extrato obtido com estes solventes não corresponde apenas aos lípidos totais da biomassa e por isso está sobrestimado. Assim sendo, para estes solventes foram apenas considerados os resultados de rendimento de AGT, ADH e ácidos gordos dirigidos para a produção de biodiesel.

O perfil do óleo obtido utilizando hexano como solvente pode ser observado na figura 3.18, concluindo-se que é muito semelhante ao da biomassa, apresentado anteriormente na tabela 3.4.

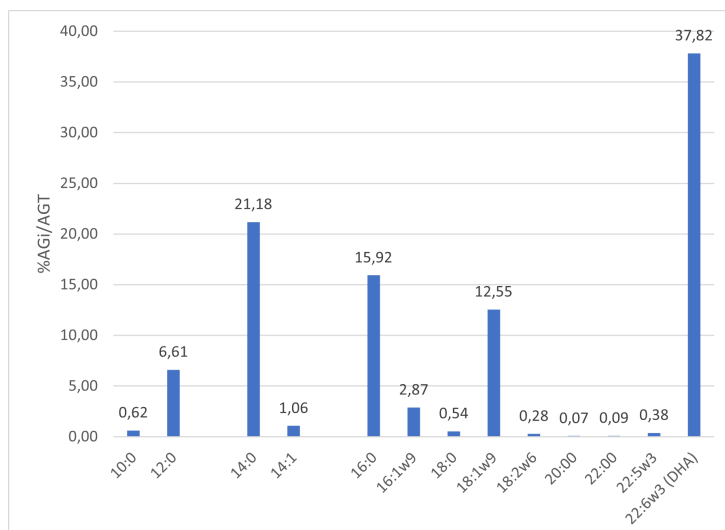


Figura 3.18: Perfil de ácidos gordos do óleo extraído por Soxhlet com hexano.

É de notar também que o rendimento em AGT com hexano é praticamente o valor obtido por transmetilação direta da biomassa (18,8%). Conclui-se que o método de Soxhlet com hexano é eficiente na recuperação deste tipo de lípidos.

Analisando os valores da tabela 3.5, conclui-se que os solventes hexano e etanol são os solventes mais eficientes na extração do ADH e de ácidos gordos para a produção de biodiesel, os compostos de interesse deste estudo. Os resultados obtidos para a acetona demonstram que este solvente extrai uma elevada quantidade de compostos não lipídicos, apresentando uma extração menos eficiente de ácidos gordos.

É também possível observar que o valor obtido para o rendimento em AGT com etanol é superior ao da transmetilação direta da biomassa. Houve, possivelmente, um erro no cálculo da quantidade de óleo utilizada para essa análise, sobrestimando esse resultado.

3.2.2 Extração acelerada com solventes

A extração acelerada com solventes foi o método verde estudado com maior ênfase neste trabalho, tendo-se realizado um planeamento experimental baseado numa superfície de resposta de acordo com a distribuição de Doehlert, de forma a determinar os intervalos de temperatura e tempo de extração que maximizam o rendimento em lípidos, AGT, ADH e ácidos gordos para a produção de biodiesel.

Ensaio preliminares

Inicialmente, realizaram-se ensaios preliminares de forma a decidir os solventes a utilizar e os intervalos das variáveis.

Os primeiros testes consistiram na análise do hexano, acetona e etanol como solventes, na medida em que se iriam realizar apenas 2 matrizes experimentais. Para isso, realizaram-se, em duplicado, ensaios a 120 °C, com 2 ciclos de extração, cada um com 3 minutos. Repetiu-se as mesmas condições,

utilizando esferas de vidro em vez de terra diatomácea, uma vez que estas podem ser reutilizadas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.6.

Tabela 3.6: Resultados preliminares obtidos pelo método de extração acelerada com os diferentes solventes utilizados, a 120 °C e com 2 ciclos de 3 minutos. Foi usada terra diatomácea nos ensaios em que se refere apenas o solvente (hexano, etanol e acetona). Todos os ensaios foram realizados em duplicado, com exceção do ensaio com hexano e terra diatomácea. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel apresentam-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.

Solvente	Rendimento em lípidos	Rendimento em AGT	Rendimento em ADH	Rendimento em AG para produção de biodiesel
Hexano	19,16	16,12	6,26	9,76
Etanol	28,12±0,10	19,36±1,62	5,04±0,17	14,38±1,78
Acetona	23,43±0,14	14,40±0,25	5,47±0,11	8,84±0,13
Hexano c/esferas	21,96±0,31	19,12±0,46	7,36±0,17	11,63±0,28

Analisando a tabela, é possível concluir que a acetona é o solvente que permite obter rendimentos menos satisfatórios, tal como verificado na extração por Soxhlet. Nos ensaios com etanol obtiveram-se rendimentos inferiores aos da extração por Soxhlet, em AGT e ADH, pelo que se concluiu que, provavelmente, a 120 °C, o etanol poderá não atingir o máximo do seu poder de dissolução do ADH. Relativamente ao hexano, obtiveram-se resultados semelhantes, em particular utilizando esferas de vidro em vez de terra diatomácea.

Assim, decidiu-se que os dois solventes a estudar seriam o hexano e o etanol e que se utilizaria esferas de vidro em vez de terra diatomácea.

De seguida, realizaram-se 3 ensaios com hexano de apenas 1 ciclo, a 120 °C, variando o tempo de extração. O intuito destes testes era perceber se realizando apenas 1 ciclo em vez de 2 e mantendo o tempo total de extração, os rendimentos obtidos eram semelhantes, e se se verificava um aumento considerável do rendimento se esse tempo de extração fosse aumentado. Um novo ciclo corresponde a uma nova descarga de solvente fresco, gastando mais recursos e encarecendo o processo.

Tabela 3.7: Resultados preliminares obtidos pelo método de extração acelerada com o solvente hexano, a 120 °C, com um ciclo e com esferas. O rendimento apresenta-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.

Tempo (min)	Rendimento em lípidos
3	21,02
6	22,03
26	23,24

Observando a tabela 3.7, verifica-se que, utilizando 1 ciclo com 6 minutos é possível conseguir um rendimento em lípidos equivalente ao obtido com 2 ciclos de 3 minutos (22%). Conclui-se também que, aumentando o tempo de extração, o rendimento em lípidos aumenta, mas de forma pouco significativa.

Desta forma, definiu-se que o planeamento experimental iria consistir em ensaios com apenas 1 ciclo, sendo o intervalo de tempo de extração a estudar de 2 a 20 minutos. Relativamente à temperatura, definiu-se o intervalo a estudar de 40 a 140 °C.

Planeamento Experimental

Como referido anteriormente, foi realizado um planeamento experimental baseado numa superfície de resposta organizado segundo a distribuição de Doehlert, avaliando 2 fatores: temperatura (fator 1) e tempo de extração (fator 2). O mesmo planeamento experimental foi executado para os solventes hexano e etanol.

A tabela 3.8 apresenta os testes realizados e as respostas obtidas para o rendimento em lípidos, em AGT, em ADH e ácidos gordos para produção de biodiesel, utilizando hexano como solvente.

Tabela 3.8: Matriz do planeamento experimental organizado segundo a distribuição de Doehlert para os fatores temperatura e tempo de extração e respostas obtidas, usando hexano como solvente. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel apresentam-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.

Teste	Temp. (°C)	Tempo (min)	Rendimento em lípidos	Rendimento em AGT	Rendimento em ADH	Rend. em AG p/ produção de biodiesel
1	40	11	27,58	22,16	8,43	13,58
2	40	11	25,12	20,57	7,92	12,52
3	90	11	21,82	18,70	6,95	11,61
4	90	11	22,18	19,02	7,28	11,61
5	140	11	21,09	19,87	7,64	12,09
6	140	11	22,48	20,95	8,02	12,80
7	65	3	20,85	19,28	7,28	11,87
8	65	3	21,75	19,30	7,36	11,82
9	115	3	20,91	17,15	6,52	10,52
10	115	3	20,85	17,57	6,73	10,73
11	65	19	23,58	17,23	6,47	10,58
12	65	19	23,38	17,66	6,85	10,70
13	115	19	22,04	17,74	6,75	10,87
14	115	19	23,74	18,26	6,92	11,21

O efeito específico da temperatura nas respostas é visível nas experiências em que o tempo de extração é mantido constante. Desta forma, fixando o tempo de extração em 11 minutos (centro do domínio experimental), o valor médio do rendimento de extração em lípidos de 26,4 g/100g de biomassa, obtido a 40 °C (testes 1 e 2) diminui cerca de 18% quando a temperatura aumenta para 90 °C (testes 3 e 4). Com o posterior aumento da temperatura para 140 °C (testes 5 e 6) o valor da extração, praticamente não sofre alteração mantendo-se em média num valor de 22 g/100g de biomassa. Este perfil de extração observa-se nas respostas restantes. Desta forma, o rendimento de extração em AGT diminui 11,6%, em ADH diminui 13,4%, em AG para produção de biodiesel diminui 11,5%, quando a temperatura aumenta de 40 °C (testes 1 e 2) para 90 °C (testes 3 e 4). Posterior aumento da temperatura para 140 °C não resulta num aumento da extração (testes 5 e 6).

Para tempos de extração mais baixos (3 min), o aumento de temperatura de 65 (testes 7 e 8) para 115 °C (testes 9 e 10) não tem efeito significativo no rendimento de extração de lípidos. No entanto, para o rendimento em AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel verifica-se que, no tempo de extração de 3 min, o aumento de temperatura, de 65 (testes 7 e 8) para 115 °C (testes 9 e 10), conduz a uma

ligeira diminuição do rendimento de extração, de 10,0%, 9,4% e 7,8%, respectivamente.

Para tempos de extração mais elevados (19 min), o aumento de temperatura de 65 (teste 11 e 12) para 115 °C (teste 13 e 14) conduz a um valor de rendimento em lípidos totais muito próximo para as duas condições (diminuição de 2,6%). Por outro lado, para o rendimento em AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel verifica-se que para um tempo de extração de 19 min o aumento de temperatura de 65 (teste 11 e 12) para 115 °C (testes 13 e 14) resulta num ligeiro aumento do rendimento. De facto, para este tempo de extração, o valor médio do rendimento em AGT aumenta 2,5%, em ADH aumenta 3,4%, em AG para produção de biodiesel aumenta 3,4%, quando a temperatura aumenta de 65 (testes 11 e 12) para 115 °C (testes 13 e 14).

Assim, verifica-se que para os lípidos totais e temperaturas acima de 65 °C, o aumento de temperatura, mantendo o tempo de extração, não melhora o rendimento de extração.

No processo ASE o aumento de temperatura resulta usualmente num aumento de rendimento, dado que com o aumento da temperatura a tensão superficial e a viscosidade do solvente diminuem e, por outro lado, a difusividade aumenta, o que resulta numa extração mais eficaz pois verifica-se uma penetração do solvente mais fácil e profunda na matriz sólida, espalhando-se e ensopando de forma mais eficiente todo o leito sólido, resultando numa transferência de massa mais rápida e num aumento do rendimento de extração. No entanto, para líquidos pressurizados o aumento de temperatura também se reflete numa diminuição da densidade e da constante dielétrica do solvente, diminuindo assim o poder solvente do líquido, bem como a sua polarizabilidade/polaridade, respetivamente.

Assim, tendo em conta estas considerações, o valor mais elevado de rendimento em lípidos totais que se obteve à temperatura de 40°C, poderá ser devido à extração de maior quantidade de outros lípidos, (por exemplo fosfolípidos), para além dos AG. De facto, a 40°C o rendimento obtido para os AGT mostra que se esgotou praticamente a matriz nestes compostos, ficando assim a possibilidade de co-extraír outros compostos. Com o aumento de temperatura de 40 para 90°C, verifica-se que o rendimento em lípidos totais diminui ligeiramente, possivelmente porque para temperaturas mais altas, apesar de haver uma melhoria nas propriedades de transferência de massa (como a tensão superficial, viscosidade e difusividade), a densidade do solvente bem como a sua constante dielétrica diminuem e, como tal, diminui também o poder solvente e a sua polaridade. Assim, a solubilidade de outros lípidos que não os AG será menor.

Por outro lado, a 90°C os AGT extraídos são em quantidade inferior que à temperatura de 40°C e por isso a co-extração de outros compostos (possivelmente mais polares) será mais difícil de acontecer. De notar que a percentagem de AGT nos lípidos aumenta com o aumento da temperatura (de 81% a 40°, para 86% a 90°C , para 93% a 40 °C), o que corrobora a menor co-extração de outros lípidos com o aumento de temperatura.

No que diz respeito à variação do rendimento de extração dos lípidos totais com o aumento de temperatura de 65° C para 115°C, a tempo de extração constante (3 min ou 19 min), as variações observadas são muito pequenas pelo que se pode considerar que o valor de rendimento não sofre alterações significativas com o aumento de temperatura (quer para tempo de extração de 3 min quer para o tempo de extração de 19 min.). De facto, as diferenças observadas não deverão ser consi-

deradas como tendência mas sim como desvios relacionados com o erro experimental inerente aos procedimentos para quantificação destes lípidos.

Relativamente ao rendimento de extração em AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel, a variação observada com o aumento de temperatura, para o tempo de extração de 3 min, poderá dever-se a que o tempo de residência do solvente no extrator não seja suficiente para haver uma difusão completa do líquido pela matriz sólida, pelo que a diferença de densidade com a temperatura poderá ser preponderante para a quantidade de soluto a extrair e, como tal, o rendimento diminui com o aumento de temperatura. Por outro lado, para o tempo de extração de 19 min, o tempo de residência do solvente no extrator é maior, sendo possível uma difusão mais completa do solvente pelo leito sólido e, conseqüentemente, o aumento da taxa de transferência de massa, que será maior para temperaturas mais altas. Desta forma, para este tempo de extração verificou-se um aumento do rendimento com a temperatura.

O efeito específico da variação do tempo nas respostas é visível nas experiências em que a temperatura de extração é mantida constante.

Quando a extração é realizada a uma temperatura de 65 °C, o aumento do tempo de extração de 3 minutos (testes 7 e 8) para 19 minutos (testes 11 e 12) leva a um aumento no valor médio do rendimento de extração em lípidos de 21,3 para 23,5 g/100 g de biomassa seca e sem cinzas (um aumento 10,3%). Nas mesmas condições, o rendimento médio de extração em AGT diminui 9,8%, em ADH diminui 8,4%, em AG para produção de biodiesel diminui 7,8%.

No que diz respeito à extração realizada a uma temperatura de 115 °C, o aumento do tempo de extração de 3 minutos (testes 9 e 10) para 19 minutos (testes 13 e 14) resulta num aumento do valor médio do rendimento de extração em lípidos de 10,1% (aumentou de um valor médio de 20,8 para 22,9 g/100g de biomassa seca e sem cinzas). Nas mesmas condições o rendimento médio de extração em AGT aumenta 3,4%, em ADH aumenta 3,0%, em AG para produção de biodiesel aumenta 3,4%.

Neste caso, o tempo de extração está diretamente relacionado com o tempo de residência do solvente no extrator. Para os lípidos totais verifica-se que, para ambas as temperaturas, o aumento do tempo conduz a um aumento de rendimento, dado que se aumenta o tempo de contacto do solvente com o soluto. No entanto, para as restantes respostas, à temperatura mais baixa, um aumento de tempo não favorece a extração de AG, possivelmente porque para a temperatura mais baixa é possível haver maior co-extração de outros lípidos que não os AG, dado que a esta temperatura o solvente tem maior capacidade para a extração de outros compostos e, por isso, o aumento do tempo de extração favorecerá a co-extração dos mesmos (é de notar que para um tempo de 3 min o conteúdo de AGT nos lípidos é de 90% enquanto que para um tempo de 19 min se tem apenas 74% de AGT nos lípidos).

Por outro lado, para a temperatura mais alta, 115 °C, o aumento do tempo de extração resulta num aumento dos AG, possivelmente porque a esta temperatura a possibilidade de co-extração de outros compostos é menor e por isso haverá menos competição pelo solvente, sendo possível extrair mais AG.

É de notar que, para todas as condições, obtiveram-se rendimentos em lípidos superiores ou semelhantes aos obtidos no método de Soxhlet com hexano. À temperatura de 115 °C e tempo de 3 minutos, atingiu-se o menor rendimento em lípidos - 20,88 g/100g biomassa - no entanto, com base no

rendimento obtido por Soxhlet, obteve-se uma recuperação de 101,3%. O rendimento em lípidos mais elevado obtido - 26,35 g/100g biomassa seca e sem cinzas - apresenta uma taxa de recuperação de lípidos de 128,9%.

Esta conclusão é bastante satisfatória na medida em que o método de ASE consiste num processo mais sustentável que o convencional, uma vez que apresenta um menor tempo de extração e utiliza menores volumes de solventes orgânicos.

A tabela 3.9 apresenta os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e ácidos gordos para produção de biodiesel (g/100g de biomassa seca e sem cinzas) obtidos de acordo com um planeamento experimental organizado segundo a distribuição de Doehlert para os fatores temperatura e tempo de extração, usando etanol como solvente.

Tabela 3.9: Matriz do planeamento experimental organizado segundo a distribuição de Doehlert para os fatores temperatura e tempo de extração e respostas obtidas, usando etanol como solvente. Os rendimentos em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel apresentam-se em g/100g de biomassa seca e sem cinzas.

Teste	Temp. (°C)	Tempo (min)	Rendimento em lípidos	Rendimento em AGT	Rendimento em ADH	Rend. em AG p/ produção de biodiesel
1	40	11	21,59	17,22	6,70	10,41
2	40	11	22,36	-	-	-
3	90	11	26,39	19,43	7,49	11,82
4	90	11	25,33	18,39	7,08	11,19
5	140	11	28,56	19,58	7,55	11,90
6	140	11	28,10	18,34	7,00	11,22
7	65	3	19,99	14,16	5,39	8,68
8	65	3	20,91	15,36	5,86	9,39
9	115	3	21,17	15,29	5,93	9,26
10	115	3	22,53	15,55	5,89	9,56
11	65	19	23,52	18,25	7,01	11,12
12	65	19	24,70	18,92	7,33	11,47
13	115	19	25,06	18,30	7,12	11,05
14	115	19	24,24	18,94	7,28	11,54

Como foi referido anteriormente, o etanol é um solvente com a capacidade de extrair outros compostos que não sejam lípidos, como complexos de proteínas e hidratos de carbono. Uma vez que não foi possível purificar estes lípidos, quando estes são mencionados refere-se ao extrato lipídico não puro, com proteínas e hidratos de carbono. Não foi possível determinar o rendimento em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel do teste 2 por motivos técnicos, pelo que se irá analisar os resultados para a condição de 40 °C e 11 minutos apenas pelo teste 1.

Da mesma forma em que se analisou a extração com hexano de acordo com o efeito específico da temperatura, analisa-se as respostas das experiências em que o tempo de extração com etanol é mantido constante. Desta forma, fixando o tempo de extração em 11 minutos (centro do domínio experimental), o valor médio do rendimento de extração em lípidos a 40 °C (testes 1 e 2) é de 21,9 g/100g de biomassa seca e sem cinzas e aumenta 18,3% quando a temperatura aumenta para 90 °C (testes 3 e 4), atingindo um rendimento de 28,3 g/100g de biomassa à temperatura de 140 °C (testes

5 e 6), 29,2% acima do valor obtido a 40 °C (testes 1 e 2). A eficácia da temperatura na extração com etanol não se observa nas respostas restantes. Desta forma, o rendimento médio de extração em AGT aumenta 9,8%, em ADH aumenta 8,9%, em AG para produção de biodiesel aumenta 10,6%, quando a temperatura aumenta de 40 (testes 1 e 2) para 90 °C (testes 3 e 4). Contudo, o posterior aumento da temperatura de 90 para 140 °C (testes 5 e 6) não resulta num aumento dos rendimentos de extração.

Para tempos de extração mais baixos (3 minutos), a alteração de temperatura de 65 °C (testes 7 e 8) para 115 °C (testes 9 e 10) apresenta um aumento de 6,8% na extração de lípidos com etanol. Nas mesmas condições, o rendimento médio de extração em AGT aumentou 4,0%, em ADH aumentou 5,3% e em AG para produção de biodiesel aumentou 4,4%.

Para tempos de extração mais elevados (19 minutos), a alteração de temperatura de 65 (testes 11 e 12) para 115 °C (testes 13 e 14) revela um aumento de 2,5% na extração de lípidos com etanol. Nas mesmas condições, os rendimentos médios de extração em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel não se alteraram.

Tal como referido para os resultados com hexano, o aumento da temperatura do solvente pressurizado resulta na melhoria da taxa de transferência de massa (por aumento da difusividade, e diminuição da tensão superficial e da viscosidade). Assim, para a extração dos AG verifica-se um aumento do rendimento com o aumento da temperatura de 40 para 90°C, como esperado com o aumento da taxa de transferência de massa. No entanto, para um aumento superior de temperatura, de 90 para 140°C, o aumento da taxa de transferência de massa irá favorecer a co-extração de outros compostos que poderão estar mais disponíveis que os AG restantes na matriz sólida e que a temperaturas mais altas são extraídos preferencialmente a estes últimos.

No que diz respeito à tendência observada de aumento do rendimento em AG com o aumento de temperatura de 65 para 115 °C, para o tempo de extração de 3 min, esta poderá dever-se à melhoria na transferência de massa que se verifica com o aumento de temperatura. Por outro lado, para um tempo de extração maior (19 min), o facto do rendimento em AG se manter apesar do aumento de temperatura poderá dever-se ao facto de que com este tempo é possível extrair uma grande parte dos AG presentes na biomassa, pelo que os AG restantes na matriz poderão ter uma localização menos acessível e por isso é favorecida a co-extração de outros compostos mais acessíveis ao solvente, ao invés de mais AG.

O efeito da variação do tempo nas respostas é visível nas experiências em que a temperatura de extração é mantida constante. Desta forma, quando a extração é realizada a uma temperatura de 65 °C, o aumento do tempo de extração de 3 minutos (testes 7 e 8) para 19 minutos (testes 11 e 12) origina um aumento no rendimento de extração de lípidos de 17,6%. Nas mesmas condições, o rendimento médio de extração em AGT aumenta 25,7%, em ADH aumenta 28,6% e em AG para produção de biodiesel aumenta 25,6%. Esta tendência poderá dever-se ao facto de que maior tempo de extração corresponde a um maior tempo de residência do solvente no extrator e, conseqüentemente, maior tempo de contacto e para difusão do solvente na matriz, o que conduzirá à extração de mais compostos.

Quando a extração é realizada a uma temperatura de 115 °C, o aumento do tempo de extração de 3 minutos (testes 9 e 10) para 19 minutos (testes 13 e 14) origina um aumento do valor médio de rendimento em lípidos de 12,8%. Nas mesmas condições, o rendimento médio em AGT aumenta

20,7%, em ADH aumenta 22,0% e em AG para produção de biodiesel aumenta 20,2%, sendo uma possível justificação a indicada anteriormente.

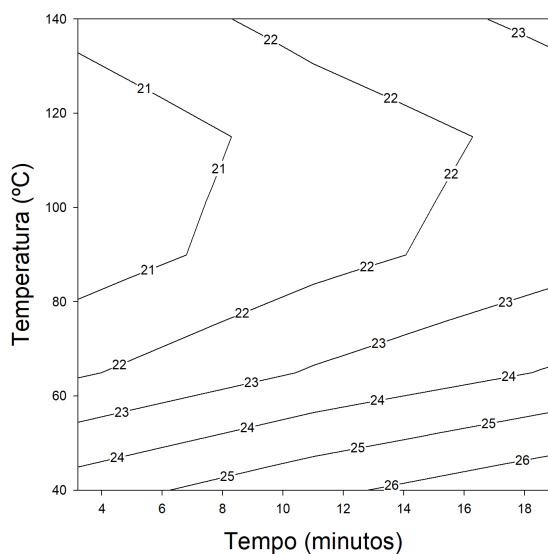
Verifica-se que a condição onde se atingiu maior rendimento em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel foi a mesma, para uma temperatura de 140 °C e tempo de 11 minutos. O rendimento em AGT foi de 18,96 g por 100 g de biomassa, o em ADH 7,28 g por 100 g de biomassa (à semelhança da condição 90 °C, 11 minutos) e o em AG para produção de biodiesel 11,56 g por 100 g de biomassa. Apesar de na extração por Soxhlet se ter obtido rendimentos maiores, as taxas de recuperação com base neste método foram elevadas: 86,7% para os AGT, 86,9% para o ADH e 86,5% para os AG para produção de biodiesel.

Comparando os dois solventes hexano e etanol, verifica-se que o rendimento de extração em AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel é superior com hexano para todas as condições, o que poderá ser explicado pelo facto de que o hexano tem uma polaridade mais próxima da dos AG (compostos pouco polares), contrariamente ao etanol que é bastante polar e por isso poderá não ter tanta afinidade com estes compostos. Por outro lado, a elevada polaridade do etanol torna-o num bom solvente para outros compostos presentes na matriz e que poderão ser co-extraídos preferencialmente aos AG.

Análise das superfícies de resposta

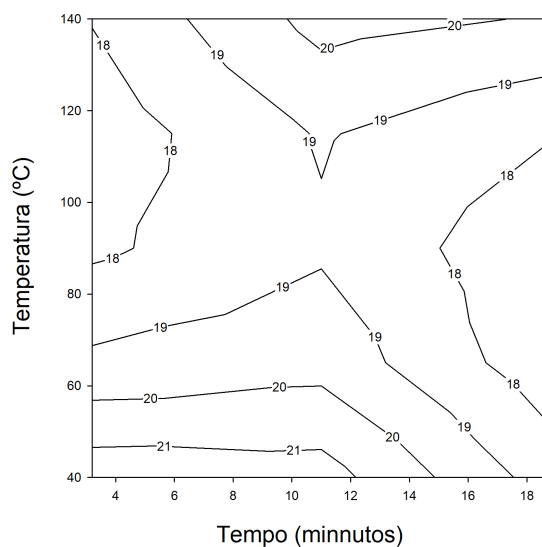
Na figura 3.19 estão representadas as superfícies de resposta obtidas para o rendimento em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel dentro dos limites do domínio experimental, utilizando hexano como solvente.

Rendimento Lipidos, % (g/ g de biomassa)



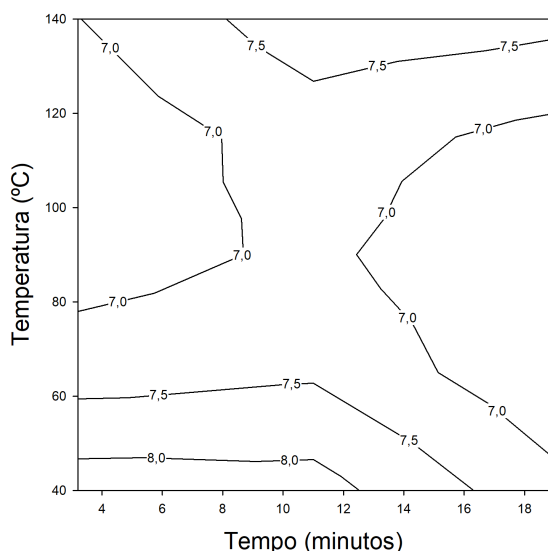
(a) Superfície de resposta para o rendimento em lípidos.

Ácidos Gordos % (g/ g de biomassa)



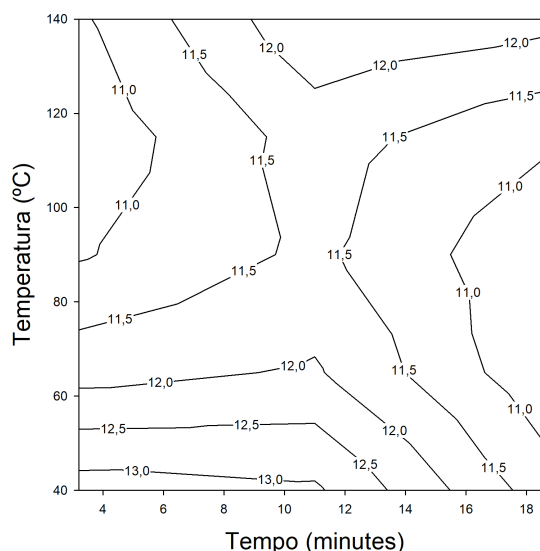
(b) Superfície de resposta para o rendimento em ácidos gordos.

DHA, % (g/ g de biomassa)



(c) Superfície de resposta para o rendimento em ADH.

Biodiesel, % (g/ g de biomassa)



(d) Superfície de resposta para o rendimento em AG para produção de biodiesel.

Figura 3.19: Superfícies de resposta obtidas no planeamento experimental para os fatores temperatura e tempo de extração, usando hexano como solvente.

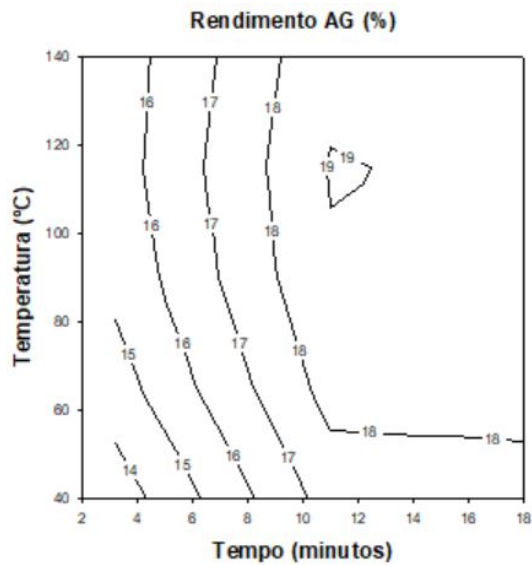
Analisando a figura a), verifica-se que a tendência geral da distribuição das curvas de isoresposta toma a forma de linhas com uma ligeira inclinação relativamente a linhas horizontais, revelando que a variação do rendimento em lípidos é mais notória ao longo das ordenadas do que das abcissas. Assim, conclui-se que a diminuição da temperatura leva a um maior incremento no rendimento em lípidos que o aumento do tempo de extração. O aumento do tempo de extração tem mais impacto para temperaturas mais elevadas. Atinge-se o valor máximo do rendimento em lípidos - 26 g/100 g de biomassa (seca e sem cinzas) - para temperaturas entre os 40 e os 45 °C e tempos de extração entre 13 e 19 minutos.

Deste modo, do ponto de vista económico e ambiental, a condição mais favorável será a 40 °C e 13 minutos.

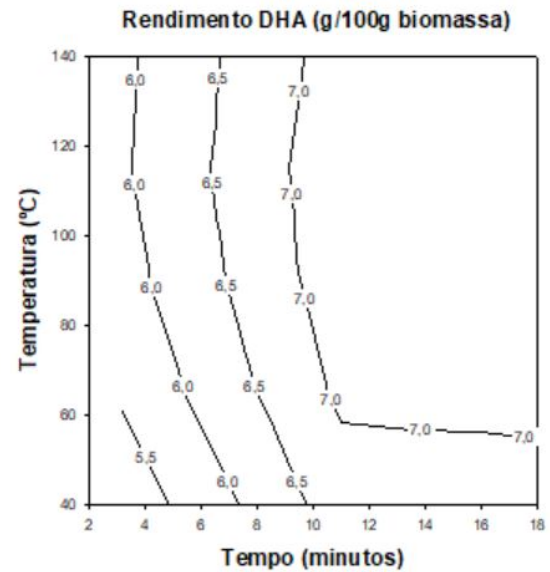
Relativamente ao rendimento em ácidos gordos, verifica-se que a temperatura exerce, de um modo geral, um efeito semelhante, ou seja, quanto maior a temperatura, menor o rendimento. No entanto, ao contrário do caso anterior, a um maior tempo de extração não está associado um maior rendimento. Atinge-se um rendimento máximo de 21 g por 100 g de biomassa (seca e sem cinzas) para valores de temperatura entre os 40 os 47 °C e para um tempo de 2 a 12 minutos.

Os gráficos das figuras c) e d) são semelhantes ao gráfico b), revelando que a superfície de resposta correspondente aos valores máximos de rendimentos em ADH e AG para produção de biodiesel se obtêm novamente no quadrante inferior esquerdo. O rendimento máximo em ADH é de 8 g/100g de biomassa (seca e sem cinzas), para valores de temperatura entre os 40 e os 47 °C e tempos de extração entre os 2 e os 12 minutos. O rendimento máximo em biodiesel é registado para temperaturas entre os 40 e os 45 °C, num intervalo de tempo semelhante, atingindo o valor de 13 g/100 g de biomassa (seca e sem cinzas).

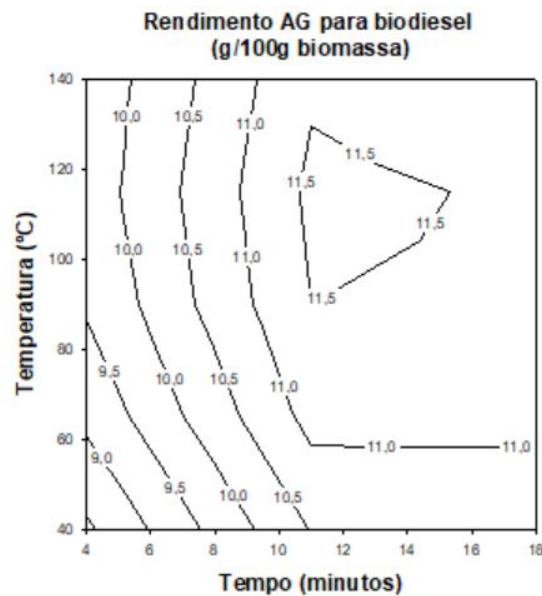
Na figura 3.20 estão representadas as superfícies de resposta obtidas para o rendimento em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel dentro dos limites do domínio experimental, utilizando etanol como solvente. Não se apresenta para o rendimento em lípidos por estes não terem sido purificados.



(a) Superfície de resposta para o rendimento em ácidos gordos.



(b) Superfície de resposta para o rendimento em ADH.



(c) Superfície de resposta para o rendimento em AG para produção de biodiesel.

Figura 3.20: Superfícies de resposta obtidas no planeamento experimental para os fatores temperatura e tempo de extração, usando etanol como solvente.

Verifica-se que ambos os gráficos apresentam curvas de isoresposta com uma ligeira inclinação relativamente a linhas verticais, indicando que a variação do rendimento é mais expressiva ao longo das abcissas do que ao longo das ordenadas. Assim, tanto para os AGT, como para o ADH e AG para produção de biodiesel, um aumento do tempo de extração provoca um maior aumento do rendimento que o aumento da temperatura.

O rendimento em AGT aumenta com o aumento do tempo de extração, apresentando um rendimento máximo de 19 g por 100 g de biomassa (seca e sem cinzas), para tempos entre os 11 e os 12 minutos e temperaturas entre 113 e 120 °C.

Relativamente ao rendimento em ADH, verifica-se que o aumento da temperatura não tem praticamente impacto, atingindo-se o maior rendimento - 7 g por 100 g de biomassa (seca e sem cinzas) - a partir dos 10 minutos de extração, a uma temperatura mínima de 60 °C.

O rendimento em AG para produção de biodiesel máximo é de 11,5 g por 100 g de biomassa (seca e sem cinzas), para temperaturas de 95 a 130 °C e com 11 a 15 minutos de extração.

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

Os dados obtidos a partir do planeamento experimental foram utilizados para proceder a uma análise através de um modelo polinomial, estando os coeficientes (β_0 a β_{22}) presentes na tabela 3.10, bem como a sua validação.

Tabela 3.10: Coeficientes do modelo polinomial que representam as respostas avaliadas no planeamento experimental usando hexano como solvente e validação do modelo. O fator 1 corresponde à temperatura e o fator 2 ao tempo.

Modelo	Rendimento em lípidos	Rendimento em AGT	Rendimento em ADH	Rendimento em AG p/ produção de biodiesel
β_0	21,63	7,11	18,86	11,61
β_1	-1,7	-0,2	-0,55	-0,34
β_2	1,21	-0,13	-0,35	-0,23
β_{12}	-0,1	0,5	1,43	0,94
β_{11}	2,44	0,89	2,03	1,13
β_{22}	-0,15	-0,64	-1,79	-1,14
Eficácia dos parâmetros	5,75	17,9	19,4	17,63
Nível de significância (α), F(5,8)	0,985	0,9996	0,999	0,999
Desajuste	4,66	0,21	0,19	0,11
Nível de significância (α), F(1,7)	0,93	0,34	0,32	0,25

O significado de cada parâmetro é o seguinte:

- β_0 - resposta no centro do domínio experimental
- β_1 - importância relativa da temperatura
- β_2 - importância relativa do tempo
- β_{12} - termo de interação entre os dois fatores
- β_{11} e β_{22} - forma como a superfície de resposta se dobra para baixo ou para cima quadraticamente

Analisando os valores da tabela, conclui-se que os valores de β_1 são todos negativos, comprovando a influência negativa do aumento da temperatura. Já os valores de β_2 são negativos para o rendimento em ácidos gordos, ADH e AG para produção de biodiesel, e positivo para o rendimento em lípidos. Conclui-se que o aumento do tempo de extração beneficia a extração de lípidos que não sejam ácidos gordos.

Verifica-se também que o valor absoluto do coeficiente β_1 é sempre superior ao de β_2 , o que significa que a variação da temperatura tem maior impacto que a variação do tempo de extração, especialmente no rendimento em lípidos.

Relativamente ao coeficiente β_{12} , apresenta valores elevados para o rendimento em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel, sendo bastante superior aos coeficientes β_1 e β_2 de ambos os modelos, o que mostra que a interação entre a temperatura e o tempo é significativa e os fatores devem ser controlados em simultâneo durante o processo, de forma a garantir uma recuperação eficiente, tanto de AGT, como de ADH como de AG para produção de biodiesel. No rendimento em lípidos, este fator é bastante inferior aos coeficientes β_1 e β_2 , revelando que a interação entre os fatores não apresenta uma influência significativa na resposta como a variação de cada fator individualmente.

De modo a avaliar-se a validação dos modelos, realizou-se o teste para a eficácia dos coeficientes e o teste para o desajuste do modelo, ambos baseados no teste de Fisher de razão das variâncias.

No teste para a eficácia dos parâmetros os coeficientes β são testados para determinar o nível de representação dos resultados obtidos, avaliando o nível de significância da quantidade de variância nos dados que foram contabilizados pelos coeficientes do modelo. Este teste mostrou que o nível de significância para o qual a hipótese nula pode ser rejeitada é 0,985, 0,999, 0,999 e 0,999 para o rendimento em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel, respetivamente.

O teste para o desajuste do modelo testa o nível a que o modelo se ajusta aos dados e os representa, avaliando-se as variâncias devido à falta de ajuste e devido à incerteza puramente experimental. Este teste revelou níveis de confiança dos modelos para a aceitação da hipótese nula de 0,93, 0,34, 0,32 e 0,25, para o rendimento em lípidos, AGT, ADH e AG para produção de biodiesel, respetivamente.

A tabela 3.11 apresenta os coeficientes derivados para cada modelo polinomial e a validação do mesmo, do planeamento experimental utilizando etanol como solvente.

Tabela 3.11: Coeficientes do modelo polinomial que representam as respostas avaliadas no planeamento experimental usando etanol como solvente e validação do modelo. O fator 1 corresponde à temperatura e o fator 2 ao tempo.

Modelo	Rendimento em AGT	Rendimento em ADH	Rendimento em AG para produção de biodiesel
β_0	7,28	18,91	11,5
β_1	0,24	0,69	0,45
β_2	0,82	2,03	1,2
β_{12}	-0,15	-0,36	-0,21
β_{11}	-0,29	-0,82	-0,52
β_{22}	-0,98	-2,48	-1,49
Eficácia dos parâmetros	5,39	3,73	3,97
Nível de significância (α), F(5,8)	0,98	0,95	0,96
Desajuste	15,55	17,86	14,60
Nível de significância (α), F(1,7)	0,99	0,99	0,99

Analisando os valores da tabela, conclui-se que os valores de β_1 e β_2 são todos positivos, comprovando que, tanto o aumento da temperatura como o aumento do tempo de extração, levam a um aumento no rendimento em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel. Verifica-se também que em

todos os modelos polinomiais o coeficiente β_2 é superior ao coeficiente β_1 , o que comprova a maior influência da variação do tempo em detrimento da variação da temperatura.

Relativamente ao coeficiente β_{12} , apresenta valores inferiores aos coeficientes β_1 e β_2 para os três modelos polinomiais, mostrando que a interação entre a temperatura e o tempo de extração não é tão significativa como a variação individual de cada um dos fatores. No entanto, especialmente no rendimento em ADH e AG para produção de biodiesel, a interação entre os fatores não deve ser desprezada e devem ser controlados em simultâneo para se atingir o máximo de produção.

De modo a avaliar-se a validação dos modelos, realizou-se o teste para a eficácia dos coeficientes e o teste para o desajuste do modelo, ambos baseados no teste de Fisher de razão das variâncias, tal como mencionado anteriormente.

O teste para a eficácia dos parâmetros mostrou que o nível de significância para o qual a hipótese nula pode ser rejeitada é 0,98, 0,95 e 0,96 para o rendimento em AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel, respetivamente.

O teste para o desajuste do modelo revelou níveis de confiança dos modelos para a aceitação da hipótese nula de 0,99 para o rendimento em AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel.

3.2.3 Extração supercrítica

A extração de lípidos da microalga *C. cohnii* foi também estudada utilizando outro processo considerado verde e ambientalmente benigno, a extração supercrítica com dióxido de carbono.

Foram realizados 5 ensaios com diferentes condições de pressão e temperatura, de forma a avaliar o efeito da sua variação. O tempo total de extração foi de 3 horas. Como referido anteriormente na secção de Materiais e métodos, durante a extração são recolhidos 4 extratos ao longo do tempo. No entanto, para a curva 5 foram apenas recolhidos 3 extractos. As condições de pressão e temperatura estudadas estão resumidas na tabela 3.12. No gráfico da figura 3.21 apresenta-se a curva cumulativa do rendimento em lípidos para cada uma das condições estudadas, em função do tempo de extração.

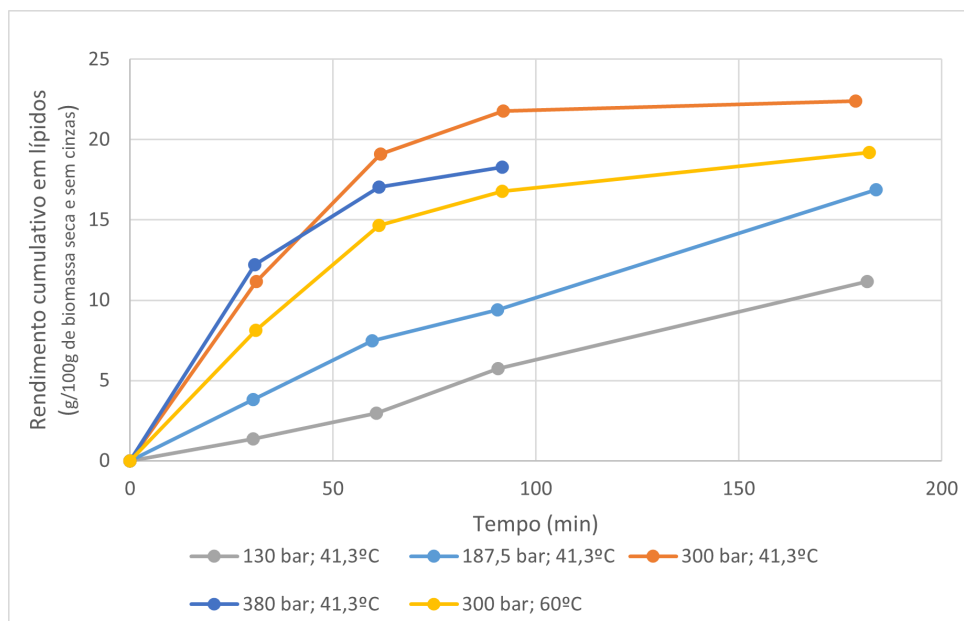


Figura 3.21: Rendimento cumulativo em lípidos ao longo do tempo de extração, nas várias condições de extração supercrítica realizadas.

Observando o gráfico, é possível concluir que, fixando a temperatura em 41,3 °C, o rendimento aumenta com o aumento de pressão de 130 bar para 300 bar. No entanto, um aumento de pressão de 300 para 380 bar o rendimento diminui. De facto, apesar de no período inicial de extração (30 min) a velocidade de extração ser muito semelhante para as duas pressões, a partir deste tempo a velocidade de extração a 380 bar diminui e, conseqüentemente, o rendimento de extração às condições de pressão de 380 bar, ao fim de 1,5 h, é inferior ao obtido a 300 bar.

É possível verificar que a progressão do rendimento em lípidos ao longo do tempo de extração apresenta perfis distintos. Para as pressões mais baixas de 130 e 187,5 bar, e temperatura de 41,3 °C, a curva apresenta uma forma linear, com um aumento do rendimento no tempo quase proporcional. As outras três curvas têm duas zonas: uma linear e um patamar. Para as condições de 300 bar e 41,3 °C, 300 bar e 60 °C e 380 bar e 41,3 °C, durante os primeiros 30 a 60 minutos, o rendimento em lípidos é proporcional ao tempo, verificando-se após 60 a 90 minutos um decréscimo progressivo do declive da curva.

A existência destas duas zonas deve-se ao facto do processo de extração supercrítica compreender duas fases. A primeira fase consiste na extração dos compostos mais acessíveis, ou seja, aqueles que se encontram livres no exterior das células fragmentadas em contacto com o solvente supercrítico. Assim, o mecanismo que predomina na fase inicial é a solubilidade do soluto (lípidos) no solvente, sendo esse o fator que controla a cinética do processo. O declive da curva corresponde à solubilidade nessas condições.

Na segunda fase, o soluto que se encontrava livre foi esgotado, iniciando-se a extração dos compostos intracelulares. Primeiro são extraídos das células que se encontram fragmentadas e de seguida das intactas. Nesta fase a taxa de extração é controlada pela difusão interna, que depende da pressão, temperatura e caudal do solvente supercrítico. Sendo um processo mais lento, controlado pela

resistência à transferência de massa externa e depois interna, a taxa de extração diminui progressivamente, observando-se a diminuição do declive da curva.

Desta forma, conclui-se que os ensaios a 41,3 °C e 130 e 187,5 bar, não atingiram a segunda fase da extração, sendo necessário mais de 3 horas para que isso acontecesse. Assim, após 3 horas de extração extraíram-se apenas 11,15 e 16,88 g de lípidos por 100 g de biomassa (seca e sem cinzas). O aumento da pressão de 130 para 187,5 bar resultou num aumento do rendimento em 51,4%.

Na condição de 300 bar e 41,3 °C, o rendimento em lípidos foi o máximo observado, 22,40 g por 100 g de biomassa (seca e sem cinzas), representando um aumento do rendimento em 32,7% relativamente ao ensaio a 187,5 bar e à mesma temperatura. Em comparação com a extração pelo método tradicional por Soxhlet usando hexano, a extração supercrítica apresenta um rendimento superior em lípidos totais, sendo possível extrair mais 8% de lípidos quando se usa dióxido de carbono supercrítico nas referidas condições de pressão e temperatura, revelando-se um resultado bastante positivo.

É possível observar que, a 300 bar, aumentar a temperatura de 41,3 para 60 °C, resulta numa diminuição do declive da curva da 1ª fase, concluindo-se que a 300 bar a taxa de extração diminui com o aumento da temperatura, assim como a solubilidade dos lípidos totais no solvente supercrítico, que é assim mais baixa à temperatura de 60 °C, resultando num menor rendimento em lípidos a uma temperatura mais alta. De facto, com o aumento da temperatura há uma diminuição da densidade do solvente e, conseqüentemente, a solubilidade dos compostos no solvente diminui. Por outro lado, verifica-se que, a 300 bar, independentemente da temperatura, a extração progride da etapa dominada pela solubilidade dos lípidos no solvente (30-60 minutos), para a fase da extração dominada pela transferência de massa externa (60-90 min), e desta para a fase limitada pela transferência de massa interna (90-180 min).

Também se verifica uma diminuição do rendimento quando, à temperatura de 41,3 °C, se aumenta a pressão de 300 para 380 bar, mas por razões distintas. De facto, com o aumento da pressão há um aumento da densidade do fluido e, conseqüentemente, um aumento da solubilidade dos compostos no solvente. Isto verifica-se na etapa da extração controlada pela solubilidade, na qual o aumento de pressão conduz a um ligeiro aumento do rendimento nos primeiros 30 minutos de extração para a pressão de 380 bar, comparando com a de 300 bar. Também nesta etapa da extração verifica-se que o declive da curva é muito semelhante para as duas condições de pressão. Por outro lado, com o aumento de pressão, a temperatura constante, verifica-se uma diminuição na difusividade do solvente e, por esse motivo, a capacidade de penetração do fluido no interior da matriz diminui, o que leva a que na etapa controlada pela transferência de massa externa e/ou interna a velocidade de extração diminua. Assim, à temperatura de 41,3 °C, o aumento de pressão de 300 para 380 bar resulta no decréscimo do rendimento em lípidos, na medida em que na fase que é controlada pela difusão, o solvente tem mais dificuldade em difundir-se pelo interior dos poros da matriz sólida.

De seguida analisaram-se os extratos por cromatografia gasosa, como descrito em 2.2.10, de forma a calcular os rendimentos em AGT, ADH e ácidos gordos para a produção de biodiesel, estando os resultados resumidos na tabela 3.12.

Tabela 3.12: Rendimentos em AGT, ADH e ácidos gordos para a produção de biodiesel obtidos para os ensaios de ESC, em gramas por 100 gramas de biomassa seca e sem cinzas.

Condições	Rendimento em AGT	Rendimento em ADH	Rendimento em AG para a produção de biodiesel	% AG nos lípidos totais
130 bar e 41,3 °C	9,69	2,59	7,04	87
187,5 bar e 41,3 °C	11,97	4,42	7,47	71
300 bar e 41,3 °C	15,38	5,87	9,39	69
380 bar e 41,3 °C	15,64	6,02	9,53	85
300 bar e 60 °C	18,39	7,08	11,20	96

Observando a tabela acima, conclui-se que, a maiores rendimentos em AGT, correspondem maiores rendimentos em ADH e em ácidos gordos dirigidos para a produção de biodiesel.

Verifica-se que os ensaios à temperatura de 41,3 °C e pressões de 130 e 187,5 bar apresentam os menores rendimentos, tal como se verificou no rendimento em lípidos. Mantendo a temperatura a 41,3 °C e aumentando a pressão de 130 para 187,5 bar, observou-se um aumento do rendimento de 23,5% em AGT, 70,7% em ADH e 6,1% em ácidos gordos para produção de biodiesel. Ou seja, a temperaturas mais baixas (como 41,3 °C), um aumento da pressão aumenta consideravelmente a solubilidade do ADH no dióxido de carbono, devido ao aumento de densidade do fluido supercrítico.

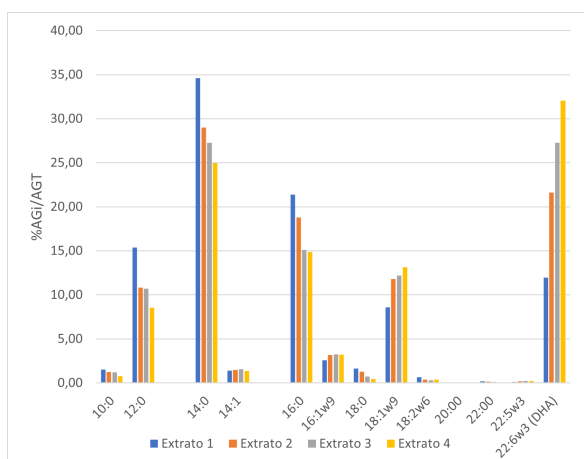
Mantendo a temperatura a 41,3 °C e aumentando a pressão de 187,5 para 300 bar, o rendimento em AGT aumentou 28,5%, em ADH 32,8% e em biodiesel 25,7%. Aumentando para 380 bar, os rendimentos observados foram semelhantes, concluindo-se que a 41,3 °C, atinge-se a máxima solubilidade para os ácidos gordos a pressões próximas de 300 bar, não se beneficiando de pressões superiores para extrair estes compostos. Apesar de não se ter prolongado a extração até um tempo total de 180 minutos, é possível concluir, através da análise da curva, que os resultados não iriam ser muito distintos.

Observando os resultados dos ensaios a 300 bar e temperaturas de 41,3 e 60 °C, verifica-se que o aumento da temperatura resulta num aumento do rendimento em AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel em 19,6, 20,6 e 19,3%, respetivamente. Apesar de se ter observado um rendimento em lípidos totais superior para 41,3 °C, conclui-se que a essa temperatura o dióxido de carbono tem um maior poder de solubilização de outros lípidos, no entanto, a solubilidade de ácidos gordos é menor.

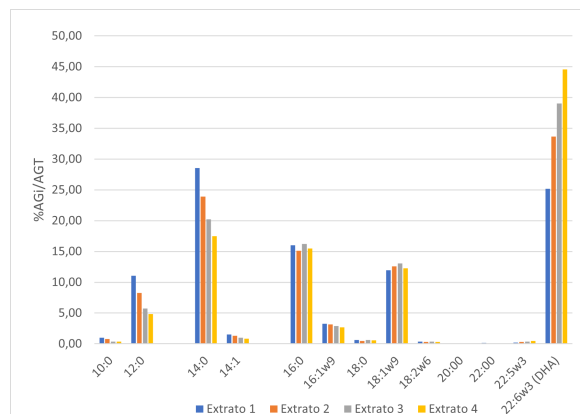
Comparativamente ao método de extração por Soxhlet com hexano, obtiveram-se para o ensaio a 300 bar e 60 °C taxas de recuperação muito satisfatórias: 99,6% para os AGT, 101,2% para o ADH e 98,7% para os ácidos gordos para a produção de biodiesel.

Perfil de ácidos gordos das curvas de ESC

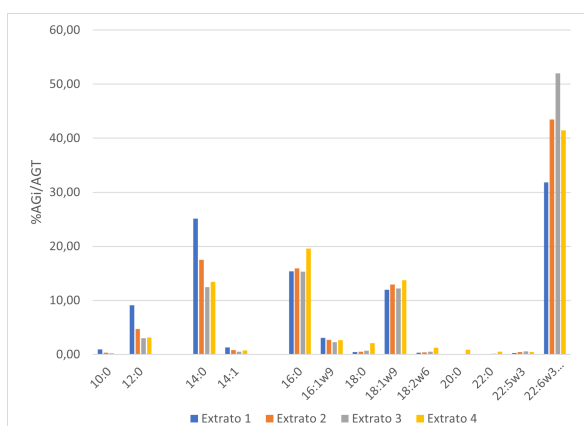
Para cada ensaio de extração supercrítica, a recolha dos 4 extratos ao longo do tempo permitiu analisar o perfil de ácidos gordos, de forma a avaliar a influência do tempo de extração na composição de cada um. Estes resultados são apresentados nos gráficos da figura 3.22.



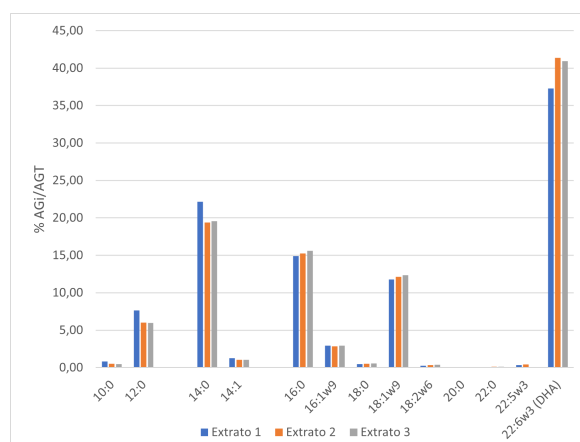
(a) Perfil de ácidos gordos dos 4 extratos recolhidos no ensaio a 130 bar e 41,3 °C.



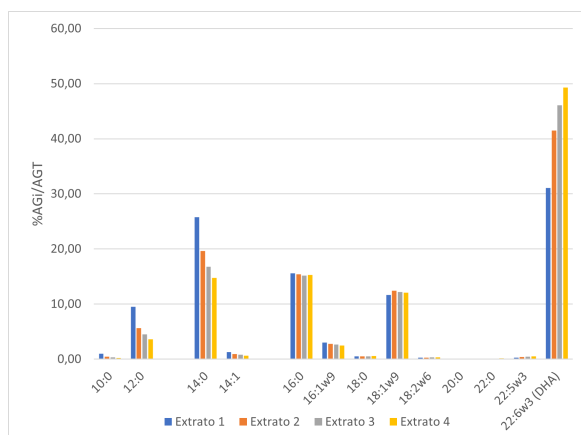
(b) Perfil de ácidos gordos dos 4 extratos recolhidos no ensaio a 187,5 bar e 41,3 °C.



(c) Perfil de ácidos gordos dos 4 extratos recolhidos no ensaio a 300 bar e 41,3 °C.



(d) Perfil de ácidos gordos dos 3 extratos recolhidos no ensaio a 380 bar e 41,3 °C.



(e) Perfil de ácidos gordos dos 4 extratos recolhidos no ensaio a 300 bar e 60 °C.

Figura 3.22: Representação gráfica da composição em ácidos gordos dos extratos recolhidos ao longo dos ensaios de ESC, como percentagem de AGT.

Observando os gráficos, conclui-se que os ácidos gordos saturados e monoinsaturados com cadeias mais curtas são extraídos na fase inicial da extração, diminuindo o seu teor relativo do extrato 1 para o extrato 4. Por outro lado, o teor de ADH aumenta ao longo do tempo de extração, estando em maiores percentagens nos extratos 3 e 4. O ADH, sendo um ácido poli-insaturado, está maioritariamente as-

sociado aos fosfolípidos da membrana celular, sendo extraído preferencialmente após a extração dos ácidos que se encontram no citoplasma.

É de notar também que, a pressões mais baixas (130 e 187,5 bar) os ácidos gordos mais curtos apresentam uma maior percentagem nos AGT, uma vez que o ADH não foi praticamente extraído nessas condições, como visto anteriormente. Nos outros três ensaios, o ADH é, em todos os extratos, o ácido gordo em maior abundância, atingindo uma percentagem de 50% nos AGT nos ensaios 2 e 4. Este facto comprova o aumento do poder de solubilização do ADH no dióxido de carbono com o aumento da pressão devido ao aumento de solubilidade, até 300 bar. Por outro lado, à pressão de 300 bar, o aumento de temperatura de 41,3 para 60 °C resulta também num aumento no rendimento dos AGT e do ADH. Neste caso, o aumento de temperatura resulta num aumento da pressão de vapor do soluto, o que facilita a passagem deste à fase fluida. Contrariamente aos lípidos totais a 300 bar, para os AGT e para o ADH o aumento de temperatura conduz a uma aumento do rendimento de extração. Destes resultados pode inferir-se que a pressão de inversão (ou pressão retrógada) para os lípidos totais será superior a 300 bar e para os ácidos gordos será inferior a 300 bar.

Finalmente, o perfil em ADH ao longo do tempo mostra que os óleos obtidos nos extratos 2, 3 e 4 dos ensaios a 300 bar e 41,3 °C e 60 °C e nos extratos 2 e 3 do ensaio a 380 bar e 41,3 °C, poderão ser adequados para a indústria farmacêutica, uma vez que são mais concentrados em ADH pois apresentam um teor relativo deste elevado, e conseqüentemente, a etapa posterior de purificação ficará mais simplificada.

Os extratos 1 e 2 dos ensaios a 41,3 °C e 130 e 187,5 bar, por serem ricos em ácidos gordos saturados e monoinsaturados e mais pobres em ADH, poderão ser interessantes para a produção de biodiesel após purificação devida.

3.3 Pigmentos

Todos os extratos lipídicos obtidos nos métodos por Soxhlet, ASE e ESC apresentavam uma tonalidade amarela alaranjada, que é tanto mais forte quanto maior a concentração de pigmentos. De forma a determiná-la, os extratos foram analisados por espectrofotometria UV/Visível, estando um espectro exemplificativo presente no anexo E.

3.3.1 Extração por Soxhlet

Foi realizada a extração pelo método convencional de Soxhlet, que servirá, tal como na extração dos lípidos, como método de comparação. Realizaram-se, em duplicado, ensaios com hexano, etanol e acetona, sendo os extratos analisados, bem como os cálculos de concentrações e rendimentos realizados, de acordo com o procedimento descrito em 2.4. Os resultados obtidos, expressos em equivalentes de β -caroteno encontram-se na tabela 3.13.

Tabela 3.13: Rendimentos (valor médio de duplicados) em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração por Soxhlet para os diferentes solventes estudados, em microgramas de pigmentos totais por grama de biomassa seca e sem cinzas.

Solvente	Rendimento em pigmentos totais
Hexano	72,30±0,78
Etanol	101,58±3,63
Acetona	79,74±1,52

Observando a tabela, conclui-se que o etanol é o solvente que permite extrair em maior quantidade os pigmentos da microalga *Cryptocodinium cohnii*, recuperando mais 41% que o hexano e 9% que a acetona. É, por isso, o solvente mais interessante a utilizar neste método para esse fim.

3.3.2 Extração por ASE

De seguida, foram analisados os extratos obtidos com o método de extração acelerada com solventes, de forma a analisar se este método "verde" seria uma alternativa eficiente ao método de soxhlet. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 3.14.

Tabela 3.14: Rendimento (média de duplicados) em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração acelerada para os diferentes solventes estudados, a 120 °C, com 2 ciclos de 3 minutos, em microgramas de pigmento por grama de biomassa seca e sem cinzas.

Solvente	Rendimento em pigmentos totais
Hexano	82,79
Etanol	83,90±3,20
Acetona	81,69±3,91
Hexano c/esferas	89,45±1,02

Analisando a tabela, é possível verificar que os resultados são semelhantes para os três solventes testados, concluindo-se que, para este método a 120 °C, os solventes apresentam o mesmo poder de solubilização dos pigmentos. É de notar também que, tal como na extração dos lípidos, a troca da terra diatomácea por esferas beneficia a extração dos pigmentos, aumentando o rendimento em 8%. Relativamente à extração por Soxhlet, verifica-se que o rendimento com hexano e acetona por ASE foi superior em 24% e 2%, respectivamente. Pelo contrário, a extração por ASE usando etanol permitiu recuperar apenas 83% dos pigmentos, comparativamente à extração por Soxhlet.

De forma a analisar se o tempo de extração influenciava a eficiência da extração, também os extratos dos ensaios preliminares foram avaliados, encontrando-se representados na tabela 3.15.

Tabela 3.15: Rendimento em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração acelerada com hexano, a 120°C e com 1 ciclo, em microgramas de pigmento por grama de biomassa seca e sem cinzas.

Tempo (min)	Rendimento em pigmentos totais
3	86,14
6	89,39
26	88,04

Através da tabela 3.15, é possível concluir que, utilizando hexano como solvente e a 120 °C, aumentar o tempo de 3 para 6 minutos eleva o rendimento em 4%. No entanto, um tempo de extração mais alto como 26 minutos não beneficia a extração dos pigmentos da *C. cohnii*.

Os extratos obtidos no âmbito do planeamento experimental foram também analisados. A tabela 3.16 resume o rendimento obtido (média do rendimento dos dois ensaios de repetição) para cada condição de temperatura e tempo, utilizando hexano como solvente.

Tabela 3.16: Rendimento (média das duas repetições na matriz experimental) em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração acelerada com hexano e 1 ciclo, para cada condição de temperatura e tempo de extração, em microgramas de pigmento por grama de biomassa seca e sem cinzas.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento em pigmentos totais
90	11	84,14±0,40
140	11	77,39±0,59
40	11	89,59±3,86
115	19	121,37±2,40
65	3	93,77±1,60
115	3	85,55±0,14
65	19	90,96±3,68

Observando a tabela, verifica-se que o maior rendimento foi obtido à temperatura de 115 °C e 19 minutos, representando uma recuperação em pigmentos 68% superior à conseguida pela extração por Soxhlet com hexano.

No entanto, observa-se que os resultados não apresentam uma tendência única de variação do rendimento com os parâmetros experimentais. Verifica-se que o maior rendimento foi obtido para a extração a 115 °C e 19 minutos, isto é, nas condições de maior tempo de extração, o aumento de

temperatura favoreceu a extração dos pigmentos. Mantendo o tempo de extração em 11 minutos, o aumento de temperatura de 40 para 140 °C resulta numa diminuição do rendimento de aproximadamente 13%. Da mesma forma, para o tempo de extração de 3 minutos, o aumento de temperatura de 65 para 115 °C conduz a uma diminuição de 8% no rendimento em pigmentos totais. Assim, pode inferir-se que, para tempos de extração mais baixos (3 e 11 minutos), o aumento de temperatura não terá um efeito muito significativo na extração dos pigmentos. Por outro lado, para um tempo de extração superior (19 minutos), o aumento de temperatura poderá favorecer a extração dos pigmentos.

Contudo, verifica-se que, mesmo o resultado mais baixo obtido é superior ao obtido pelo método de extração convencional por Soxhlet em 7%, concluindo-se que o método de ASE com hexano é uma alternativa ao método convencional de Soxhlet com o mesmo solvente.

Da mesma forma que o para o hexano, os extratos dos ensaios do planeamento experimental utilizando etanol como solvente foram analisados por espectrofotometria UV/Visível, estando os rendimentos obtidos presentes na tabela 3.17.

Tabela 3.17: Rendimento (média das duas repetições) em pigmentos totais obtidos nos ensaios de extração acelerada com etanol e 1 ciclo, para cada condição de temperatura e tempo de extração, em microgramas de pigmento por grama de biomassa seca e sem cinzas.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento em pigmentos totais
90	11	78,59±2,40
140	11	87,32±0,79
40	11	80,06±1,07
115	19	78,45±1,83
65	3	69,73±1,94
115	3	74,68±3,44
65	19	73,87±3,35

Analisando a tabela, verifica-se que, fixando a temperatura em 65 °C e aumentando o tempo de 3 para 19 minutos, o rendimento aumenta 4%, e fixando em 115 °C e aumentando o tempo da mesma forma, o rendimento aumenta 5%. Assim, pode concluir-se um aumento ligeiro do rendimento em pigmentos com o acréscimo do tempo de extração.

O valor mais elevado de rendimento foi para o extrato obtido à temperatura de 140 °C, a mais elevada do planeamento experimental, podendo induzir que os pigmentos têm maior solubilidade no etanol a temperaturas mais elevadas. No entanto, este valor (87,32 µg pigmentos totais/100 g biomassa seca e sem cinzas) é ainda inferior ao obtido com o método de Soxhlet com etanol, apresentando uma taxa de recuperação de pigmentos de 86%.

3.3.3 Extração por ESC

Por fim, foram analisados os 4 extratos recolhidos ao longo dos 5 ensaios de extração supercrítica, estando as curvas de extração relativas ao rendimento cumulativo em pigmentos representadas na figura 3.23.

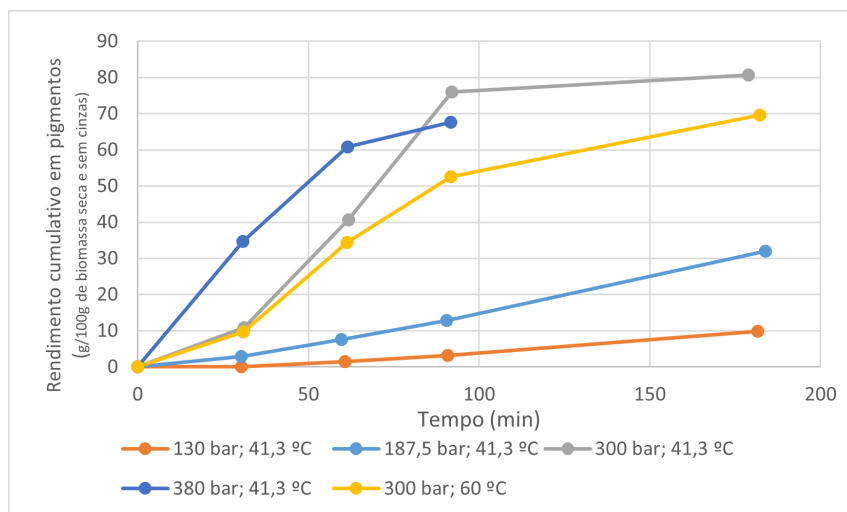


Figura 3.23: Rendimento cumulativo em pigmentos ao longo do tempo de extração, nas 5 condições de extração supercrítica realizadas.

Na figura 3.23 observa-se que, à temperatura fixa de 41,3 °C, aumentar a pressão de 130 para 187,5 bar, resulta num acréscimo em 227% do rendimento total de pigmentos. Aumentando para 300 bar, o rendimento em pigmentos aumenta 152% face à pressão de 187,5 bar, atingindo um valor de 80,64 $\mu\text{g pigmentos totais}/100 \text{ g biomassa seca e sem cinzas}$, sendo o resultado máximo obtido. Este valor apresenta, em relação à extração por Soxhlet, uma taxa de recuperação de 112%, revelando-se um resultado bastante satisfatório.

Verifica-se que, tal como nas curvas do rendimento cumulativo em lípidos, a 130 e 187,5 bar, as curvas do rendimento cumulativo em pigmentos apresentam uma variação linear, concluindo-se que as três horas de extração não foram suficientes para recuperar todos os pigmentos libertados pelas células fragmentadas.

É de notar que, nos primeiros 60 minutos, o rendimento obtido para a pressão de 380 bar é superior ao alcançado a 300 bar à mesma temperatura. Este resultado mostra que a cinética de extração de pigmentos é mais elevada a 380 bar, concluindo-se uma maior solubilidade dos pigmentos no dióxido de carbono a essa pressão. No entanto, a partir dos 90 minutos, observa-se um rendimento mais elevado para a pressão de 300 bar. Sendo esta etapa de extração limitada pela transferência de massa externa e interna, o aumento de pressão não favorece a extração, dado que a difusividade diminui com o aumento de pressão, e, portanto, a difusão interna é superior a pressões mais baixas, resultando num rendimento total superior.

Por fim, fixando a pressão a 300 bar, verifica-se uma diminuição em 19% do rendimento em pigmentos, quando se aumenta a temperatura de 41,3 para 60 °C. Este comportamento é semelhante ao verificado pelos lípidos nestas condições e está relacionado com a diminuição da densidade de solvente com o aumento de temperatura.

Com os resultados obtidos, conclui-se que a extração supercrítica é um método eficiente na recuperação dos pigmentos acumulados pela microalga *C. cohnii*, relevando-se uma boa alternativa ao método convencional de Soxhlet.

3.4 Estimativas dos parâmetros físicos da fração para biodiesel

Como mencionado em 2.5, procedeu-se à separação da fração para biodiesel do óleo extraído da biomassa produzida no ensaio I, através de um método de complexação com ureia. O perfil de ácidos gordos dessa fração encontra-se na figura 3.24.

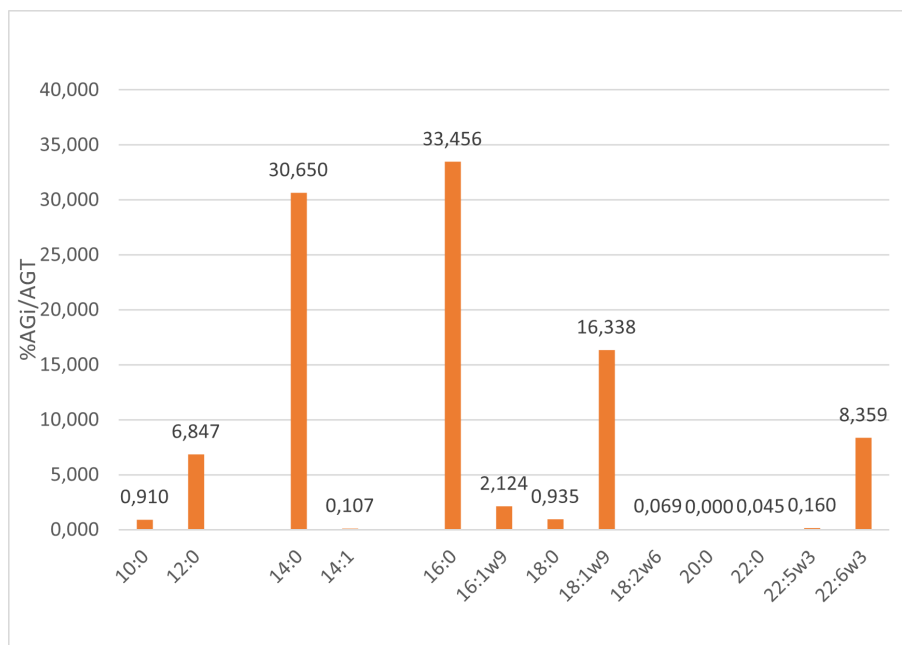


Figura 3.24: Perfil de ácidos gordos da fração obtida para biodiesel, da biomassa do ensaio I, após separação por complexação com ureia.

O método utilizado revelou-se bastante eficiente, na medida em se obteve uma fração rica em ácidos gordos saturados e monoinsaturados, particularmente nos ácidos mirístico (14:0), palmítico (16:0) e oléico (18:1 w-9). Para além disso, este processo teve a capacidade de reduzir a percentagem de ADH nos AGT de 51,60 (mencionada na tabela 3.1) para 8,359%.

De forma a avaliar-se se este óleo era apropriado para biodiesel, determinaram-se os parâmetros mencionados em 2.5, através do cálculo inicial da AU (*Average unsaturation*). O valor obtido para a AU foi de 0,68861 e os valores estimados para as propriedades apresentam-se na tabela 3.18.

Tabela 3.18: Valores obtidos para os parâmetros de biodiesel a partir do grau de saturação e sua comparação com os requeridos na norma Europeia EN 14214.

Propriedade	Valor obtido	Valor requerido no EN 14214
Viscosidade (mm ² /s)	4,77	3,5-5,0
Densidade relativa	0,876	0,86-0,9
Número de cetano	56,51	Mín. 51
Índice de iodo	63,92	Máx. 120

Observando a tabela 3.18, verifica-se que os 4 parâmetros estimados encontram-se dentro dos regulamentos estabelecidos. Deste modo, tendo em conta estas propriedades, prevê-se a possibilidade de utilizar o óleo obtido para a produção de biodiesel.

Capítulo 4

Conclusões e trabalho futuro

O presente trabalho tinha como principal objetivo produzir culturas de elevada concentração celular da microalga *Cryptocodinium cohnii*, com alto conteúdo de lípidos intracelulares, nomeadamente de ácido docosahexaenóico (ADH) e de ácidos gordos para a produção de biodiesel.

Realizaram-se três ensaios, num biorreator de bancada de 7 L operado em regime fed-batch com três fontes de carbono diferentes: glicose, melação de cana e glicerol bruto, sendo estes dois últimos subprodutos industriais. Assim, um dos objetivos deste estudo passava por avaliar a sua viabilidade como fontes de carbono de custo reduzido, resultando na diminuição dos custos do processo e favorecendo a sustentabilidade.

No ensaio I, em que se utilizou glicose como fonte de carbono, atingiu-se uma concentração final de biomassa de 18,7 g/L, com um teor de lípidos e de ADH de 16,8 e 7,0 % (m/m), respetivamente. No ensaio II utilizou-se melação de cana como fonte de carbono. Uma vez que este é constituído por sacarose e a estirpe de microalga utilizada (ATCC 30772) não a consome, foi necessário hidrolisar previamente o melação, em frutose e glicose. Contudo, no final da fermentação, verificou-se que a hidrólise foi incompleta, resultando numa concentração de glicose no meio muito reduzida ao longo de todo o ensaio. Para além disso, ocorreu uma contaminação por leveduras ao 4^o dia, sendo que estas apresentam uma taxa de crescimento específica muito superior à da microalga e consomem as três fontes de carbono que estavam presentes no meio (sacarose, glicose e frutose). Assim, esta fermentação teve de ser terminada antes do tempo previsto, a cultura não cresceu como pretendido e o teor de lípidos na biomassa final foi muito reduzido - 7,5% (m/m). Por fim, realizou-se um ensaio com glicerol bruto, que resultou numa concentração final de biomassa de 18,7 g/L, com um teor de lípidos e de ADH de 20,6 e 7,5% (m/m).

Assim, demonstrou-se que o glicerol bruto pode ser utilizado como uma alternativa à glicose, como fonte de carbono sustentável para o crescimento da microalga *Cryptocodinium cohnii*. Relativamente ao melação de cana, seria necessário assegurar uma hidrólise completa do mesmo e realizar uma nova fermentação utilizando este substrato. Tabora [39] realizou um ensaio de cultivo da *Cryptocodinium cohnii* num *Erlenmeyer*, usando melação de cana totalmente hidrolisado como fonte de carbono, obtendo um teor máximo de AGT e ADH de 17,1 e 9,4%. Estes resultados demonstram que a microalga cresce

na presença de glicose proveniente do melaço. Contudo, neste estudo, as condições de cultivo eram distintas. Desta forma, uma nova fermentação num biorreator operado em regime fed-batch utilizando melaço totalmente hidrolisado poderá ser desenvolvida, para avaliar se este é de facto uma fonte de carbono promissora.

No ensaio III, apesar de se ter atingido uma elevada concentração final de biomassa, este não foi o valor mais elevado em toda a fermentação. 20 horas antes de se ter terminado a fermentação, a biomassa atingiu uma concentração máxima de 19,5 g/L. Nesse momento, analisou-se a concentração de glicerol no meio por um método de deteção rápida, tendo-se obtido um valor baixo de glicerol residual. No entanto, após ter-se terminado a fermentação, a amostra analisada por HPLC demonstrou que a concentração de glicerol no meio era suficiente para que a microalga continuasse a produzir lípidos (18,5 g/L). Assim, adicionou-se um pulso que resultou numa concentração excessiva de fonte de carbono no meio e, conseqüentemente, a biomassa não cresceu por inibição pelo substrato. Considera-se por isso que, uma possível abordagem de trabalho futuro será uma optimização na utilização deste kit de glicerol, ou, se se confirmar pouco rigoroso, a procura de outra alternativa.

Posteriormente, utilizou-se a biomassa obtida no ensaio III, dado que foi a mais rica em lípidos, para estudar técnicas de extração lipídica mais verdes e ambientalmente sustentáveis.

Inicialmente, realizaram-se extrações através do método tradicional de Soxhlet, de forma a servir como processo de referência para quantificação lipídica. De seguida, foram testados os métodos de extração acelerada com solventes (ASE) e extração supercrítica (ESC).

No estudo da técnica de ASE, procedeu-se à variação da temperatura e tempo de extração, de forma a identificar as condições operatórias que maximizam os rendimentos de extração de lípidos, ácidos gordos totais, ADH e ácidos gordos dirigidos para a produção de biodiesel. Para esse efeito, recorreu-se a um planeamento experimental com base numa superfície de resposta e de acordo com a distribuição de dois fatores de Doehlert. Este estudo foi realizado para dois solventes de polaridades distintas, hexano e etanol, de forma a avaliar o seu efeito na extração. Esta abordagem permitiu concluir que, utilizando hexano como solvente, a extração acelerada com solventes beneficia de temperaturas mais baixas (40-45 °C) e tempos de extração mais elevados (13-19 minutos) para maximizar o rendimento em lípidos totais. Relativamente aos AGT, ADH e AG para produção de biodiesel, a maximização do seu rendimento beneficia de temperaturas na mesma gama, no entanto, não necessita de tempos de extração elevados, apresentando um rendimento máximo no intervalo de 2-12 minutos. Verificou-se também que, para o rendimento em lípidos, a interação entre os dois fatores não apresenta uma influência significativa na resposta como a variação de cada fator individualmente. Já para os rendimentos em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel, a interação é elevada e os fatores devem ser controlados em simultâneo durante o processo, de forma a garantir uma recuperação eficiente. Ao comparar este processo com o método convencional de Soxhlet com hexano, conclui-se que em todas as condições foi possível obter rendimentos superiores, relevando-se num método muito promissor.

Relativamente ao etanol, apenas se avaliou os rendimentos em AGT, ADH E AG para a produção de biodiesel, uma vez que, devido à sua polaridade, tem o poder de extrair outros compostos como hidratos de carbono e proteínas, resultando num extrato lipídico não puro. Assim, não foi possível

quantificar os lípidos extraídos, sendo necessária uma purificação. Sugere-se então, como trabalho futuro, uma otimização na purificação dos extratos obtidos com etanol, de forma a avaliar o potencial deste solvente na extração de lípidos de microalgas através do método ASE. O planejamento experimental permitiu concluir que utilizando etanol como solvente, a variação do tempo de extração provoca um maior aumento do rendimento em AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel do que o aumento da temperatura, sendo que com tempos intermédios (10-15 minutos) e uma temperatura mínima de 60 °C, o rendimento é máximo. Verificou-se que, apesar da interação entre o tempo de extração e a temperatura não ser tão significativa como a variação individual de cada um dos fatores, esta não deve ser desprezada e devem ser controlados em simultâneo para se atingir o máximo de produção. Comparativamente ao método de Soxhlet com etanol, apesar de não se ter atingido rendimentos tão elevados, a taxa de recuperação foi alta (87%). Apesar de não se revelar um solvente tão eficiente como o hexano nesta técnica, também se considera um solvente com potencial utilização neste método.

Os ensaios de ESC realizados permitiram concluir que, na gama de temperatura de trabalho (41,3-60 °C), que correspondem a valores baixos/moderados, e pressões mais elevadas (300-380 bar), o rendimentos em lípidos, AGT, ADH e AG para a produção de biodiesel são elevados. Em particular, na condição de 300 bar e 41,3 °C o rendimento em lípidos é superior ao obtido na extração por Soxhlet, e a 300 bar e 60 °C o rendimento em AGT, ADH e AG para produção de biodiesel é superior aos obtidos na extração por Soxhlet. Estas conclusões revelam-se bastante positivas na medida em que este método apresenta vantagens a nível ambiental.

Comparou-se também a concentração de pigmentos no óleo extraído nos três métodos. Foi possível concluir que, os métodos de ASE e ESC, para além de serem eficientes na extração de lípidos, também apresentam um elevado poder de extração dos pigmentos sintetizados pela *C. cohnii*.

Finalmente, estimou-se parâmetros físicos da fração para biodiesel da biomassa obtida no ensaio I e confirmou-se que estavam de acordo os limites estipulados pela norma Europeia, o que prevê a possibilidade de utilizar esta microalga como fonte de ácidos gordos para produção de biodiesel, para além de fonte de ADH.

Bibliografia

- [1] C.A.Beam and M. Himes. Distribution of members of the crypthecodinium cohnii (dynophyceae) species complex. *J. Protozool*, 29(1), 1982.
- [2] T.Lopes and C. Silva. The dark side of microalgae biotechnology: a heterotrophic biorefinery platform directed to w-3 rich lipid production. *Microorganisms*, 7, 2019.
- [3] D. Pleinssner and N. T. Eriksen. Effects of phosphorous, nitrogen and carbon limitation on biomass composition in batch and continuous flow cultures of the heterotrophic dinoflagellate crypthecodinium cohnii. *Biotechnol. Bioeng*, 109, 2012.
- [4] C. Rattledge. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 2004.
- [5] R. Henderson, J. W. Leftley, and R. Sargent. Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate crypthecodinium cohnii. *Elsevier*, 27(6), 1988.
- [6] Y. Jiang, F. Chen, and S. Liang. Production potential of docosahexanoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate crypthecodinium cohnii. *Elsevier*, 34(6-7):633–637, 1999.
- [7] A. R. A. Mendes and R. Vasconcelos. Crypthecodinium cohnii with emphasis on dha production: a review. *J.Appl.Phycol.*, 21, 2008.
- [8] M. D. Swaaf, J. Pronk, and L. Sijtsma. Fed-batch cultivation of the docosahexanoic acid producing marine alga crypthecodinium cohnii on ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(1):40–43, 2003.
- [9] W. Safdar, M. Shamoan, X. Zan, J. Haider, H. Sharif, M. Shoaib, and Y. Song. Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of crypthecodinium cohnii under different nitrogen source and concentration. *AMB Express*, 7:85, 2017.
- [10] W. Safdar, Y. Song, and X. Zan. Synergistic effects of pH, temperature and agitation on growth kinetics. *International Journal of Research in Agricultural Sciences*, 4, 2017.
- [11] A. Mendes, P. Guerra, V. Madeira, F. Ruano, T. L. da Silva, and A. Reis. Study of docosahexanoic acid production by the heterotrophic microalga crypthecodinium cohnii ccmp 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:109–121, 2007.

- [12] M. Isleten-Hosoglu and M. Elibol. Bioutilization of cheese whey and corn steep liquor by heterotrophic microalgae *Cryptocodinium cohnii* for biomass and lipid production. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, pages 233–241, 2017.
- [13] Y.Gong, J. Liu, M. Jiang, Z. Liang, H. Jin, and X. Hu. Improvement of omega-3 docosahexanoic acid production by marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* using rapeseed meal hydrolysate and waste molasses as feedstock. *PLoS ONE*, 10, 2015.
- [14] M.Isleten and M. Elibol. Improvement of medium composition and cultivation conditions for growth and lipid production by *Cryptocodinium cohnii*. *Romanian Biotechnological Letters*, 22, 2017.
- [15] A. Metherel, A. Domenichiello, A. Kitson, and R.P.Bazinet. Biochimica et biophysica acta whole-body dha synthesis-secretion kinetics from plasma eicosapentaenoic acid and alpha-linolenic acid in the free-living rat. *BBA-Mol. Cell Biol. Lipids*, 1861:997–1004, 2016.
- [16] United states department of agriculture, 2005. Disponível em: http://health.gov/dietaryguidelines/dga2005/report/HTML/table_g2_adda2.htm, . [Consultado a: Março/2022].
- [17] L.Horrocks and K. Yeo. 'health benefits of docosahexaenoic acid (dha). *Pharmacological research*, 40:211–225, 1999.
- [18] Food and drug administration, 10 6 2014. Disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm397443.htm>, . [Consultado a: Março/2022].
- [19] A. Hassan. Prescription omega-3 fatty acid products: considerations for patients with diabetes mellitus. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. targets Ther.*, 9:109–118, 2016.
- [20] Y. M. et al. The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementations on anti-tumor drugs in triple negative breast cancer the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementations on anti-tumor drugs in triple negative breast cancer. *Nutr. Cancer*, pages 1–10, 2020.
- [21] T. Sanders. Dha status of vegetarians. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81: 137–141, 2009.
- [22] M. Sprague, G. Xu, M. Betancor, R.E.Olsen, and D. Tocher. Endogenous production of n-3 long-chain pufa from first feeding and the influence of dietary linoleic acid and alfa-linolenic:linoleic ratio in atlantic salmon (*salmo salar*). *Br. J. Nutr.*, 122:1091–1102, 2019.
- [23] F. Industries. Microalgae n-3 pufas production and use in food and feed industries. *Marine Drugs*, 19:1–29, 2021.
- [24] P. C. Calder. Docosahexanoic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69:8–21, 2016.
- [25] A. Atabani, A.S.Silitonga, I.Anjum, T.M.I.Mahlia, H.H.Masjuki, and S.Mekhilef. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 16:2070–2093, 2012.

- [26] S.N.Naik, V. Goud, P.K.Rout, and A.K.Dalai. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *14:578–597*, 2010.
- [27] B.R.Moser. Biodiesel production, properties and feedstocks. *Vitr. Cell. Dev. Biol-Plant*, 45:229–266, 2009.
- [28] D.Singh, D.Sharma, S.L.Soni, S.Sharma, P. Sharma, and A.Jhalani. A review on feedstocks, production processes and yield for different generations of biodiesel. *Fuel*, 262, 2020.
- [29] D.P.Ho, H.H.Ngo, and W. Guo. A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresour Technol.*, 169:742–749, 2014.
- [30] Y. Chisti. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25:294–306, 2007.
- [31] X.Meng, J. Yang, X.Xu, L. Zhang, Q.Nie, and M.Xian. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Elsevier*, 34:1–5, 2009.
- [32] CEN. Automotive fuels - fatty acid methyl esters (fame) for diesel engines - requirements and test methods. 2010.
- [33] C. Graça. Determinação do índice de iodo a partir da composição dos óleos. Master's thesis, Universidade de aveiro, 2010.
- [34] M. e K.Heimann e R.J.Brown. Microalgae biodiesel: current status and future needs for engine performance and emissions. *Renew. Sustain. Energy Rev*, 79:1160–1170, 2017.
- [35] Keep molasses for bioenergy and bio-based products. Disponível em: <http://www.sustainablesugar.eu/molasses>, . [Consultado a: Abril/2022].
- [36] A. e D. Kammen. Molasses for ethanol: the economic and environmental impacts of a new pathway for the lifecycle greenhouse gas analysis of sugarcane ethanol. *Environmental Research Letters*, page 5, 2009.
- [37] J. N.-R. e M. Guzik e S. Kenny e R. Babu. Carbon-rich wastes as feedstocks for biodegradable polymer production using bacteria. *Advances in applied microbiology*, pages 139–200, 2013.
- [38] M. e L. Sijtsma e J.T.Pronk. High cell density fed batch cultivation of the dha producing marine algae *Cryptocodinium cohnii*. *Biotechnol.Bioeng.*, pages 666–672, 2003.
- [39] T. Taborda. Using low cost carbon sources for the production of biodiesel and omega-3 lipids from the heterotrophic microalgae *Cryptocodinium cohnii*. Master's thesis, Instituto superior técnico, 2019.
- [40] Glycerin market report, march 2021. Disponível em: <http://www.hbint.com/datas/media/6058c0f45e3e8833fb39340b/sample-quarterly-glycerine-2.pdf>, . [Consultado a: Abril/2022].
- [41] F. Y. e M. Hanna e R. Sun. Value-added uses for crude glycerol, a by product of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 2012.

- [42] S. H. e X. Luo e C. Wan e Y.Li. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, pages 5915–5921, 2012.
- [43] D. F. e N. Valentinyi e L.Rasz e P.Mizsey. Evaluation of microalgae-based biorefinery alternatives. *Clean Technol.Environ.Policy*, pages 501–5015, 2016.
- [44] T. da Silva e J.C Roseiro e A.Reis. Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial fuels production processes. *Trends Biotechnology*, pages 225–232, 2012.
- [45] T. da Silva e A.Reis. The use of multi-parameter flow cytometry to study the impact of n-dodecane additions to marine dinoflagellate microalga *Cryptocodinium cohnii* batch fermentations and dha production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, pages 875–887, 2008.
- [46] M. e M.Herrero e C.Quirós. Flow cytometry: A high-throughput technique for microbial bioprocess characterization. *Elsevier*, 2011.
- [47] A citometria de fluxo de células de sistemas de informação. Disponível em: <https://www.gratispng.com/png-im2ewi/>, . [Consultado a: Março/2022].
- [48] M. M. e S.D Sarker. Accelerated solvent extraction for natural products isolation. *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*, 864:75–87, 2012.
- [49] C. Blanco-Llamero and F. J. Señoráns. Biobased solvents for pressurized liquid extraction of nanochloropsis gaditana omega-3 lipids. *Marine drugs*, 19:1–14, 2021.
- [50] Y. T. e R.J.N.Zhang e N.Sharif. Efficient lipid extraction and quantification of fatty acids from algal biomass using accelerated solvent extraction (ase). *RSC Advances*, 6:127–134, 2016.
- [51] I. Efthymiopoulos, P. Hellier, N. Ladommatos, A. E. 1, and B. Mills-Lamprey. Factors affecting the efficiency of pressurized solvent extraction of oil from spent coffee grounds. *Detritus*, pages 1–9, 2019.
- [52] L. Jaime, I. Rodriguez-Meizoso, A. Cifuentes, S. Santoyo, S. Suarez, E. Ibanez, and F. J. Senorans. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from haematococcus pluvialis microalgae. *Elsevier*, 43:105–112, 2010.
- [53] M. F. Montenegro-Landívar, P. Tapia-Quiros, X. Vecino, M. Reig, C. Valderrama, M. Granados, J. L. Cortina, and J. Saurina. Fruit and vegetable processing wastes as natural sources of antioxidant-rich extracts: Evaluation of advanced extraction technologies by surface response methodology. *Elsevier*, pages 1–10, 2021.
- [54] F. J. S. Natalia Castejón. Simultaneous extraction and fractionation of omega-3 acylglycerols and glycolipids from wet microalgal biomass of nanochloropsis gaditana using pressurized liquids. *Elsevier*, 37:74–82, 2019.
- [55] S. J. e G. Ferrari e K. Velicov e F. Donsi. High-pressure homogenization treatment to recover bioactive compounds from tomato peels. *Elsevier*, 262:170–180, 2019.

- [56] Q. Li, R. Kamal, Y. Chu, Q. Wang, X. Yu, and Q. Huang. Automated pressurized liquid extraction of microbial lipids from oleaginous yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192:283–295, 2020.
- [57] T. J. Bruno, C. N. de Castro, J.-F. P. Hamel, and A. M. Palvra. Supercritical fluid extraction of biological products. *Recovery Processes for Biological Materials*, pages 302–353, 1993.
- [58] L. C. e C. Turner. Supercritical fluids and gas-expanded liquids. *The Application of green solvents in separation processes*, pages 155–214, 2017.
- [59] R. M. C. e Pedro Calado Simões e Alberto Reis e Teresa Lopes da Silva e Vitor Hugo Martins e Yolanda Sanchez Vicente. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptothecoidinium cohnii*. *Eng. Life Sci.*, 10:158–164, 2010.
- [60] H. L. e E. Filho. Estudo do dióxido de carbono operando como fluido supercrítico refrigerante em sistemas de refrigeração. Master's thesis, Universidade federal de Uberlândia.
- [61] P. e R. Armenta. Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, pages 539–547, 2011.
- [62] Y. e B. Schuur e S. R. A. Kersten e D. W. F. Brilman. Opportunities for switchable solvents for lipid extraction from wet algal biomass: An energy evaluation. *Algal Research*, pages 271–283, 2015.
- [63] F. M. S. M. M. C. A. R. M. L. Gouveia, B. P. Nobre. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Elsevier*, pages 717–723, 2006.
- [64] S. e H. Wang e S. Tian. Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*, pages 44–49, 2011.
- [65] A. F. P. Rui L. Mendes, Alberto D. Reis. Supercritical CO₂ extraction of α -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. *Elsevier*, pages 57–63, 2006.
- [66] J. C. e J. K. Wang e Q. Chien. Biodiesel production from microalgae through supercritical carbon. *Journal of the Japan Institute of Energy*, pages 369–373, 2011.
- [67] B. e 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*, pages 763–771, 2009.
- [68] R. e H. L. Fernandes e J. M. Novais. Supercritical carbon dioxide extraction of hydrocarbons from the microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*, pages 289–293, 1995.
- [69] W. E. Federation. 4500-norg nitrogen (organic). *Stand. Methods Exam. Water Wasterwater*, pages 130–135, 1999.
- [70] D. H. Doehlert. Uniform shell designs. *Journal of the Royal statistical society series*, pages 231–239, 1970.

- [71] S. e S.L.Morgan. *Experimental design: a chemometric approach*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987.
- [72] N. D. e H.Smith. *Applied regression analysis*. Nova Iorque: John Wiley Sons, 1966.
- [73] K.S.Rowan. *Photosynthetic Pigment of Algae*. Cambridge university press, 1989.
- [74] R. G. e. A. R. T. Lopes da Silva, A.R. Santos. Valorizing fish canning industry by-products to produce ω -3 compounds and biodiesel. *Environmental Technology Innovation*, pages 74–81, 2018.
- [75] S. kongruang e S. Roytrakul e M. Syriariyann. Renewable biodiesel production from oleaginous yeast biomass using industrial wastes. *Edp science*, 2020.
- [76] W. H. e Jon Hansen e Ray Gladue e Crystal Wojnar. The sensitivity of the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* to transient hydrodynamic forces and cell-bubble interactions. *Biotechnology Progress*, 23:1355–362, 2019.
- [77] M. D. Swaaf. Docosahexanoic acid production by the marine algae *Cryptocodinium cohnii*. *Delft Univ. Press*, pages 1–136, 2003.
- [78] E. Daio. Biodiesel and omega-3 lipids production from the marine microalgae *Cryptocodinium cohnii*. Master's thesis, Instituto superior técnico, 2021.
- [79] M. Bento. Fracionamento do óleo extraído da microalga marinha *Cryptocodinium cohnii* para obtenção de biocombustíveis e compostos ω -3 (adh). Master's thesis, Instituto superior técnico, 2022.
- [80] F. C. e M. R. Johns. Effect of c/n ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.*, 25:203–209, 1991.

Apêndice A

Reagentes e solventes

Tabela A.1: Reagentes químicos e solventes utilizados neste trabalho.

Nome	Fórmula química	Pureza (%)	Marca	Aplicação
Sal marinho	-	-	OceanusIberia	Meio de cultura
Extrato de levedura	-	-	HiMedia	Meio de cultura
Extrato de milho	-	-	COPAM	Meio de cultura
Glicerol bruto	-	-	Iberol	Meio de cultura
D-Glucose, anidro	$C_6H_{12}O_6$	99.5	Pronolab	Meio de cultura
Cloranfenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	-	USB	Meio de cultura
Penicilina	$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$	-	AlfaAesar	Meio de cultura
Sulfato de streptomicina	$(C_{21}H_{39}N_7O_{12})_{22} \cdot 3H_2SO_4$	-	PanReac	Meio de cultura
Hidróxido de Sódio	NaOH	-	José M.Vaz Pereira, S.A.	Meio de cultura e azoto residual
Ácido clorídrico	HCl	-	Merck	Meio de cultura e azoto residual
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	97.0	Merck	HPLC e azoto residual
Ácido bórico	H_3BO_3	98.8	Merck	Azoto residual
CFDA	$C_{29}H_{19}NO_{11}$	-	Life Technologies	Citometria de fluxo
Iodeto de propídio	$C_{27}H_{34}I_2N_4$	-	Life Technologies	Citometria de fluxo
Metanol	CH_3OH	99.8	Merck	Análise de ácidos gordos
Cloreto de acetilo	C_2H_3ClO	98.5	Panreac	Análise de ácidos gordos
Ácido heptadecanóico	$C_{17}H_{34}O_2$	-	Nu-Check-Prep	Análise de ácidos gordos
N-heptano	C_7H_{16}	99.0	Fisher Chemical	Análise de ácidos gordos
Sulfato de sódio anidro	Na_2SO_4	99.0	Merck	Análise de ácidos gordos
N-Hexano	C_6H_{14}	95	Fisher Chemical	Soxhlet; ASE; ESC
Dióxido de carbono	CO_2	99.998	Air Liquide	ESC
Acetona	C_3H_6O	99,5	Sigma Aldrich	Soxhlet; ASE
Etanol absoluto anidro	C_2H_5OH	99,9	Group Carlo Erba	Soxhlet; ASE

Apêndice B

Equações utilizadas na ESC

B.1 Cálculo do volume de dióxido de carbono corrigido

Para determinar o volume de dióxido de carbono corrigido para as condições PTN utilizado em cada medida recorreu-se à equação B.1, onde δV corresponde ao volume de dióxido de carbono que passou pelo contador nas condições do trabalho, $T_{contador}$ à temperatura de saída do dióxido de carbono do contador e $P_{gas,contador}$ à pressão de saída do mesmo.

$$V_{corrigido,PTN} = \Delta V \times \frac{P_{gas,contador}}{760} \times \frac{273,15}{T_{contador}} \quad (B.1)$$

B.2 Cálculo da pressão do gás à saída do contador

A equação B.2 foi utilizada para calcular a pressão do dióxido de carbono à saída do contador. P_{atm} corresponde à pressão atmosférica lida no barómetro, $C_{p,atm}$ à correção da pressão atmosférica para 273,15 K (que varia com a pressão atmosférica e a temperatura ambiente), δh à altura de água do tubo no copo exterior e $P_{sat,Tcontador,H_2O}$ à pressão de saturação da água à temperatura de saída do gás no contador. O valor de 13,6 converte mmH₂O em mmHg, uma vez que é a densidade do mercúrio.

$$P_{gas,contador} = (P_{atm} - C_{p,atm}) + \frac{\Delta h}{13,6} - P_{H_2O}^{sat,Tcontador} \quad (B.2)$$

Apêndice C

Fotografias do microscópio

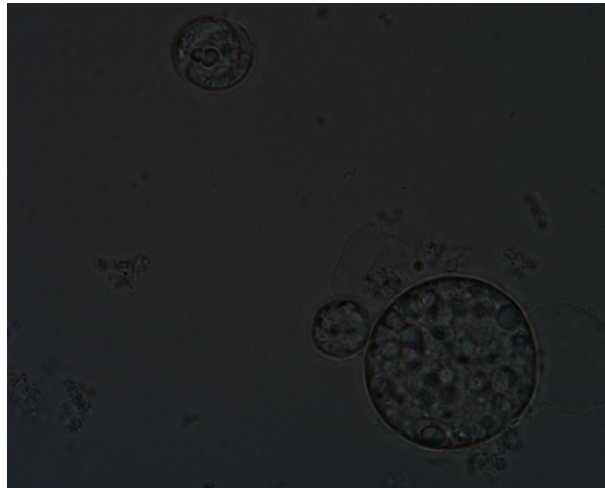


Figura C.1: Fotografia microscópica da *Crypthecodinium cohnii*, obtida no ensaio II deste estudo, ao 3^o dia de fermentação, com ampliação x1000.

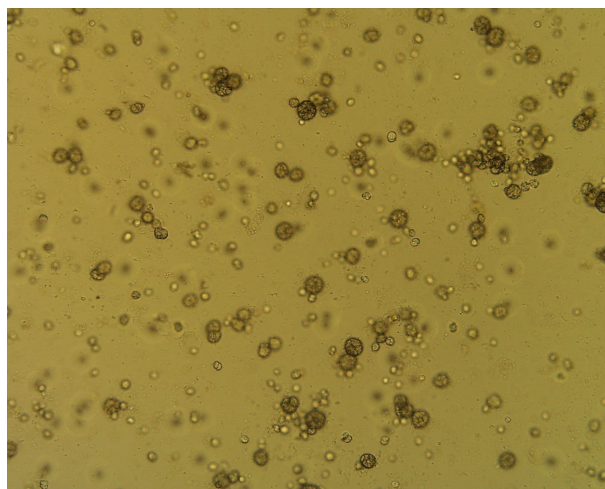


Figura C.2: Fotografia microscópica da *Crypthecodinium cohnii*, obtida no ensaio II deste estudo, ao 3^o dia de fermentação, com ampliação x100.

Apêndice D

Fotografia da contaminação

Na figura D.1 é possível observar a contaminação com levedura no ensaio II, após centrifugação da biomassa final. A camada laranja corresponde a biomassa da *C. cohnii* e a camada vermelha a biomassa de levedura contaminante.

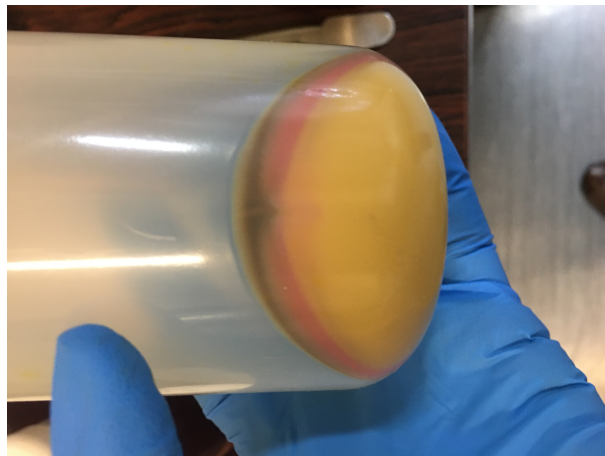


Figura D.1: Fotografia da biomassa do ensaio II contaminada com leveduras, após centrifugação.

Apêndice E

Análise dos pigmentos - espectro do extrato lipídico

Na figura E.1 observa-se o espectro do extrato lipídico obtido na extração acelerada com hexano, com dois ciclos estáticos, cada um com 3 minutos, ilustrando-se o tipo de espectros obtidos na análise de todos os extratos que se recolheu, tanto no ASE, como no soxhlet e ESC. Na figura E.2 representa-se o espectro da solução padrão de β -caroteno em hexano, confirmando que no espectro do extrato está presente o pico do mesmo ao comprimento de onda máximo de absorção de 450 nm.

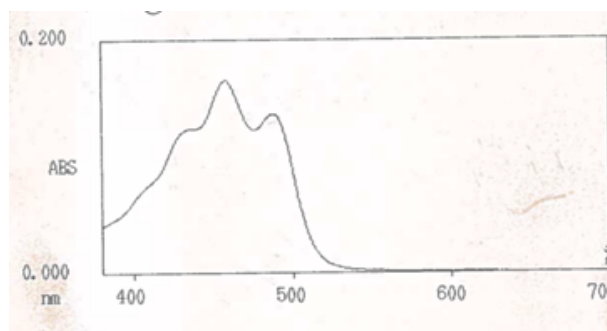


Figura E.1: Espectro do extrato lipídico obtido por ASE com hexano.

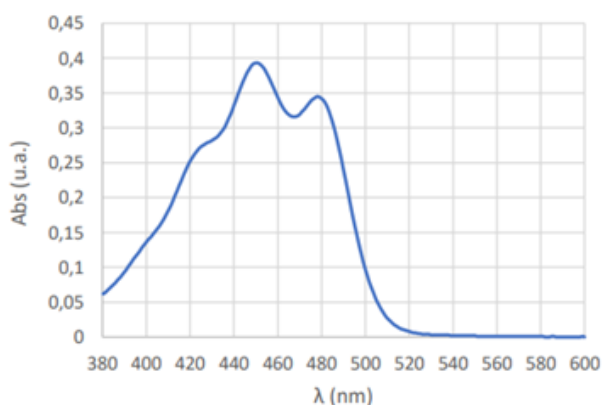


Figura E.2: Espectro da solução padrão do β -caroteno em hexano.