

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA E DO ÓLEO DA  
MICROALGA *Desmodesmus sp.* USANDO DIÓXIDO DE CARBONO  
SUPERCRÍTICO**

**ANA LUCIA BARBOSA DE SOUZA**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA E DO ÓLEO DA  
MICROALGA *Desmodesmus sp.* USANDO DIÓXIDO DE CARBONO  
SUPERCRÍTICO**

**ANA LUCIA BARBOSA DE SOUZA**

*Sob a Orientação da Professora Dr<sup>a</sup>.*

**Marisa Fernandes Mendes**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência em Engenharia Química, Área de concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2015

661

S729e

T

Souza, Ana Lucia Barbosa de, 1988-  
Extração e caracterização da biomassa e  
do óleo da microalga *Desmodesmus* sp. usando  
dióxido de carbono supercrítico / Ana Lucia  
Barbosa de Souza. - 2015.  
42 f.: il.

Orientador: Marisa Fernandes Mendes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia Química, 2015.  
Bibliografia: f. 43-52.

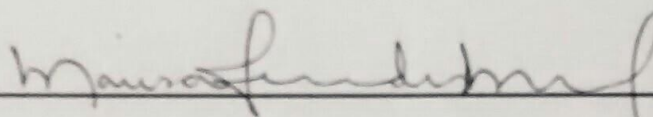
1. Tecnologia química - Teses. 2.  
Microalga - Composição - Teses. 3.  
Extração com fluido supercrítico - Teses.  
4. Dióxido de carbono - Teses. I. Mendes,  
Marisa Fernandes, 1972- II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia Química. III.  
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

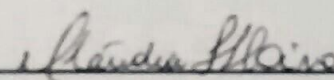
ANA LUCIA BARBOSA DE SOUZA

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química

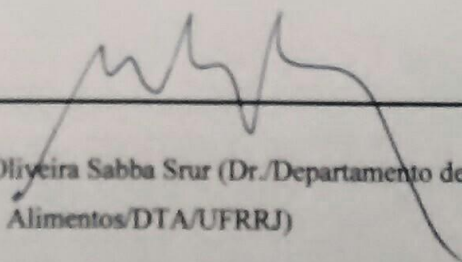
DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 23/02/15



Prof.<sup>a</sup>. Marisa Fernandes Mendes (Dr.<sup>a</sup>/ Departamento de Engenharia Química/TT/UFRRJ) (Orientadora e Presidente)



Prof.<sup>a</sup>. Cláudia Ferreira da Silva Lório (Dr.<sup>a</sup>/IFRJ)



Prof. Armando Ubirajara de Oliveira Sabba Srur (Dr./Departamento de Engenharia de Alimentos/DTA/UFRRJ)

*Dedico esta dissertação ao meu “quarteto fantástico”, a dupla que me motiva a ser uma pessoa melhor, minha filha Sarah e ao meu esposo Rafael e aos meus exemplos de vida e coragem, minha mãe Josefa e a minha sogra Denise.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre iluminou meus caminhos e nunca me deixou desistir por mais difíceis que eles sejam.

À toda minha família, mais uma vez a minha filha Sarah, meu esposo Rafa, a minha mãe Josefa e a minha sogra Denise, que sempre me apoiaram e me ajudaram a vencer mais uma etapa da minha vida. Em especial as minhas irmãs, Aline, Alice e Juju e aos meus queridos cunhados Bruno, Rodrigo, Raquel pelo amor, incentivo, carinho e compreensão nos meus momentos de ausência.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marisa Fernandes Mendes, pela orientação, paciência e dedicação. Suas palavras realmente me fizeram acreditar e me ensinaram que sim, eu podia chegar onde estou e ir além! Agradeço pela amizade e por me proporcionar e auxiliar em tantos momentos fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todo o corpo técnico do Instituto de Tecnologia da UFRRJ que ajudou na realização deste trabalho, em especial o amigo Luizão, que sempre me salvou diversas vezes.

À Banca examinadora, Prof. Dr. Armando Ubirajara de Oliveira Sabaa Srur e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Ferreira da Silva Lírio e à banca de seminários, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Hess, Prof. Dr. Luís Américo Calçada e Prof. Dr. Paulo Jansen pela leitura, correções e sugestões.

Ao Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner, do Laboratório de Cultivos de Algas, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela biomassa doada e pela atenção.

Ao Laboratório de Pesquisas em Frutas e Hortaliças no Instituto de Nutrição, em especial ao Prof. Sabaa, Elaine e Mariana por me auxiliarem nas análises da composição química.

Ao Laboratório de Controle Bromatológico e Microscópico, em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Ribeiro Leite Moura e a Paula Bastos, pela ajuda na realização das análises de proteínas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Nora, do Laboratório Química Orgânica, Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela grande ajuda nas análises cromatográficas.

Aos amigos do mestrado, Carlinha (amiga de uma vida!), Diego, Carlos, Vinícius, Andrew, Camila Souza e Leandro. E em especial à Camilinha, “my frienda mineira”, pelo abrigo, risadas, choros e madrugadas pensando neste dia e a Cris Leal, “minha toddynho”, por nossas aventuras e sempre rir e chorar “dan-dan, dançando”. Cada um de um modo especial contribuiu para a realização deste trabalho. Obrigada a todos pela amizade!

Ao grupo do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis, em especial Murilo, Dani, Matheus e Cris Pereira, com os quais tive o grande prazer de trabalhar e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas do Instituto Nacional de Tecnologia, Marcinha, Sabrinella e Nati, pela torcida e pela ajuda diversas vezes.

À FAPERJ, pelo apoio financeiro para a montagem da unidade de extração com fluido supercrítico. À CAPES, pela bolsa concedida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade.

A todos que, de alguma forma, direta ou indireta, colaboraram na realização deste trabalho e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer o meu agradecimento.

“Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la. Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes. Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo. Só é digno de sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la. Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência. Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina, pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas. Seja um debatedor de idéias. Lute pelo que você ama.”

*(Augusto Cury)*

## RESUMO

SOUZA, Ana Lucia Barbosa de. **Extração e caracterização da biomassa e do óleo da microalga *Desmodesmus sp.* usando dióxido de carbono supercrítico.** 52 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A utilização de fluidos supercríticos na extração de produtos naturais tem se mostrado uma alternativa viável e promissora em relações aos métodos convencionais. Devido às características da extração supercrítica, que permitem a obtenção de produtos de melhor qualidade e sem resíduos químicos, por isso essa técnica de extração vem sendo muito utilizada na obtenção de moléculas bioativas a partir de microalgas, que se destaca por apresentar antioxidantes, fibras, fitoesteróis, nutrientes, entre outros. O presente trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade técnica da extração supercrítica do óleo da microalga *Desmodesmus sp.*, empregando-se dióxido de carbono como solvente. Foi utilizado método convencional, soxhlet com hexano como solvente, a fim de comparar com a extração supercrítica e os resultados mostraram a eficiência e seletividade da extração supercrítica quanto à concentração de ácidos graxos. Os melhores rendimentos em óleo foram nas condições operacionais de 300 bar e 100°C, 500 bar e 70°C e 440 bar e 90°C, alcançando valores de 3,342%, 3,103% e 2,586%, respectivamente. A biomassa residual após a extração supercrítica foi avaliada, e os resultados indicaram que é promissora para ser utilizada em diversas áreas, devido ao seu alto teor de carboidratos e proteínas. A análise por cromatografia gasosa indicou os ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e  $\gamma$ -linolênico (C18:3) como sendo os mais abundantes no óleo da *Desmodesmus sp.* Os modelos simples estudados, Esquível *et al.*, (1999), Reverchon & Sesti Osseo (1994) e Zeković (2003) mostraram-se aptos para representar a extração supercrítica do óleo da microalga *Desmodesmus sp.*

**Palavras-chave:** *Desmodesmus sp.*, CO<sub>2</sub> supercrítico, composição química, curvas de extração, modelos matemáticos.



## ABSTRACT

SOUZA, Ana Lucia Barbosa de. **Extraction and characterization of the biomass and *Desmodesmus sp* microalgae oil using supercritical carbon dioxide**. Dissertation (Master in Chemical Engineering, Chemical Tecnology). Technology Institute, Chemical Engineering Departament , Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The use of supercritical fluid extraction of natural products has been shown to be a viable and promising alternative to conventional methodologies. Due to the characteristics of supercritical extraction, which allow to obtain better quality products with no chemical waste, this extraction technique has been widely used in the obtaining of bioactive molecules from microalgae, as antioxidants, fibers, phytosterols, nutrients, among others. This work aimed to study the technical feasibility of supercritical extraction of oil from the microalgae *Desmodesmus sp.* using carbon dioxide as solvent. Conventional method, using hexane as solvent, was used in order to compare the extraction of oils from microalgal biomass study and the results show the efficiency and selectivity of supercritical fluid extraction in respect to the fatty acids concentration. The best yields of oil occurred at the operational conditions of 300 bar and 100 °C, 500 bar and 70 °C and 440 bar and 90 °C, reaching values of 3.342%, 3.103% and 2.586%, respectively. The residual biomass after supercritical fluid extraction was assessed in order to evaluate the residual potential and the results indicated that it is a promising one, due to its high concentration in carbohydrates and proteins. The analysis by gas chromatography indicated the myristic acid (C14:0), palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1) and  $\gamma$ -linolenic (C18:3) as the main fatty acids present in the *Desmodesmus sp.* oil. Simple models were used to model the extraction curves, Esquível *et al.* (1999), Sesti & Reverchon Osseo (1994) and Zeković (2003) and all of them were able to represent supercritical extraction of oil from microalgae *Desmodesmus sp.*

**Keywords:** *Desmodesmus sp.*, supercritical CO<sub>2</sub>, chemical composition, extraction curves, mathematical models.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>Desmodesmus sp.</i> .....	5
<b>Figura 2</b> - Diagrama de fases típico de uma substância pura. ....	11
<b>Figura 3</b> - Esquema da unidade supercrítica inserida no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis. ....	20
<b>Figura 4</b> - Curvas de extração nas condições de 300 bar - 100 °C, 440 bar - 90 °C e 500 bar- 70°C. ....	27
<b>Figura 5</b> - Curvas de extração nas condições de 300 bar - 40 °C, 300 bar - 70 °C e 440 bar- 50°C. ....	28
<b>Figura 6</b> - Curvas de extração nas condições de 100 bar - 70 °C, 160 bar - 50 °C e 160 bar- 90°C. ....	28
<b>Figura 7</b> - Superfície de resposta do rendimento do óleo da microalga <i>Desmodesmus sp.</i> em função da pressão e da temperatura .....	30
<b>Figura 8</b> - Gráfico de pareto da extração do óleo da microlga <i>Desmodesmus sp.</i> em função da pressão e do tempo.....	30
<b>Figura 9</b> - Superfície de resposta da concentração (%) em ácidos graxos da microalga <i>Desmodesmus sp.</i> em função da pressão e da temperatura. ....	32
<b>Figura 10</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999), a 100 – 70 °C, 160 bar – 50 °C e 160 bar – 90 °C.....	35
<b>Figura 11</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999), a 300 – 40 °C, 300 bar – 70 °C e 440 bar – 50 °C.....	35
<b>Figura 12</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999), a 300 – bar e 100 °C; 440 bar – 90 °C e 500 bar – 70 °C.....	36
<b>Figura 13</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon & Osseo (1994), a 100 – bar e 70 °C; 160 bar – 50 °C e 160 bar – 90 °C.....	38
<b>Figura 14</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon & Osseo (1994) a 300 – bar e 40 °C; 300 bar – 40 °C e 440 bar – 50 °C.....	38
<b>Figura 15</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon & Osseo (1994) a 300 – bar e 100 °C; 440 bar – 90 °C e 500 bar – 70 °C.....	39
<b>Figura 16</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003) a 100 – bar e 70 °C; 160 bar – 50 °C e 160 bar – 90 °C.....	39
<b>Figura 17</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003) a 300 – bar e 40 °C; 300 bar – 70 °C e 440 bar – 50 °C.....	40
<b>Figura 18</b> - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003) a 300 – bar e 100 °C; 440 bar – 90 °C e 500 bar – 70 °C.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição química de algumas espécies de microalgas (% em base seca) .....	6
<b>Tabela 2</b> - Composição química do óleo de algumas espécies de microalgas.....	7
<b>Tabela 3</b> - Vantagens e desvantagens de alguns métodos de extração de óleo a partir de microalgas.....	9
<b>Tabela 4</b> - Comparação dos métodos de extração baseado no rendimento em lipídeos.....	9
<b>Tabela 5</b> - Condições de extração de lipídeos neutros a partir de microalgas usando CO <sub>2</sub>	13
<b>Tabela 6</b> - Extração usando CO <sub>2</sub> supercrítico de moléculas de interesse a partir de microalgas.....	14
<b>Tabela 7</b> - Condições operacionais de temperatura e pressão utilizadas nos experimentos de extração do óleo da microalga <i>Desmodesmus sp.</i> de acordo com o planejamento experimental .....	19
<b>Tabela 8</b> - Resultados experimentais de rendimento de extração com CO <sub>2</sub> supercrítico ...	27
<b>Tabela 9</b> - Os coeficientes de regressão da DCCR e análise de variância.....	29
<b>Tabela 10</b> - Composição de ácidos graxos presentes no óleo da microalga <i>Desmodesmus sp.</i> em diferentes métodos de extração .....	31
<b>Tabela 11</b> - Os coeficientes de regressão da DCCR e análise de variância.....	32
<b>Tabela 12</b> - Resultados da composição química, em percentagem, da biomassa após submetidas a extração supercrítica .....	33
<b>Tabela 13</b> - Rendimento calculado, os parâmetros e desvio relativo obtido para o modelo de Esquivel <i>et al.</i> (1999) nas diferentes condições de pressão e temperatura .....	34
<b>Tabela 14</b> - Rendimento normalizado calculado, o parâmetro e desvio relativo obtido para o modelo de Reverchon & Osseo (1994) nas diferentes condições de pressão e temperatura .....	37
<b>Tabela 15</b> - Rendimento normalizado calculado, o parâmetro e desvio relativo obtido para o modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003) nas diferentes condições de pressão e temperatura.....	37

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> - Diâmetro médio de Sauter .....	18
<b>Equação 2</b> - Diâmetro médio entre as malhas .....	18
<b>Equação 3</b> - Determinação de carboidratos .....	23
<b>Equação 4</b> - Modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999) .....	24
<b>Equação 5</b> - Desvio Relativo Médio.....	24
<b>Equação 6</b> - Modelo Reverchon & Osseo (1994).....	24
<b>Equação 7</b> - Equação modificada de Reverchon & Osseo (1994) .....	24
<b>Equação 8</b> - Rendimento de extração normalizado .....	25
<b>Equação 9</b> - Modelo de Zekovic <i>et al.</i> (2003) .....	25
<b>Equação 10</b> - Rendimento experimental .....	26
<b>Equação 11</b> - Rendimento em óleo da microalga, como função de pressão e temperatura	30

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVO .....	3
2.1 Objetivo geral .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1 Microalgas .....	4
3.2 A espécie <i>Desmodesmus sp.</i> .....	4
3.3 Composição química das microalgas .....	5
3.4 Aplicabilidade dos óleos de microalgas .....	7
3.5 Extração de lipídeos de microalgas .....	8
3.6 Fluido Supercrítico .....	10
3.7 Escolha do Solvente .....	11
3.8 Extração de compostos bioativos de microalgas usando fluido supercrítico .....	12
3.9 Modelagem Matemática .....	16
3.10 Considerações sobre a Revisão Bibliográfica .....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
4.1 Materiais .....	18
4.1.1 Microalga .....	18
4.1.2 Solventes .....	18
4.2 Metodologia Experimental .....	18
4.2.1 Pré-tratamento da biomassa .....	18
4.2.1.1 Secagem da amostra antes da extração supercrítica .....	18
4.2.1.2 Cálculo do diâmetro médio da partícula .....	18
4.2.2 Extração Convencional .....	19
4.2.3 Planejamento experimental .....	19
4.2.3 Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico .....	20
4.2.4 Análises Cromatográficas .....	21
4.2.4.1 Derivatização do óleo da microalga <i>Desmodesmus sp.</i> .....	21
4.2.4.2 Caracterização dos ésteres metílicos presentes no óleo <i>Desmodesmus sp.</i> ..	21
4.2.5 Composição química da microalga <i>Desmodesmus sp.</i> após o processo de extração com fluido supercrítico .....	22
4.2.5.1 Determinação da umidade .....	22
4.2.5.2 Determinação de proteínas .....	22
4.2.5.3 Determinação de lipídeos .....	23
4.2.5.4 Determinação do resíduo mineral fixo (RMF) .....	23
4.2.5.5 Determinação de fibras solúveis .....	23
4.2.5.6 Determinação de carboidratos .....	23
4.2.7 Modelagem Matemática .....	23
4.2.7.1 Modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999) .....	23
4.2.7.2 Modelo de Reverchon & Osseo (1994) e o Modelo de Zeković <i>et al.</i> (2003) .....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5.1 Pré tratamento da Biomassa .....	26
5.2 Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico .....	26
5.3 Análises Cromatográficas .....	31
5.4 Composição química da biomassa após a extração com fluido supercrítico .....	33

5.5 Resultado dos modelos de Esquível <i>et al.</i> (1999), Reverchon & Osseo (1994) e Zeoković <i>et al.</i> (2003) .....	34
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por esses organismos, os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (DERNER *et al.*, 2006).

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos conhecidos como os principais produtores primários dos ecossistemas aquáticos (BRENNAN & OWENDE, 2010; HOEK *et al.*, 1995). Sendo um grupo, elas podem lidar com altas e baixas temperaturas, intensidades de luz abaixo do ideal, baixa disponibilidade de nutrientes essenciais e outros recursos. Uma variedade de estratégias fisiológicas e bioquímicas proporciona às microalgas uma riqueza de moléculas orgânicas complexas que pertencem à categoria de produtos químicos bioativos, dependendo das vias biossintéticas (SKULBERG, 2004).

As microalgas possuem também outras vantagens sobre muitos outros organismos, visto que elas podem ser cultivadas para a produção e o processamento de compostos com alto valor agregado. Sendo assim, a busca por substâncias químicas bioativas a partir de microalgas está se tornando cada vez mais promissora. A manutenção controlada no cultivo de microalgas é um fator chave na utilização das mesmas como uma fonte de produtos de importância econômica (SKULBERG, 2004).

Uma das características mais relevantes às microalgas é a capacidade de conversão do dióxido de carbono e da energia luminosa através do processo de fotossíntese, que permite a produção de proteína, ésteres, carotenoides, clorofila, enzimas, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas; com isso, a biomassa e os extratos da biomassa de microalgas vêm ganhando destaque no mercado mundial (RICHMOND, 2004; CHISTI, 2007).

Um método alternativo para extrair compostos e evitar o uso de solventes tóxicos é a utilização de dióxido de carbono supercrítico. Atualmente é uma tecnologia de extração bem conhecida, e é considerado um processo verde (CRAMPON *et al.*, 2013), uma vez que o CO<sub>2</sub> é reconhecido como um solvente seguro e não inflamável.

Uma das principais vantagens da utilização do dióxido de carbono supercrítico é a sua alta seletividade, além disso, depois de despressurização, torna-se CO<sub>2</sub> gasoso e é, em seguida, espontaneamente separado do extrato e o resíduo, é completamente livre de traços de solventes tóxicos. Isso permite uma valorização direta de ambos, os extratos e a utilização dos resíduos sem qualquer tratamento, como exemplo, a biomassa resultante pode ser usada na digestão anaeróbia de diversos micro-organismos. Além disso, o CO<sub>2</sub> pode ser reciclado de forma segura, que representa um benefício econômico e ambiental.

Diante do exposto, o objetivo proposto nesta dissertação foi estudar a extração supercrítica do óleo da microalga *Desmodesmus sp.*, visando identificar as melhores condições para a extração do mesmo, identificando sua composição e seus compostos bioativos.

Com isso, essa dissertação apresenta quatro capítulos. O primeiro trata da revisão bibliográfica, onde são descritos os principais conceitos sobre as microalgas, os compostos obtidos a partir da biomassa microalgal, quais os processos de extração mais utilizados e sua aplicabilidade. Como o solvente de escolha foi o CO<sub>2</sub> supercrítico, será abordado o conceito de fluido supercrítico, a escolha do solvente, o que vem sendo relatado

na literatura em relação a microalgas usando fluido supercrítico, modelagem matemática e uma breve consideração sobre a revisão. O segundo capítulo aborda os materiais e métodos utilizados ao longo da dissertação e no terceiro, seguem os resultados e discussões acerca da metodologia estudada. O quarto capítulo contém as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.



## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a viabilidade técnica da extração supercrítica do óleo da microalga *Desmodesmus sp.* empregando-se dióxido de carbono como solvente.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as condições de extração a partir de um planejamento de experimentos;
- ✓ Identificar os ácidos graxos através de um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC);
- ✓ Analisar a composição química da biomassa microalgal antes e depois da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico;
- ✓ Modelar matematicamente o processo de extração usando os modelos de Esquível *et al.* (1999), Reverchon & Osseo (1994) e Zeković (2003).

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Microalgas

As microalgas pertencem a um grupo muito heterogêneo de organismos, são predominantemente aquáticos e, em geral, microscópicos unicelulares, podendo formar colônias e apresentam pouco ou nenhuma diferenciação celular. São caracterizadas pela presença de pigmentos responsáveis pela coloração variada e por mecanismo fotoautotrófico. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (RAVEN *et al.*, 2005).

São consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra, sendo a base de inúmeras cadeias tróficas nos ambientes aquáticos (CHISTI, 2007).

São encontradas, principalmente, no meio marinho e água doce, representando uma variedade grande de espécies que vivem em condições extremas. Estima-se que mais de 50.000 espécies existam, mas somente um número limitado de, aproximadamente, 30.000 já foram estudadas e analisadas (RICHMOND, 2004).

As microalgas existem em um número variado de espécies e são diferenciadas, principalmente, pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. As principais linhagens de microalgas em termos de abundância são descritos por Raven *et al.* (2005):

i) *Diatomáceas (Bacillariophyta)*, da qual existem, aproximadamente, 100.000 espécies, sendo considerada a espécie que domina o fitoplâncton dos oceanos, podendo ser encontradas em água doce. Apresentam sílica como constituinte da parede celular e a reserva de carboidratos;

ii) *Algas verdes (Chlorophyceae)*, representadas por cerca de 17.000 espécies, são encontradas, em sua grande maioria, em meio marinho ou em água doce. A principal forma de reserva é o amido, porém sob certas condições podem armazenar óleo;

iii) *Algas azuis (Cyanophyta)*, conhecidas por desempenharem papel importante na atmosfera: a fixação de oxigênio e

iv) *Algas douradas (Chrysophyceae)*, que possuem cerca de 1.000 espécies, com habitat predominantemente doce, são semelhantes às diatomáceas.

O crescimento da população microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos (RAVEN *et al.*, 2005). Os fatores biológicos referem-se às taxas metabólicas da espécie cultivada, quanto aos fatores físico-químicos os principais que afetam o crescimento das microalgas são luz, temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes e estes são os que demandam maior estudo. Não existe um meio único para todas as espécies, uma vez que cada uma tem suas necessidades específicas (RICHMOND, 2004).

### 3.2 A espécie *Desmodesmus sp.*

Conforme o banco de dados mundial Algaebase ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org), 1996), a classificação da espécie utilizada nesta dissertação é:

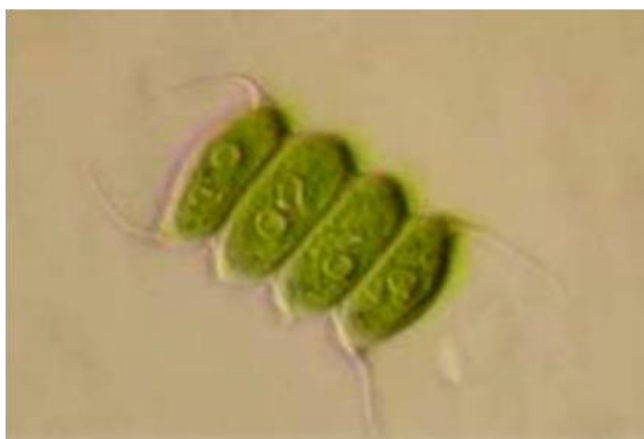
- ❖ **Império:** Eukaryota;
- ❖ **Reino:** Plantae;
- ❖ **Sub Reino:** Viridaeplantae;
- ❖ **Filo:** Chlorophyta;
- ❖ **Classe:** Chlorophyceae;

- ❖ **Ordem:** Sphaeropleales;
- ❖ **Família:** Scenedesmaceae;
- ❖ **Sub Família:** Desmodesmoideae;
- ❖ **Gênero:** *Desmodesmus*;
- ❖ **Espécie:** *Desmodesmus sp.*

Quanto à morfologia, o gênero *Desmodesmus* é caracterizado por agrupamentos achatados de células em linha reta ou curvadas, geralmente com 2, 4 ou 8 células, mais raramente com 16 ou 32 células ovóides ou elipsóides juntas paralelamente formando o chamado cenóbio, de vida livre. Nos extremos do cenóbio há longos espinhos (NATURAL HISTORY MUSEUM, 2011).

A parede celular pode ser ornamentada com pequenas verrugas, reticulada ou apresentar uma crista mediana evidente. A maioria das espécies apresenta espinhos nos pólos das células internas. Cada célula é uninucleada e contém um cloroplasto parietal com um pirenóide. As células interiores ou médias, muitas vezes, apresentam um simples espinho apical, considerando que as células marginais ou terminais apresentam um único grande espinho em cada ápice, e estes são diagonais ao longo do eixo da colônia (cenóbio). A reprodução assexuada ocorre pela formação de autocolônias, as quais são liberadas pela ruptura da parede da célula - mãe. A reprodução sexuada não observada nessa espécie (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

A Figura 1 mostra a microalga *Desmodesmus sp*, este gênero inclui mais de 100 espécies distribuídas pelo mundo inteiro. São fitoplanctônicas e de origem dulcícola, ocorrendo em ambiente lênticos e lóticos, em águas de diferentes trofismos, sendo mais comuns em meios eutróficos (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).



**Figura 1** - *Desmodesmus sp* (www.aquafuels.eu, 2009).

### 3.3 Composição química das microalgas

As microalgas têm sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas, devido a sua importância econômica, nutricional e ecológica e possuem uma composição bioquímica diversificada (carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos graxos, pigmentos, vitaminas, entre outros) e essa composição está relacionada à natureza de cada espécie de microalga, bem como aos fatores ambientais relacionados à região onde o cultivo está sendo realizado e ao meio de cultura utilizado (MIAO & WU, 2006).

Muitas análises de composição química bruta foram publicadas para diferentes cepas de microalgas em crescimento e sob diferentes condições (TOKUSOGLU & UNAL, 2003; BECKER, 2004; LIANG *et al.*, 2004; SHIMAMATSU, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006; RODRIGUEZ - GARCIA & GUIL-GUERRERO, 2008).

As porcentagens desses componentes variam de microalga para microalga, como apresentados na Tabela 1.

O elevado teor protéico de várias espécies de microalgas é uma das razões para considerar esses micro-organismos como uma fonte não convencional de proteínas (RICHMOND, 2004). As células, à medida que são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, podem fornecer os essenciais para alimentação de seres humanos e animais (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2004).

**Tabela 1** - Composição química de algumas espécies de microalgas (% em base seca)

Microalgas	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídeos (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	19
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	22	2
<i>Spirogyra sp.</i>	6-28	33-64	11-21
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-55	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Anabaena cilíndrica</i>	43-56	5-30	4-7

Fonte: Adaptado de BECKER, 2004.

As microalgas são também uma excelente fonte de carboidratos, encontrados na forma de amido, celulose, açúcares e outros polissacarídeos. Os carboidratos disponíveis têm boa digestibilidade total e, por conseguinte, possuem algumas limitações em seus usos e aplicações.

Os principais componentes da fração lipídica das microalgas são ácidos graxos, ceras, esteróis, hidrocarbonetos, cetonas e pigmentos, como exemplo, carotenoides, clorofilas, ficobilinas (HALIM *et al.*, 2011).

Em geral, as microalgas em sua composição possuem ácidos graxos em números de átomos de carbono na gama de 12 a 22, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poliinsaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídeos e, em algumas espécies, os PUFA (ácidos graxos poliinsaturados) representam entre 25 e 60% dos lipídeos totais (BECKER, 1988; BROWN, 1991; BECKER, 2004), como apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição química do óleo de algumas espécies de microalgas

Microalgas	Principais Ácidos Graxos
<i>Dunaliella Salina</i> <sup>a</sup>	C14:0/ C14:1/ C16:0/ C16:3/ C16:4/ C18:2/C18:3
<i>Isochrysis sp.</i> <sup>a</sup>	C14:0/ C14:1/C16:0/C16:1/ C18:1/ C18:3/ C18:4/ C22:6
<i>Nannochloris sp.</i> <sup>a</sup>	C14:0/ C14:1/ C16:0/ C16:1/ C16:3/ C20:5
<i>Nitzschia sp.</i> <sup>a</sup>	C14:0/ C14:1/ C16:0/ C16:1/ C16:3/ C20:6
<i>Chlorella</i> <sup>b</sup>	C14:0/C16:0/C18:0/C16:1/C18:1/C22:1/C16:2/C16:3/C16:4/ C18:2/C18:3
<i>Scenedesmus</i> <sup>b</sup>	C14:0/C16:0/C18:0/C20:0/C22:0/C24:0/C16:1/C18:1/C20:1/ C16:2/C16:3/C16:4/C18:2/C18:3/C18:4/C22:2
<i>Desmodesmus</i> <sup>b</sup>	C14:0/C16:0/C18:0/C20:0/C22:0/C16:1/C18:1/C16:2/C16:3/ C16:4/C18:2/C18:3/C18:4/C20:2

Fonte: <sup>a</sup>TEIXEIRA & MORALES, 2006; <sup>b</sup>KAUR, 2012.

As microalgas também representam uma valiosa fonte de quase todas as vitaminas essenciais (A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico), o que agrega valor nutricional a sua biomassa (GUIL-GUERRERO *et al.*, 2004). Vale ressaltar, assim como muitos outros constituintes intracelulares, que o teor de vitaminas pode variar em função de fatores ambientais, estratégias de separação da biomassa e método de secagem das células (BROWN *et al.*, 1999).

Outro constituinte são os pigmentos como a clorofila, os carotenoides (astaxantina,  $\beta$ -caroteno) e ficobiliproteínas. Essas moléculas têm uma variedade de aplicações comerciais, desde a utilização como corante natural em alimentos até a utilização como moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias em cosméticos (SPOLAORE *et al.*, 2006).

### 3.4 Aplicabilidade dos óleos de microalgas

Devido ao grande potencial biotecnológico, nas últimas décadas tem-se dado ênfase à fração lipídica das microalgas, sendo utilizadas em diversos campos de aplicação, com exemplos, saúde humana e animal, cosmetologia e energética.

Diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico - EPA e ácido docosahexaenóico - DHA, por exemplo) e pigmentos carotenoides (astaxantina, beta-caroteno, luteína, cantaxantina etc.), que apresentam propriedades terapêuticas (GILL & VALIVETY, 1997; TRIPATHI *et al.*, 1999).

Os PUFA têm função na prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, da aterosclerose e da arritmia, da redução da pressão arterial, da redução dos níveis de colesterol e triglicerídios no plasma, da artrite reumatóide, do câncer e são aparentemente essenciais na nutrição infantil e no desenvolvimento cerebral (FÁBREGAS *et al.*, 1994; GILL & VALIVETY, 1997).

Atualmente, são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. São também

incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas etc., tanto como suplemento nutricional quanto como corantes naturais (BECKER, 2004; COLLA *et al.*, 2004; PULZ & GROSS, 2004).

Outras aplicabilidades dos óleos são na indústria farmacêutica para produção de espessante e emulsificante na elaboração de cremes.

A *Spirulina* tem sido utilizada como extrato em produtos comercialmente disponíveis (Protulines, Exsymol S.A.M., Monaco) que visam evitar os sinais de envelhecimento precoce da pele e a formação de estrias. Outro exemplo é o extrato de *Chlorella vulgaris* (Dermochlorella, Codif, St. Malo, França) utilizado para estimular a regeneração de tecidos e a síntese de colágeno, o que resulta na redução de rugas. Recentemente, dois novos produtos foram lançados, sendo um composto por extrato de *Nannochloropsis oculata* (Pepha-Tight) caracterizado por proporcionar firmeza a pele com efeitos a curto e longo prazo, e outro com extrato de *Dunaliella salina* (Pepha-Ctive) que demonstra capacidade de estimular a proliferação celular e influenciar o metabolismo energético envolvido na síntese da pele (SPOLAORE *et al.*, 2006).

As pesquisas estão em crescente desenvolvimento em relação às microalgas devido ao fato de serem promissoras fontes de triacilgliceróis para produção de biodiesel e apresenta uma série de vantagens em relação ao cultivo de oleaginosas (BRENNAN & OWENDE, 2010):

1. Elevada produtividade resultante de maiores taxas de fotossíntese;
2. Podem ser cultivadas em terras não aráveis;
3. Não deslocam culturas tradicionais de oleaginosas voltadas para fins alimentícios;
4. Pode utilizar água do mar e água salobra, o que reduz o uso de água potável. Os nutrientes utilizados no cultivo, como nitrogênio e fósforo, também podem ser obtidos a partir de águas residuais. Além de fornecer meio de crescimento existe um potencial para tratamento de efluentes orgânicos provenientes da indústria;
5. Coleta pode ser diária sem seguir regime de safra;
6. Realizam a biofixação de dióxido de carbono (1 kg de biomassa seca de microalga utiliza cerca de 1,83 kg de CO<sub>2</sub>);
7. O cultivo de algas não necessita de herbicidas ou pesticidas;
8. Eles também podem produzir valiosos co-produtos, tais como proteínas e biomassa residual depois extração de óleo, os quais podem ser utilizados como alimento ou fertilizantes;
9. Teor e a qualidade dos ácidos graxos podem ser facilmente manipulados no sentido de gerar combustível que se enquadre na especificação adotada.

### **3.5 Extração de lipídeos de microalgas**

Um dos principais obstáculos para o total aproveitamento da fração lipídica é a capacidade de sucesso e eficiência ao extrair óleo das células, uma vez que em algumas espécies seu produto lipídico se encontra no interior das células.

Além disso, há a preocupação de extrair o óleo da maneira mais segura e ambientalmente sustentável, pois a extração com solvente pode não ser sempre a melhor solução para recuperar o óleo da biomassa de microalgas (MERCER & ARMENTA, 2011).

Os métodos usados para extrair lipídeos podem ser categorizados em mecânicos e químicos (HALIM, DANQUAH & WEBLEY, 2012). Os métodos químicos são extração por solventes, extração com fluidos supercríticos, extração por líquidos iônicos e extrações

enzimáticas, já os métodos mecânicos comumente utilizados são prensagem, extração assistida por ultrassom, entre outros (HALIM *et al.*, 2011; KHOO *et al.*, 2011).

Todos esses métodos têm as suas vantagens e desvantagens individuais, como mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Vantagens e desvantagens de alguns métodos de extração de óleo a partir de microalgas

<b>Métodos de extração</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Referências</b>
<b>Prensagem</b>	Fácil uso; não há necessidade de solvente	Grande quantidade de amostra necessária; processo lento	POPOOLA & YANGOMODOU, 2006
<b>Extração por solventes</b>	Solventes utilizados são relativamente baratos; os resultados são reprodutíveis	Muitos solventes orgânicos são altamente inflamáveis e/ou tóxicos; recuperação do solvente é caro, alto gasto energético; Requer grandes quantidades de solvente	HERRERO <i>et al.</i> , 2004; GALLOWAY <i>et al.</i> , 2004
<b>Extração com fluidos supercríticos</b>	Não tóxico (nenhum resíduo de solvente orgânico nos extratos); “solvente verde”; não inflamável e de simples operação	Alto consumo de energia; caro e difíceis de dimensionar em grande escala	MÁCIAS-SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2005; PAWLISZYN, 1993
<b>Ultrassom assistida</b>	Reduz o tempo de extração e o consumo do solvente; maior penetração de solvente nas células	Alto consumo de energia; caro e difíceis de dimensionar em grande escala	LUQUE-GARCÍA & CASTRO, 2003; MARTIN, 1993

Fonte: Adaptado de MERCER & ARMENTA, 2011.

O teor de lipídeos de microalgas varia consideravelmente de acordo com as diferentes espécies e com os métodos de extração. A Tabela 4 mostra a comparação de diferentes métodos de extração baseados nas espécies, solvente utilizado, condições operacionais e o rendimento em lipídeos.

**Tabela 4** - Comparação dos métodos de extração baseado no rendimento em lipídeos

Microalga	Métodos de extração	Solvente utilizado	Condições de operacionais <sup>1</sup>	Rendimento (%)	Autores
<i>Shizochytrium limacinum</i>	Supercrítico	CO <sub>2</sub> e etanol	40 °C, 350 bar, 30min	33,9	GOUVEIA <i>et al.</i> , 2007;
<i>Pavlova sp.</i>		CO <sub>2</sub>		34	CHENG <i>et al.</i> , 2011
<i>Shizochytrium limacinum</i>		n – Hexano		45	TANG <i>et al.</i> , 2011
<i>Nannochloropsis oculata</i>		Diclorometano		9	LIAU <i>et al.</i> , 2010
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Soxhlet	n – Hexano	40 °C, 0.1 MPa, 18 h	5,79	LIAU <i>et al.</i> , 2010
<i>Nannochloropsis oculata</i>		Etanol		40,90	LIAU <i>et al.</i> , 2010
<i>Pavlova sp.</i>		n – Hexano		45,2	CHENG <i>et al.</i> , 2011
<i>Nannochloropsis oculata</i>		Éter de Petróleo		8,2	CONVERTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Synechocystis PCC6803</i>		Etanol		48	SHENG <i>et al.</i> , 2011
<i>Synechocystis PCC6803</i>	Mistura de solventes	Hexano/ etanol	200 °C, 0.1 MPa, 2 h	52	SHENG <i>et al.</i> , 2011
<i>Synechocystis PCC6803</i>		Hexano/ isopropanol		36	SHENG <i>et al.</i> , 2011
<i>Synechocystis PCC6803</i>		Clorofórmio/ metanol		50	SHENG <i>et al.</i> , 2011
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Ultrasson Assistida	Éter de petróleo	Frequência 40kHz, 1h	3,3	CONVERTI <i>et al.</i> , 2011

<sup>1</sup>Temperatura, pressão e tempo.

Fonte: Adaptado de SHAIJA & SUCHITHRA, 2011.

### 3.6 Fluido Supercrítico

Tem sido amplamente estudada em diversas áreas do conhecimento, tendo como destaque sua utilização na extração de compostos de fontes naturais. Pode ser definida como a solubilização de determinados compostos de uma matriz sólida ou líquida em um solvente em condições supercríticas.

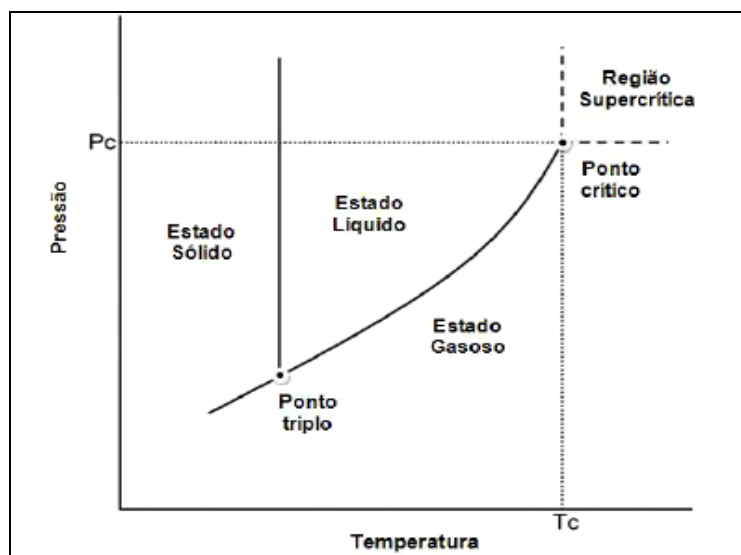
A extração com fluido supercrítico é uma operação unitária, onde são empregados solventes acima de seus pontos críticos para extraírem componentes solúveis de uma mistura (WILLIAMS, 1981).

Segundo MAUL (1999), a temperatura crítica de um gás é aquela temperatura acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão. A pressão crítica é definida como a pressão acima da qual o gás não pode mais ser



liquefeito, não importando a quanto se diminua a temperatura. É um estado intermediário em que o gás se encontra, isto é, entre o líquido e o gasoso (Figura 2).

Nessas condições, o gás é relativamente denso comparado com um gás convencional e as forças de solubilização são mais intensas. As propriedades físicas de um fluido supercrítico são intermediárias entre um gás e um líquido típicos. A densidade de um fluido supercrítico pode ser mudada pela variação da pressão aplicada sobre o fluido.



**Figura 2** - Diagrama de fases típico de uma substância pura (Adaptado de Herrero, 2010).

Assim, um fluido supercrítico pode ter a densidade que oscila entre aquelas exibidas pelos gases até valores típicos dos líquidos, quando o fluido é comprimido a altas temperaturas. Por exemplo, a de dissolver uma variedade de materiais, exatamente como fazem os líquidos convencionais, mas com o poder de penetração dos gases (MAUL, 1999).

Os fluidos supercríticos apresentam viscosidade baixa como a de um gás, alta densidade como os líquidos e difusão intermediária entre gases e líquidos, variando com a sua densidade. São prontamente adaptáveis a muitas separações difíceis, não somente por permitir a separação de materiais instáveis termicamente, a baixas temperaturas, mas também devido à alta compressibilidade e solubilidade exponencial, e ainda efetuar separações com pequenas variações de pressão (SILVA *et al.*, 1997).

### 3.7 Escolha do Solvente

O conhecimento das propriedades termodinâmicas, como solubilidade, seletividade e propriedades de transporte, como taxa de transferência de massa, é fundamental para o projeto e ampliação da escala de processos a alta pressão. A solubilidade é um parâmetro de grande relevância na determinação das condições de operação, enquanto que a seletividade permite a obtenção de informações acerca da qualidade e composição dos extratos (FERREIRA *et al.*, 1999).

A seletividade do solvente por determinados componentes presentes na mistura (soluto) pode ser variada, mudando-se a temperatura e a pressão dentro da região supercrítica.

Em processos com solventes supercríticos, o grande potencial para a transferência de massa é determinado por uma força motriz e a diferença de concentração entre o soluto e o solvente, gerando assim um estado de equilíbrio.

A condição de equilíbrio fornece informações sobre (BRUNNER, 1994):

- A capacidade do solvente supercrítico de dissolver substâncias no equilíbrio termodinâmico;
- A composição em equilíbrio na fase líquida;
- A seletividade do solvente (habilidade do solvente em dissolver seletivamente um ou mais compostos).

Existem dados de solubilidade de compostos orgânicos em CO<sub>2</sub> supercrítico disponíveis na literatura e, por isso, a solubilidade desses compostos em CO<sub>2</sub> líquido é, às vezes, utilizado como guia para as solubilidades supercríticas. Para um dado soluto, a solubilidade nos estados líquido e supercrítico é frequentemente da mesma ordem de grandeza. Essa informação pode servir como um ponto de referência, pois um composto solúvel em CO<sub>2</sub> líquido, muito raramente é insolúvel em CO<sub>2</sub> supercrítico (SILVA *et al.*, 1997).

O solvente mais utilizado é o CO<sub>2</sub>, devido a sua não toxicidade, inflamabilidade, baixa temperatura crítica (31,04 °C) e pressão crítica (73,8 bar), o que traz vantagens tanto na energia requerida, como na conservação de substâncias termolábeis, baixo custo, disponível em alta pureza, altamente seletivo e facilmente removido do produto extraído, devido a sua alta volatilidade (YAMAGUCHI, 1986).

De acordo com Mendes *et al.* (2006), a extração com fluido supercrítico, apesar de apresentar diversas vantagens sobre os processos convencionais, possui um dos maiores problemas concernente à implantação industrial dessa técnica, que está no alto custo do investimento, causado pela necessidade de se utilizar equipamentos especiais que suportem altas pressões, atrelado a necessidade de se reciclar o solvente.

O CO<sub>2</sub> quando utilizado na extração de óleos demonstra boa seletividade devido a sua baixa polaridade, não alterando as propriedades nutricionais e o óleo produzido é livre de contaminação por solventes (BRUNETTI, 1989; REVERCHON & OSSEO, 1994).

Os parâmetros de extração do dióxido de carbono supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de pequenas quantidades de outros produtos, chamados de co-solventes, polares ou apolares, como a água e o etanol, e também pela seleção das condições de temperatura e pressão específicas. Essas opções proporcionam uma maior flexibilidade e permitem a adequação de condições de extração para as necessidades específicas dos produtos a serem extraídos e ao produto final desejado.

### **3.8 Extração de compostos bioativos de microalgas usando fluido supercrítico**

Algumas microalgas são conhecidas por terem um excepcional valor nutricional, devido ao seu teor de antioxidantes, fibras, fitoesteróis, nutrientes, entre outros.

Os principais campos de aplicação é o setor da saúde com foco para alimentos e farmacêuticos para a extração de lipídios ou moléculas dedicados ao consumo humano ou a saúde animal (ANDRICH *et al.*, 2005; MONTERO *et al.*, 2005; MACÍAS-SÀNCHEZ *et al.*, 2005).

As microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* são as mais citadas, uma vez que possuem fácil cultivo, bem como a presença de co-produtos que oferecem benefícios para a saúde.

Segundo Crampon, Boutin & Badens (2011), as condições de extração e rendimentos de lipídeos neutros (triglicerídeos) a partir de microalgas usando CO<sub>2</sub> supercrítico, como solvente, mostraram que uma ampla gama de condições de operação foram estudadas, conforme apresentadas na Tabela 5.

O pré-tratamento realizado na biomassa após a colheita é um fator preponderante. As principais questões são: a secagem, devido à presença de água, em geral, para extração utilizando o CO<sub>2</sub> supercrítico a taxa de umidade deve ser < 12 %. A outra questão é em relação ao rompimento celular, pois os compostos de interesse, geralmente, se encontram intracelular resultando em limitações na transferência de massa.

**Tabela 5** - Condições de extração de lipídeos neutros a partir de microalgas usando CO<sub>2</sub>

Pressão (Bar)	172 – 700
Temperatura (°C)	40 – 70
Tempo de extração (h)	1 – 7
Rendimento (%)	0,017 – 100
Co-solvente	Etanol
Proporção de massa CO <sub>2</sub> / microalgas (kg/kg)	6 – 500
Pré – Tratamento (Biomassa)	Secagem e Rompimento Celular

Fonte: Adaptado de CRAMPON, BOUTIN & BADENS, 2011.

Espécies como *Nannochloropsis sp.*, *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* dependendo das condições operacionais de temperatura e pressão, apresentam rendimento de extração de 100% (MENDES *et al.*, 2003; MENDES, 2006; ANDRICH *et al.*, 2005 ).

A extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de moléculas de interesse a partir de microalgas atualmente se tornou um assunto de grande interesse e numerosos dados experimentais já estão disponíveis na literatura (Tabela 6), com exceção da espécie a ser estudada neste trabalho.

Pouca informação é dada sobre a coloração do óleo extraído de microalgas por extração supercrítica. Sabe-se da literatura que as microalgas possuem quantidades significativas de pigmentos, vermelho (carotenóides) e/ou verde (clorofilas). Uma vez que eles, geralmente, são lipossolúveis parece difícil evitar a sua extração (mesmo por alteração das condições da pressão e da temperatura).

Mendes *et al.* (1995) relatam a presença de carotenóides totais extraídos com o óleo da microalga *Chlorella vulgaris*, as condições que obtiveram os maiores rendimentos foram de 350MPa - 55 °C; vazão de CO<sub>2</sub> de 0,4 L/min e diâmetro de partícula de 0,4 mm.

Gouveia *et al.* (2007) estudaram a produção de carotenóides a partir de *Chlorella vulgaris*. Foi claramente demonstrado que a recuperação do carotenóide melhora quando as microalgas são trituradas mecanicamente e com rendimento de 69 % nas condições operacionais de 300 bar - 40 °C; vazão de CO<sub>2</sub> de 0,34 L/min.

Alguns autores relataram a presença de clorofilas em óleos extraídos de microalgas com CO<sub>2</sub> supercrítico (CHOI, 1987; MACÍAS-SÀNCHEZ, 2005).

**Tabela 6** - Extração usando CO<sub>2</sub> supercrítico de moléculas de interesse a partir de microalgas

Microalgas	Compostos extraídos	Aplicações	Pressão (Bar)	Temperatura (°C)	Solvente	Rendimento (%)	Autores
<i>Botryococcus braunii</i>	Alcadienos (85%)	Energia	125 – 300	40	CO <sub>2</sub>	40 – 98	MENDES <i>et al.</i> , 1995; MENDES <i>et al.</i> , 2003
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Extratos antioxidantes	Saúde	202 – 405	40 - 80	CO <sub>2</sub>	1,8 - 3,9	MENDIOLA <i>et al.</i> , 2007
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Extratos antioxidantes, luteína	Saúde	250 – 400	32 - 55	CO <sub>2</sub>	2,15 - 7,18	HU <i>et al.</i> , 2007; WU, WU & SHI, 2007
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lipídeos (22-25%), carotenóides	Alimentos	200 – 350	55	CO <sub>2</sub>	0,05 - 60	MENDES <i>et al.</i> , 2003; GOUVEIA <i>et al.</i> , 2007
<i>Dunalliella salina</i>	β-caroteno, extratos antioxidantes	Alimentos, Energia	440	27,5	CO <sub>2</sub>	-	MENDIOLA <i>et al.</i> , 2008; MENDES <i>et al.</i> , 2003
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina (5%), carotenóides	Alimentos	200 – 550	40 – 80	CO <sub>2</sub> + 10 vol % etanol ; 10 vol % óleo de soja e óleo de oliva	-	NOBRE <i>et al.</i> , 2006; MACHMUDAH <i>et al.</i> , 2006

**Tabela 6** - Extração usando CO<sub>2</sub> supercrítico de moléculas de interesse a partir de microalgas

							(Continuação)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Lipídeos (25%)	Saúde	400 – 700	40 - 55	CO <sub>2</sub>	60 - 100	ALDRICH <i>et al.</i> , 2005
<i>Ochromonas danica</i>	Lipídeos (28%)	Alimentos	172 – 310	40	CO <sub>2</sub>	8,9 - 21,4	POLAK <i>et al.</i> , 1989
<i>Skeletonema costatum</i>	Lipídeos (8,6%), β-caroteno	Alimentos	172 – 310	40	CO <sub>2</sub>	3,0 - 29,1	POLAK <i>et al.</i> , 1989
<i>Spirulina máxima</i>	Lipídeos, ácido γ-linolênico	Alimentos	250 – 400	40 - 55	CO <sub>2</sub> + 10 mol % etanol	4 – 100	MENDES <i>et al.</i> , 2006; MENDES <i>et al.</i> , 2003
<i>Spirulina pacifica</i>	carotenoides, β-caroteno, β-cryptoxantina, zeaxantina	Alimentos, Saúde	350	60	CO <sub>2</sub> + 15 vol % etanol	-	CARERI <i>et al.</i> , 2001
<i>Spirulina platensis</i>	Lipídeos (7,8%), carotenoides, clorofilas, extratos antioxidantes e antimicrobianos e vitamina E	Alimentos, Saúde	78 – 700	40 – 75	CO <sub>2</sub> + 10 vol % etanol	8 – 100	MENDIOLA <i>et al.</i> , 2007; WANG <i>et al.</i> , 2006
<i>Synechococcus sp.</i>	Carotenoides, clorofilas	Alimentos, Saúde	100 – 500	40 - 60	CO <sub>2</sub> + 15 vol % etanol	0,30 - 98,2	MACÍAS-SÀNCHEZ <i>et al.</i> , 2005; MONTERO <i>et al.</i> , 2005

Fonte: Adaptado de CRAMPON, BOUTIN & BADENS, 2011.

Macías-Sánchez *et al.* (2010), mostraram a influência da pressão e temperatura na extração de luteína e  $\beta$ -caroteno da microalga *Scenedesmus almeriensis*. As extrações ocorreram durante 300 min, sendo o maior rendimento em luteína e  $\beta$ -caroteno na pressão de 400 bar a 60 °C, apresentando valores de 0,0468 mg luteína/ g em peso seco de microalga e 1,50 mg  $\beta$ -caroteno/ g em peso seco de microalga.

Mendes *et al.* (1994) investigaram a extração com fluido supercrítico com dióxido de carbono da microalga *Botryococcus braunii* foram submetidas a 40 ° C e pressões de 12,5, 20,0 e 30,0 MPa. O maior rendimento de extração de lipídeos e a fração dos hidrocarbonetos foram de aproximadamente 380 mg e 145 mg respectivamente, na condição de pressão de 30 MPa. Os autores sugerem que este comportamento é associado com a localização dos hidrocarbonetos fora da parede da célula. E que o extrato apresenta aspecto fluido de coloração dourada e clorofila e fosfolipídeos não foram detectados.

Mendiola *et al.* (2007) observaram uma interessante atividade antioxidante e antimicrobiana em extratos de *Spirulina platensis* , utilizando a extração do CO<sub>2</sub> supercrítico puro e a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e etanol 10% vol. Os experimentos foram realizados sob pressões de 7.8-36,1 MPa e temperaturas de 300,15-356,15 K. Usando a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico puro, o rendimento foi de 70%, a 22 MPa , temperatura 323,15 K, e uma duração de 2 h de extração .

Mendiola *et al.* (2008) avaliaram a extração da vitamina E (tocoferol), a partir de *Spirulina platensis*. Eles obtiveram rendimentos muito baixo quando utilizaram CO<sub>2</sub> supercrítico puro, mesmo sob alta pressão e temperatura (0,85% em 32 MPa e 348,15 K para 1,15 h). Estes resultados eram esperados uma vez que tocoferol é uma molécula polar.

Os estudos de microalgas usando a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico têm sido realizados em escala de laboratório. A biomassa seca processada é geralmente na gama de dezenas de gramas e nunca superior a 180 g. Esses dados são, por conseguinte, insuficiente para considerar os problemas em “scale-up” (CRAMPON, BOUTIN & BADENS, 2011).

### 3.9 Modelagem Matemática

Os modelos matemáticos cumprem um papel fundamental quando a ampliação de escala é necessária, e são também indispensáveis para o controle e a melhoria do processo. Para a aplicação industrial de um possível processo que envolva fluidos supercríticos, é importante ter amplo conhecimento dos modelos que permitem correlacionar e extrapolar os dados experimentais (LANGA *et al.*, 2009).

A modelagem matemática de curvas globais da extração por fluido supercrítico é útil para a adimensionalização de extratores, obtenção de parâmetros que proporcionem a ampliação de escala e dimensionalização de equipamento para posterior análise de custos que o processo pode gerar. Esse método tem sido empregado por vários autores para reproduzir dados experimentais e, a partir deles, ajustar parâmetros que contribuirão para a simulação de processos extrativos em escalas e condições operacionais variadas (MEZZOMO *et al.*, 2009; CARVALHO JR., 2004; MOURA, 2004; MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

Os modelos apresentados na literatura para descrever o processo de extração usando fluido supercrítico mostram diferenças na quantidade de variáveis, portanto, existem modelos menos ou mais complexos. Com o objetivo de gerar um resultado mais confiável, condizente com a realidade do processo extrativo, autores têm buscado reunir em um único modelo a maior parte das variáveis que mais influenciam no processo, como

temperatura e pressão, altura do leite, diâmetro do leite, diâmetro da partícula, rendimento global.

Pouca informação é fornecida para lidar com a modelagem das curvas experimentais dos compostos bioativos de microalgas (MENDES *et al.*, 2006; VALDERRAMA *et al.*, 2008). Esta falta de informação pode ser explicada pelo fato dos modelos encontrados nos estudos publicados terem sido desenvolvidos para descrever as curvas de extração supercrítica obtidos a partir de plantas e vegetais (sementes, folhas, etc.) (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e, por outro lado, pelo fato da extração supercrítica utilizando CO<sub>2</sub> de moléculas de interesse a partir de microalgas ser um assunto de interesse crescente.

Os trabalhos mais recentes em relação a modelagem das curvas de extração de compostos a partir de microalgas foram publicados por Mouahid *et al.* (2013) e Taher *et al.* (2014), onde ambos os autores escolheram o modelo Sovová (1994; 2011), que reúne um grande número de variáveis para descrever com maior precisão as cinéticas obtidas experimentalmente, levando em consideração a transferência de massa do processo em questão.

Nesta dissertação, propõe-se um estudo sobre a modelagem das curvas de extração de lipídeos a partir da microalga *Desmodesmus sp.* obtidas experimentalmente usando CO<sub>2</sub> supercrítico utilizando três modelos empíricos, Esquível *et al.* (1999); Reverchon & Sesti Osseo, (1994) e Zeković *et al.* (2001), para os quais não há dados na literatura envolvendo estes modelos e biomassa similar.

### **3.10 Considerações sobre a Revisão Bibliográfica**

A extração supercrítica de microalgas vêm aumentando consideravelmente ao longo dos anos, para extração de compostos de alto valor agregado, como por exemplo, lipídeos com atividade funcional ou para produção de biodiesel, carotenóides para produção de alimentos e fármacos, vitaminas e outros compostos.

Consegue-se concluir com a revisão bibliográfica apresentada que não existem estudos envolvendo a microalga em questão, principalmente no que diz respeito à aplicação do fluido supercrítico para conhecimento da composição da referida espécie, assim como a modelagem matemática das curvas de extração para os modelos estudados na dissertação.

Com isso, tem-se a motivação para a realização do presente estudo, contribuindo para o conhecimento da composição do extrato com a aplicação do fluido supercrítico e expondo mais uma matéria-prima promissora para a obtenção de compostos bioativos, como para a produção de biodiesel.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Microalga

A microalga utilizada nesta dissertação foi a microalga *Desmodesmus sp.*, fornecida pelo Laboratório de Cultivo de Algas, da Universidade Federal de Santa Catarina. A suspensão foi centrifugada, desidratada parcialmente em estufa e mantida sob refrigeração e ao abrigo da luz até sua utilização.

#### 4.1.2 Solventes

Os solventes utilizados nas extrações foram o dióxido de carbono (mínimo de pureza de 99,998%, White Martins e Air Products) e para extração convencional foi hexano P.A. (misturas de isômeros, Isofar). Para extração a frio foi utilizado clorofórmio P.A. (Isifar) e metanol P.A (Isifar).

### 4.2 Metodologia Experimental

#### 4.2.1 Pré-tratamento da biomassa

##### 4.2.1.1 Secagem da amostra antes da extração supercrítica

As amostras de *Desmodesmus sp.*, cerca de 10 g de biomassa, foram secas em estufa durante 20 minutos a 40 °C para retirar a umidade, a fim de que a água não provoque alterações no balanço de massa do processo e para que não ocorra extração de água em detrimento do óleo da biomassa.

##### 4.2.1.2 Cálculo do diâmetro médio da partícula

O diâmetro médio das partículas foi determinado de acordo com o diâmetro médio de Sauter, como mostra a Equação (1).

$$d_p = \frac{1}{\sum \frac{m_i}{d_{pi}}} \quad (1)$$

onde,  $m_i$  é a fração mássica retida na malha e  $d_{pi}$ , o diâmetro médio entre as malhas que reteve e a que deixou passar, conforme apresentado na Equação (2):

$$d_{pi} = \frac{d_{\#} + d_{\#+1}}{2} \quad (2)$$

O material usado nos experimentos de extração, foram submetidos a uma análise granulométrica. A biomassa foram peneiradas em peneiras da série Tyler, das quais foram escolhidas as de número 12, 20, 32, 42, 60 mesh, as quais foram colocadas em agitador de peneiras (Bertel), com agitação moderada, durante 10 minutos, tempo para separação



completa das partículas. A quantidade de massa retida em cada peneira foi pesada em balança.

#### 4.2.2 Extração Convencional

Cerca de 10 gramas de biomassa microalgal foram colocadas em um cartucho de celulose e alimentadas em um extrator. Em um balão de 500 mL foram colocados 100 mL de solvente, que foi aquecido em chapa aquecedora (Biomixer DB-IVAC), permanecendo sob refluxo contínuo.

O solvente evapora e se condensa sobre o material sólido. Neste processo, os solutos são concentrados no balão. Após a destilação, os produtos foram direcionados para um rotaevaporador (Fisatom 803), acoplado a uma bomba de vácuo (New Pump) para evaporação do solvente a temperatura abaixo do seu ponto de ebulição. O solvente hexano foi utilizado com uma relação de 1:10 e o tempo de extração foi de 5 horas.

#### 4.2.3 Planejamento experimental

A metodologia do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, que podem ser usados no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas, variáveis dependentes, com inúmeros fatores, variáveis independentes (MATTIETTO & MATTA, 2012). É uma técnica estatística baseada no emprego de planejamentos fatoriais, que tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS NETO *et al.*, 1996). Foi analisado estatisticamente o efeito de duas variáveis independentes, sendo que os resultados da análise estatística e os níveis das variáveis estão dispostas na tabela 7.

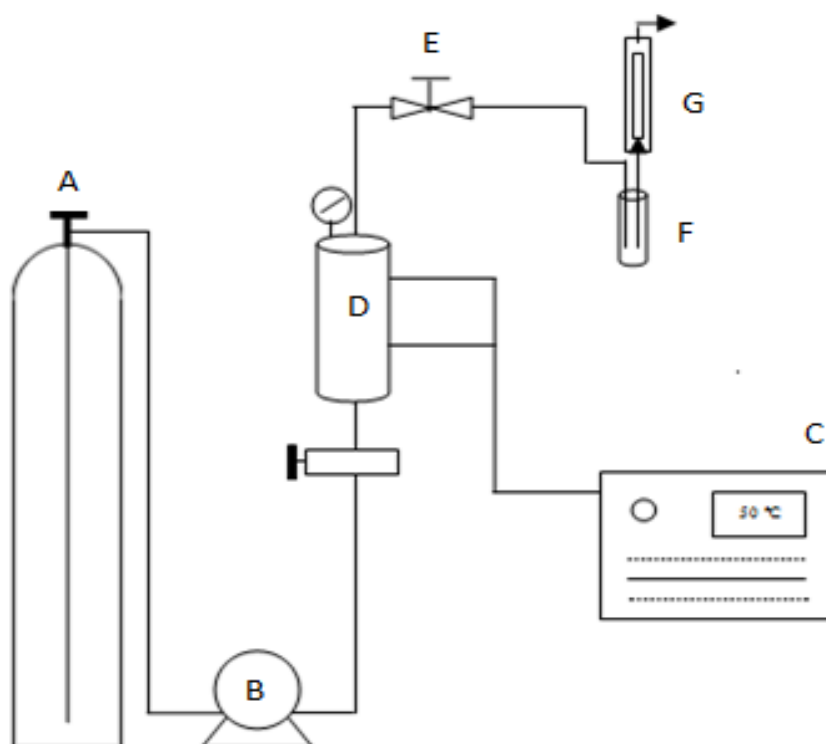
**Tabela 7** - Condições operacionais de temperatura e pressão utilizadas nos experimentos de extração do óleo da microalga *Desmodesmus sp.* de acordo com o planejamento experimental

Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais	
	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)
1	-1	-1	50	160
2	1	-1	90	160
3	-1	1	50	440
4	1	1	90	440
5	-1,4142	0	40	300
6	1,4142	0	100	300
7	0	-1,4142	70	100
8	0	1,4142	70	500
9	0	0	70	300
10	0	0	70	300
11	0	0	70	300

A temperatura e pressão foram definidas como as variáveis independentes; Na extração do óleo da biomassa da *Desmodesmus sp.* foi utilizado um delineamento composto central rotacional  $2^2$  incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central totalizando 11 ensaios.

#### 4.2.3 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

O aparato experimental, como mostrado na Figura 3, para a extração dos óleos bioativos das microalgas com dióxido de carbono supercrítico se encontra no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (DEQ/UFRRJ) e é composto por um extrator de aço inoxidável 316S de 42 mL de volume, com telas de 260 mesh no topo e no fundo para evitar a passagem de qualquer material, evitando o entupimento da linha. O extrator foi acoplado a um banho termostático (Tecnal) para controle da temperatura durante o processo de extração. Uma bomba de alta pressão (Palm modelo G100), específica para bombeamento de CO<sub>2</sub>, foi responsável pela alimentação do solvente. A vazão de CO<sub>2</sub> foi de, aproximadamente, de 6,04 mL/min.



**Figura 3** - Esquema da unidade supercrítica inserida no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis, sendo A: Cilindro de CO<sub>2</sub>; B: Bomba de alta pressão; C: Banho térmico; D: Extrator; E: Válvula micrométrica; F: Amostra; G: Medidor de vazão (Adaptado de MENDES, 2002).

O extrator foi alimentado com cerca de 10 g da biomassa microalgal e pérolas de vidro foram adicionadas para evitar que a amostra fique empacotada em alguns pontos, fazendo com que o CO<sub>2</sub> supercrítico entre em contato com toda amostra para garantir melhores rendimentos, após sua alimentação, foi adicionado à linha da bomba de alta

pressão. O CO<sub>2</sub> que se encontra no cilindro é pressurizado por uma bomba de ar comprimido para dentro do extrator, que se mantém totalmente vedado para que não haja vazamento de gás e para que também possa ocorrer estabilização da pressão. Durante todo o processo, a bomba continua ligada para compensar a perda de CO<sub>2</sub> durante as amostragens.

Os ensaios foram realizados seguindo o planejamento de experimentos com o tempo máximo de extração de 420 minutos, onde foi observada a saturação da curva de extração. Foi utilizada a técnica de despressurização através de uma válvula micrométrica que controla o fluxo e recolhe as amostras em tempos determinados. A amostragem variou de acordo com a condição experimental, visto que a extração pode ser mais lenta ou mais rápida.

Para as condições de 100, 160 e 500 bar, a mesma foi realizada a cada 20 minutos até o esgotamento da extração. Para a condição de pressões 300 e 440 bar, observou-se a presença de extrato já em 10 minutos e a amostragem, então, foi realizada considerando esse intervalo. Por ser um processo dinâmico, em intervalos de tempo, foram promovidas coletas em tubo polipropileno, previamente pesado, através de uma válvula micrométrica. Após cada coleta, o tubo foi mantido imerso em um banho com gelo para que não houvesse degradação do extrato. A cada coleta realizada, é feita a pesagem da amostra de óleo extraído em balança analítica para o estudo da cinética de extração.

#### **4.2.4 Análises Cromatográficas**

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório Química Orgânica, do Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

##### **4.2.4.1 Derivatização do óleo da microalga *Desmodesmus sp.***

Existem várias metodologias para derivatizar amostras contendo ácidos graxos, sendo a mais usual as reações de metilação usando trifluoreto de boro em solução de metanol (BF<sub>3</sub>-metanol) (METCALFE *et al.*, 1966). Para análise dos ácidos graxos totais presente no óleo da microalga *Desmodesmus sp.* foi necessário inicialmente a saponificação e posterior esterificação.

A transesterificação foi realizada a partir de 25 mg de amostra de óleo da microalga *Desmodesmus sp.*, que foi tratada com 1,5 mL de uma solução NaOH 0,5N. A mistura reacional foi agitada e aquecida a 100 °C durante 5 min. Após esse tempo, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL do reagente de esterificação BF<sub>3</sub>/metanol (14%) e aqueceu-se a 100 °C durante 5 min. A mistura foi novamente resfriada, seguido pela adição de 1 mL de *n*-hexano e 5 mL de solução saturada de NaCl e agitou-se cuidadosamente. A fase orgânica foi separada da fase aquosa em um tubo de vidro limpo e repetiu-se novamente o processo de extração com 2 mL de *n*-hexano. As fases de *n*-hexano foram reunidas, secas com fluxo de nitrogênio e armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento da análise qualitativa por cromatografia em fase gasosa.

##### **4.2.4.2 Caracterização dos ésteres metílicos presentes no óleo *Desmodesmus sp.***

A análise dos ésteres metílicos foi realizada através das injeções das amostras e padrões (1 µL) em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC). Os

padrões foram devidamente pesados (1 mg) e dissolvidos em diclorometano (5 mL). Para as análises utilizou-se um cromatógrafo a gás (Agilent, modelo: HP-5890 – Series II), com detector de ionização de chama a 280°C e injetor com divisão de fluxo a 250 °C, a uma razão de 1:30 para o volume de injeção de 1µL. A coluna capilar utilizada foi a 5% fenilmetilpolisiloxano (Factor Four - VF-5ms; 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm d.f., Varian) e o hélio foi o gás de arraste, em fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> (Pressão: 12 psi). 280 °C. A temperatura da coluna iniciou-se a 140 °C, por 1 minuto, seguida de taxa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> até 290 °C, onde permaneceu durante 10 minutos.

Após a obtenção dos cromatogramas, os ésteres metílicos foram determinados através da comparação dos seus tempos de retenção com aqueles obtidos pela injeção de padrões de ésteres metílicos autênticos (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) sob as mesmas condições cromatográficas, sendo eles: C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0 e C23:0, que teve o propósito de identificar a concentração de cada uma das amostras extraídas .

#### **4.2.5 Composição química da microalga *Desmodesmus sp.* após o processo de extração com fluido supercrítico**

Para avaliação da composição química da microalga *Desmodesmus sp.* foram selecionados cinco pontos do planejamento de experimentos, sendo eles: 160 bar – 50 °C; 160 bar – 90 °C; 300 bar – 70 °C; 440 bar – 50 °C e 440 bar – 90 °C, além da amostra in natura.

Foram realizadas as seguintes análises para a caracterização da composição química da *Desmodesmus sp.*: umidade, proteína, lipídeos, fibras e resíduo mineral, de acordo com as metodologias do Instituto Adolfo Lutz (2005). Os ensaios foram realizados em triplicata, com exceção da análise de fibras, em virtude da pouca quantidade de amostra.

As análises foram feitas no Laboratório de Pesquisas em Frutas e Hortaliças no Instituto de Nutrição e no Laboratório de Controle Bromatológico, no Instituto de Farmácia, ambos na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

##### **4.2.5.1 Determinação da umidade**

A umidade da biomassa microalgal foi determinada em estufa a 105 °C por 6 horas. Pesou-se, aproximadamente, 0,5 gramas da amostra em balança analítica (Shimadzu, modelo AUY220) em pesa-filtros, sendo em seguida transferida para estufa (Brasonto, modelo 3). Após, as amostras eram retiradas da estufa e pesadas, até se obter peso constante. O percentual de umidade foi determinado através da diferença entre a massa da amostra antes e após secagem.

##### **4.2.5.2 Determinação de proteínas**

A determinação de nitrogênio total (NT) proposta por Kjeldahl em 1883 tem como objetivo determinar indiretamente o teor de proteínas em várias amostras biológicas, assim como o nitrogênio total em plantas para avaliação do estado nutricional (YASHURA & NOKIAHARA, 2001; NOGUEIRA & SOUZA, 2005).

Este método baseia-se na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a 350 °C com ácido sulfúrico concentrado, na qual todo o nitrogênio da amostra é transformado em sulfato de amônio, que é tratado com solução de hidróxido de sódio 40%

formando amônia (volátil), que é recolhida em solução de ácido bórico 4%, que é quantificado volumetricamente utilizando ácido clorídrico 0,004 N. As reações ocorrem em três etapas: digestão, destilação e titulação.

A proteína é calculada através de um fator de conversão (baseado no percentual médio de nitrogênio nas proteínas dos alimentos).

#### **4.2.5.3 Determinação de lipídeos**

A metodologia e o resultado obtido foi o mesmo apresentado no tópico 4.2.2 usando o método de Soxhlet.

#### **4.2.5.4 Determinação do resíduo mineral fixo (RMF)**

O teor de cinzas da microalga *Desmodesmus sp.* foi determinado com, aproximadamente, 1 grama de amostra que foi pesada em cadinhos de porcelana e levada a mufla (Fornitec) na temperatura de 550 °C até que não houvesse mais pontos pretos no resíduo calcinado. Os cadinhos foram retirados da mufla e colocados no dessecador para esfriar por pelo menos 30 minutos. Após, o cadinho foi pesado novamente e o percentual RMF foi determinado através da diferença entre a massa da amostra antes e após a incineração.

#### **4.2.5.5 Determinação de fibras solúveis**

Para a análise de determinação de fibras foram pesados, em um erlenmeyer, cerca de 0,5 gramas de amostra. Após, foi adicionado 50 mL de água destilada e colocado em uma chapa aquecedora até a ebulição.

O material foi filtrado e acidificado com HCl (solução de 1:1), até o alcance de pH 2,5 e filtrado. Em seguida foi adicionado no filtrado etanol 1:1 e deixado por 7 dias. Após foi filtrado novamente e colocados na estufa por 24 horas. Em seguida, foi colocado no dessecador por 30 minutos, pesado e colocado na mufla por 5 horas. Depois foi colocado no dessecador por mais 30 minutos e pesado.

O cálculo da porcentagem é feito pela relação de grama de fibras pela quantidade de amostra.

#### **4.2.5.6 Determinação de carboidratos**

A determinação de carboidratos foi quantificada pelo método de NIFEXT (extrato livre de nitrogênio). A quantidade total de carboidratos (TC) foi obtida subtraindo de 100% e o resultado encontrado representa a fração glicídica do produto, conforme apresentado na Equação 3.

$$TC = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ RMF} + \% \text{ lipídeos} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ fibras}) \quad (3)$$

#### **4.2.7 Modelagem Matemática**

##### **4.2.2.7 Modelo de Esquível *et al.* (1999)**

A teoria do modelo de Esquível *et al.* (1999) foi proposta anteriormente por Naik & Lentz (1989) que observaram que as curvas de extração de plantas e sementes eram semelhantes às isotermas de adsorção de Langmuir. Esquível *et al.* (1999) propuseram este modelo para descrever curvas de extração globais e por ser um modelo empírico, não considera interações entre o soluto e a matriz sólida e tem apenas dois parâmetros de ajuste, conforme apresentado na Equação 4.

$$e = e_{\text{lim}} \left( \frac{t}{b+t} \right) \quad (4)$$

sendo  $e$  a razão entre a massa de óleo recuperada em função do tempo ( $t$ ) e a massa inicial ( $M$ ) de carga livre de soluto;  $e_{\text{lim}}$  o parâmetro ajustável, que representa o valor de “ $e$ ” para um tempo infinito de extração e  $b$  o parâmetro ajustável dependente da vazão mássica, temperatura e pressão, e não possui significado físico.

O parâmetro  $e_{\text{lim}}$  pode presumidamente depender apenas do material a ser extraído, desde que este seja igual ao conteúdo inicial de óleo do mesmo, e, ao se plotar a curva de rendimento ( $e$ ) pelo tempo, a divisão “ $e_{\text{lim}}/b$ ” representa a inclinação inicial da curva de extração.

O desvio relativo médio (DRM %) foi calculado através da Equação 5, sendo  $N_{\text{exp}}$  o número de pontos experimentais utilizados.

$$DRM\% = \frac{100}{N_{\text{exp}}} \sum \left| \left( \frac{(e \text{ experimental}) - (e \text{ calculado})}{e \text{ experimental}} \right) \right| \quad (5)$$

#### 4.2.7.2 Modelo de Reverchon & Osseo (1994) e o Modelo de Zeković *et al.* (2003)

O modelo proposto por Reverchon & Osseo (1994) foi utilizado para calcular o rendimento em óleo da extração supercrítica do óleo de manjeriço, como apresentado na Equação 6.

$$Y = 100 \left[ 1 - \exp \left( \frac{-k_p t}{\frac{(1-\varepsilon)V\rho}{W} + k_p t_i} \right) \right] \quad (6)$$

Sendo,

$Y$  rendimento normalizado da extração (%);

$\varepsilon$  porosidade do leito do material;

$V$  o volume do extrator ( $\text{m}^3$ );

$\rho$  densidade do fluido ( $\text{kg}/\text{m}^3$ );

$W$  vazão de solvente ( $\text{kg s}^{-1}$ );

$K_p$  Coeficiente de partição volumétrica do extrato entre a fase sólida e fluida no equilíbrio;

$t_i$  Tempo de difusão interna (s);

$t$  Tempo de extração (s).

Assumindo que  $(1-\varepsilon)V\rho/W \ll k_p t_i$ , a expressão pode ser negligenciada e a equação é modificada para a Equação 7, forma final do modelo do de Reverchon & Osseo (1994).

$$Y = 100 \left[ 1 - \exp \left( \frac{-t}{t_i} \right) \right] \quad (7)$$

Rendimento de extração normalizado ( $Y$ ) pode ser calculado conforme mostrado na Equação 8.

$$Y = 100 \times \frac{y}{y_{\max}} \quad (8)$$

Sendo,

$y$  rendimento de extração;

$y_{\max}$  rendimento máximo de extração.

A fim de evitar a avaliação do tempo de difusão interna, a equação 7 pode ser modificada, assumindo que para certos sistemas de extração  $t_i$  pode ser considerada como uma constante, deste modo, a Equação 9 pode ser descrita como:

$$Y = 100 [1 - \exp(at + b)] \quad (9)$$

A equação é conhecida como forma modificada do modelo de Reverchon & Osseo, por Zeković *et al.* (2003).

O desvio relativo médio (DRM %) foi calculado através da Equação 5, apresentada anteriormente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Pré tratamento da Biomassa

Segundo Pereira e Meireles (2010), a água presente na matriz vegetal compete com o soluto na interação com o solvente, diminuindo assim o rendimento do processo. Por esta razão, a secagem do material vegetal é recomendada.

Nas extrações em que foi utilizada a biomassa úmida, nos testes iniciais, foi observado no extrato uma grande quantidade de água. Diante disso, antes das extrações, a biomassa devidamente pesada, cerca de 10 g, era colocada em estufa durante 20 minutos a 40 °C, para retirada da umidade da amostra. Todas as amostras do planejamento de experimentos passaram pelo mesmo procedimento.

O tamanho de partícula do material é outro ponto que interfere no rendimento da extração, pois em geral a taxa de extração aumenta com a diminuição do tamanho de partícula da matriz sólida, uma vez que ocorre um aumento da área disponível para a transferência de massa (CASSEL *et al.*, 2008; PEREIRA & MEIRELES, 2010);

Após a caracterização granulométrica foi utilizada para os experimentos a biomassa microalgal com o diâmetro médio de Sauter de 0,861 µm.

### 5.2 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

A viabilidade técnica da extração de óleo da *Desmodium sp.* com dióxido de carbono supercrítico em diferentes condições de pressão e temperatura foi investigada. O rendimento experimental (e%) foi calculado de acordo com a Equação 10.

$$e \% = \frac{\text{massa extraída}}{\text{massa de carga livre de soluto}} \quad (10)$$

Sendo massa extraída a massa de óleo extraído e massa de carga livre de soluto a massa da microalga sem a presença do óleo.

Para o cálculo da massa de carga livre de soluto, foi necessária a percentagem de óleo extraído no método convencional soxhlet, utilizando hexano como solvente. A partir da realização desse experimento, obteve-se o valor de 16,73% de óleo extraído. Na Tabela 8 podem-se observar os rendimentos encontrados para todas as condições experimentais estudadas.

Um maior rendimento de óleo foi observado quando foram utilizadas as pressões mais elevadas. Tal comportamento está relacionado ao aumento da densidade do fluido supercrítico e, conseqüentemente, ao poder de solvatação, ocasionados pela elevação da pressão, à temperatura constante, durante os experimentos.

Já o efeito da temperatura na densidade é mais complexo; pode-se afirmar que, à pressão constante, um aumento na temperatura leva à uma diminuição na densidade do solvente supercrítico. Mudanças na temperatura, além de influenciarem na densidade do solvente, também influenciam na pressão de vapor e na energia cinética das moléculas de soluto. Em temperaturas próximas do ponto crítico, o efeito da diminuição da densidade do solvente supercrítico é mais pronunciado (ROSA *et al.*, 2009; PEREIRA & MEIRELES, 2010).

A pressão de vapor do soluto aumenta com a temperatura e tende a aumentar a solubilidade do mesmo, enquanto que a temperatura tem um efeito contrário sobre a

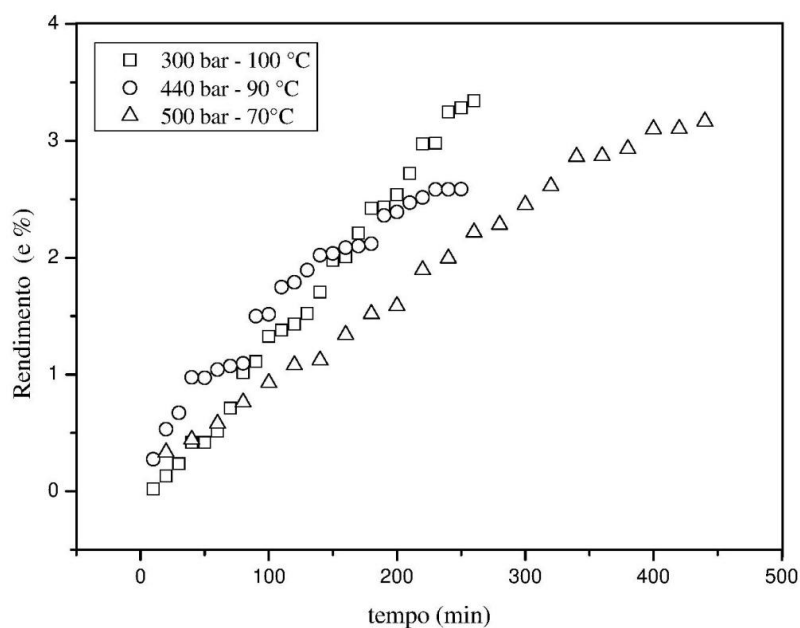


densidade do solvente e a solubilidade do soluto. Isto pode ser observado na condição de 300 bar – 100 °C, onde foi obtido o maior o rendimento em óleo (3,3427%).

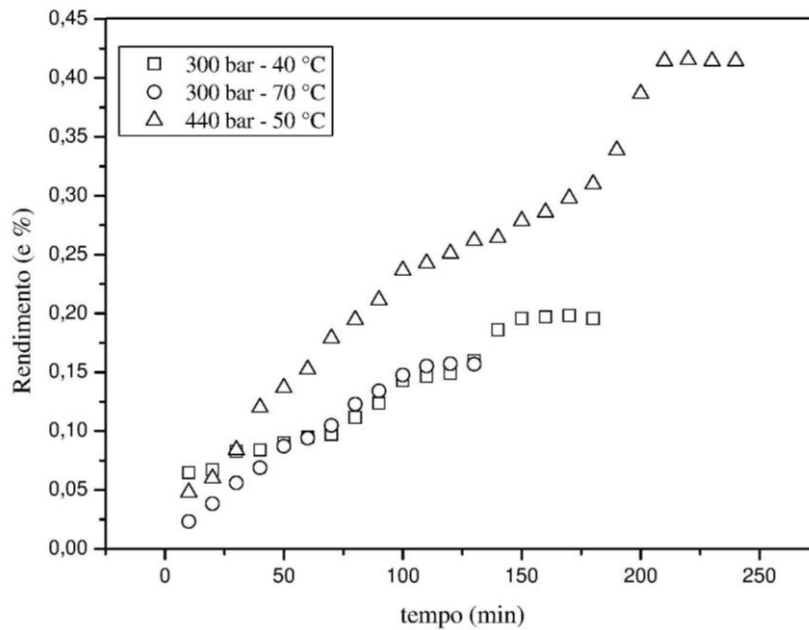
**Tabela 8** - Resultados experimentais de rendimento de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais		Rendimento (e%)
	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	
1	-1	-1	50	160	0,0372
2	1	-1	90	160	0,0336
3	-1	1	50	440	0,4143
4	1	1	90	440	2,5866
5	-1,4142	0	40	300	0,1957
6	1,4142	0	100	300	3,3427
7	0	-1,4142	70	100	0,0600
8	0	1,4142	70	500	3,1038
9	0	0	70	300	0,1897
10	0	0	70	300	0,1489
11	0	0	70	300	0,1356

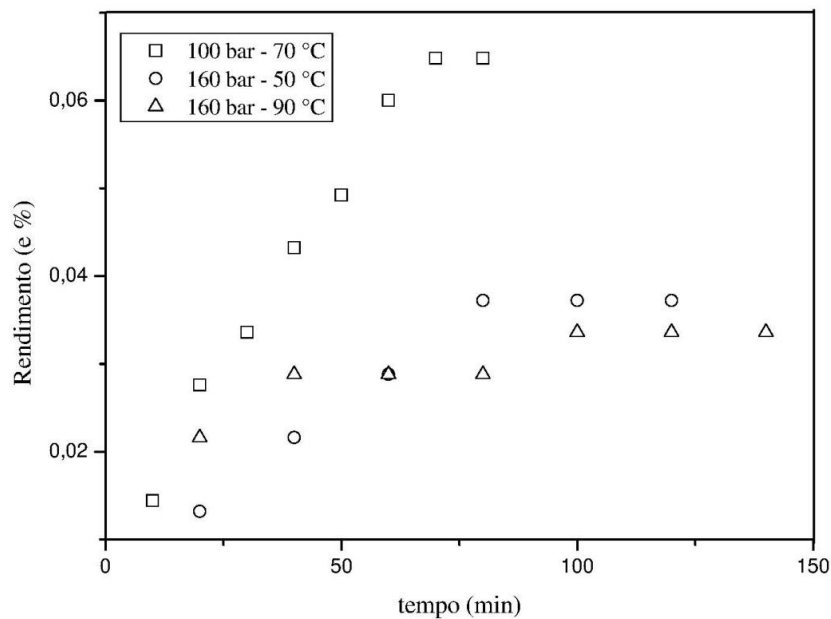
Nas Figuras 4, 5 e 6 são apresentadas as curvas de extração para todas as pressões e temperaturas investigadas. As curvas relacionam rendimento (e%) em função do tempo (minutos) da extração. Observa-se que o tempo final de extração variou conforme as diferentes condições de pressão e temperatura. Conforme dito anteriormente, a extração máxima durou 420 minutos na condição de 500 bar – 70 °C.



**Figura 4** - Curvas de extração nas condições de 300 bar - 100 °C, 440 bar - 90 °C e 500 bar - 70 °C.



**Figura 5** - Curvas de extração nas condições de 300 bar - 40 °C, 300 bar - 70 °C e 440 bar - 50°C.



**Figura 6** - Curvas de extração nas condições de 100 bar - 70 °C, 160 bar - 50 °C e 160 bar - 90°C.

Alguns trabalhos da literatura relatam comportamento semelhante aos obtidos experimentalmente nesta dissertação, não com a microalga de estudo, mas com outras espécies.

Mendes *et al.* (1995) extraíram lipídios da microalga *Chlorella vulgaris* com CO<sub>2</sub> supercrítico e observaram o mesmo comportamento nas temperaturas de 40 e 55 °C e nas

pressões de 200 e 350 bar, onde na pressão e temperatura mais elevada, maior foi o rendimento em lipídeos.

Mendes *et al.* (2003) descreveram que, a temperatura constante, a microalga *Dunaliella salina* apresenta um maior rendimento com o aumento da pressão. No entanto, o efeito da temperatura não é muito significativo para certos intervalos de pressões, exceto a 200 bar, em que um aumento na temperatura leva a uma diminuição no rendimento de carotenoides extraídos.

Thana *et al.* (2008) investigaram a extração do carotenoide astaxantina em *H. pluvialis*, onde o melhor rendimento obtido foi na condição de 500 bar e 80°C durante 4 horas de extração, alcançado um rendimento de astaxantina de 11,42 mg/0,5g.

Segundo Palavra *et al.* (2011), em extrações supercríticas usando CO<sub>2</sub> com algumas microalgas realizadas a 39 °C e pressões de 125, 200 e 300 bar, foi observado que o conteúdo extracelular, como exemplo, hidrocarbonetos foram rapidamente extraídos, ao contrário do intracelular, como exemplo, lipídeos.

Taher *et al.* (2014) utilizaram um planejamento de experimentos onde as variáveis eram: pressão (bar), temperatura (°C) e vazão de CO<sub>2</sub> (g min<sup>-1</sup>). Eles observaram que o maior rendimento em óleo foi na condição de 500 bar, 50°C e uma vazão de 1,92 g min<sup>-1</sup>, obtendo um rendimento em óleo de 7,34 % (g óleo g<sup>-1</sup> biomassa).

A influência das duas variáveis, temperatura e pressão, foi estatisticamente investigada sob 95% de nível de confiança ( $p \leq 0,05$ ). Os coeficientes lineares e quadráticos das variáveis estudadas e as suas interações, erro padrão, significado de cada coeficiente determinado pelo p-valor e os valores da análise de variância (ANOVA) estão listados na Tabela 9.

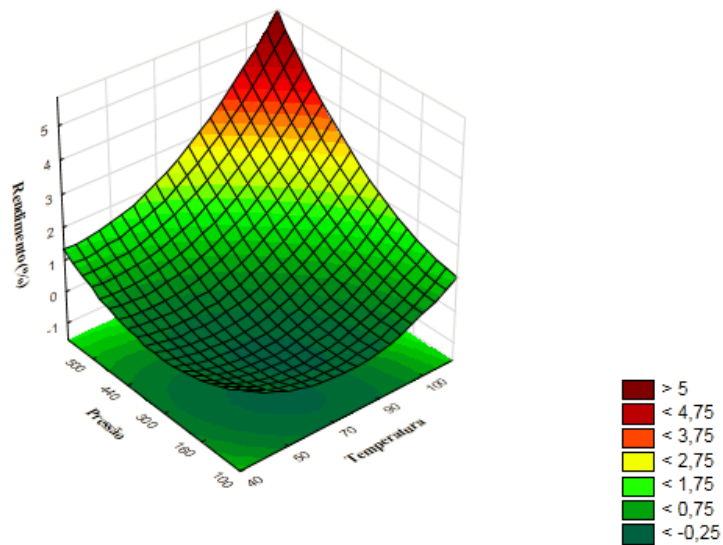
**Tabela 9** - Os coeficientes de regressão da DCCR e análise de variância

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	p – valor	
Temperatura (L)	0,828248	0,253706	0,022332	
Temperatura (Q)	0,578032	0,302737	0,114482	
Pressão (L)	0,905147	0,253706	0,016083	
Pressão (Q)	0,483972	0,302737	0,170791	
Temperatura por Pressão	0,543750	0,358260	0,189532	
<b>ANOVA</b>				
	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F-calculado
<b>Regressão</b>	11,3032	2	5,6515	6,51
<b>Resíduo</b>	6,9351	8	0,8668	
<b>Total</b>	18,2382	10		

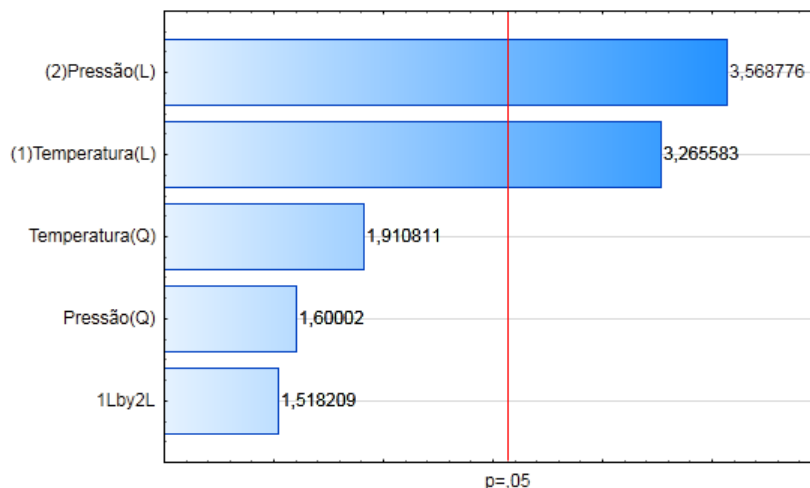
Os valores de p dos coeficientes de regressão sugerem que a pressão e temperatura, com um fator linear, foram significativas ( $p \leq 0,05$ ). Este resultado corrobora os resultados experimentais anteriormente apresentados na Figura 6, em que as melhores condições operacionais ocorreram em pressão e temperaturas mais elevadas. Um modelo de primeira ordem foi estabelecido, Equação 11, com base na ANOVA descrito que o rendimento (e%) em óleo da microalga *Desmodesmus sp.* é uma função das variáveis independentes significativas (pressão, y e temperatura, x).

$$e (\%) = ,8282 * x + ,9051 * y \quad (11)$$

O valor de F-calculado (6,51) maior que o de F-tabelado (4,45), mostra que o modelo é válido e apropriado para representar as relações entre os parâmetros selecionados, com isso a superfície de resposta e o gráfico de pareto foram gerados (Figura 7 e 8) para uma melhor visualização da influência da pressão e temperatura sobre o rendimento da extração do óleo da *Desmodesmus sp.*



**Figura 7** - Superfície de resposta do rendimento do óleo da microalga *Desmodesmus sp.* em função da pressão e da temperatura



**Figura 8** - Gráfico de pareto da extração do óleo da microalga *Desmodesmus sp.* em função da pressão e do tempo.

### 5.3 Análises Cromatográficas

O óleo da microalga *Desmodesmus sp.* extraído por CO<sub>2</sub> supercrítico foi analisado em um cromatógrafo gasoso e os resultados em concentração (%) da composição de ácidos graxos podem ser observados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Composição de ácidos graxos presentes no óleo da microalga *Desmodesmus sp.* em diferentes métodos de extração

Ác. Graxos	160 bar 50 °C	160 bar 90 °C	440 bar 50 °C	440 bar 90 °C	300 bar 40 °C	300 bar 100 °C	100 bar 70 °C	500 bar 70 °C	300 bar 70 °C	Soxhlet
<b>C14:0</b>	1,046	1,102	14,316	0,356	0,402	0,307	0,996	1,958	0,25	1,105
<b>C15:0</b>	-	-	-	-	0,126	-	-	-	0,111	-
<b>C16:0</b>	40,506	26,572	1,01	10,889	10,075	0,205	42,604	7,654	7,547	8,387
<b>C18:0</b>	23,061	9,022	0,786	0,745	0,094	0,889	24,812	1,747	0,586	1,143
<b>C18:1</b>	2,554	1,372	0,637	1,188	29,485	1,03	-	1,091	20,036	31,24
<b>C18:2</b>	-	6,573	15,103	32,531	-	32,658	0,662	27,096	6,363	10,78
<b>C18:3</b>	1,654	0,196	0,854	0,608	0,864	5,319	0,299	3,676	0,014	12,448
<b>C20:0</b>	-	-	1,37	-	0,102	-	-	-	0,137	-
<b>C23:0</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	-
<b>Saturados</b>	64,613	36,696	17,482	11,99	10,799	1,401	68,412	11,359	9,291	10,635
<b>Insaturados</b>	4,208	8,141	16,594	34,327	30,349	39,007	0,961	31,863	26,413	54,468
<b>Não-identificados</b>	31,179	55,163	65,924	53,683	58,852	59,592	30,627	56,778	64,296	34,897

Os resultados mostram que os ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e  $\gamma$ -linolênico (C18:3) são os mais abundantes no óleo da *Desmodesmus sp.*, além de apresentar que, conforme a pressão aumenta, maior é a concentração (%) dos ácidos graxos insaturados.

Entre os vários ácidos graxos constituintes dos lipídeos das algas, talvez o mais importante sejam os ácidos graxos poliinsaturados e dentro desse grupo, os ácidos graxos essenciais são: linoléico (C18:2),  $\gamma$ -linolênico (C18:3), aracdônico e o eicosapentenoico. Com exceção do ácido linoléico, os demais são raros nos alimentos convencionais entretanto, certas algas contém em grandes concentrações (PAOLETTI, 1980).

Os resultados apresentados são similares com os encontradas na literatura, como por exemplo, Cheung *et al.* (1998) mostraram que os melhores rendimentos de ácidos graxos ômega-3, ocorreu a baixas temperaturas e altas pressões. Já, Cheung (1999) mostrou que, sob baixas pressões, mais ácidos graxos saturados são extraídos. Em contraste, quando a pressão é aumentada, a percentagem de ácidos graxos insaturados aumenta na fase de extração.

A influência das duas variáveis, temperatura e pressão foram estatisticamente investigada sob 95% de nível de confiança ( $p \leq 0,05$ ) na concentração (%) de ácidos graxos. Os coeficientes lineares e quadráticos das variáveis estudadas e as suas interações, erro padrão, significado de cada coeficiente determinado pelo p-valor e os valores da análise de variância (ANOVA) estão listados na Tabela 11.

Os valores de p dos coeficientes de regressão sugerem que a pressão, com um fator linear, a pressão e temperatura com um fator quadrático e suas interações, foram significativas ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 11** - Os coeficientes de regressão da DCCR e análise de variância

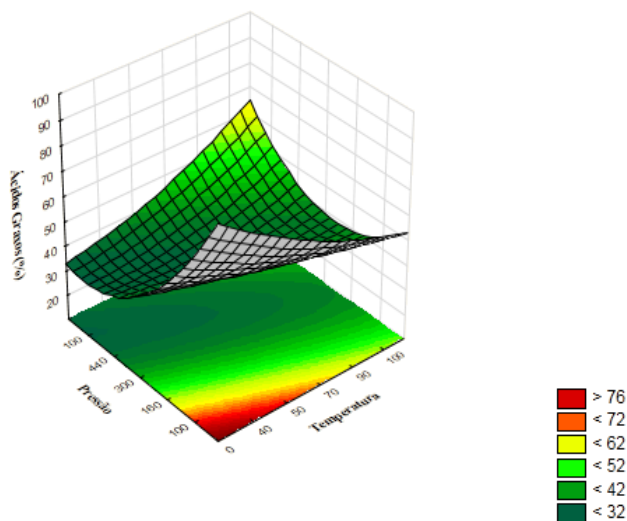
Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	<i>p</i> – valor
Temperatura (L)	-1,60307	0,635340	0,020724
Temperatura (Q)	2,52638	0,758126	0,000035
Pressão (L)	-8,79340	0,635340	0,000038
Pressão (Q)	10,33257	0,758126	0,000163
Temperatura por Pressão	9,05625	0,897169	0,020724

ANOVA				
	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F-calculado
<b>Regressão</b>	602,9297	1	602,9297029	
<b>Resíduo</b>	977,9718	9		5,54
<b>Total</b>	1580,9015	10	108,6635375	

Nesse caso, todas as variáveis, tanto com suas contribuições lineares quanto quadráticas, foram significativas para a extração dos ácidos graxos apresentados.

O valor de F-calculado (5,54) maior que o de F-tabelado (5,11), mostrando que o modelo é válido e apropriado para representar as relações entre os parâmetros selecionados, com isso a superfície de resposta foi gerado (Figura 9) para uma melhor visualização da influência da pressão e temperatura sobre a extração de ácidos graxos do óleo da *Desmodesmus sp.*



**Figura 9** - Superfície de resposta da concentração (%) em ácidos graxos da microalga *Desmodesmus sp.* em função da pressão e da temperatura.

Em comparação ao rendimento em óleo, a extração por soxhlet se mostrou superior à extração supercrítica, mas em contrapartida a extração supercrítica se mostrou eficiente e seletiva quanto à extração dos ácidos graxos. A extração por soxhlet obteve o total da concentração de ácidos graxos de 65,103%, enquanto que na extração supercrítica nas condições operacionais de 100 bar – 70 °C e 160 bar – 50 °C, apresentaram, respectivamente, o total de 69,373% e 68,821%. Os resultados se diferem dos obtidos do

rendimento em óleo, onde nas maiores pressões e temperaturas, maiores foram os rendimentos e óleo. Provavelmente, nessas condições operacionais, outros compostos mais pesados estão sendo extraídos em detrimento dos ácidos graxos e isso pode ser facilmente explicado pela alta condição de pressão, que favorece a solubilidade desses compostos.

Barros, Assis e Mendes (2014) justificam que a extração por soxhlet, utilizando o hexano, a temperatura (69 °C) e índice de polaridade (P= 2,7), propicia a extração de maiores quantidades de substâncias apolares e também de outras menos apolares de forma indiscriminada. Por se tratar de um solvente apolar de peso molecular superior ao do CO<sub>2</sub> utilizado na extração supercrítica, favorece o aumento do rendimento, porém com menor grau de pureza. Na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, o controle das condições operacionais pode proporcionar um menor rendimento, porém uma maior seletividade em relação aos compostos extraídos.

A composição de ácidos graxos obtidos da microalga *Desmodesmus sp.* se assemelha com os resultados obtidos na literatura, inclusive em relação a outras microalgas distintas da usada nesse trabalho. Cada microalga contém um óleo com uma dada composição em ácidos graxos, mas tal óleo, em geral, é composto de ácidos graxos 14:0-20:0 com altas frações de 16:0, 18:1 (ômega-9), 20:4 (ômega-6), e 20:5 (ômega-3). No entanto, graças à seletividade do CO<sub>2</sub> supercrítico, é possível modificar ligeiramente a composição do óleo.

#### 5.4 Composição química da biomassa após a extração com fluido supercrítico

A avaliação da composição química de microalgas *Desmodesmus sp.* foi feita com a amostra “in natura”, para comparar com as amostras após a extração supercrítica. Os resultados da análise da composição química após a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico são mostrados na Tabela 12.

**Tabela 12** - Resultados da composição química, em percentagem, da biomassa após submetidas a extração supercrítica

<b>Amostras</b>	<b>Umidade</b>	<b>RMF</b>	<b>Lipídeos</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Fibras</b>	<b>Carboidratos</b>
<i>In natura</i> *	10,70	16,04	16,73	42,44	0,011	14,08
<b>160 bar - 50 °C</b>	8,02	6,50	16,696	41,05	0,007	27,73
<b>160 bar - 90 °C</b>	7,73	6,53	16,698	39,75	0,002	29,29
<b>300 bar - 70 °C</b>	6,40	6,68	16,573	37,41	0,003	32,93
<b>440 bar - 50 °C</b>	10,65	6,07	16,316	38,7	0,006	28,25
<b>440 bar - 90 °C</b>	7,63	6,11	14,144	34,76	0,003	37,36

Os resultados mostram que, após a extração, a biomassa permanece com elevados níveis de proteína e carboidratos, apresentando-se a como um potencial em nutracêuticos, alimentos para animais ou para bio-fertilizantes.

O teor de lipídeos apresentado na Tabela 12 foi obtido subtraindo-se o conteúdo total de óleo presente na biomassa extraída pelo método convencional, menos o conteúdo lipídico extraído no CO<sub>2</sub> supercrítico.

Muitos autores estudaram o melhor destino para a biomassa residual e em geral, após a extração do óleo, a mesma segue para produção de biodiesel. Com isso, não há estudos que tratam da reutilização desse tipo de resíduo após a extração supercrítica, que

pode ser aplicado em estudos de alimentos, cosméticos e farmacêuticos, principalmente devido ao fato de que a biomassa está livre de solventes orgânicos.

Verdugo e Rubilar (2014) relataram que existem muitos estudos que utilizam a biomassa residual a partir de microalgas, devido ao fato do teor de proteínas e de carboidratos serem presentes no resíduo. São usados, principalmente, para alimentação animal e focaram em seus estudos na utilização de concentrado de proteína de *B. braunii* para produzir fibras.

Lee *et al.* (2013) investigaram o reuso após cultivo fotoautotrófico da microalga *D. tertiolecta* LB999. As composições de carboidratos, lipídeos, proteína, cinzas e a umidade da biomassa *D. tertiolecta* foram 37,8, 20,6, 25,5, 9,6 e 6,5% (m/m), respectivamente. Os autores indicaram que os lipídeos da biomassa residual foram completamente extraídos por clorofórmio e metanol e a percentagem dos carboidratos totais da biomassa residual, após a extração de lipídeos, foi de 51,9%, aproximadamente (m/m). Estes autores também estudaram a utilização desta biomassa residual para produção de bioetanol a partir dos produtos de sacarificação enzimática por *S. cerevisiae* YPH500, apresentando resultado positivo no processo fermentativo.

Ramos-Suárez *et al.* (2014) investigaram os aminoácidos extraídos pela microalga *Scenedesmus sp.* e os resíduos avaliados foram o substrato para a digestão anaeróbia. Os autores afirmam que se consegue extrair 59% do total de aminoácidos em proteínas.

Nos últimos anos, vêm crescendo os estudos a fim de reutilizar o resíduo da biomassa microalgal de maneira sustentável, já que tem um grande potencial em diversas áreas.

### 5.5 Resultado dos modelos de Esquível *et al.* (1999), Reverchon & Osseo (1994) e Zeoković *et al.* (2003)

A seguir são apresentados os resultados do modelo empírico de Esquível *et al.* (1999). A estimação dos parâmetros do modelo de Esquível *et al.* (1999) foi realizada através do programa Statística. O rendimento calculado ( $e_{\text{calculado}}\%$ ) e o desvio (DRM%) foram calculados através das Equações 5 e 6, respectivamente.

Os valores dos rendimentos calculados e dos respectivos desvios podem ser vistos na Tabela 13.

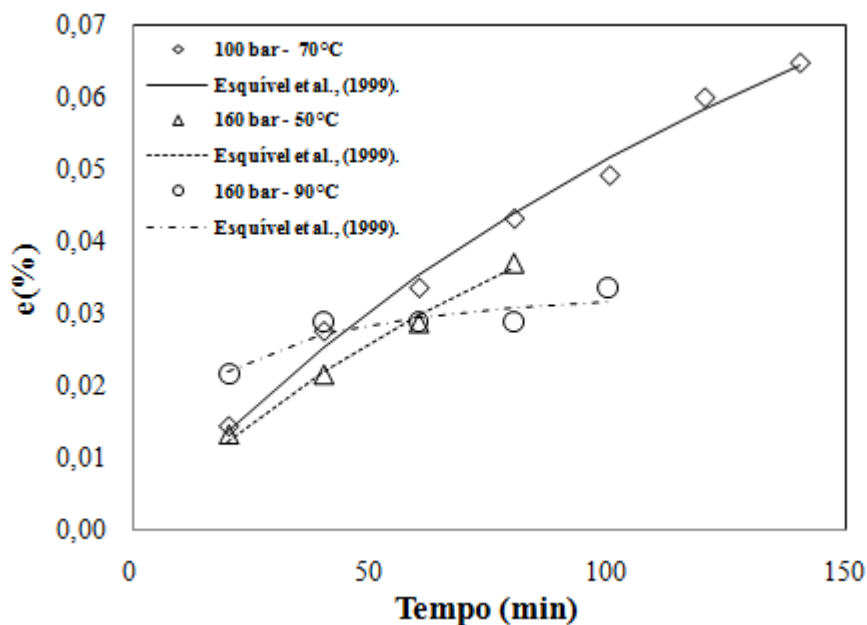
**Tabela 13** - Rendimento calculado, os parâmetros e desvio relativo obtido para o modelo de Esquível *et al.* (1999) nas diferentes condições de pressão e temperatura

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (K)	$e_{\text{Calculado}}$	$e_{\text{lim}}$	b	DR (%)
1	160	323	0,0365	0,10954	159,9391	3,6976
2	160	363	0,0318	0,0358	12,5926	4,5514
3	440	323	0,3655	0,8598	283,9498	7,0275
4	440	363	2,6359	4,8185	206,9947	6,0219
5	300	313	0,1740	0,3023	110,5831	14,0743
6	300	373	3,4524	69,35589	5089,298	2,1742
7	100	343	0,0644	0,1721	233,9638	4,1439
8	500	343	3,2176	16,2384	1699,6610	5,5364
9	300	343	0,1615	0,4635	224,3296	3,3272

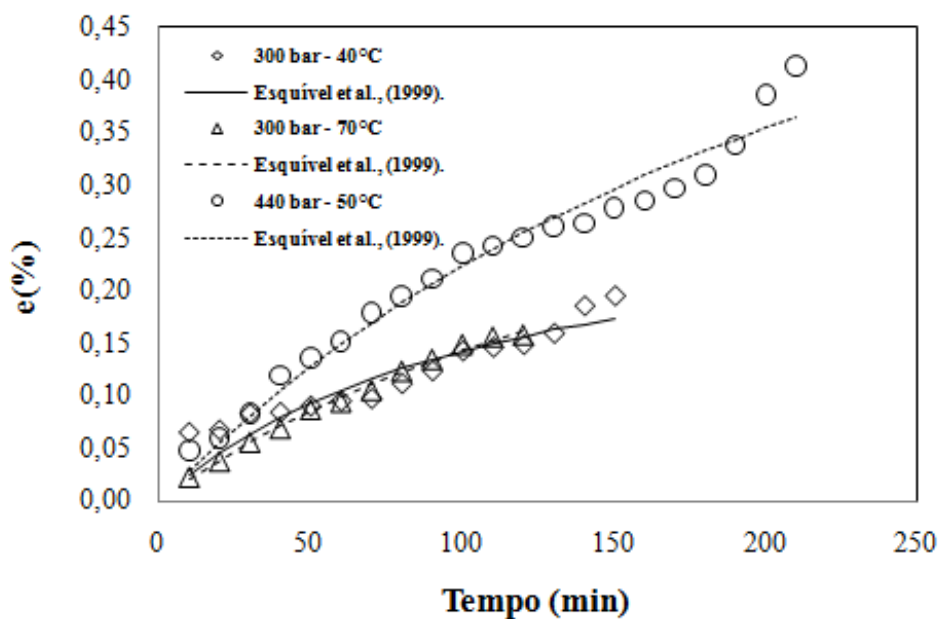


O modelo de Esquível *et al.* (1999), aplicado a esse trabalho, conseguiu representar toda a curva de extração, tanto a parte rápida, quanto a parte mais lenta da curva. Os desvios variaram de 2,1742% a 14,3327%.

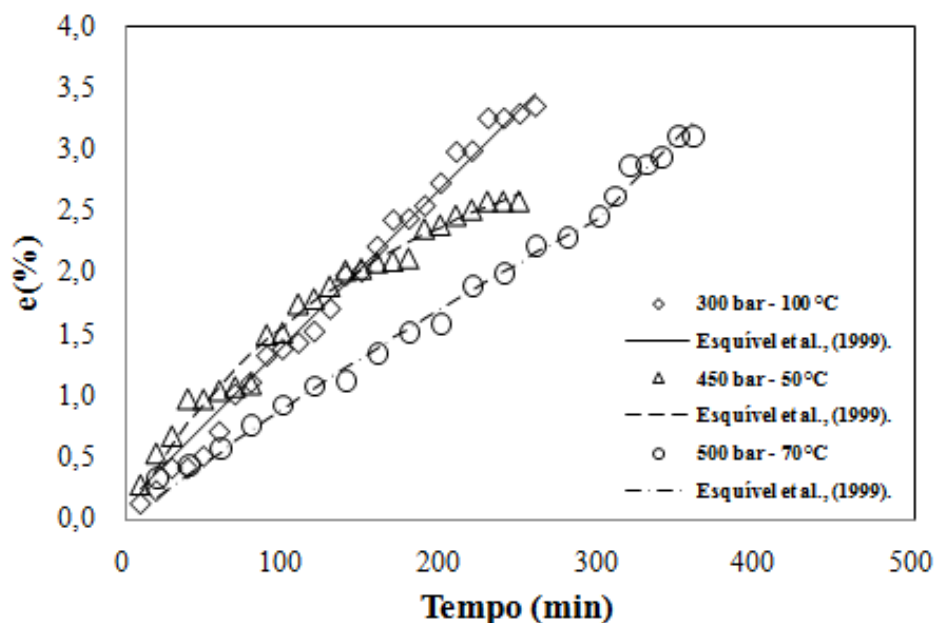
Nas Figuras 10, 11 e 12 pode-se observar que o modelo se ajusta bem aos resultados obtidos experimentalmente.



**Figura 10** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível *et al.* (1999), a 100 – 70 °C, 160 bar – 50 °C e 160 bar – 90 °C.



**Figura 11** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível *et al.* (1999), a 300 – 40 °C, 300 bar – 70 °C e 440 bar – 50 °C.



**Figura 12** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Esquível *et al.* (1999), a 300 – bar e 100 °C; 440 bar – 90 °C e 500 bar – 70 °C

Nos trabalhos que estudaram o modelo de Esquível *et al.* (1999) com extração de compostos usando fluido supercrítico, como o de Pereira (2009) e o reportado por Silva *et al.* (2008), os valores de  $e_{lim}$  foram baixos, para algumas condições operacionais. No caso do  $e_{lim}$  deste trabalho, também foram baixos com exceção da condição de 300 bar e 100 °C.

Pereira (2009) relata que ao contrário do que foi observado por Esquível *et al.* (1999), o parâmetro  $e_{lim}$  também sofreu variações com a temperatura e a pressão. A comprovação dessa variação é a diminuição do  $e_{lim}$ , a pressão constante, com o aumento da temperatura. Essa dependência também foi observada em SILVA *et al.* (2008).

A estimação dos parâmetros dos modelos de Reverchon & Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003), foram realizadas através do programa Statistica. O rendimento normalizado calculado ( $RN_{calculado}\%$ ) e o desvio (DRM %) foram calculados através das Equações 8 e 5, respectivamente.

Ambos os modelos aplicados a esse trabalho, Reverchon & Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003), se ajustaram bem ao início da curva de extração. Os desvios para o modelo Reverchon & Osseo (1994) variaram de 7,0281% a 39,1126%.

Os valores dos rendimentos experimentais e dos respectivos desvios podem ser vistos na Tabela 14.

Pode-se observar que a estimação dos valores de tempo difusional ( $t_i$ ), são assertivos com o comportamento experimental, como pode ser visto nos gráficos apresentados anteriormente (Figuras 4,5 e 6).

Vale ressaltar que o tempo difusional pode ser definido como o tempo lento da extração, onde a difusão a ser facilmente acessível e o soluto está esgotando.

**Tabela 14** - Rendimento normalizado calculado, o parâmetro e desvio relativo obtido para o modelo de Reverchon & Osseo (1994) nas diferentes condições de pressão e temperatura

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (K)	RN <sub>calculado</sub> (%)	t <sub>i</sub> (h)	DR (%)
1	160	323	87,1944	0,6487	8,8588
2	160	363	98,8730	1,2572	7,0281
3	440	323	82,2793	2,0226	6,4589
4	440	363	92,1626	1,6363	7,3116
5	300	313	86,3105	1,2572	14,6564
6	300	373	81,7891	2,6421	39,1126
7	100	343	87,6577	1,1152	9,3098
8	500	343	85,8721	3,5768	15,3697
9	300	343	88,5017	0,9219	11,7048

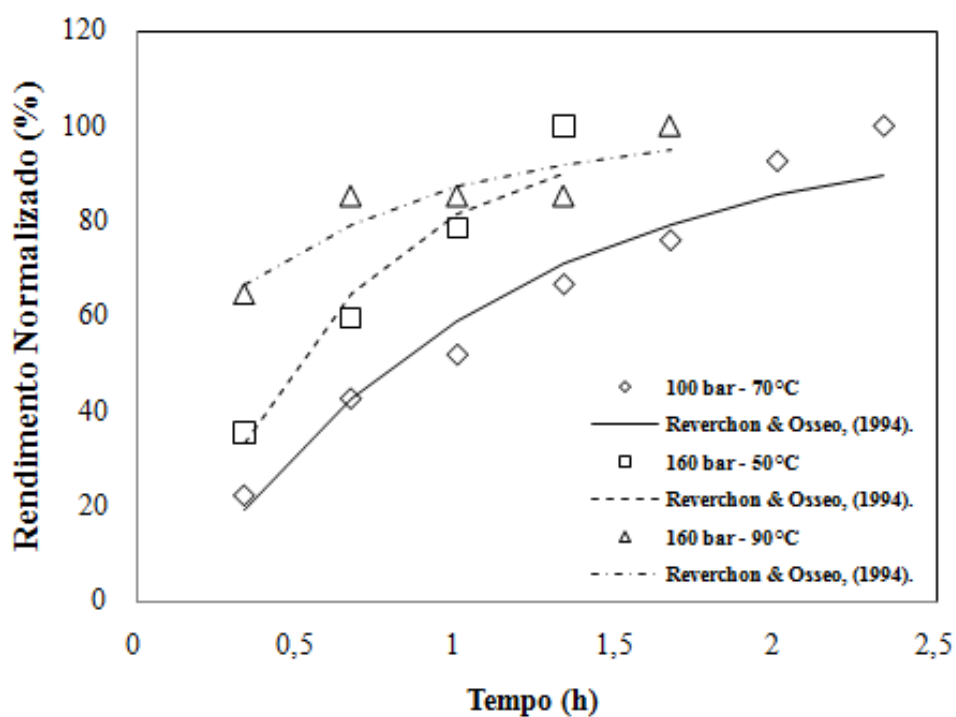
Os desvios para o modelo Zeković *et al.* (2003) variaram de 3,7892% a 39,1126%. Os valores dos rendimentos experimentais e dos respectivos desvios podem ser vistos na Tabela 15.

**Tabela 15** - Rendimento normalizado calculado, o parâmetro e desvio relativo obtido para o modelo de Zeković *et al.* (2003) nas diferentes condições de pressão e temperatura

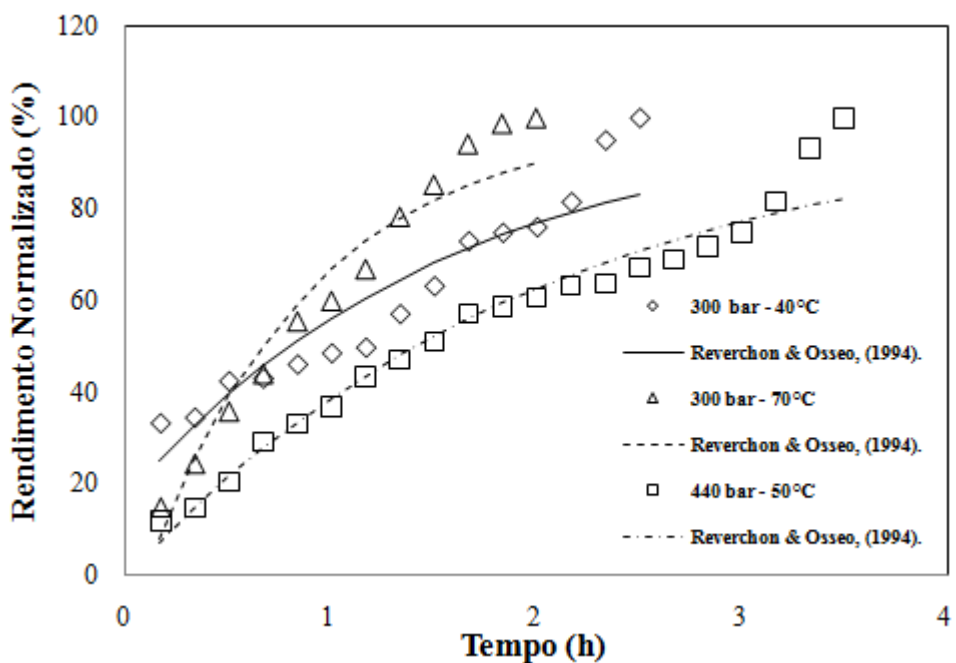
Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (K)	RN <sub>calculado</sub> (%)	a	b	DR (%)
1	160	323	90,1272	-1,9143	0,2369	7,0654
2	160	363	95,1885	-1,4526	-0,6131	5,0234
3	440	323	92,6016	-0,5001	0,0093	8,8442
4	440	363	86,0728	-0,6336	0,0035	29,9186
5	300	313	83,2364	-0,6431	-0,1781	10,058
6	300	373	81,7891	-0,4933	0,2485	39,1126
7	100	343	89,4666	-1,0193	0,1276	8,1828
8	500	343	87,6404	-0,3147	0,1123	3,7892
9	300	343	90,2521	-1,2264	0,1246	11,1599

Nas Figuras 13, 14 e 15 pode ser observar o ajuste do modelo de Reverchon & Osseo (1994) aos resultados obtidos experimentalmente.

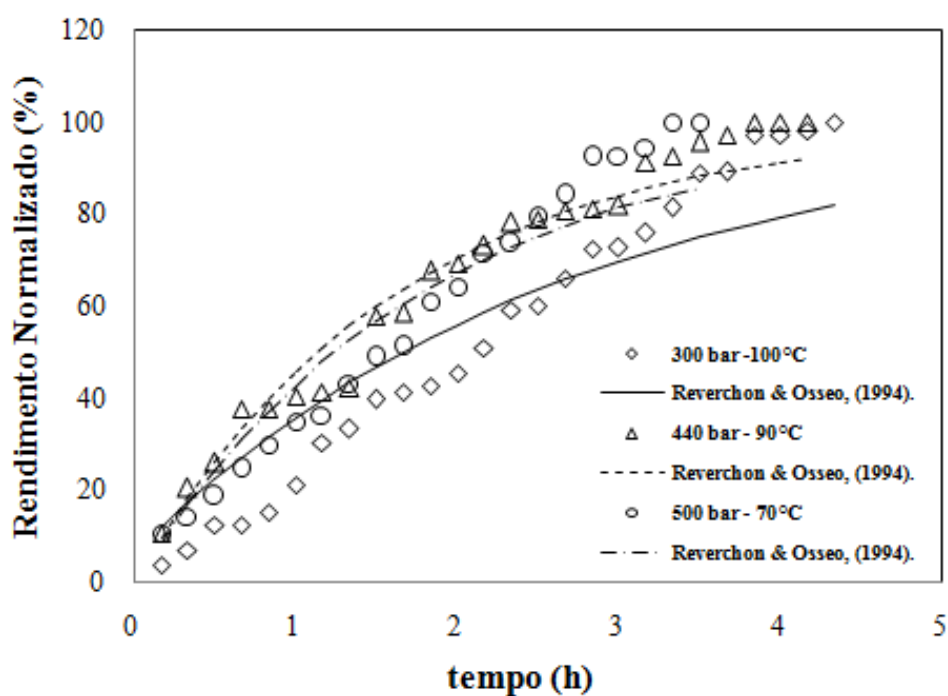
Yusup, Mičić e Chan (2013) estudaram a extração do óleo das sementes de pinhão-mansão usando CO<sub>2</sub> supercrítico e o resultado obtido experimentalmente foi comparado com os modelos de Reverchon & Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003), e relatam que altos valores dos coeficientes de correlação mostraram que ambos os modelos são capazes de se ajustar com o resultado experimental.



**Figura 13** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon & Osseo (1994), a 100 – bar e 70 °C; 160 bar – 50 °C e 160 bar – 90 °C

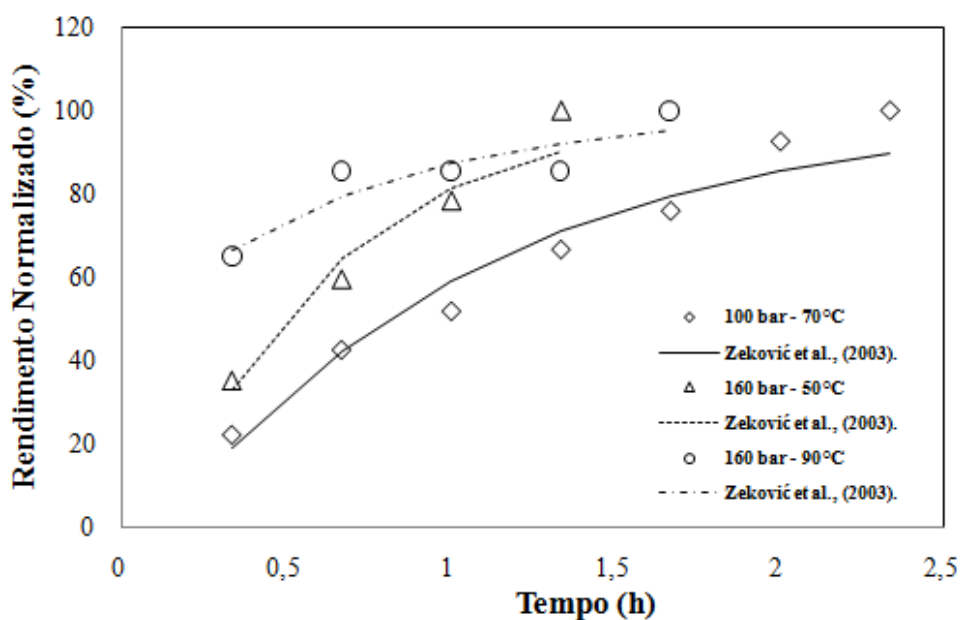


**Figura 14** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon & Osseo (1994) a 300 – bar e 40 °C; 300 bar – 70 °C e 440 bar – 50 °C.

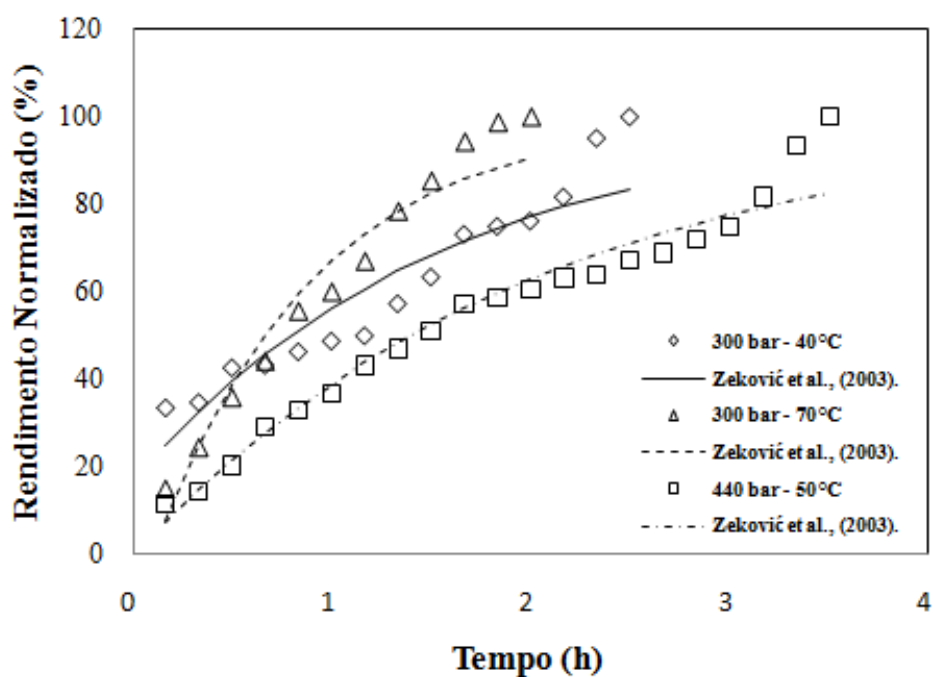


**Figura 15** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Reverchon & Osseo (1994) a 300 – bar e 100 °C; 440 bar – 90 °C e 500 bar – 70 °C.

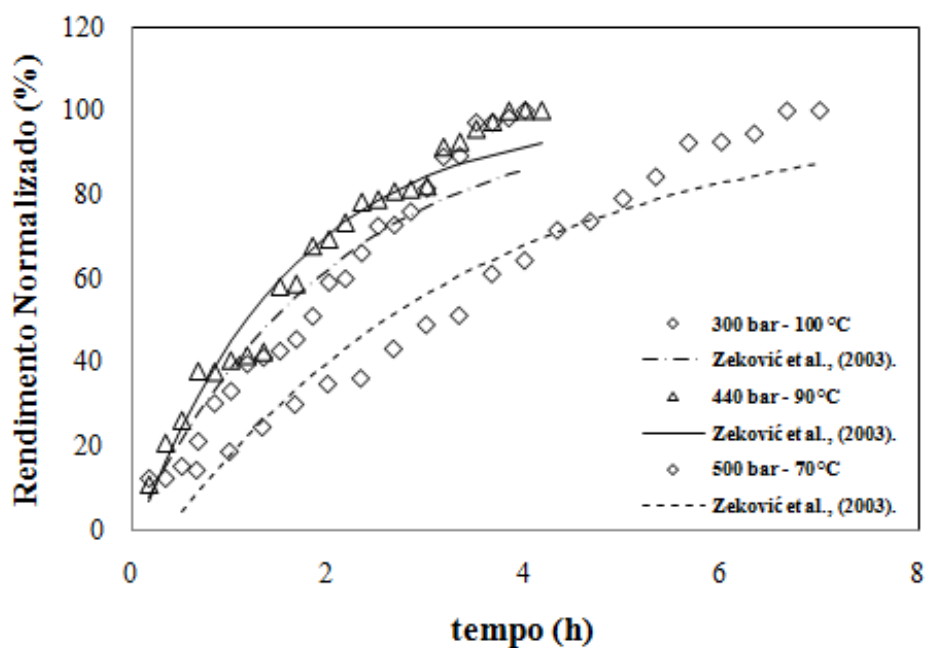
Nas Figuras 16, 17 e 18 pode-se observar o ajuste do modelo de Zeković *et al.* (2003) aos resultados obtidos experimentalmente.



**Figura 16** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković *et al.* (2003) a 100 – bar e 70 °C; 160 bar – 50 °C e 160 bar – 90 °C.



**Figura 17** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković *et al.* (2003) a 300 – bar e 40 °C; 300 bar – 70 °C e 440 bar – 50 °C.



**Figura 18** - Curvas de extração experimental e predita pelo modelo de Zeković *et al.* (2003) a 300 – bar e 100 °C; 440 bar – 90 °C e 500 bar – 70 °C.

Isto também foi visto neste estudo e altos valores dos coeficientes de correlação dos modelos Reverchon & Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003) foram obtidos, comprovando que ambos os modelos são capazes de representar a parte mais rápida do processo de extração, presente no início da curva da extração.

Apesar de serem modelos empíricos são mais simples do que os que envolvem transferência de massa. Todos os três modelos foram aptos a representar a extração do óleo da microalga em questão, usando fluido supercrítico, e podem ser aplicados em outros processos de extração envolvendo outras microalgas.

Os modelos, com seus respectivos parâmetros, podem ser aplicados para outras microalgas com composição química semelhantes, assim como condições operacionais, visando prever o comportamento da extração do óleo e otimizar o tempo operacional.

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Inicialmente, pode-se concluir que a extração supercrítica foi uma técnica promissora para a extração do óleo da microalga *Desmodesmus sp.*, usando o CO<sub>2</sub> supercrítico. Os melhores resultados obtidos foram nas condições de 300 bar – 100 °C, 500 bar – 70 °C e 440 bar e 90 °C, alcançando valores de 3,342%, 3,103% e 2,586%, respectivamente. Foi observado também que pressão e temperatura foram variáveis significativas para a extração do óleo.

A biomassa residual após a extração supercrítica foi avaliada, com a finalidade de avaliar o potencial do resíduo e os resultados indicaram que é promissora, podendo ser utilizada em diversas áreas como para ração animal, suplementação humana, entre outros.

Além disso, o óleo extraído e caracterizado por cromatografia gasosa, indicou a presença dos ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e  $\gamma$ -linolênico (C18:3) sendo os mais abundantes no óleo da *Desmodesmus sp.* e mostrou que mesmo apresentando o maior rendimento, o soxhlet não apresentou maior concentração em ácidos graxos

Os modelos empíricos estudados, Esquível *et al.* (1999), Reverchon & Osseo (1994) e Zeković *et al.* (2003), são aptos a representar a extração do óleo da microalga em questão, apesar do modelo de Esquível *et al.* (1999) ter melhor ajustado os resultados da extração.

Diante dos resultados encontrados, propõem-se como sugestões:

- a modelagem dos dados experimentais, utilizando outros modelos de transferência de massa, como o modelo de Sovová (1994);
- utilizar a biomassa residual para produzir algum produto de valor comercial;
- a realização de análises de cromatografia gasosa do óleo extraído em diferentes pontos da curva de EFSC para verificar a influência do tempo de extração na quantidade e qualidade dos compostos extraídos;
- a avaliação de custos de processo para a extração com fluido supercrítico versus a extração convencional;
- a investigação da aplicação de um co-solvente visando aumentar o rendimento da extração com fluido supercrítico.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGAEBASE. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 08 ago. 2014
- ANDRICH, G.; ZINNAI, A.; NESTI, U.; VENTURI, F.; FIORENTINI, R. Supercritical Fluid Extraction of Oil from Microalga *Spirulina (arthrospira) platensis*. *Acta Aliment.* 35 (2), 195, 2006.
- AQUAFUELS. Disponível em: <<http://www.aquafuels.eu>>. Acesso em: nov. 2013.
- BARROS, N. A.; ASSIS, A. V. R ; MENDES, M. F. Extração do óleo de manjeriço usando fluido supercrítico: análise experimental e matemática. *Ciência Rural*, 44 (8), 2014
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora Unicamp, 1996.
- BECKER, E.W. Micro-algae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University, p.222-256, 1988.
- BECKER, E.W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge studies in biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press; 239pp, 1994.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science. p.312-351, 2004.
- BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae- A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co- products. *Rewable and Sustainable Reviews*. 14, 557-577, 2010.
- BROWN, M.R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.145, p.79-99, 1991.
- BROWN, M. R.; MULAR, M.; MILLER, I.; FARMER, C. & TRENERRY, C. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11, 247-255, 1999.
- BRUNNER, G. *Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process*. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, v.4, 1994.
- BRUNETTI, L. Deacidification of Olive Oils by Supercritical Carbon Dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc., U.S.*, 66 (2):209-217, 1989.
- CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A.; VON HOLST, C. *Supercritical Fluid Extraction for Liquid*

Chromatographic Determination of Carotenoids in *Spirulina pacifica* Algae: A Chemometric Approach. *J. Chromatogr., A*, 912, 61, 2001.

CARVALHO JR., R.N. Obtenção de Extrato de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por Extração Supercrítica: Determinação do Rendimento Global, de Parâmetros Cinéticos e de Equilíbrio e Outras Variáveis do Processo. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade de Campinas, 2004.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W. Processos de extração supercrítica aplicados a produtos naturais. In: Cassel, E.; Rocha, L.M. (Org.). *Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapêuticos*, 2.ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 213-228, 2008.

CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, D.; CHEN, X.; WANG, J. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two –step catalytic conversion. *Bioresour. Technol.*, 111, 208-214, 2011.

CHENG, C. H.; DU, T. B.; PI, H. C.; JANG, S. M.; Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO<sub>2</sub>. *Bioresour. Technol.* 102, 10151-10153, 2011.

CHEUNG, P.C.K. Temperature and Pressure Effects on Supercritical Carbon Dioxide Extraction of n-3 Fatty Acids from Red Seaweed. *Food Chemistry*, v.65, p.399-403, 1999.

CHEUNG, P. C. K.; LEUNG, A. Y. H.; ANG, P. O., JR. Comparison of Supercritical Carbon Dioxide and Soxhlet Extraction of Lipids from a Brown Seaweed, *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4228. 1998.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHOI, K.; NAKHOST, Z.; KRUKONIS, V.; KAREL, M. Supercritical Fluid Extraction and Characterisation of Lipids from Algae *Scenedesmus obliquus*. *Food Biotechnol.* 1987, 1 (2), 263.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift fur Naturforschung, Tübingen*, v. 59c, p. 55-59, 2004.

COSTA, J.A.V.; MORAIS, M.G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 2-9, 2011.

CONVERTI, A.; CASAZZA, E.Y.; ORTIZ, P. PEREGO, BORGUI, M DEL. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process. Intensif.* 48, 1146-1151, 2009.

CRAMPOM, C., BOUTIN, O., BADENS, E. Supercritical carbon dioxide extraction of molecules of interest from microalgae and seaweeds. *I&EC research*, 50, 8941-8953, 2011.

CRAIGIE, J.S. Cell walls. In: Cole KM, Sheath RM, editors. *Biology of the red algae*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 221-257, 1990.

DERNER, R. B., S. OHSE, M. VILLELA, S. M. de CARVALHO e R. FETT. *Microalgas, produtos e aplicacoes*. *Ciencia Rural* n. 36, v. 6, p. 1959 -1967, 2006

ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M. B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. *Journal of Supercritical Fluids*. v.16, p. 43-58,1999.

FÁBREGAS, J.; FERRÓN, L.; GAMALLO, Y. et al. Improvement of growth and cell productivity by aeration rate in cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, v. 48, p. 107-111, 1994.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *Journal of Supercritical Fluids*. v.14, p. 235-245, 1999.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B. DE; PRADO, J. F.; REZIG, S. H. *Algas, uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Porto Alegre: Artmed, 332p. 2010.

GALLOWAY, J. A., KOESTER, K. J., PAASCH, B. J., MACOSKO, C. W. Effect of sample size on solvent extraction for detecting cocontinuity in polymer blends. *Polymer*. 45, 423 – 428, 2004.

GARCIA ALBA, C.; TORRI, C.; SAMORÌ, J.; VAN DER SPEK, D.; FABBRI, S.R.A.; KERSTEN, D.W.F. Hydrothermal treatment (HTT) of microalgae: evaluation of the process as conversion method in an algae biorefinery concept. *Energy Fuels*, v. 26 (1), p. 642-657, 2012.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends in Biotechnology*, n. 15, p. 401-409, 1997.

GUIL-GUERRERO, J. L.; NAVARRO-JUÁREZ, R.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C.; CAMPRA-MADRID, P. & REBOLLOSO-FUENTES, M.M. Functionnal properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering*, 65, 511-517, 2004.

GOUVEIA, L.; NOBRE, B.; MARCELO, F.; MREJEN, S.; CARDOSO, M.; PALAVRA, A.; MENDES, R. Functional Food Oil Coloured by Pigments Extracted from Microalgae with Supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chem.*, 101, 717, 2007.

HALIM R, DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol Adv* 30 709-732, 2012.

HALIM R, GLADMAN B, DANQUAH MK, WEBLEY PA. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*;102(1):178–85, 2011.

HERRERO, M.; SENORANS, F. J.; CIFUENTES A.; IBANEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga Food Chemistry, 93, pp. 417–423, 2005

HOANG, M. H.; HA, N. C.; THOM, L. T.; TAM, L. T.; ANH, H. T. L., THU, N. T. H.; HONG, D. D. Extraction of squalene as value-added product from the residual biomass of *Schizochytrium mangrovei* PQ6 during biodiesel producing process. Journal of Bioscience and Bioengineering. VOL. 118 No. 6, 632-639, 2014.

HOEK, C. V. Algae: an introduction to phycology. London: Cambridge University, 1995.

HONG, D. D., MAI, D. T. M., THOM, L. T., HA, N. C., LAM, B. D., TAM, L. T., ANH, H. T. L., AND THU, N. T. H. Biodiesel production from Vietnam heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* PQ6, J. Biosci. Bioeng., 116,180-185, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4<sup>a</sup> ed. Brasília: Anvisa, 2005.

KAUR SIMRAT, MANAS SARKAR, RAVI B. SRIVASTAVA, HEMANTA K. GOGOI AND MOHAN C. KALITA. Fatty acid profiling and molecular characterization of some freshwater microalgae from India with potential for biodiesel production. New Biotechnology. Volume 29, Number 3, 2012.

KHOO, H. H., SHARRATT, P. N.; DAS, R. K.; BALASUBRAMANIAN, P. K. NARAHARIESETTI, S.; SHAIK, S. Life cycle energy and CO<sub>2</sub> analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminary results and comparisons. Bioresour. Technol. 102, 5800-5807, 2011.

LANGA, E.; CACHO, J.; PALAVRA, A.M.F.; BURILLO, J.; MAINAR, A.M.; URIETA, J.S. The Evolution of Hyssop Oil Composition in the Supercritical Extraction Curve Modeling of the Extraction Process. Journal of Supercritical Fluids, v. 49, p.37-44, 2009.

LEE, O. K.; KIM, A. L.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; JUNG, Y. T.; LEE, J. W.; LEE, E.Y. Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology. 132: 197-201, 2013.

LIANG, S.; LIU, X.; FENG, C.; ZIJIAN, C. Current microalgal health food R & D activities in China. Hydrobiologia 512:45–48, 2004.

LIAU, B. C; SHEN, C.T.; LIANG, F. P.; HONG, S. E.; HSU, S. L; JONG, T. T.; CHANG, C.M.J. Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. J. supercrit. Fluids. 55, 169-175, 2010

LOPES DA SILVA, T., GOUVEIA, L., REIS, A. Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production, Appl. Microbiol. Biotechnol., 98, 1043-1053, 2013.

LUQUE-GARCÍA, J. L., CASTRO, M. D. LD., Ultrasound: A powerful tool for leaching. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 22, 41–47, 2003.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D., MANTELL, C., RODRÍGUEZ, M., MARTÍNEZ DE LA OSSA, E., LUBIÁN, L.M., MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering* 66, 245–251, 2005.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D., FERNANDEZ-SEVILLA, M., ACIÉN-FERNÁNDEZ, F.G., CERÓN-GARCIA, M.C., MOLINA-GRIMA, E. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry* 123, 928–935, 2010.

MACHMUDAH, S.; SHOTIPRUK, A.; GOTO, M.; SASAKI, M.; HIROSE, T. Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using Supercritical CO<sub>2</sub> and Ethanol as Entrainer. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 3652, 2006.

MARTIN, P. D., Sonochemistry in industry. Progress and prospects. *Chem. Ind-London.* 233–236, 1993.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. *Industrial Engineering of Chemistry Research*, v. 42, p. 1057- 1063, 2003.

MATTIETTO, R. A.; MATTA, V. M. Utilização de um delineamento composto central rotacional para avaliação microbiológica de polpas de açaí pasteurizadas. *Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2012.

MAUL, A. A., WASICHY, R., BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. *Rev. Bras. Farmacog. São Paulo*, v. 5, p. 185-200, 1996.

MENDES, M.; PESSOA, F.; ULLER, A. An economic evaluation based on an experimental study of the vitamin E concentration present in deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 23, p. 257-265, 2002.

MENDES, M.F., PESSOA, F.L.P., QUEIROZ, E.M., MENDES, R., PALAVRA, A., COELHO, J. Modelos do processo de transporte na extração do óleo essencial do urucum utilizando fluido supercrítico, *Simposio Brasileiro de Urucum*, Joao Pessoa, 2006.

MENDES, R. L.; FERNANDES, H. L.; COELHO, J. A. P.; CABRAL, J. M. S.; PALAVRA, A. M. F.; NOVAIS, J. M. J. *Appl. Phycol.* 6, 289, 1994.

MENDES, R.; FERNANDES, H.; COELHO, J.; REIS, E.; CABRAL, J.; NOVAIS, J.; PALAVRA, A. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Carotenoids and other Lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chem.*, 53, 99, 1995.

MENDES, R.; NOBRE, B.; CARDOSO, M.; PEIRERA, A.; PALAVRA, A. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Compounds with Pharmaceutical Importance from Microalgae. *Inorg. Chim. Acta.*, p.356-328, 2003.

MENDES, R.; REIS, A.; PALAVRA, A. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\gamma$ -Linolenic Acid and Other Lipids from *Arthrospira (spirulina) maxima*: Comparison with Organic Solvent Extraction. *Food Chem.* 99, 57, 2006.

MENDIOLA, J.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÀNS, F. J. Screening of Functional Compounds in Supercritical Fluids Extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chem.* 102, 1357, 2007.

MENDIOLA, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, D.; RUPEREZ, F.; MARTÍN-ALVAREZ, P.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; BARBAS, C.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORANS, F. Enrichment of Vitamin E from *Spirulina platensis* Microalga by SFE. *J. Supercrit. Fluids*, 43, 484, 2008.

MERCER, P. ; ARMENTA, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. *Eur. J. Lipid Technol.* 113, 539-547, 2011.

METCALFE, L.D. SCHMITZ, A.A. PELKA, J.R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S.R.S. Supercritical Fluid Extraction of Peach (*Prunus persica*) Almond Oil: Kinetics, Mathematical Modeling and Scale-Up. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 51, p.10-16, 2009.

MIAO, X.; WU, Q.; YANG, C. Fast Pyrolysis of Microalgae to Produce Renewable Fuel. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 71 (2), 855. 2004

MONTERO, O., MACÍAS-SÀNCHEZ, M.; LAMA, C.; LUBÍAN, L., MANTELL, C., RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\beta$ -carotene from a Marine Strain of the Cyanobacterium *Synechococcus* species. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9701, 2005.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, v. 129, p. 439 - 445, 2007.

MOUAHID, A., CRAMPON, C., AMINE, S-A., BADENS, E. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modeling. *J. of supercritical fluids*, 77, 7-16, 2013.

MOURA, L.S. Obtenção por Extração Supercrítica do Extrato de Funcho (*Foeniculum vulgare*): por Determinação das Isotermas de Rendimento Global, de Parâmetros Cinéticos, e do Equilíbrio de Fases. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NATURAL HISTORU MUSEUM. Disponível em: <<http://www.nhm.ac.uk/>>. Acesso em: 3 set 2014.

NOBRE, B.; MARCELO, F.; PASSOS, R.; BEIRÃO, L.; PALAVRA, A.; GOUVEIA, L.; MENDES, R. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Astaxanthin and other Carotenoids from the Microalga *Haematococcus pluvialis*. *Eur. Food Res. Technol.*, 223, 787, 2006.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.

OLIVEIRA, E. L. G., SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Review of kinetic models for supercritical Fluid extraction, *Chemical Engineering Research and Design*. 89, 1104–1117, 2011.

PALAVRA, A. M. F.; COELHO, J. P.; BARROSO, J. G.; RAUTER, A. P.; FARELEIRA J. M. N. A.; MAINARD, A.; URIETAD, J. S.; NOBRE, B. P.; GOUVEIA, L.; MENDES, R. L.; CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants. *J. of Supercritical Fluids*. 60: 21– 27, 2011.

PAWLISZYN, J., Kinetic model of supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. Sci*. 31, 31–37, 1993.

PAOLETTI, C.; VINCENZINI, M.; BOCCI, F.; MATERASSI. Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina máxima* e *Spirulina platensis*. In: materassi R. (ed) atti del convegno “Prospettive della coltura di *Spirulina* in Itália”Accademia dei Georgofili, Firenze, p. 111-125, 1980.

PEREIRA, C. S. S. Avaliação De Diferentes Tecnologias Na Extração Do Óleo Do Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L), dissertação de mestrado, UFRRJ,2009.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds:fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*,v. 3, p. 340-372, 2010.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. In the Search of New Functional Food Ingredients from Algae. *Trends Food Sci. Technol.*, 19, 31, 2008.

POPOOLA, T. O. S., YANGOMODOU, O. D., Extraction, properties and utilization potentials of cassava seed oil. *Biotechnology*. 5, 38–41, 2006.

PULZ,O., GROSS,W.. Valuble products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65: 635-648, 2004.

RAMOS-SUÁREZ, J. L.; CUADRA, F. G.; ACIÉN G. F.; CARRERAS, N. Benefits of combining anaerobic digestion and amino acid extraction from microalgae. *Chem. Eng. Journal.*, 258:1-9, 2014.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F.& EICHHORN,S. E. *Biologia Vegetal*. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

RENAUD, S.M. et al. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, v.170, n.2, p.147-159, 1999.

REVERCHON, E., OSSÉO, S. Comparison of processes for the supercritical carbon dioxide extraction of oil from soybean seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 71, p. 1007-12, 1994.

RICHMOND, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004.

RODRIGUEZ-GARCIA I, GUIL-GUERRERO JL. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem* 108:1023, 2008.

ROSA, P.T.V.; PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ-REINOSO, B.; SMITH JR., R.L.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L.J.; PETERS, C.J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: Meireles, M.A.A. (Ed.). *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*. Boca Raton: CRC Press, p. 269-401, 2009.

SILVA, C. F.; MENDES, M. F.; PESSOA, F. L. P.; QUEIROZ, E. M. Supercritical carbon dioxide extraction of macadamia (*Macadamia integrifolia*) nut oil: experiments and modeling. *Braz. J. Chem. Eng.*.vol.25 no.1, 2008.

SILVA, F. P. T.; LIBERAL, E. M.; PESSOA, F. L. P. Uso do fluido supercrítico na extração de produtos naturais. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos- SBCTA*. v.31, p.48-61, jan/jun, 1997.

SHENG, J.; VANNELA, R.; RITTMANN, B. E.; Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803, *Bioresour. Technol.*102, 1697-1703, 2011.

SHIMAMATSU H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia* 512:39–44, 2004.

STENGEL, D.B., CONNAN, S., POPPER, Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29, 483-501, 2011.



SKULBERG, O. In: RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> – I. Modelling of extraction curves. Chemical Engineering Science, v.49, n.3, p. 409-414, 1994.

SOVOVA H., STATEVA R.P.: Supercritical Fluid Extraction from Vegetable Materials. (Eng) Rev. Chem. Eng. 27(3-4), 79-156, 2011.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C.J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 101, n° 2, 87-96, 2006.

TAHER, H; AI-ZUHAIR, S; AI-MARZOUQI A.; HAIK, Y.; FARID, M.; TARIQ, S. Supercritical carbon dioxide extraction of lipids :Process optimization and laboratory scale-up. The Journal of Supercritical Fluids.86, 57-66, 2014.

THANA P, MACHMUDAH S, GOTO M, SASAKI M, PAVASANT P, SHOTIPRUK A. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Bioresource Technology;99:3110–5, 2008.

TANG, S.; QUIN, C.; WANG, H.; LI, S.; TIAN, S. Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of dha from oil rich microalgae. J. Supercrit. Fluids. 57, 44-49, 2011.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES. M.E. Microalgas como matéria prima para a produção de biodiesel. Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. P.91-96, 2006.

TOKUSOGLU O & UNAL MK.. Biomass nutrient profiles of three microalgae: Spirulina platensis, Chlorella vulgaris, and Isochrysis galbana. J Food Sci. 68:1144–48, 2003.

TRIPATHI, U. et al. Production of astaxanthin in Haematococcus pluvialis cultured in various media. Bioresource Technology, n.68, p.197-199, 1999.

VALDERRAMA, J.; PERRUT, M.; MAJEWSKI, W. Extraction of Astaxantine and Phycocyanine from Microalgae with Supercritical Carbon Dioxide. J. Chem. Eng. Data, 48, 827, 2003.

VERDUGO, M.; LIM, L.T.; RUBILAR M. Electrospun Protein Concentrate Fibers From Microalgae Residual Biomass. J. Polym. Environ., 22:373-383, 2014.

WANG, Y., YIPING, W., YANG, J., PFEFFER, R., DAVE, R., MICHNIAK, B., WANG, Y. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. Journal of Powder Technology 164, 94–102, 2006.

WILLIAMS, D. F. Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. J. Am. Oil Chem. Soc., U.S.A., 36 (11): 1769-1788, 1981.

YAMAGUCHI, K. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oils from Antarctic Krill. J. Agric. Food Chem, U. S. A., 34 (5): 904-907, 1986.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. Journal of agricultural and food chemistry, v. 49, p. 4581-4583, 2001.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O.P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. Phytochemistry, v.9, n.30, p.2963-2967, 1991.

YUSUP, S; MIĆIĆ, V.; CHAN, Y.H. Modeling of supercritical carbon dioxide of jatropha (*Jatropha curcas* L.) seeds. MALREP, 2013.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High Quality Biodiesel Production from a Microalga *Chlorella protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters. J. Biotechnol. 126, 499, 2006.

ZEKOVIĆ, Z.; LEPOJEVIĆ, Z & TOLIĆ, A. Modelling of thyme – supercritical carbon dioxide extraction system, II. The influence of extraction time and carbon dioxide pressure, Sep .Sci. Technol.38, 541-552, 2003.