

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Aplicação de tecnologias de extração de clorofilas e carotenoides de  
microalgas e uso da biomassa microalgal na adsorção de metais  
pesados**

Tese de Doutorado

Allan Valcareggi Morcelli

Porto Alegre

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Aplicação de tecnologias de extração de clorofilas e carotenoides de  
microalgas e uso da biomassa microalgal na adsorção de metais  
pesados**

Allan Valcareggi Morcelli

Tese de doutorado apresentada como requisito para a obtenção do título de  
Doutor em Engenharia.

**Orientador: Prof. Dr. Nilson Romeu Marcílio**

**Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Rech**

Porto Alegre

2021

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Wilson e Regina Helena, agradeço por todo o apoio que sempre recebi e por sempre terem tornado a minha educação uma prioridade.

Aos meus orientadores, Nilson Marcílio e Rosane Rech, agradeço por todos os ensinamentos e por terem sido grandes apoiadores.

Aos professores Rafael Soares e Paula Staudt, agradeço pela disponibilidade e interesse em contribuir ao meu trabalho de doutorado de forma tão significativa.

Aos colegas de LAPA, especialmente ao professor Claudio Frankenberg e aos Eng. Químicos Willian Andrade e Gabriel Vencato, agradeço pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros do LOPE, especialmente aos professores Eduardo Cassel e Rubem Vargas, e aos Eng. Químicos Pedro Tondo e Leandro Siqueira, agradeço pelo empenho em viabilizar este trabalho.

À Engenheira Química Gerti Weber Brun, agradeço por todo o incentivo e apoio para que conseguisse conciliar as atividades como professor com a conclusão deste trabalho de doutorado.

Aos meus amigos, colegas de trabalho e alunos, agradeço por terem acompanhado com entusiasmo esta trajetória, sempre oferecendo palavras de apoio.

A todos os professores que passaram pela minha vida, muito obrigado.

*“I did then what I knew how to do. Now that I know better, I do better.”*

*— Maya Angelou*

## Resumo

A sustentabilidade é um fator chave no desenvolvimento de soluções para os desafios globais de hoje em dia e requer a aplicação de tecnologias ambientalmente benéficas. Nesse contexto, é crescente o interesse em explorar o potencial das microalgas como valiosas matérias-primas para diferentes aplicações, tornando a biorrefinaria multiproduto uma abordagem que deve reduzir o alto custo da tecnologia microalgal, levando a aplicações em larga escala em um futuro próximo. *Heterochlorella luteoviridis* e *Chlorella sorokiniana* são espécies de microalgas consideradas importantes fontes de pigmentos como clorofila a e b, luteína e  $\beta$ -caroteno. No entanto, os pigmentos produzidos por microalgas são retidos nas organelas dentro das células ou no citoplasma, e a parede celular atua como uma barreira dificultando a extração desses compostos. A extração eficiente e econômica é considerada fundamental para viabilizar a produção biológica de pigmentos em larga escala. Considerando o número escasso de estudos experimentais avaliando solventes orgânicos comumente usados, permitidos pela legislação ambiental para extrair compostos de microalgas, este trabalho teve como objetivo a extração da clorofila a, clorofila b e dos carotenoides encontrados em *Heterochlorella luteoviridis* e *Chlorella sorokiniana*. Os solventes etanol, acetona, acetato de etila e hexano foram utilizados para a extração em batelada, e os rendimentos de extração e perfis de carotenoides dos extratos foram determinados para avaliar a aplicabilidade desses solventes. Três razões de solvente para biomassa foram testadas (100:1, 200:1 e 1000:1), entretanto esta variável não afetou os resultados na maioria dos casos. O etanol apresentou a maior eficiência na recuperação de clorofilas de microalgas, apresentando altos rendimentos e sendo, portanto, recomendado nesta aplicação. Quanto à recuperação de carotenoides, a acetona figurou entre os solventes mais eficientes na extração de violaxantina, luteína, zeaxantina e caroteno de ambas as biomassas de microalgas, demonstrando ser um solvente orgânico geralmente adequado nesta aplicação. O modelo COSMO-SAC corroborou os resultados de extração, provando ser uma importante ferramenta na triagem de solventes para processos de extração. Em uma segunda abordagem, um planejamento composto central foi empregado para avaliar o uso de misturas sub e supercríticas de CO<sub>2</sub>+etanol para extrair clorofilas e carotenoides da microalga *Chlorella sorokiniana*. Os perfis de carotenoides dos extratos foram totalmente avaliados, e as condições ótimas para a extração de clorofila a, clorofila b, carotenos, luteína, zeaxantina e violaxantina foram diferenciadas. A temperatura de extração, a

pressão e a composição da mistura de solventes mostraram-se fatores relevantes, pois as condições experimentais proporcionaram resultados de extração fundamentalmente diferentes. A presença de etanol mostrou-se essencial para a extração eficiente de clorofilas e para melhorar substancialmente a recuperação de carotenoides. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a integridade celular e indicou que o aumento da pressão pode ter afetado positivamente a extração dos compostos ao causar rompimento das partículas. Além disso, o COSMO-SAC foi usado para calcular os coeficientes de atividade de diluição infinita (CADIs) de carotenoides na mistura solvente. Esta abordagem teórica foi capaz de corroborar os resultados experimentais ao prever com precisão a composição ideal do solvente para extrair compostos, mais uma vez provando que o modelo COSMO-SAC é uma ferramenta importante para a otimização de processos de extração de biomoléculas. Em uma abordagem sobre o potencial de utilização da biomassa microalgal, este trabalho ainda avaliou a capacidade das biomassas de *C. sorokiniana* e *H. luteoviridis* em absorver metais pesados comumente encontrados em efluentes industriais de curtumes e da indústria de galvanoplastia. As remoções de metais pesados foram de 61,4 %  $\text{Cu}^{2+}$ , 90,2 %  $\text{Cr}^{3+}$ , 6,9 %  $\text{Cr}^{6+}$ , 93,7 %  $\text{Fe}^{2+}$ , 90,6%  $\text{Fe}^{3+}$  e 70,3 %  $\text{Zn}^{2+}$  para *H. luteoviridis*, e 65,6 %  $\text{Cu}^{2+}$ , 75,7 %  $\text{Cr}^{3+}$ , 5,4 %  $\text{Cr}^{6+}$ , 86,0 %  $\text{Fe}^{2+}$ , 63,5 %  $\text{Fe}^{3+}$  e 62,7 %  $\text{Zn}^{2+}$  para *C. sorokiniana*. A análise de regressão mostrou que a capacidade de sorção era dependente da microalga, da concentração de metal pesado em solução e do número atômico do adsorvato. Esses resultados indicaram que o uso de microalgas como bioissorventes é uma alternativa tecnológica promissora, e a remoção eficiente de ferro foi destacada.

**Palavras-chave:** Microalgas. Carotenoides. Extração com solventes. Extração com fluido supercrítico. COSMO-SAC. Metais Pesados. Bioissorventes.

## Abstract

Sustainability is a key factor in developing solutions to today's global challenges, and it requires the application of environmentally beneficial technologies. It encapsulates the development and exploitation of renewable sources of energy, food and bio-based products. In this context, there is a growing interest in exploiting the potential of microalgae as valuable raw materials for the production of biofuels. Nevertheless, several components of microalgal biomass present enormous potential for different applications, rendering the multi-product biorefinery an approach expected to reduce the high cost of microalgal technology, leading to large-scale applications in the near future. *Heterochlorella luteoviridis* and *Chlorella sorokiniana* are microalgal species considered important sources of pigments such as chlorophyll a and b, lutein and  $\beta$ -carotene. However, microalgae-produced pigments are retained in organelles within cells or in the cytoplasm, and the cell wall acts as a barrier making it difficult to extract these compounds. Efficient and cost-effective extraction is considered fundamental to make the large-scale biological production of pigments feasible. Considering the scarce number of experimental studies evaluating commonly used organic solvents permitted by legislation to extract microalgal compounds, this work aimed at the extraction of chlorophyll a, chlorophyll b and the carotenoids found in *Heterochlorella luteoviridis* and *Chlorella sorokiniana*. Ethanol, acetone, ethyl acetate and hexane were evaluated for the batch extraction of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids. Extraction yields and the carotenoid profiles of extracts were evaluated to assess the applicability of these solvents. Three solvent to biomass ratios were tested (100:1, 200:1 and 1000:1), however this variable did not affect the results in most cases. Ethanol showed the highest efficiency in the recovery of chlorophylls from microalgae, presenting high yields and therefore being recommended in this application. As for the recovery of carotenoids, acetone figured among the solvents found to be the most efficient in the extraction of violaxanthin, lutein, zeaxanthin and carotene from both microalgal biomasses, proving to be a generally suitable organic solvent in this application. COSMO-SAC corroborated extraction results, proving to be an important tool in the screening of solvents for extraction processes. In a second approach, a central composite



design was employed to evaluate the use of sub- and supercritical mixtures of CO<sub>2</sub>+ethanol to extract chlorophylls and carotenoids from the microalga *Chlorella sorokiniana*. The carotenoid profiles of extracts were fully evaluated, and the optimal conditions for the extraction of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenes, lutein, zeaxanthin and violaxanthin were differentiated. Extraction temperature, pressure and the composition of the solvent mixture proved to be relevant factors, as the experimental conditions rendered fundamentally different extraction results. The presence of ethanol proved to be essential for the efficient extraction of chlorophylls and to substantially improve the recovery of carotenoids. Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate cell integrity, and indicated that the increase of pressure may have positively affected the extraction of compounds by causing disruption of the particles. In addition, COSMO-SAC was used to calculate infinite dilution activity coefficients (IDACs) of carotenoids in solvent mixtures. This theoretical approach was able to corroborate experimental results by accurately predicting the optimal solvent composition to extract compounds, again proving that COSMO-SAC is an important tool for the optimization of extraction processes to recover biomolecules. Finally, to approach the applicability of the microalgal biomass, this work further evaluated the capacity of *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* biomasses to adsorb heavy metals commonly found in these industrial wastewaters. The heavy metal uptakes were 61.4 % Cu<sup>2+</sup>, 90.2 % Cr<sup>3+</sup>, 6.9 % Cr<sup>6+</sup>, 93.7 % Fe<sup>2+</sup>, 90.6 %, Fe<sup>3+</sup> and 70.3 % Zn<sup>2+</sup> for *H. luteoviridis*, and 65.6 % Cu<sup>2+</sup>, 75.7 % Cr<sup>3+</sup>, 5.4 % Cr<sup>6+</sup>, 86.0 % Fe<sup>2+</sup>, 63.5 %, Fe<sup>3+</sup> and 62.7 % Zn<sup>2+</sup> for *C. sorokiniana*. Regression analysis showed that sorption capacity was dependent on the microalga, the heavy metal concentration in solution and the atomic number of the adsorbate. These results indicated that the use of microalgae as biosorbents is a promising alternative technology, and the efficient removal of iron has been highlighted.

**Keywords:** Microalgae. Carotenoids. Solvent extraction. Supercritical fluid extraction. COSMO-SAC. Heavy metals. Biosorbents.

## Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura química da clorofila a e clorofila b. ....	16
Figura 2 - Estruturas moleculares dos principais carotenoides encontrados nas microalgas <i>C. sorokiniana</i> e <i>H. luteoviridis</i> . ....	18
Figura 3 - Estrutura molecular da astaxantina. ....	27
Figura 4 - Relação entre a distribuição de carga e o perfil sigma gerado por COSMO- SAC para a molécula de etanol. ....	41
Figura 5 - Fotobiorreatores do tipo <i>airlift</i> com trocador de calor interno desenvolvidos por Kochem et al. (2013). ....	56
Figura 6 - Apresentação da biomassa em pó da microalga <i>C. sorokiniana</i> produzida pela empresa Chlorella Manufacturing CO Ltd (Taiwan). ....	57
Figura 7 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado neste trabalho. ....	61

## Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

ANOVA	análise de variância
CADI	coeficiente de atividade a diluição infinita
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
<i>COSMO-SAC</i>	<i>Conductor-like Screening Model for Real Solvent Segment Activity</i>
DAD	detector de arranjo de diodos
DMF	dimetilformamida
E	porcentagem de etanol
EFS	extração com fluido supercrítico
<i>m</i>	massa (g)
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MSR	metodologia de superfície de resposta
P	pressão
$R^2$	coeficiente de determinação
$\sigma$	sigma
T	temperatura
TZVP	<i>Triple-Zeta Valence with Polarization</i>
v/v	volume/volume

# Sumário

<b>Capítulo 1 - Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2 – Objetivos .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo 3 - Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Microalgas.....</b>	<b>11</b>
3.1.1. Classificação e relevância .....	11
3.1.2. O conceito de biorrefinaria microalgal.....	12
3.1.3. Aplicações nutricionais da tecnologia de microalgas .....	14
3.1.4. Pigmentos sintetizados por microalgas .....	15
<b>3.2. Técnicas de extração de pigmentos produzidos por microalgas.....</b>	<b>21</b>
3.2.1. Extração com solventes orgânicos (Extração sólido-líquido).....	22
3.2.2. Extração de pigmentos de microalgas com solventes .....	24
3.2.3. Extração com fluido supercrítico .....	29
3.2.4. Extração com fluido supercrítico de pigmentos de microalgas .....	31
<b>3.3. Termodinâmica de processos de extração.....</b>	<b>35</b>
3.3.1. Equilíbrio de fases e a não-idealidade em solução.....	36
3.3.2. COSMO-SAC.....	39
<b>3.4. Adsorção de metais pesados por microalgas.....</b>	<b>42</b>
3.4.1. Contaminação de efluentes industriais por metais pesados .....	43
3.4.2. Processos de tratamento de efluentes contaminados por metais pesados.....	44
3.4.3. Tecnologia de adsorção de metais pesados .....	48
3.4.4. Biossorção de metais pesados.....	50
3.4.5. Aplicação de microalgas na biossorção de metais pesados .....	53
<b>Capítulo 4 – Extração de clorofilas e carotenoides das microalgas <i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>Heterochlorella luteoviridis</i>.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Materiais e métodos.....</b>	<b>55</b>
4.1.1. Solventes orgânicos .....	55
4.1.2. Cultivo de biomassa.....	56
4.1.3. Experimentos de seleção de solventes .....	57
4.1.4. Experimentos de extração com fluido sub e supercrítico .....	58
4.1.5. Extração exaustiva .....	61
4.1.6. Análise de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais.....	61
4.1.7. Determinação do perfil de carotenoides.....	62
4.1.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	62

4.1.9.	Cálculo da eficiência de extração e análise estatística dos dados .....	63
4.1.10.	Geração de perfis Sigma e cálculos de CADIs .....	63
<b>4.2.</b>	<b>Artigo 1 .....</b>	<b>64</b>
4.2.1.	Introduction .....	65
4.2.2.	Materials and methods .....	66
4.2.3.	Results and discussion.....	69
4.2.4.	Conclusions .....	73
4.2.5.	References .....	73
4.2.6.	Supporting Information.....	89
<b>4.3.</b>	<b>Artigo 2 .....</b>	<b>101</b>
4.3.1.	Introduction .....	103
4.3.2.	Materials and Methods.....	106
4.3.3.	Results and Discussion.....	112
4.3.4.	Conclusions .....	129
4.3.5.	References .....	135
<b>Capítulo 5 – Adsorção de metais pesados utilizando a biomassa <i>in natura</i> das microalgas <i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>Heterochlorella luteoviridis</i> .....</b>		<b>143</b>
<b>5.1.</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>143</b>
5.1.1.	Cultivo da biomassa.....	143
5.1.2.	Caracterização da composição e morfologia da biomassa microalgal .....	143
5.1.3.	Preparo do efluente sintético .....	144
5.1.4.	Experimentos de adsorção em batelada .....	145
5.1.5.	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) .....	145
5.1.6.	Cálculos de eficiência e capacidade de adsorção.....	146
5.1.7.	Análise por regressão.....	146
<b>5.2.</b>	<b>Artigo 3.....</b>	<b>147</b>
5.2.1.	Introduction.....	150
5.2.2.	Materials and Methods.....	152
5.2.3.	Results and Discussion .....	157
5.2.4.	Conclusions .....	166
5.2.5.	References .....	167
<b>Capítulo 6 – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros .....</b>		<b>197</b>
<b>6.1.</b>	<b>Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>198</b>
<b>Referências.....</b>		<b>200</b>



---

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes de rápido crescimento, que convertem a luz solar, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e uma pequena quantidade de nutrientes em biomassa. Existem mais de 30.000 espécies documentadas e isoladas de microalgas de rios e mares em todo o mundo (RAMMUNI et al., 2018; SHAH et al., 2016). No setor industrial, as microalgas encontram aplicação por serem capazes de utilizar o CO<sub>2</sub> como fonte única de carbono, atuando na captura desse gás causador do efeito estufa e potencialmente produzindo metabólitos de alto valor agregado. Na alimentação humana e animal, microalgas vêm sendo usadas por seu valor nutricional. Além disso, as microalgas contêm um grande número de compostos em sua composição química que apresentam potencial de aplicação nas indústrias médica e farmacêutica (DI LENA et al., 2019).

Nos últimos anos, a sustentabilidade tem representado um fator chave que requer a aplicação de tecnologias ambientalmente corretas, juntamente com o desenvolvimento e a exploração de fontes renováveis de energia, alimentos e produtos de base biológica. Nesse contexto, as microalgas vêm recebendo um interesse crescente como matéria-prima valiosa para a produção de biocombustíveis, incluindo biodiesel, biogás, bioetanol e biohidrogênio. No entanto, vários componentes da biomassa microalgal definem um enorme potencial para diferentes opções de valorização. Além dos principais ingredientes da biomassa, carboidratos, lipídios e proteínas, uma ampla gama de produtos de valor agregado, como pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados, macro e micronutrientes, vitaminas e muitos compostos bioativos podem ser obtidos por meio de processamento *downstream* apropriado. Prevê-se que esta abordagem de biorrefinaria de múltiplos produtos reduza o alto custo da tecnologia de microalgas, levando a aplicações em grande escala em um futuro próximo (KOUTRA et al., 2020).

*Heterochlorella luteoviridis*, anteriormente conhecida como *Chlorella luteoviridis*, é uma microalga listada no catálogo de novos alimentos desde 1997 e considerada segura para uso alimentar desde então. Apesar disso, poucos são os estudos

relacionados a ela, enfocando principalmente sua caracterização completa, incluindo seu perfil de carotenoides. *H. luteoviridis* sintetiza cerca de 1,2 a 3 mg de carotenoides por grama de biomassa, com a luteína como o pigmento principal (DIPRAT et al., 2017b; JAESCHKE et al., 2019). Por sua vez, *Chlorella sorokiniana* é uma espécie de microalga com alta tolerância a altas temperaturas e níveis de radiação solar, o que a torna um importante recurso para aplicação industrial (LEÓN-VAZ et al., 2019). Esta espécie de microalga é rica em carboidratos, vitaminas e proteínas, e vem sendo muito utilizada na nutrição humana e animal. *C. sorokiniana* apresenta alto potencial de fixação de CO<sub>2</sub> e é uma alternativa valiosa na produção comercial de importantes antioxidantes como a luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno (MATSUKAWA et al., 2000).

Clorofilas, carotenoides e ficobilinas são três das maiores classes de pigmentos fotossintéticos em microalgas. A clorofila é o principal pigmento encontrado nas microalgas e é o principal responsável pela fotossíntese. A clorofila encontra seu uso principal na indústria cosmética e como corante natural por sua alta ação estabilizante. Além dessas aplicações, a clorofila apresenta benefícios medicinais por suas propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias (KANG et al., 2018). Por sua vez, os carotenoides são pigmentos em abundância nas microalgas, responsáveis por absorver a luz solar em frequências de comprimento de onda que não são absorvidas pela clorofila. Após essa absorção, a energia é então transferida para a clorofila, reduzindo o excesso de energia que seria necessário para a fotossíntese, aumentando a eficiência desse processo metabólico (RAMMUNI et al., 2018). Além disso, os carotenoides apresentam atividade fotoprotetora contra o excesso de luz. Os pigmentos são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, nutracêutica, alimentícia, entre outras, por apresentarem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e hepatoprotetoras (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004; SPOLAORE et al., 2006).

Mais de 400 tipos de carotenoides são encontrados naturalmente em uma ampla gama de bactérias fotossintetizantes, fungos, algas e plantas. Dentre eles, o  $\beta$ -caroteno, na maioria dos casos, é o mais relevante (BEGUM et al., 2016a). O  $\beta$ -caroteno tem demonstrado vários benefícios à saúde humana e animal, pois é convertido em vitamina A no organismo, que auxilia na imunidade, previne cataratas, cegueira noturna e doenças de pele (AGARWAL; RAO, 2000). O  $\beta$ -caroteno também é utilizado como corante para melhorar a aparência de margarinas, queijos, sucos, entre outros produtos. Este carotenoide apresenta propriedades imunomoduladoras e antienvhecimento, e existem



estudos que associam o  $\beta$ -caroteno à redução do risco de doenças degenerativas, como o câncer. Por exemplo, *Dunaliella sp.* contém estereoisômeros *9-cis* e *total-trans* de  $\beta$ -caroteno que têm uma influência direta na redução da incidência de algumas variedades de câncer (BEGUM et al., 2016a).

A luteína, a zeaxantina e a violaxantina pertencem à classe dos carotenoides denominados xantofilas. Quando absorvidos pelo corpo humano, esses carotenoides se acumulam nas córneas, onde são responsáveis por protegê-las do espectro da luz azul e melhorar a clareza da visão. A luteína é usada para tratar doenças degenerativas dos olhos e doenças relacionadas à idade, como catarata, doença do nervo óptico, doença de Alzheimer e retinopatia diabética (CHEN et al., 2019). Por sua vez, a violaxantina é uma xantofila natural de cor laranja biossintetizada a partir da zeaxantina por reação de epoxidação. Sua aplicação potencial em produtos médicos e de saúde vem sendo destacada devido à sua forte atividade eliminadora de radicais ABTS+ e ao fato de que também demonstrou inibição válida da peroxidação lipídica e hemólise dos glóbulos vermelhos. A violaxantina purificada de *Dunaliella tertiolecta* e *Chloroidium ellipsoideum* também exibiu atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e pró-apoptótica contra linhagens de células cancerosas humanas *in vitro* (PASQUET et al., 2011a; WANG et al., 2018).

Devido a uma complexidade química inerentemente alta, é impraticável ter apenas um método de extração para a ampla gama de pigmentos geralmente presentes nas microalgas. Vários bioprodutos são retidos em organelas dentro das células ou no citoplasma. A parede celular ao redor da célula atua como uma barreira semipermeável dificultando a extração desses compostos (GONG; BASSI, 2016a). Geralmente, para reduzir o tempo de extração e facilitar a percolação do solvente pela célula, ela passa por processos como moagem, homogeneização e aplicação de micro-ondas ou ultrassom (MEZZOMO et al., 2011). Esses métodos apresentam desvantagens, como a introdução de perdas de biomassa no caso da moagem, e a dificuldade de escalonamento quando são aplicados micro-ondas ou ultrassom, devido à alta demanda de energia desses processos. Recentemente, estudos vêm sendo realizados com foco em novos métodos de pré-tratamento, incluindo a aplicação de campo elétrico pulsado ou moderado, que consiste na promoção da eletroporação da membrana celular, aumentando sua permeabilidade pela aplicação de um campo elétrico de alta intensidade (JAESCHKE et al., 2016; LUENGO et al., 2014).

No entanto, o uso de solventes orgânicos é uma opção simples, fácil e acessível para extração, exceto quando estes são muito caros ou quando são necessárias grandes quantidades (RAMMUNI et al., 2018). Em comparação com outros métodos, a extração com solventes orgânicos frequentemente atinge eficiências e purezas de extração suficientes ao ponto de ser escalonável para grandes processos industriais (CERÓN-GARCÍA et al., 2018). Há amplo “*know-how*” na construção e operação de equipamentos multiestágios para contato sólido-líquido, principalmente para a extração de óleos de sementes, como soja, girassol, canola, entre outros. A existência dessa tecnologia atualmente empregada torna sua aplicação na extração de compostos de microalgas mais atraente economicamente em comparação com tecnologias emergentes mais caras. No entanto, a legislação local restringe o uso de solventes orgânicos em aplicações alimentícias e farmacêuticas. Como exemplo, a legislação europeia permite entre os líquidos apenas etanol, acetona e acetato de etila (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2009). Por sua vez, em países como Brasil e EUA, o hexano também está listado e tem sido amplamente utilizado em processos de extração industrial (POTRICH et al., 2020).

A extração por fluido supercrítico (EFS) é considerada uma técnica alternativa promissora aos métodos convencionais de extração por solvente devido às várias propriedades distintas apresentadas pelos fluidos neste estado de agregação. Os fluidos supercríticos têm viscosidade relativamente baixa e alta difusividade, qualidades que permitem que eles penetrem em materiais sólidos porosos de forma mais eficaz e, conseqüentemente, gerem taxas de transferência de massa muito maiores (LANG; WAI, 2001). Processos de extração altamente seletivos podem ser desenvolvidos pela manipulação do poder de solvatação do fluido pela mudança de pressão e/ou temperatura, uma ferramenta particularmente útil para a extração de amostras complexas, como materiais vegetais (REVERCHON; DE MARCO, 2006). O CO<sub>2</sub> tem sido o solvente mais usado na EFS de compostos naturais devido ao seu ponto crítico relativamente baixo (72,8 atm, 31,1 ° C) e seu baixo custo. É um solvente seguro, não tóxico e não inflamável que apresenta baixo impacto ambiental. Sua baixa temperatura crítica é de especial interesse para a extração de moléculas termolábeis. No entanto, o CO<sub>2</sub> é notadamente um solvente apolar, tornando necessária a adição de cossolventes polares para a extração de compostos mais polares (LANG; WAI, 2001; VANDANA; TEJA, 1997). Entre eles, o etanol tem sido o modificador mais amplamente utilizado para a extração de compostos naturais,

uma vez que é geralmente permitido pelas legislações dos países para aplicações alimentares e farmacêuticas (ŞANAL et al., 2005).

É importante enfatizar a importância da polaridade do solvente em um processo de extração, visto que os solventes são mais capazes de recuperar aqueles compostos cuja polaridade é semelhante à sua (BALASUBRAMANIAN et al., 2011). Os produtos naturais bioativos geralmente têm estruturas complexas contendo vários grupos funcionais diferentes, e segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos são relativamente comuns, o que torna sua solubilidade diferente das moléculas orgânicas pequenas convencionais. Devido à energia altamente coesiva de alguns produtos naturais bioativos, é difícil selecionar solventes adequados para o processo de separação (REN et al., 2013).

A purificação de biomoléculas é geralmente composta por uma extensa sequência de operações que exploram as diferenças nas propriedades físico-químicas, termodinâmicas ou moleculares entre o composto alvo e todos os outros compostos presentes em uma mistura. Assim, o desenvolvimento do processo “*downstream*” depende da aquisição de conhecimento suficiente sobre as propriedades das espécies químicas envolvidas (ASENJO; ANDREWS, 2004). O valor do coeficiente de distribuição global nos processos de extração depende do tamanho molecular, carga, hidrofobicidade, solubilidade e afinidade entre as moléculas. Porém, nem todos esses parâmetros são igualmente importantes, e isso depende do sistema escolhido (AHAMED et al., 2006). Muitos modelos termodinâmicos foram desenvolvidos com o objetivo de prever propriedades de substâncias e misturas e auxiliar na seleção de solventes para uma variedade de aplicações. Uma propriedade físico-química importante que pode ser prevista por modelos termodinâmicos é o coeficiente de atividade, uma propriedade de mistura que fornece uma medida da não idealidade da fase de solução, que influencia fundamentalmente o coeficiente de partição de uma espécie entre fases. Coeficientes de atividade em diluição infinita (CADI) são de grande valor em engenharia química quando se avalia o comportamento de equilíbrio de um composto muito diluído em uma fase (SANDLER, 1996).

A adição de uma macromolécula biológica a um solvente dá origem à não-idealidade termodinâmica da solução. No caso de extração por solvente de compostos de microalgas, as proporções necessárias entre o solvente líquido e o soluto desejado tornam o CADI um indicador importante, uma vez que a seletividade e a capacidade em diluição infinita, que são funções dos valores do CADI, quantificam a aplicabilidade dos solventes

líquidos e podem ser utilizados com a finalidade de triagem (ANANTHARAJ; BANERJEE, 2010). Dentre os modelos desenvolvidos recentemente que podem ser empregados com essa finalidade, o COSMO-SAC (“*Conductor-like Screening Model for Real Solvent Segment Activity*”) vem ganhando maior interesse devido à menor necessidade de estimativas de parâmetros específicos usando dados experimentais, embora ainda apresentando alta precisão na predição das propriedades do sistema. É um modelo de equilíbrio preditivo baseado na química quântica em que o coeficiente de atividade é calculado a partir da energia livre de solvatação das moléculas em uma solução (GERBER; SOARES, 2013).

Os processos de extração de compostos de microalgas mencionados irão invariavelmente gerar uma grande quantidade de biomassa residual. Encontrar aplicações a este resíduo é uma necessidade para alcançar a sustentabilidade de uma biorrefinaria microalgal. Neste sentido, algumas tecnologias já foram testadas na literatura, como a bioconversão a etanol, biogás e outros produtos, o tratamento térmico por queima ou pirólise rápida, a produção de compósitos, entre outras (SHAHID et al., 2019; TORRES et al., 2015). O potencial da aplicação de biomassa microalgal como bioissorvente na remoção de metais pesados de efluentes industriais vem recebendo pequena atenção, embora os estudos presentes na literatura sejam promissores (KAPLAN, 2013). A contaminação por metais pesados tornou-se um problema global devido à rápida urbanização e ao aumento da atividade industrial. Os metais pesados presentes nos efluentes industriais reduzem a capacidade de recuperação dos corpos d'água devido à sua ação tóxica sobre os microrganismos; esses microrganismos são responsáveis pela recuperação das águas por meio da decomposição da matéria orgânica presente nas águas (IGBERASE; AUGUSTINE; OSIFO, 2018). O principal aspecto que gera interesse na remoção de metais pesados de efluentes é que esses metais são contaminantes não degradáveis e seu acúmulo em organismos humanos está associado à incidência de várias doenças degenerativas, como Parkinson e Alzheimer (MOLAZADEH et al., 2015; ZENDRON, 2015). A aplicação de microalgas como bioissorventes na remoção de metais pesados é uma tecnologia simples e ambientalmente favorável, havendo interesse na aplicação da biomassa na sua forma *in natura*, ou, sobretudo, após a exaustão de seus compostos de alto valor agregado.

Com o rápido desenvolvimento de indústrias como instalações de chapeamento de metais, operações de mineração, indústrias de fertilizantes, curtumes, baterias,

indústrias de papel e pesticidas, etc., efluentes industriais contendo metais pesados vêm sendo direta ou indiretamente despejados no meio ambiente, especialmente nos países em desenvolvimento. Metais pesados tóxicos de particular preocupação no tratamento de efluentes industriais incluem zinco, cobre, níquel, mercúrio, cádmio, chumbo, cromo, entre outros (FU; WANG, 2011). O processo de adsorção vem sendo apontado como a estratégia mais eficiente, econômica, e seletiva para a remoção de metais pesados de efluentes industriais. A utilização da biomassa inativa de microalgas como bioissorventes para remoção de metais pesados de efluentes industriais vem ganhando atenção aumentada, apesar de ainda existir escassez de trabalhos abordando este tópico em particular na literatura. Diante dos resultados atualmente disponíveis na literatura, percebe-se que esta tecnologia simples se mostra promissora. No entanto, dada a baixa densidade de resultados experimentais na literatura e a necessidade de ampliar o conhecimento a respeito desta tecnologia, justifica-se a continuidade da promoção de estudos experimentais abordando novas espécies de microalgas e novas estratégias para o processo de adsorção.

Esta tese de doutorado está estruturada em 6 (seis) capítulos. No primeiro capítulo, é feita uma introdução sobre a importância da extração de produtos de valor agregado a partir de microalgas e do uso da biomassa microalgal em processos como o de adsorção. No segundo capítulo, são apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos do presente estudo. No capítulo 3 (três), são abordados os fundamentos teóricos e a revisão bibliográfica sobre microalgas, extração de pigmentos produzidos por microalgas e termodinâmica de processos de extração. No capítulo 4 (quatro) é feita uma abordagem da extração de clorofilas e carotenoides das microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e *Chlorella sorokiniana*. Neste, são apresentados 2 (dois) artigos científicos sobre o tema, o primeiro publicado no periódico *Chemical Engineering & Technology* e o segundo publicado no periódico *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*. No capítulo 5 (cinco) é feita uma abordagem sobre a utilização das microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e *Chlorella sorokiniana* na bioissorção de metais pesados, e este capítulo inclui o terceiro artigo científico gerado neste projeto, submetido ao periódico *Applied Microbiology & Biotechnology*. Finalmente, o capítulo 6 (seis) apresenta as considerações finais do presente estudo, incluindo conclusões e sugestões de trabalhos futuros.

---

## CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar diferentes tecnologias de extração de clorofila a, de clorofila b e de carotenoides a partir das microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e *Chlorella sorokiniana*, utilizando os solventes orgânicos etanol, acetona, acetato de etila e hexano, além do uso de misturas sub e supercríticas de CO<sub>2</sub> e etanol. Este estudo também objetivou o aproveitamento da biomassa destas linhagens de microalgas para a adsorção de metais pesados comumente encontrados em efluentes industriais gerados em curtumes e na indústria da galvanoplastia.

### 2.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos correlacionados com os diferentes artigos científicos produzidos neste trabalho tem-se:

(a) Objetivos específicos relacionados ao artigo “*Extraction of chlorophylls and carotenoids from microalgae: COSMO-SAC assisted solvent screening*”:

- avaliar o emprego dos solventes orgânicos etanol, acetona, acetato de etila e hexano na extração de clorofila a, de clorofila b e de carotenoides da biomassa liofilizada das microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e *Chlorella sorokiniana*;
- analisar os perfis de carotenoides dos extratos resultantes;
- avaliar a aplicabilidade da tecnologia de extração por solventes, de modo a indicar os melhores solventes para a recuperação de cada composto;
- empregar o modelo termodinâmico COSMO-SAC para a comparação qualitativa dos perfis sigma dos solventes e dos compostos de interesse;
- prever coeficientes de diluição de atividade infinita (CADIs) a fim de corroborar os resultados experimentais obtidos;

(b) Objetivos específicos relacionados ao artigo “*Supercritical fluid (CO<sub>2</sub>+ethanol) extraction of chlorophylls and carotenoids from Chlorella sorokiniana: COSMO-SAC assisted prediction of properties and experimental approach*”:

- avaliar o emprego da tecnologia de extração com fluido supercrítico empregando misturas de CO<sub>2</sub> e etanol na extração de clorofila a, de clorofila b e de carotenoides da biomassa liofilizada da microalga *Chlorella sorokiniana*;
- aplicar uma metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos da pressão, da temperatura e da fração volumétrica de etanol na mistura solvente empregada no processo de extração com fluido supercrítico sobre os rendimentos de extração;
- realizar uma análise completa dos perfis de carotenoides dos extratos obtidos, diferenciando a extração de clorofila a, clorofila b, caroteno, luteína, zeaxantina e violaxantina;
- avaliar através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) o efeito de ruptura celular causado pelos processos de extração com fluido supercrítico e correlacionar esse fator às recuperações de pigmentos;
- empregar o modelo termodinâmico COSMO-SAC para a comparação qualitativa dos perfis sigma de solventes e dos compostos de interesse;
- prever CADIs a fim de avaliar o efeito da composição da mistura sobre a extração de carotenoides, de modo a corroborar os resultados experimentais obtidos;

(c) Objetivos específicos relacionados ao artigo “*Remediation of Tannery and Electroplating Wastewaters: Adsorption of heavy metals by Chlorella sorokiniana and Heterochlorella luteoviridis*”:

- avaliar o potencial da aplicação de biomassa microalgal *in natura* das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Heterochlorella luteoviridis* como bioissorvente na remediação de efluentes industriais;
- avaliar o emprego de biomassa residual gerada em processos de extração como bioissorvente na remoção de metais pesados presentes em efluentes de curtumes e de indústrias de galvanoplastia;

- avaliar em batelada o desempenho da adsorção por microalgas dos íons metálicos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  de soluções monoelementares com concentrações semelhantes às encontradas em efluentes industriais;
- determinar os fatores que influenciam a adsorção de metais pesados por microalgas.



---

## CAPÍTULO 3 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre microalgas e os principais pigmentos sintetizados por esses microrganismos, salientando suas aplicações à saúde humana. Em adição, são abordados aspectos relacionados aos processos de extração desses compostos, destacando-se aqueles testados neste trabalho: a extração pelo emprego de solventes orgânicos e a extração com fluido supercrítico.

### 3.1. Microalgas

#### 3.1.1. Classificação e relevância

As algas são organismos fotossintetizantes que crescem em uma variedade de habitats aquáticos, incluindo lagos, lagoas, rios, oceanos e até mesmo em efluentes urbanos e industriais. Elas podem tolerar uma ampla variedade de condições, como temperaturas, salinidades, valores de pH e intensidades de luz, e podem crescer sozinhas ou em simbiose com outros organismos (KHAN; SHIN; KIM, 2018). As algas são amplamente classificadas como *Rhodophyta* (algas vermelhas), *Phaeophyta* (algas pardas), *Cyanophyceae* (algas azuis), e *Chlorophyta* (algas verdes), e classificadas por tamanho como macroalgas ou microalgas. Macroalgas (algas marinhas) são algas multicelulares de grande tamanho, e visíveis a olho nu, enquanto as microalgas são microrganismos unicelulares que podem ser procariotos, semelhantes às cianobactérias (*Chloroxybacteria*), ou eucariotos, semelhantes às algas verdes (*Chlorophyta*) (EVANGELISTA et al., 2008).

Microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes de rápido crescimento, que convertem a luz solar, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e uma pequena quantidade de nutrientes em biomassa (RAMMUNI et al., 2018). Elas produzem compostos carbônicos que podem ser utilizados na produção de biocombustíveis, suplementos para a saúde, produtos farmacêuticos e cosméticos. Também encontram aplicações no tratamento de

efluentes e na mitigação de CO<sub>2</sub> atmosférico. Uma vantagem de usar microalgas para a obtenção de produtos de alto valor agregado é que elas podem ser cultivadas de forma autotrófica utilizando recursos disponíveis a um custo muito baixo. Dessa forma, não é criada competição por terras ou culturas alimentares, pois as microalgas podem crescer em terras degradadas. No entanto, um meio de cultura rico em nutrientes e sais é necessário para o seu cultivo adequado (BAICHA et al., 2016). A biomassa de microalgas também apresenta alta eficiência fotossintética; associada ao emprego de sistemas de produção de bioenergia, esta característica torna as microalgas fontes alternativas de energia renovável para o futuro (KHOO et al., 2011). Além disso, as microalgas são capazes de bio-sequestrar o CO<sub>2</sub> dos gases de combustão gerados nas fábricas e usinas de energia, apresentando, desta forma, uma potencial contribuição para a redução das emissões de gases causadores do efeito estufa (CHEAH et al., 2015).

As microalgas produzem uma ampla gama de bioprodutos, incluindo polissacarídeos, lipídios, pigmentos, proteínas, vitaminas, compostos bioativos e antioxidantes (BRENNAN; OWENDE, 2010). O interesse pelas microalgas como matéria-prima renovável e sustentável para a produção de biocombustíveis inspirou um novo enfoque no desenvolvimento de biorrefinarias. Engenharia de bioprocessos pode ser empregada para o aumento da eficiência e produtividade, e técnicas de engenharia genética podem ser utilizadas para melhorar seu potencial como uma fonte de bioprodutos renováveis. O cultivo industrial de microalgas para produzir biocombustíveis e bioprodutos aumentou consideravelmente nas últimas décadas. As microalgas passaram a ser produzidas em grande quantidade e vendidas como suplementos alimentares e nutricionais, enquanto seus extratos ou produtos purificados são usados em fármacos e cosméticos (PULZ; GROSS, 2004).

### **3.1.2. O conceito de biorrefinaria microalgal**

Biorrefinaria é uma unidade de processo desenvolvida visando a obtenção de biocombustíveis, energia e produtos de alto valor agregado através da transformação de biomassa. O conceito de biorrefinaria é uma forma promissora de mitigar a emissão de gases de efeito estufa, uma vez que as emissões de combustíveis fósseis contribuíram fortemente para o aquecimento global (JUAN et al., 2011). O conceito de biorrefinaria é semelhante ao da refinaria de petróleo tradicional, de modo que a biomassa é convertida

em produtos químicos comercializáveis, combustíveis e subprodutos (PÉREZ et al., 2017). A principal diferença entre a biorrefinaria e a refinaria de petróleo reside nas matérias-primas (biomassa e petróleo bruto, respectivamente) e na tecnologia empregada. Ampla integração de insumos, produtos e recursos pode ser aplicada em biorrefinarias para produzir produtos de valor agregado.

O principal gargalo desta abordagem é a separação de diferentes frações sem causar danos às outras frações. Isso poderá ser superado por meio do uso de processos de separação simples, de baixo consumo de energia, econômicos e escalonáveis. Em um projeto adequadamente desenvolvido, as frações de óleo, minerais, carboidratos e proteínas poderão ser usadas para a produção de produtos químicos, combustíveis, rações, biogás e diversos outros produtos de alto valor agregado. Os resíduos do processo, como glicerina e lodo, também poderão ser transformados em produtos secundários de maior ou menor valor agregado. Em última instância, os componentes de menor valor ou então não-recuperáveis da fração de proteína e carboidrato terão o potencial de se transformar em energia para reduzir o custo de utilidades da própria unidade industrial, contribuindo significativamente à rentabilidade do processo (CHEW et al., 2017).

Como mencionado, microalgas contêm grande quantidade de proteínas, lipídios e carboidratos, que podem ser a matéria-prima para diferentes produtos. Isso torna as microalgas potenciais candidatas em processos de biorrefinaria (GONZÁLEZ-DELGADO; KAFAROV, 2011). Elas são cultivadas em tanques abertos ou em sistemas fechados que envolvem processos de mistura e de concentração. Esses processos consomem muita energia, e o aproveitamento máximo da biomassa de microalgas com o mínimo uso de energia continua sendo um objetivo principal (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

A biorrefinaria microalgal pode gerar produtos de modo a atender diferentes mercados, e é passível de diversas integrações. Por exemplo, os lipídios extraídos de microalgas podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel, enquanto os carboidratos de microalgas podem ser usados como fonte de carbono nas indústrias de fermentação para substituir as fontes convencionais de carboidratos, como açúcares simples ou biomassa lignocelulósica tratada. Além disso, ácidos graxos de cadeia longa encontrados em microalgas têm funções importantes como suplementos alimentares saudáveis, enquanto proteínas e pigmentos encontrados em microalgas exibem propriedades desejadas nas indústrias farmacêuticas para tratar certas doenças

(YEN et al., 2013). O importante papel das microalgas na produção de biocombustíveis e produtos químicos de base biológica torna a sua produção em larga escala um mercado promissor, e o desenvolvimento de biorrefinarias que integrem adequadamente os recursos é um aspecto chave para viabilizar este novo conceito de indústria. Neste contexto, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de processos de extração de compostos que sejam econômicos e eficientes.

### **3.1.3. Aplicações nutricionais da tecnologia de microalgas**

As empresas voltadas à fabricação de produtos de microalgas desenvolveram ao longo dos últimos anos diversos novos sistemas para a produção de biomassa e para sua conversão a produtos variados. A biomassa de microalgas como pó seco ou na forma comprimida como pastilhas é o produto predominante neste mercado. Esta biomassa é geralmente recuperada a partir do seu cultivo em lagoas artificiais ou em fotobiorreatores através da aplicação de processos de separação como a centrifugação e a secagem. O produto final da produção de biomassa é geralmente um pó de cor verde ou laranja, que é vendido principalmente no mercado de alimentos saudáveis para humanos. Existe também um mercado crescente para biomassa microalgal na nutrição animal, tanto na aquicultura quanto na pecuária. Ao longo das últimas décadas, a biomassa microalgal vem sendo predominantemente utilizada no mercado de alimentos saudáveis, com mais de 75 % da produção anual de biomassa microalgal sendo destinada à fabricação de pós, comprimidos, cápsulas ou pastilhas. Diversas combinações de microalgas ou misturas com outros alimentos saudáveis podem ser encontradas atualmente no mercado. O benefício do consumo da biomassa microalgal na promoção da saúde é geralmente atribuído a um efeito imunomodulador (BELAY et al., 1993).

Com este propósito de promoção da saúde, os extratos de algas em várias formas de produtos estão criando um novo setor de mercado para produtos de microalgas. Em comparação com os pós de algas, os alimentos funcionais ou nutracêuticos produzidos com biomassa de microalgas são sensorialmente muito mais convenientes e variados, combinando assim benefícios à saúde com atratividade para os consumidores. O mercado de alimentos funcionais é um nicho lucrativo de produção de alimentos e deve crescer globalmente. Estimativas apontaram que este mercado tenha representado um valor total de 304,5 bilhões de dólares em 2020, com uma taxa média de crescimento anual de 8,5 %

(BOGUE et al., 2017). Alimentos suplementados com biomassa de microalgas podem ter outras influências positivas, como por exemplo, efeitos prebióticos ou de fortificação mineral (PULZ; GROSS, 2004).

Portanto, há uma demanda crescente pela produção de suplementos alimentares e produtos aplicados à promoção da saúde que podem ser obtidos a partir de microalgas, dada a vasta gama de substâncias que estes microrganismos são capazes de sintetizar. Entre os muitos compostos bioativos produzidos por microalgas estão vitaminas, lipídeos, pigmentos e polissacarídeos. Alguns desses compostos demonstraram atividades anticâncer, anti-infecciosas, antioxidantes, imunoestimulantes, anti-inflamatórias e de redução do colesterol ruim (COÊLHO, 2019). Neste trabalho, os variados benefícios atribuídos ao consumo de pigmentos produzidos por microalgas são destacados.

#### **3.1.4. Pigmentos sintetizados por microalgas**

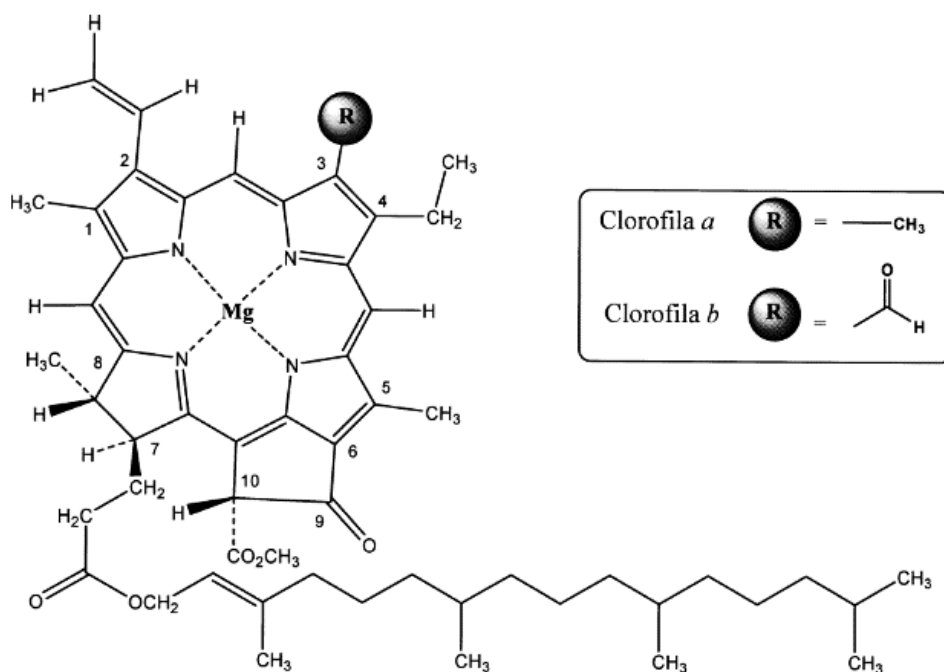
Dentre a grande variedade de compostos sintetizados por microalgas, os pigmentos naturais são um dos grupos mais relevantes a serem explorados. Os pigmentos naturais de microalgas apresentam benefícios à saúde por suas propriedades antioxidantes, anticâncer e anti-inflamatórias, e podem substituir os corantes artificiais com vantagens. Três classes de pigmentos são encontradas nas microalgas: ficobiliproteínas (até 8 % do peso seco), carotenoides (geralmente 0,1 – 0,2 % do peso seco, mas alcançando até 14 % em algumas espécies) e clorofilas (0,5 – 1,0 % do peso seco) (BARREIRO, 2020). Nesta seção é apresentada uma breve revisão sobre a natureza bioquímica e as aplicações de clorofilas e de carotenoides relevantes a este trabalho.

##### **3.1.4.1. Clorofila**

A clorofila é um dos valiosos compostos bioativos sintetizados por microalgas e está presente em abundância na natureza, desempenhando um papel crítico de “captação de luz” no metabolismo de praticamente todos os organismos fotossintetizantes. Nas plantas, está confinada nos cloroplastos, onde é complexada com fosfolipídios, polipeptídios e tocoferóis, e protegida por uma membrana hidrofóbica. As clorofilas são tetrapirróis com um magnésio ligado centralmente (Figura 1), e existem dois tipos

principais de clorofila, dependendo de pequenas diferenças estruturais: clorofila a (um pigmento azul/verde com absorvância máxima de 660 nm a 665 nm) e clorofila b (um pigmento verde/amarelo com absorvância máxima de 642 nm a 652 nm) (HUMPHREY, 1980). Assim, a clorofila vem sendo crescentemente utilizada como corante devido à sua absorvância seletiva de luz nas regiões vermelha e azul, em acompanhamento às mudanças no mercado e na legislação que geraram uma demanda renovada por corantes naturais para produtos alimentícios em preferência aos artificiais (HALIM et al., 2010; SPEARS, 1988).

**Figura 1** - Estrutura química da clorofila a e clorofila b.



Fonte: CHLOROPHYLLS; STREIT; CANTERLE, 2005

O consumo de clorofila vem sendo associado a muitos benefícios medicinais. Devido à sua estrutura química semelhante à da hemoglobina, a clorofila estimula o crescimento de tecidos através da facilitação de uma troca rápida de dióxido de carbono e oxigênio, e esta propriedade a tornou aplicável no tratamento de úlceras, sepse oral e também na proctologia (HORWITZ, 1951). A clorofila e seus derivados presentes em frutas e vegetais têm demonstrado alta atividade antioxidante e antimutagênica, e têm papel fundamental na prevenção do câncer. Esse efeito é atribuído principalmente ao

aprisionamento de agentes mutagênicos no trato gastrointestinal. Foi demonstrado que derivados da clorofila como feoforbídeo e feofitina apresentam forte atividade antioxidante, embora sejam encontrados em concentrações muito baixas em frutas e vegetais (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007; LANFER-MARQUEZ; BARROS; SINNECKER, 2005).

Como visto, este pigmento natural encontra ainda aplicações nos setores alimentício, cosmético e farmacêutico. No entanto, existem desvantagens relacionadas ao seu uso para coloração: são moléculas quimicamente instáveis às condições de pH e sensíveis ao calor e à luz. Portanto, as clorofilas são comumente transformadas, de modo que o magnésio é normalmente substituído por sódio ou cobre a fim de se obter maior estabilidade. Este derivado da clorofila é denominado clorofilina e é amplamente utilizado na indústria alimentícia como aditivo alimentar e corante.

#### **3.1.4.2. Carotenoides**

Os carotenoides são pigmentos lipofílicos amplamente encontrados na natureza, que geralmente apresentam coloração amarela, laranja ou vermelha. A maioria desses compostos compartilham uma estrutura comum C40 de unidades de isopreno e são divididos em dois grupos: carotenos e xantofilas. Enquanto os carotenos são estruturas apenas de hidrocarbonetos, as xantofilas são os derivados oxigenados dos carotenos; eles são compostos relativamente hidrofílicos devido à presença de grupos hidroxila e grupos cetona nos anéis terminais. Tanto os carotenos quanto as xantofilas podem se apresentar naturalmente em suas formas isoméricas cis ou trans (SASSO et al., 2012; VARELA et al., 2015). Em células vegetais, a membrana do tilacoide é o local das reações dependentes de luz da fotossíntese dentro dos cloroplastos e das cianobactérias, e os pigmentos fotossintetizantes são incorporados diretamente nela (GOVINDJEE et al., 2019). Lá, os carotenoides estão ligados aos complexos coletores de luz e funcionam para absorver a luz e extinguir o excesso de energia no metabolismo fotossintetizante (NISAR et al., 2015).

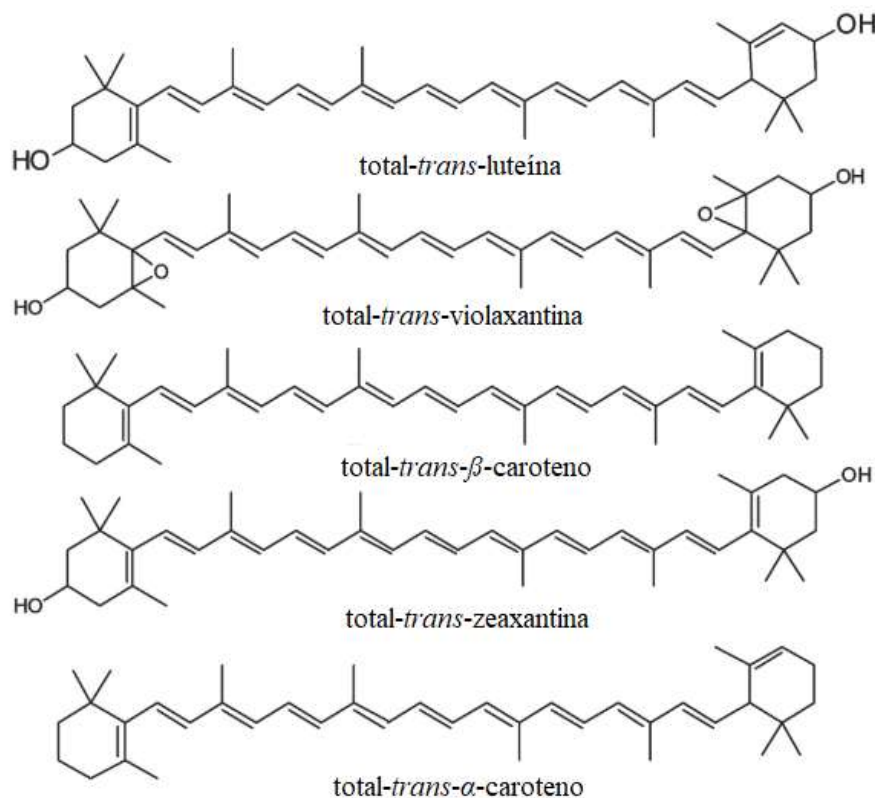
Na natureza são encontrados mais de 400 tipos de carotenoides. Dentre eles, o  $\beta$ -caroteno que na maioria dos casos é o mais relevante (BEGUM et al., 2016a). O  $\beta$ -caroteno apresenta vários benefícios à saúde humana e animal, pois é convertido no

organismo em vitamina A, que auxilia na imunidade, previne catarata, cegueira noturna e doenças de pele (AGRAWAL S; RAO AV, 2000). O  $\beta$ -caroteno é também utilizado como corante para melhorar a aparência de margarinas, queijos, sucos, entre outros produtos. Há estudos que associam o  $\beta$ -caroteno com a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer. Ele apresenta propriedades imunomoduladoras e antienvhecimento. O  $\beta$ -caroteno produzido pela microalga *Dunaliella sp.* contém tanto os estereoisômeros 9-*cis* quanto os totalmente *trans*, que apresentam influência direta na redução de incidências de algumas variedades de câncer (BEGUM et al., 2016a). Por sua vez, luteína, zeaxantina e violaxantina pertencem à classe de carotenoides denominados xantofilas. Quando absorvidas no organismo humano, elas se concentram nas córneas, onde são responsáveis pela sua proteção contra o espectro referente à luz azul e melhoram a nitidez da visão. Luteína é utilizada no tratamento de doenças degenerativas nos olhos e doenças associadas à idade, como a catarata, as doenças nos nervos ópticos, o mal de Alzheimer e a retinopatia diabética (CHEN et al., 2019). As estruturas moleculares dos principais carotenoides relevantes a este trabalho são apresentadas na Figura 2.

**Figura 2** - Estruturas moleculares dos principais carotenoides encontrados nas microalgas



*C. sorokiniana* e *H. luteoviridis*.



Fonte: DIPRAT et al., 2017

Alguns carotenoides primários, como a luteína, estão associados de forma importante a componentes estruturais e funcionais no aparelho fotossintetizante celular, uma vez que expandem o espectro de absorção de luz de algas e plantas ao transferir energia absorvida para as clorofilas (YE; JIANG; WU, 2008). Por sua vez, os carotenoides secundários são dispersados em gotículas oleosas e funcionam para formar uma camada protetora quando as células são expostas a condições de estresse (BEGUM et al., 2016a). Os carotenoides apresentam alta atividade antioxidante, uma propriedade que os permite proteger as células de radicais reativos, prevenir a peroxidação lipídica e promover a estabilidade e funcionalidade do aparato fotossintetizante (NIYOGI; BJÖRKMAN; GROSSMAN, 1997). No entanto, isso também torna os carotenoides geralmente sensíveis à luz, oxigênio e calor, tornando mais difícil produzi-los, manuseá-los e armazená-los adequadamente (GONG; BASSI, 2016a).

Os carotenoides vêm sendo estudados pelos seus inúmeros potenciais benefícios à saúde humana, como o fortalecimento do sistema imunológico, a redução do risco de

doenças degenerativas, a atuação na neutralização dos radicais livres devido às suas propriedades antioxidantes e até mesmo à atividade antiobesidade/hipolipemiante (MEZZOMO; FERREIRA, 2016). Muitas frutas e vegetais vêm sendo apontados como importantes fontes naturais por conter carotenoides que apresentam atividade provitamina A. A deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública e a principal causa de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento, pois é um importante fator de crescimento e desenvolvimento. Também está diretamente envolvida na manutenção de atividades relacionadas ao sistema imunológico e reprodutor, à regeneração da pele e à qualidade da visão (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006). Além disso, os carotenoides são, ao lado das vitaminas, os agentes quimiopreventivos mais investigados, pois sua atividade antioxidante pode neutralizar os radicais livres, prevenindo ou reduzindo os danos causados por esses compostos nas células (SHAMI; MOREIRA, 2004).

Tanto os carotenoides precursores da vitamina A quanto os não precursores (como luteína, zeaxantina e licopeno) têm demonstrado ação protetora contra o câncer e atuam na inibição de outras doenças para as quais a neutralização de radicais livres desempenha um papel importante (KIM; AHN; LEE-KIM, 2001). Dentre elas, podem ser citadas aterosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, doenças degenerativas e doenças cardiovasculares (JOHNSON, 2002). No entanto, até o momento, a principal aplicação industrial dos carotenoides tem sido nas indústrias de alimentos e cosméticos como corantes em produtos que perderam parte de sua cor natural devido ao processamento intenso, para colorir cápsulas de medicamentos, suplementos e cosméticos, ou para padronizar a cor e sabor em muitos produtos alimentícios. Os carotenoides vêm encontrando demanda renovada recentemente como aditivos em alimentos e suplementos por causa de seus muitos benefícios à saúde, como os previamente destacados (KLÄUI; BAUERNFEIND, 1981; MEZZOMO; FERREIRA, 2016).

A rota química para a síntese de carotenoides é um processo bem estabelecido e ainda representa a maior parte do mercado global. No entanto, surgiram preocupações quanto à sua segurança para o consumo humano, tornando a produção biotecnológica de carotenoides um mercado emergente (YE; JIANG; WU, 2008). Os carotenoides podem ser biossintetizados por microrganismos fotossintetizantes, como algas e cianobactérias, e por microrganismos não fotossintetizantes, como bactérias, fungos e leveduras

(VALDUGA et al., 2009). Dentre esses microrganismos, as microalgas têm sido indicadas como alguns dos biocatalisadores mais adequados para a produção em massa de carotenoides, devido ao seu conteúdo potencialmente elevado de carotenoides e pelo rápido crescimento alcançado quando fotobiorreatores de alta eficiência e condições otimizadas de crescimento são empregadas nas etapas de cultivo (GONG; BASSI, 2016a).

### **3.2. Técnicas de extração de pigmentos produzidos por microalgas**

O processo de extração de compostos de valor agregado de microalgas começa com a desidratação da cultura de microalgas, em geral, altamente diluída e, em seguida, com o emprego de tecnologias como liofilização ou secagem por pulverização para obter células com teor de umidade muito baixo. As clorofilas e os carotenoides podem então ser extraídos da biomassa seca, e esta etapa é geralmente realizada por extração com solventes orgânicos ou por extração com fluido supercrítico. Em ambos os casos, o processo de extração envolve a penetração do solvente através da membrana celular e a dissolução dos lipídios, bem como das lipoproteínas das membranas dos cloroplastos. Quando produtos de alta pureza são desejados, uma etapa de fracionamento pode ser seguida, visando separar os pigmentos e derivados da clorofila (HALIM et al., 2010; JEFFREY et al., 1997). Tanto a clorofila quanto os carotenoides são altamente reativos; assim, o rendimento de um determinado procedimento de extração é afetado pela formação de produtos de degradação quando há exposição ao excesso de luz, oxigênio/ar, altas temperaturas e condições ácidas ou básicas (CUBAS; GLORIA LOBO; GONZÁLEZ, 2008).

A etapa de extração depende do pigmento alvo e pode ser realizada por métodos convencionais ou não convencionais. Os métodos convencionais incluem o uso de solventes (solventes puros ou misturas aquosas/orgânicas) e a escolha do solvente deve ser feita em relação à capacidade inerente ao pigmento de ser dissolvido e extraído, sem interferir em sua estrutura. Por exemplo, etanol, acetona, metanol, n-hexano, éter dietílico e clorofórmio vêm sendo usados analiticamente para extrair pigmentos de microalgas em combinação com diferentes técnicas (por exemplo, saponificação, congelamento/descongelamento e aquecimento). Além da extração por solvente, a

extração por fluido supercrítico (EFS), que usa CO<sub>2</sub> como solvente de extração, também é usada como uma alternativa mais ambientalmente favorável (NWOBA et al., 2020).

Os métodos não convencionais ainda compreendem as técnicas eletrotecnológicas, como por exemplo, o campo elétrico pulsado, que vem recebendo crescente atenção, uma vez que não gera calor durante o processamento. Descargas elétricas de alta tensão, campos elétricos moderados e extração assistida por micro-ondas ou ultrassom são outros métodos que podem ser usados para extrair pigmentos-alvo. Em grande escala, alguns desafios precisam ser enfrentados no que diz respeito aos elevados custos e ao estágio primário em que se encontra o desenvolvimento do processamento *up/downstream*. Atualmente, algumas abordagens vêm sendo estudadas para superar essas restrições. A integração de processos associada à implementação de uma biorrefinaria é um aspecto fundamental para atingir a viabilidade econômica, que tem como foco a redução do consumo de energia, de geração de resíduos, e uma melhora na relação tamanho do equipamento/capacidade de produção. Como visto, a biorrefinaria é a alternativa mais adequada para melhorar as vantagens econômicas e ambientais devido à valorização plena da biomassa microalgal (RAJESH BANU et al., 2020).

### **3.2.1. Extração com solventes orgânicos (Extração sólido-líquido)**

A extração por solvente, também conhecida como extração sólido-líquido, é o método mais amplamente utilizado para extração de compostos naturais. A extração de produtos passa pelas seguintes etapas: (1) o solvente penetra na matriz sólida; (2) o soluto se dissolve no solvente; (3) o soluto é difundido para fora da matriz sólida; (4) os solutos extraídos são coletados. Qualquer fator que aumente a difusividade e a solubilidade nestas etapas irá facilitar a extração. As propriedades do solvente de extração, o tamanho de partícula das matérias-primas, a proporção de solvente para sólido, a temperatura de extração e a duração da extração afetarão a eficiência da extração. A seleção do solvente é crucial para a extração sólido-líquido. Seletividade, solubilidade, custo e segurança devem ser considerados na seleção de solventes. Com base na lei da semelhança e da intermiscibilidade (isto é, semelhante dissolve semelhante), os solventes com um valor de polaridade próximo à polaridade do soluto têm probabilidade de ter um desempenho melhor, e vice-versa. Os álcoois, sobretudo etanol e metanol, são solventes que vêm sendo amplamente utilizados na extração fitoquímica (ZHANG; LIN; YE, 2018).

Alguns fatores relevantes ao processo de extração sólido-líquido têm efeitos amplamente conhecidos. Geralmente, quanto mais fino o tamanho da partícula, melhor é o resultado alcançado pela extração com solventes. A eficiência de extração será aumentada pelo pequeno tamanho de partícula devido à maior penetração do solvente e difusão de solutos. Um tamanho de partícula muito fino, entretanto, resultará na absorção excessiva deste no sólido e na dificuldade na separação subsequente. Por sua vez, as altas temperaturas aumentam a solubilidade e facilitam a difusão. Temperaturas muito altas, entretanto, podem causar a perda de solventes, levar a extratos com impurezas indesejáveis e, importante, à decomposição de componentes termolábeis. Quanto à cinética do processo, a eficiência de extração aumenta com o aumento do tempo de extração somente ao longo de um determinado intervalo, já que a continuidade do processo não afetará a extração após ter-se alcançado o equilíbrio termodinâmico, marcado pela igualdade de concentração dos compostos no extrato e na solução retida nos sólidos. Quanto maior for a razão solvente para sólido, maior será o rendimento de extração; no entanto, uma proporção de solvente para sólido muito alta causará excesso de solvente e irá demandar uma energia e tempo muito elevados para sua recuperação (ZHANG; LIN; YE, 2018).

Os métodos convencionais de extração por solventes podem incluir maceração, percolação e refluxo. A maioria destas técnicas empregam grandes quantidades de solventes potencialmente tóxicos e poluentes, e costumam ser demoradas, trabalhosas, apresentar baixa seletividade e podem render baixos rendimentos de extração (HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006). Alguns métodos de extração mais modernos envolvendo o emprego de solventes, como a extração com líquido pressurizado e a extração assistida por micro-ondas ou por ultrassom também vêm sendo aplicados na extração de produtos naturais e oferecem algumas vantagens, como a redução do consumo de solventes orgânicos potencialmente tóxicos ou poluentes, menores tempos de extração, maiores rendimentos e seletividades. Em adição, tecnologias de alta pressão subcríticas e supercríticas surgem como importantes técnicas alternativas para a recuperação de pigmentos de microrganismos ou diretamente de fontes vegetais, e seu estudo está em amplo desenvolvimento (LU et al., 2014; MEZZOMO; FERREIRA, 2016). No entanto, existe amplo *know-how* no desenvolvimento e escalonamento de processos de extração sólido-líquido a unidades industriais nas quais a extração de compostos é promovida em múltiplos estágios. Tratam-se de processos baratos e tecnicamente simples, que, se

adequadamente projetados, permitem alcançar eficiências de extração que garantam a rentabilidade do processo global. Considera-se que estes fatores justifiquem a investigação desta tecnologia na extração de pigmentos de microalgas.

### **3.2.2. Extração de pigmentos de microalgas com solventes**

A extração de clorofilas de espécies vegetais vem sendo praticada com um propósito analítico há bastante tempo. Para quantificar a quantidade de clorofila em uma determinada espécie, a clorofila intracelular deve primeiro ser extraída. O método tradicional que vem sendo empregado é a extração por solventes orgânicos. Foi verificado que a ruptura celular, alcançada por meio de trituração, homogeneização ou aplicação de ultrassom, melhora significativamente a eficiência da extração de clorofila usando solventes orgânicos. Além da ruptura celular, a escolha do solvente empregado influencia fundamentalmente na quantidade de pigmento recuperada, e o rendimento de um determinado procedimento de extração também será afetado pela formação de produtos de degradação, uma vez que a clorofila é fortemente reativa. Produtos de degradação da clorofila são formados quando suas moléculas são expostas ao excesso de luz, oxigênio/ar, altas temperaturas e condições ácidas ou básicas (HALIM et al., 2010).

Uma variedade de estudos anteriores sobre extração de clorofilas com solventes orgânicos indicou que o metanol e o etanol são solventes de extração superiores à acetona. Extração de clorofila assistida por ultrassom foi promovida em banho de gelo e no escuro a fim de evitar degradação (SIMON; HELLIWELL, 1998). No estudo, o metanol removeu três vezes mais pigmento do que acetona 90 % em água. Além disso, quando a trituração de tecido foi usada, o metanol removeu 20 % mais pigmento do que acetona 90 %. Em outro trabalho, foi verificado que acetona 90 % era um solvente orgânico ineficiente na recuperação de clorofila em comparação com o metanol ou com etanol 95 %. No entanto, foi demonstrado que o uso de metanol como solvente de extração resultou em uma solução instável e levou à formação de produtos de degradação da clorofila a (SARTORY; GROBBELAAR, 1984). Embora 100 % de acetona não tenha produzido a maior quantidade de clorofila de muitas espécies em particular, seu uso como solvente de extração inibiu fortemente a formação de produtos de degradação. Em outros estudos, a dimetilformamida (DMF) foi testada, e concluiu-se que ela seria um solvente de extração superior ao metanol, etanol 90%, etanol 100% e acetona 90%. A extração

usando DMF não exigiu a ruptura das células, pois os pigmentos foram completamente extraídos após algumas etapas de imersão. Além disso, os pigmentos permaneceram estáveis por até vinte dias quando armazenados no escuro a 5 °C (JEFFREY et al., 1997; MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2009). No entanto, a natureza tóxica da DMF diminui seu apelo como um solvente eficiente.

Por sua vez, a extração de carotenoides de fontes vegetais também é geralmente realizada usando solventes orgânicos, devido à sua hidrofobicidade moderada a alta. No entanto, esses solventes são geralmente compostos orgânicos voláteis originados principalmente de recursos não-renováveis. Eles são inflamáveis, voláteis e muitas vezes tóxicos, e contribuem à poluição ambiental e ao efeito estufa (YARA-VARÓN et al., 2016). É importante diferenciar os solventes geralmente adequados à extração em aplicações analíticas daqueles que podem ser empregados na produção de alimentos e fármacos, permitidos por legislação devido à sua não-toxicidade e segurança. Hoje em dia, o n-hexano é um dos solventes mais usados para extrair carotenoides apolares por suas várias qualidades, como baixa polaridade, fácil remoção dos produtos por evaporação, estabilidade e ponto de ebulição conveniente, isto é, alto o suficiente para limitar as perdas durante a extração, mas suficientemente baixo para limitar o consumo de calor durante a sua recuperação (SICAIRE et al., 2015).

Convencionalmente, os carotenoides são extraídos usando solventes orgânicos como acetona, clorofórmio, hexano, isopropanol, metanol, cloreto de metileno e éter dietílico. Uma grande variedade de combinações de solventes também vem sendo usada, o que fornece um efeito sinérgico na extração de carotenoides. A escolha do solvente apropriado ou combinação de solventes é um dos fatores mais críticos para a extração eficiente de carotenoides. No entanto, a seleção do solvente apropriado nem sempre é fácil, pois fatores como o grupo funcional (e a polaridade resultante), o comprimento de cadeia dos carotenoides, a matriz da amostra e seus componentes e o teor de umidade desempenham papéis importantes (SAINI; KEUM, 2018).

O licopeno e o  $\beta$ -caroteno são carotenoides não polares altamente lipofílicos devido à sua estrutura de hidrocarboneto conjugado sem grupos funcionais polares. A adição de grupos funcionais polares, como epóxido (violaxantina e neoxantina), hidroxila (luteína e zeaxantina), cetona (cantaxantina) ou cetonas mais grupos hidroxila (astaxantina), aumenta a polaridade dos carotenoides. Normalmente, acetona e hexano são frequentemente selecionados para extração de carotenoides polares e apolares,

respectivamente. Por outro lado, uma mistura de acetona/etanol/hexano é mais frequentemente aplicada para a extração simultânea de carotenoides polares e apolares. Devido às propriedades miscíveis em água, acetona e etanol são preferidos para a extração eficiente de carotenoides de material vegetal contendo uma grande quantidade de umidade. Uma revisão sobre métodos de extração de carotenoides concluiu que hexano, acetona e etanol/hexano (4:3) são os solventes mais comumente usados para amostras derivadas de plantas (CEPEDA; FENTE; REGAL, 2014).

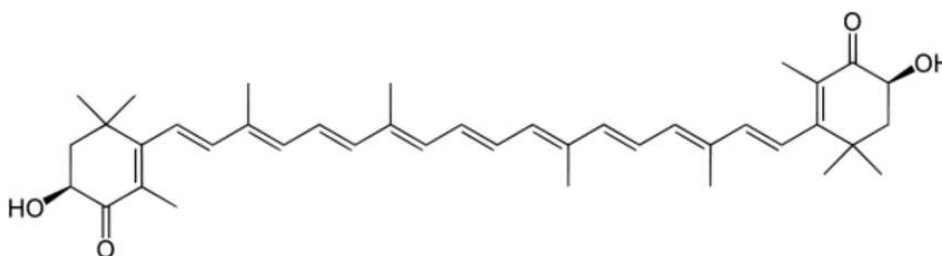
A maioria dos solventes (incluindo, etanol, hexano e acetona) usados para extração possuem riscos ambientais, à saúde (toxicidade) e segurança (decomposição, explosão). No entanto, com base em questões ambientais e de saúde e segurança, etanol e acetona vêm sendo considerados os solventes preferidos, em comparação com hexano, éter dietílico, diclorometano e clorofórmio, que são geralmente usados para extração de carotenoides em escala laboratorial (ALFONSI et al., 2008; CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007). Para melhorar a sustentabilidade, solventes verdes e líquidos iônicos mais ecologicamente favoráveis vêm sendo explorados para a extração de carotenoides e outros compostos bioativos (CEPEDA; FENTE; REGAL, 2014).

Em grande parte, procedimentos de extração de carotenoides de microalgas foram reportados como metodologias analíticas para recuperação de carotenoides em escala laboratorial, sem levar em consideração, por exemplo, a alta toxicidade dos solventes empregados e, portanto, a aplicabilidade à produção de alimentos e fármacos, impossibilitando seu escalonamento. Especificamente, a extração da vasta gama de carotenoides produzidos por microalgas pela aplicação de solventes orgânicos recebeu pouca atenção até o momento, e há um número escasso de trabalhos disponíveis na literatura. No entanto, dentro desta abordagem, em um trabalho com o objetivo de estabelecer o melhor método de extração de luteína e  $\beta$ -caroteno para a microalga *Desmodesmus sp.*, foi verificado que o melhor solvente para extração foi a mistura hexano/etanol na proporção 1:1 (v/v) (SOARES et al., 2016). Para obter o rendimento máximo, o procedimento estabelecido incluiu seis extrações realizadas durante 40 min. No entanto, nesse estudo, os testes de estabilidade mostraram que as xantofilas e os carotenos apresentaram maior estabilidade em metanol e foram menos afetados negativamente em comparação às clorofilas no extrato metanólico. A identificação cromatográfica e a quantificação de pigmentos de *Desmodesmus sp.* revelaram que seus constituintes principais eram *trans*-zeaxantina, clorofila b,  $\beta$ -caroteno e *trans*-luteína.



A maior parte dos estudos tratando da extração de carotenoides de microalgas para desenvolvimento de um processo industrial eficiente e rentável deu enfoque à recuperação de astaxantina de microalgas do gênero *Haematococcus*, e foram aplicadas diferentes técnicas de ruptura da parede celular (KIM et al., 2016). A astaxantina é um carotenoide de estrutura molecular semelhante à das xantofilas comumente encontradas em *C. sorokiniana* e *H. luteoviridis* (Figura 3), de modo que os resultados encontrados para a extração deste composto alvo podem ser utilizados como uma importante referência. Em vez de ácidos fortes e solventes orgânicos como clorofórmio e metanol, que são amplamente usados para extração de lipídeos de microalgas, solventes orgânicos relativamente mais brandos, como acetona, acetato de etila e etanol vêm sendo preferidos para a extração de carotenoides de microalgas.

**Figura 3** - Estrutura molecular da astaxantina.



Fonte: Adaptado de GONG; BASSI (2016).

Quando a acetona foi usada como um único solvente para desintegração da parede celular e extração de astaxantina, um rendimento muito baixo de extração de 4 mg/g de biomassa seca foi observado (MENDES-PINTO et al., 2001). Para aumentar a eficiência da extração de astaxantina da acetona, pré-tratamentos utilizando NaOH e HCl para quebra da parede celular foram incorporados ao processo. Melhorias consideráveis (50 - 75 %) em comparação com os resultados da acetona sozinha foram observadas, embora os rendimentos de extração de astaxantina tenham permanecido baixos, variando de 6 a 7 mg/g de biomassa seca. Misturas de etanol e acetato de etila (1:1, v/v) foram testadas para extração de astaxantina da biomassa seca de *H. pluvialis*, sendo relatado um rendimento de extração de astaxantina relativamente maior, de 18 mg/g de biomassa seca (ZOU et al., 2013). Em adição, para a biomassa úmida de *H. pluvialis*, foi testado um método de extração de astaxantina à base de éter dimetílico liquefeito para aplicação sob condição de alta pressão de 0,59 MPa (BOONNOUN et al., 2014). Ainda assim, um rendimento de extração de astaxantina muito baixo, de 1 mg/g foi obtido, cujo resultado

pode ser atribuído à polaridade mais baixa que a da acetona. No geral, esses resultados indicam que o rendimento da extração da astaxantina é amplamente dependente das condições operacionais, como o tipo e a mistura do solvente e o tempo de processamento. Deve-se notar que a exposição prolongada de células de *H. pluvialis* a solventes orgânicos pode afetar significativamente a estabilidade e a qualidade de compostos carotenoides como a astaxantina.

Vários métodos de pré-tratamento físico ou mecânico, como trituração, moagem e prensagem foram testados para quebrar as paredes celulares de *H. pluvialis*. Pré-tratamentos de moagem com subsequente extração orgânica usando uma mistura de metanol e diclorometano (3: 1, v/v) foram avaliados, resultando em um rendimento de extração de astaxantina de 23 mg/g (ZHANG et al., 2014). Quando a extração com hexano pressurizado a 10,3 MPa foi realizada após três aplicações de pré-tratamento por moagem, um rendimento de extração de astaxantina consideravelmente mais alto, de 35 mg/g, foi obtido (JAIME et al., 2010). Em adição, um rendimento de extração de astaxantina de 18,0 mg/g foi alcançado através de uma combinação de moagem com pérolas de vidro (0,5 mm) e subsequente extração com acetona (NOBRE et al., 2006). No entanto, em uma abordagem semelhante utilizando pérolas de vidro de 1 mm, um rendimento de astaxantina relativamente baixo de 7,8 mg/g foi obtido, possivelmente devido ao uso de pérolas de vidro de tamanho diferente e um tempo de extração curto, de 10 min (BOONNOUN et al., 2014). Ainda, o pré-tratamento com prensagem foi capaz de romper mais de 80 % das células úmidas de *H. pluvialis*, rendendo 24 µg de astaxantina/célula após subsequente extração com acetato de etila (PRAVEENKUMAR et al., 2015). De forma geral, o alto consumo de energia dos métodos físicos de ruptura celular e o escalonamento necessário são preocupações importantes para a relação custo-benefício da produção de carotenoides de microalgas.

O método físico-químico de extração pela aplicação de ultrassom foi combinado com a extração por solventes para extrair astaxantina da biomassa de *H. pluvialis*. Em um estudo, três métodos diferentes de extração de astaxantina pela aplicação de ultrassom foram testados: pré-tratamento com ácido clorídrico em duas etapas seguido por extração com acetona, hexano/isopropanol em uma etapa única (6:4, v/v) e extração com metanol em duas etapas seguida por extração com acetona em uma etapa adicional (DONG et al., 2014). O tratamento em duas etapas com ácido clorídrico/acetona assistida por ultrassom mostrou o melhor rendimento de extração de astaxantina, 20 mg/g, enquanto os dois

outros métodos apresentaram rendimentos de 10 a 14 mg/g, mas os autores não deram explicações detalhadas sobre os respectivos mecanismos relevantes. Em outro estudo, quando a mistura de etanol e acetato de etila foi usada em um processo de extração assistida por ultrassom, um rendimento de astaxantina de 28 mg/g foi obtido (ZOU et al., 2013).

### **3.2.3. Extração com fluido supercrítico**

A extração por fluido supercrítico (EFS) é considerada uma técnica promissora em alternativa aos métodos convencionais de extração por solvente, devido às várias propriedades distintas apresentadas pelos fluidos neste estado de agregação. Os fluidos supercríticos têm viscosidade relativamente baixa e alta difusividade, qualidades que permitem que eles penetrem em materiais sólidos porosos de forma mais eficaz e, conseqüentemente, gerem taxas de transferência de massa muito maiores (LANG; WAI, 2001). Processos de extração altamente seletivos podem ser desenvolvidos pela manipulação do poder de solvatação do fluido pela mudança de pressão e/ou temperatura, uma ferramenta particularmente útil para a extração de amostras complexas, como materiais vegetais (REVERCHON; DONSI; SESTI OSSEO, 1993).

O funcionamento da EFS baseia-se nas propriedades de solvatação do fluido supercrítico, cujas características são obtidas empregando-se pressão e temperatura que ultrapassam o ponto crítico do fluido. Na verdade, a EFS apresenta vantagens imediatas sobre as técnicas de extração tradicionais, incluindo uma maior flexibilidade por meio do controle dos parâmetros do processo, a prevenção de solventes poluentes e uma redução de energia gasta na recuperação de solvente pós-extração (CRAMPON; BOUTIN; BADENS, 2011). A eficiência de extração depende de algumas características ajustáveis intrínsecas do fluido supercrítico, como temperatura e pressão, que são parâmetros operacionais importantes, além de algumas propriedades extrínsecas, incluindo as características da matriz da amostra e a interação com compostos alvo (SHARIF et al., 2014). Devido às complexas interações entre os fatores, uma única condição de EFS pode não gerar informações suficientes para abordar adequadamente todos os fatores que afetam o processo. Para superar essa dificuldade, delineamentos experimentais envolvendo metodologia de superfície de resposta (MSR) vêm sendo frequentemente adotados para ajudar na busca dos fatores de operação ideais (PATIL et al., 2011; ŞANAL

et al., 2005). Uma das desvantagens da EFS são os custos de equipamento mais elevados em comparação com o processo tradicional de extração por solvente. No entanto, o esquema básico do processo (extração mais separação) é relativamente simples de escalonar e, desta forma, esta tecnologia vem ganhando crescente atenção (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

O solvente supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono, que apresenta condições críticas consideradas amenas, a 30,9 °C e 73,8 bar. Ele é barato, ambientalmente favorável e geralmente reconhecido como seguro pelas organizações de segurança na produção de alimentos e fármacos. O CO<sub>2</sub> supercrítico também é atraente devido à sua alta difusividade combinada com seu poder de solvatação facilmente ajustável. Outra vantagem é que o CO<sub>2</sub> é gasoso à temperatura e pressão ambientes, o que torna a recuperação de um analito livre de solvente muito simples. Além disso, ao trabalhar com amostras de alimentos e produtos naturais, a capacidade de operar o processo de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico a baixas temperaturas usando um meio não oxidante se torna importante, pois permite a extração de compostos termolábeis ou facilmente oxidáveis. A principal desvantagem do CO<sub>2</sub> supercrítico é sua baixa polaridade, problema que pode ser superado empregando modificadores polares (também chamados de cossolventes) para alterar a polaridade do fluido supercrítico e aumentar seu poder de solvatação em relação ao analito de interesse. Por exemplo, a adição de porcentagens relativamente pequenas (1–10%) de metanol ao dióxido de carbono expande sua faixa de extração para incluir analitos mais polares. Os modificadores também podem reduzir as interações analito-matriz, melhorando sua extração quantitativa (HERRERO et al., 2010).

Parâmetros importantes na EFS de pigmentos incluem pressão, temperatura, e a seleção e concentração do cossolvente. Estudos demonstraram que os rendimentos de extração aumentaram com o aumento da pressão, pois uma pressão mais alta resulta em uma densidade de CO<sub>2</sub> mais elevada, levando a uma melhor solubilidade do soluto. Por sua vez, o aumento da temperatura pode aumentar a pressão de vapor do soluto, favorecendo a sua passagem para a fase supercrítica (KITADA et al., 2009). Dessa forma, a faixa de temperatura de extração também deve ser considerada para a recuperação de pigmentos, que usualmente são compostos termolábeis. Deseja-se facilitar a extração propriamente dita dos compostos alvo, evitando ao mesmo tempo sua degradação e problemas de contaminação do extrato por impurezas. É sugerido, por exemplo, que uma

faixa de temperatura de 40 – 60 ° C é preferível para extração de luteína (YEN; CHIANG; SUN, 2012). Outro fator que pode ser essencial para a melhoria da eficiência da extração é o pré-tratamento da biomassa microalgal antes do processo de EFS. Como exemplo, a moagem da biomassa de *C. vulgaris* foi eficaz no aumento da eficiência de recuperação de carotenoides (SAFI et al., 2014).

Foi verificado que o uso de um cossolvente pode ser essencial para aumentar a recuperação do pigmento. Uma vez que uma das principais vantagens da EFS é consistir em um processo mais ecologicamente favorável, é preferível usar um solvente de baixa toxicidade, e este aspecto se torna mandatório na produção de produtos alimentícios e de fármacos. O etanol vem sendo indicado como a melhor escolha, pois, não só aumenta a eficiência da extração quando usado como cossolvente (RUEN-NGAM et al., 2012; YEN; CHIANG; SUN, 2012), como também é considerado seguro para o processamento de alimentos. Além dos parâmetros mencionados anteriormente, a recuperação máxima também requer o emprego da concentração ideal de cossolvente. O uso de cossolventes pode melhorar o rendimento da extração, mas a seletividade pode ser inferior à do CO<sub>2</sub> puro, em virtude da alta gama de compostos que apresentarão afinidade com o aditivo utilizado. Ademais, quando a concentração de cossolvente é muito alta, a densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico diminui, causando menor eficiência de extração (MÄKI-ARVELA; HACHEMI; MURZIN, 2014).

#### **3.2.4. Extração com fluido supercrítico de pigmentos de microalgas**

A EFS vem sendo muito utilizada para extrair compostos bioativos de materiais vegetais, destacando-se a recuperação de compostos antioxidantes. Algas e microalgas têm-se destacado na busca por novas fontes viáveis de antioxidantes naturais e compostos funcionais que possam ser empregados na indústria de alimentos (YEN et al., 2015). As microalgas formam um grupo diversificado de microrganismos contendo uma grande quantidade de compostos biologicamente ativos, em geral, como resultado da sua adaptação a condições ambientais desfavoráveis. Fluidos supercríticos foram usados pela primeira vez para o tratamento da matriz algal para selecionar biomoléculas valiosas na indústria de processamento de alimentos (MICHALAK et al., 2015). Atualmente, outros compostos funcionais de atividade comprovada na saúde humana foram obtidos a partir de microalgas usando EFS. CO<sub>2</sub> supercrítico vem sendo utilizado como solvente,

comumente acompanhado por etanol como modificador, e as condições operacionais têm variado entre 40 – 85 °C e 78,6 – 500 bar. Encontra-se reportada a extração de lipídios, incluindo ácidos graxos poli-insaturados, por exemplo, ácidos graxos ômega-3: ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico, e ácidos graxos ômega-6: ácido  $\gamma$ -linolênico e ácido araquidônico, polifenóis e vitaminas. Particularmente, a extração de pigmentos de microalgas vem ganhando crescente atenção, sendo clorofilas e carotenoides importantes alvos de estudos recentes.

A extração de clorofila de microalgas por EFS depende da densidade do fluido, que é uma função da pressão operacional e da temperatura. Estudos foram conduzidos sobre a extração de clorofila das microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Synechococcus sp.* As condições de extração ótimas foram 60 °C e 400 bar para *Nannochloropsis gaditana* e 60 °C e 500 bar para *Synechococcus sp.* (MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2005, 2007). A temperatura constante, um aumento na pressão aumentará a densidade do fluido. Isso irá aumentar o poder de solvatação do fluido supercrítico, mas diminuirá seu coeficiente de difusão. O aumento da temperatura sob pressão constante também tem um efeito duplo. O aumento da temperatura aumenta as pressões de vapor dos pigmentos e, portanto, proporciona melhor solubilidade, mas também diminuirá a densidade do fluido supercrítico, o que levará a um menor poder de solvatação. Portanto, o rendimento de clorofila em cada condição operacional dependerá de qual efeito predomina (HALIM et al., 2010).

Em um trabalho subsequente, a extração de clorofilas usando dióxido de carbono modificado com etanol como cossolvente (5,0 %) foi testada para a biomassa das microalgas *Nannochloropsis gaditana*, *Synechococcus sp.* e *Dunaliella salina* (MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2008). O uso de etanol na recuperação de clorofilas é justificado pela modificação da polaridade da mistura supercrítica causada pela sua adição e o consequente aumento de compatibilidade do solvente com as moléculas polares de clorofila. Os maiores rendimentos de extração de clorofila com CO<sub>2</sub> + 5% de etanol foram alcançados a 500 bar e 60 °C para *N. gaditana*, 400 bar e 60°C para *D. salina*, e 300 bar e 60 °C para *Synechococcus sp.* Neste trabalho, a maior recuperação na extração de clorofila foi alcançado com a espécie *Synechococcus sp.* (2,22 mg/g de biomassa seca).

Em geral, os trabalhos que abordaram a EFS de clorofilas de microalgas contemplaram sua extração em conjunto com carotenoides. A literatura atualmente

identifica a EFS como o método não convencional mais extensamente estudado para a recuperação de carotenoides de algas e microalgas. Na extração supercrítica de carotenoides com CO<sub>2</sub>, em geral, a eficiência de extração aumenta com a pressão e a temperatura até um nível ideal. No entanto, essa tendência é dependente do efeito combinado de pressão e temperatura. Em alguns casos, a alta pressão de CO<sub>2</sub> causou menor recuperação de carotenoides e, por outro lado, alguns pesquisadores observaram uma redução na extração de carotenoides quando baixa pressão de CO<sub>2</sub> foi empregada, dependendo da temperatura utilizada em combinação (POOJARY et al., 2016). Em concordância com a discussão previamente apresentada sobre os efeitos da pressão e da temperatura sobre as características do fluido supercrítico, a recuperação dos carotenoides se mostra altamente dependente da complexa interação entre estes fatores, que afetam fundamentalmente a densidade, a viscosidade e a pressão de vapor no sistema. A predominância de um ou outro efeito é responsável pela eficiência de extração.

Em um estudo realizado com a microalga *Synechococcus sp.* (MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2007), os autores obtiveram o maior rendimento de carotenoides usando CO<sub>2</sub> supercrítico a uma temperatura de 50 °C quando pressões de 200 bar e 300 bar foram utilizadas, enquanto o rendimento diminuiu quando pressões de 400 bar a 500 bar foram testadas. Nessas pressões, o rendimento máximo de extração foi obtido a 60 °C. A variação observada no rendimento em relação à pressão e temperatura foi correlacionada aos efeitos dominantes da densidade ou pressão de vapor nessas condições. Observações semelhantes foram feitas no estudo subsequente dos autores sobre a EFS de carotenoides de *Scenedesmus almeriensis*. Ao estudar os efeitos da pressão (200 - 600 bar) e da temperatura (32 – 60 °C), o rendimento máximo de luteína foi alcançado em pressões intermediárias. Vários outros estudos demonstraram efeitos semelhantes de pressão e temperatura na recuperação de diversos carotenoides (POOJARY et al., 2016).

Entre os cossolventes testados na EFS de carotenoides de microalgas, tem-se o etanol como o modificador mais utilizado, mas também existem pesquisas publicadas utilizando acetona e óleo vegetal como modificadores de polaridade para a recuperação eficiente de β-caroteno, astaxantina, luteína e zeaxantina (POOJARY et al., 2016). Como visto, o CO<sub>2</sub> supercrítico é apolar, e a adição de uma pequena quantidade de cossolvente aumenta a capacidade do CO<sub>2</sub> supercrítico de dissolver carotenoides relativamente polares. A adição de cossolventes também pode causar inchaço das partículas de

microalgas, facilitando a rápida transferência de massa de solutos contidos na matriz (FAHMY et al., 1993). Alguns cossolventes, como o etanol, podem aumentar a transferência de massa ao criar ligações de hidrogênio com os solutos (NOBRE et al., 2006). Em um estudo sobre a extração de CO<sub>2</sub> supercrítico de luteína de *Scenedesmus sp.*, o etanol foi considerado o cossolvente superior em comparação a metanol, propanol, butanol e acetona (YEN; CHIANG; SUN, 2012), e em outro estudo, a presença do etanol melhorou a recuperação de carotenoides totais da microalga *H. pluvialis* em até 25 %. A utilização de etanol como solvente aumentou significativamente a recuperação de fucoxantina das algas *U. pinnatifida* e *Sargassum muticum* em até 90 e 10 vezes, respectivamente (CONDE; MOURE; DOMÍNGUEZ, 2015; KANDA et al., 2014).

É importante ressaltar que, embora o uso de cossolventes melhore o rendimento de extração, em alguns casos, sua presença pode diminuir a seletividade do processo. Em um trabalho realizado por (CASAS CARDOSO et al., 2012), os autores mostraram que, embora o rendimento obtido de  $\beta$ -caroteno tenha aumentado com o uso de CO<sub>2</sub> modificado por 5 % de etanol como cossolvente, sob essas condições a zeaxantina foi co-extraída. Este resultado é compatível com o aumento da compatibilidade da mistura solvente com este último soluto, dada sua maior polaridade. A seletividade também é dependente dos parâmetros de operação da EFS, como pressão e temperatura, e também o tempo de extração (KITADA et al., 2009). Assim, o uso de um cossolvente pode comprometer a pureza do produto alvo e este aspecto deve ser considerado.

Os resultados encontrados na literatura mostram que múltiplos fatores influenciam significativamente a eficiência de extração e a seletividade da recuperação de pigmentos por EFS. Portanto, os parâmetros de processo devem ser cuidadosamente considerados e otimizados para uma recuperação eficiente e seletiva dos compostos alvo. Para este propósito, a metodologia de superfície de resposta (MSR) mostra-se como uma importante ferramenta estatística que vem sendo bastante utilizada. Em um estudo realizado por Thana et al. (2008), utilizando um planejamento composto central, foi investigado o efeito das temperaturas (40 – 80 °C), pressões (300–500 bar) e tempos de extração (1 – 4 h) nos rendimentos de astaxantina utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. As condições ideais para extração de astaxantina foram encontradas a 70 °C de temperatura, 500 bar de pressão e 4 horas de tempo de extração. Nessas condições, o rendimento de extração de astaxantina previsto foi de 23,04 mg/g (equivalente a 83,78 % de recuperação).



As pressões e temperaturas ótimas necessárias para a extração de carotenoides das microalgas *Nannochloropsis gaditana*, *Scenedesmus almeriensis*, *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.*, *Synechococcus sp.*, e *Undaria pinnatifida* também foram relatadas na literatura e encontram-se revisadas no trabalho de Poojary et al. (2016). De forma resumida, a EFS demonstrou ser uma excelente técnica para a extração seletiva de carotenoides de uma ampla gama de algas e microalgas. Em geral, mostrou-se que o uso de CO<sub>2</sub> supercrítico sozinho aumenta a seletividade do processo, enquanto a eficiência de extração pode ser aumentada com o uso de cossolventes como o etanol, embora isso comprometa a seletividade.

É importante destacar que alguns aspectos tornam difícil a avaliação dos resultados presentes na literatura. Primeiramente, há resultados consideravelmente contrastantes entre estudos de escopos semelhantes; isto é, embora alguns trabalhos tenham conseguido corroborar seus resultados experimentais com base no conhecimento técnico pertinente ao processo de EFS (avaliando os efeitos das variáveis sobre as propriedades do fluido, dos compostos alvo e da matriz microalgal), outros reportaram resultados discrepantes a estes fundamentos, sem que fosse sugerida uma relação causal. Secundariamente, a forma como a recuperação de pigmentos foi apresentada diferiu entre trabalhos, com resultados reportados como mg/g de biomassa seca ou como a porcentagem do conteúdo de pigmentos da biomassa microalgal que foi extraída no processo, aqui denominado “rendimento”. Neste trabalho, considerou-se que o rendimento é o parâmetro mais adequado para quantificar a recuperação em um processo de extração, pois normaliza a extração de cada pigmento levando em consideração o conteúdo variável deste composto apresentado por diferentes linhagens de microalgas. Ainda, esta informação indica quanto do conteúdo disponível na matriz microalgal não foi recuperado, permanecendo disponível como alvo do esgotamento ou tendo-se degradado no processo. O grupo majoritário de trabalhos publicados não reportou este parâmetro e tampouco relatou a caracterização da biomassa microalgal estudada quanto a seu conteúdo de pigmentos, impossibilitando a avaliação supracitada.

### **3.3. Termodinâmica de processos de extração**

O projeto de processos usando solventes líquidos ou em estado supercrítico é fortemente dependente do equilíbrio entre fases, o qual é altamente sensível a mudanças

nas condições operacionais. Portanto, a engenharia de equilíbrio de fase desempenha um papel fundamental na síntese e no projeto desses processos. Trata-se da aplicação sistemática do conhecimento do equilíbrio de fases ao desenvolvimento de processos. Esse conhecimento compreende o uso de bancos de dados, geração de dados experimentais, o entendimento do comportamento fenomenológico de fase, o emprego da análise termodinâmica e de procedimentos de modelagem matemática para cálculos de processo (HERRERO et al., 2010).

Dessa forma, o desenvolvimento de processos *downstream* envolvidos na purificação de pigmentos de microalgas depende da aquisição de conhecimentos sobre as propriedades das espécies químicas envolvidas (ASENJO; ANDREWS, 2004), pois o coeficiente de distribuição global nos processos de extração depende, em grau variável, de uma ampla gama de propriedades, como tamanho de molécula, carga, hidrofobicidade, solubilidade e afinidade entre as moléculas (AHAMED et al., 2006).

### 3.3.1. Equilíbrio de fases e a não-idealidade em solução

Para que um sistema qualquer esteja em equilíbrio térmico e mecânico, dois critérios devem ser atendidos: não devem existir gradientes de temperatura ( $T$ ) e tampouco gradientes de pressão ( $P$ ) neste sistema. Quando um sistema multifásico é considerado, pode-se resumir estas condições conforme apresentado nas Equações 3.1 e 3.2 a seguir (KORETSKY, 2012):

$$T^{\alpha} = T^{\beta} = \dots = T^{\pi} \quad (3.1)$$

$$P^{\alpha} = P^{\beta} = \dots = P^{\pi} \quad (3.2)$$

onde os sobrescritos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi$  denotam diferentes fases que coexistem neste sistema. Um terceiro critério, o equilíbrio químico, deve ser respeitado para que haja equilíbrio entre estas fases. Para que isso ocorra, a energia de Gibbs total do sistema deve ser a mínima possível (para dadas temperatura e pressão), o que corresponde à igualdade da energia de Gibbs parcial molar de cada componente, conforme Equação 3.3:

$$\bar{G}_i^{\alpha} = \bar{G}_i^{\beta} = \dots = \bar{G}_i^{\pi} \quad (3.3)$$

onde o subíndice  $i$  denota uma espécie química qualquer presente neste sistema. A energia de Gibbs parcial molar é uma quantidade muito importante no que se refere ao equilíbrio químico e recebe a denotação de potencial químico ( $\mu_i$ ). A definição de uma propriedade parcial molar é sua derivada em relação ao número de mols de dado componente ( $n_i$ ). Assim, em resumo, o potencial químico pode ser definido conforme a Equação 3.4:

$$\mu_i = \bar{G}_i = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,P,j \neq i} \quad (3.4)$$

Desta forma, da introdução do conceito de potencial químico, pode-se resumir a condição de equilíbrio entre fases como expresso na Equação 3.5:

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta = \dots = \mu_i^\pi \quad (3.5)$$

Assim, de forma enunciada, a condição de equilíbrio entre fases é a igualdade de potencial químico de cada uma das espécies químicas presentes no sistema em todas as fases coexistentes.

A fugacidade ( $f$ ) é uma propriedade termodinâmica intensiva, com unidade de pressão, criada de forma a generalizar a equação diferencial do potencial químico. Lewis (1901) a propôs como uma nova propriedade termodinâmica, definida da seguinte forma, conforme Equação 3.6:

$$\mu_i - \mu_i^o = RT \ln \left( \frac{\hat{f}_i}{\hat{f}_i^o} \right) \quad (3.6)$$

onde  $\hat{f}_i$  é a fugacidade do componente  $i$  quando em mistura,  $\mu_i^o$  e  $\hat{f}_i^o$  representam, respectivamente, o potencial químico e a fugacidade em um estado de referência que pode ser adotado arbitrariamente, e  $R$  é a constante universal dos gases. Por conveniência, o

tratamento mais usual consiste em determinar a condição de gás ideal ou de solução ideal como estado de referência. A adoção destas referências envolverá então o uso conjunto de equações de estado ou de modelos termodinâmicos de energia de Gibbs em excesso adequados, respectivamente.

Assim, torna-se também importante a compreensão da energia de Gibbs em excesso, que, por se tratar de uma propriedade de excesso, representa a diferença entre o valor real desta propriedade e aquele que seria apresentado pelo mesmo sistema na condição de idealidade. Assim, define-se a energia de Gibbs de excesso conforme mostrado na Equação 3.7:

$$\bar{G}_i^E = \bar{G}_i - \bar{G}_i^{Id} = \mu_i - \mu_i^{Id} = RT \ln \left( \frac{\hat{f}_i}{\hat{f}_i^{Id}} \right) \quad (3.7)$$

Outra maneira de representar a energia de Gibbs de excesso, comumente empregada para quantificar a não-idealidade da fase líquida, é a introdução do coeficiente de atividade ( $\gamma_i$ ), como relação entre a fugacidade do componente  $i$  em mistura e sua fugacidade em solução ideal. Desta forma, o argumento do logaritmo na Equação 3.7 pode ser substituído conforme representado na Equação 3.8:

$$\bar{G}_i^E = \bar{G}_i - \bar{G}_i^{Id} = \mu_i - \mu_i^{Id} = RT \ln(\gamma_i) \quad (3.8)$$

Assim, a predição do equilíbrio de fases dependerá, fundamentalmente, do cálculo adequado da energia de Gibbs de excesso, que por sua vez, será alcançado pelo emprego de um modelo termodinâmico adequadamente selecionado.

No contexto de processos de extração, a adição de uma macromolécula biológica a um solvente dá origem à não-idealidade termodinâmica da solução. Como visto, o coeficiente de atividade é uma propriedade da mistura que fornece uma medida da não-idealidade da fase de solução, e é uma propriedade físico-química importante que influencia fundamentalmente o coeficiente de partição de uma espécie entre fases (ANANTHARAJ; BANERJEE, 2010).

Mais especificamente, os coeficientes de atividade a diluição infinita (CADI) são de grande valor quando se avalia o comportamento de equilíbrio de um composto muito diluído em uma fase (SANDLER, 1996). Esta condição pode ser considerada compatível com aquela encontrada na extração de pigmentos de microalgas por solventes orgânicos, bem como na extração sub e supercrítica, dadas as usuais proporções necessárias entre o solvente/mistura e o soluto que se deseja extrair. A seletividade e a capacidade em diluição infinita, que são funções dos valores do CADI, quantificam a aplicabilidade dos solventes e podem ser utilizados com a finalidade de triagem (ANANTHARAJ; BANERJEE, 2010). O CADI se torna, portanto, um importante indicador da afinidade entre misturas de solventes e solutos em processos de separação e, indiretamente, da eficiência de extração que pode ser alcançada. Diante disso, o desenvolvimento e aplicação de modelos termodinâmicos adequados para a previsão de CADI de moléculas biológicas em solução mostra-se de grande importância.

### 3.3.2. COSMO-SAC

Modelos preditivos de equilíbrio baseados em química quântica, conhecidos como modelos baseados em COSMO, estão entre os desenvolvimentos mais recentes no campo de predição de propriedades de misturas. Por meio deles, o coeficiente de atividade é calculado a partir da energia livre de solvatação das moléculas em uma solução. Solvatação é qualquer interação de estabilização entre um soluto (ou agrupamento de solutos) e o solvente, ou interação similar do solvente com grupos de um material insolúvel. Tais interações geralmente envolvem forças eletrostáticas e forças de Van der Waals, bem como efeitos químicos mais específicos, como a formação de ligações de hidrogênio. Os modelos baseados na teoria COSMO são fundamentados no conceito da superfície acessível pelo solvente de uma determinada molécula (GERBER; SOARES, 2013).

Nesses modelos, a molécula do soluto é considerada imersa em um meio dielétrico contínuo com permissividade. Dessa maneira, o soluto gera uma cavidade no interior do dielétrico e a interface entre a cavidade e o dielétrico é normalmente conhecida como área acessível ao solvente (ou SAS, do inglês “*solvent accessible surface*”). Para qualquer distribuição de carga, a resposta de um dielétrico homogêneo contínuo consiste em uma superfície de distribuição de cargas na interface devido à polarização do meio (KLAMT;

SCHÜRMANN, 1993). O modelo constrói uma cavidade dentro do condutor perfeito, de acordo com o conjunto de regras e dimensões específicas dos átomos. O dipolo da molécula extrai a carga do meio condutor para a superfície da cavidade gerada, com o intuito de cancelar o campo elétrico gerado, tanto aquele no interior do condutor, quanto aquele tangente à superfície (FERRARINI, 2017).

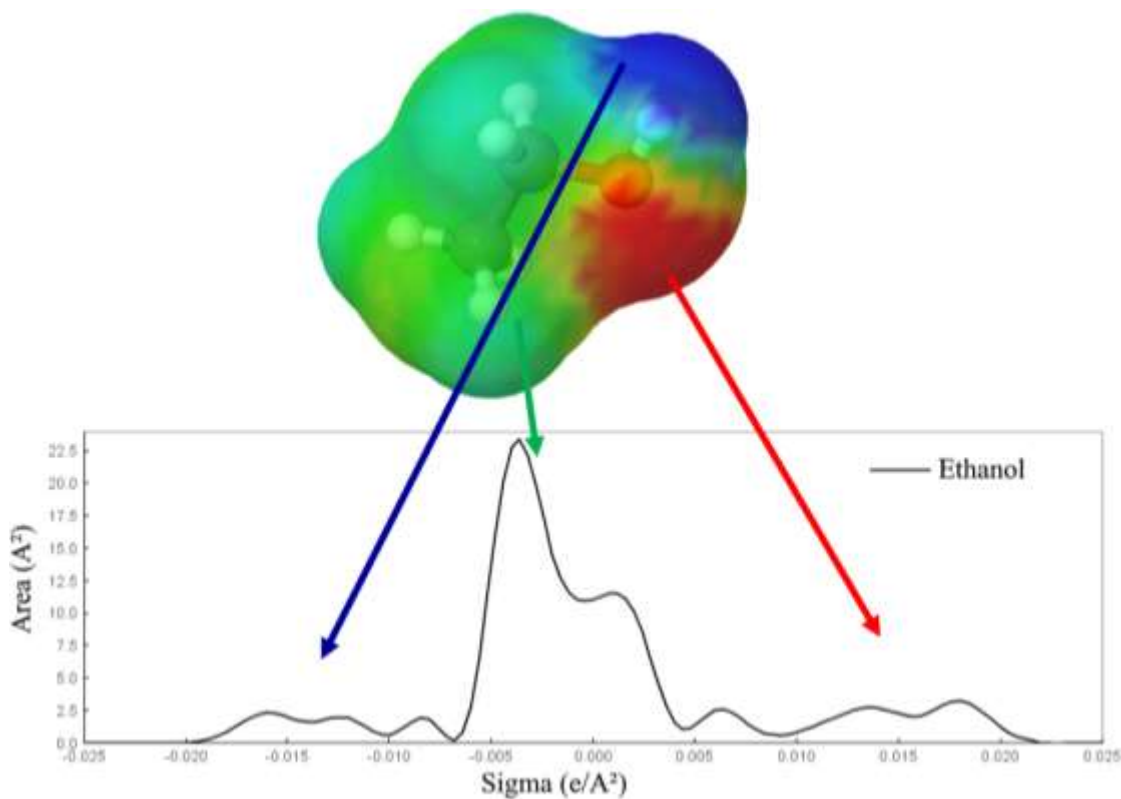
Em modelos baseados em COSMO, cada molécula é considerada como sendo composta pelos núcleos dos átomos, seus elétrons e uma superfície externa. A superfície é o que separa a molécula do solvente e é onde uma carga aparente é induzida pelos núcleos e elétrons. Para a construção da superfície, cada átomo é considerado como sendo um núcleo centrado numa esfera com raio definido. A superfície é então construída pela união de todas as esferas com o uso de suavização. Essa abordagem simplificada da molécula é necessária para determinar, através da mecânica quântica, informações importantes da substância que serão posteriormente utilizadas pelo modelo em substituição aos dados experimentais (GERBER, 2010).

Uma variante do referido grupo de modelos é o COSMO-SAC (*Conductor-like Screening Model for Real Solvent Segment Activity*), um modelo que teve diversas aplicações em sistemas complexos, como o comportamento de predição de soluções poliméricas e líquidos iônicos. Nele, o cálculo do coeficiente de atividade requer o perfil sigma, a área superficial de Van der Waals e o volume de cada molécula da mistura. É, em essência, um modelo preditivo e vem ganhando cada vez mais atenção devido à menor necessidade de estimativas de parâmetros específicos usando dados experimentais, embora ainda apresentando alta precisão na predição das propriedades do sistema (FERRARINI et al., 2018a).

Será possível, dessa forma, determinar a distribuição tridimensional de carga aparente induzida na superfície da molécula, e esta distribuição poderá, para praticidade de interpretação, ser graficada em duas dimensões, apresentando uma relação entre a fração da superfície molecular para uma densidade de carga correspondente, no diagrama denominado “perfil sigma” (GERBER, 2010). A título de ilustração, a Figura 4 mostra o perfil sigma gerado por COSMO-SAC para o etanol, o correlacionando à distribuição de cargas na superfície da molécula. Nessa representação de superfície, as áreas verdes estão associadas a regiões apolares da molécula, enquanto as áreas vermelhas e azuis estão associadas a distribuições de carga positivas e negativas, respectivamente.

O uso do perfil sigma bidimensional no lugar da distribuição tridimensional da densidade de carga sobre a superfície molecular é baseado na suposição de que as interações entre os elementos da superfície molecular são dependentes apenas de uma interação de superfície local entre um par de segmentos (WANG; SANDLER; CHEN, 2007). No perfil sigma, o eixo das abscissas mostra diferentes valores de densidade de carga  $\sigma$ , induzida na superfície das moléculas, e esse valor usualmente varia entre  $-0,025 e/\text{Å}^2$  e  $0,025 e/\text{Å}^2$ . No eixo das ordenadas tem-se a probabilidade de encontrar um elemento com densidade de carga  $\sigma_i$  em uma substância pura  $i$  multiplicado pela área superficial total da cavidade, resultando que esta variável apresente unidade de área ( $\text{Å}^2$ ). A integral do perfil sigma é sempre igual à carga da molécula, sendo zero para moléculas neutras e valores diferentes de zero (... , -2, -1, +1, +2, ...) para íons.

**Figura 4** - Relação entre a distribuição de carga e o perfil sigma gerado por COSMO-SAC para a molécula de etanol.



Fonte: O Autor.

Para alcançar estas informações, cálculos de mecânica quântica são necessários para encontrar a conformação da molécula que apresenta menor energia, e é, portanto, mais estável. Dessa forma, o procedimento consiste em uma otimização de geometria que

irá determinar os ângulos e distâncias entre os núcleos dos átomos da molécula que correspondem ao mínimo de energia, partindo apenas dos átomos que compõem a molécula e a forma como eles estão ligados. Os cálculos necessários para a realização destes procedimentos estão implementados em diversos pacotes de *softwares* de química quântica (GERBER, 2010). Entre estes, destaca-se o uso do método de Hartree-Fock, que se baseia em obter uma solução aproximada da equação de Schrödinger para átomos e moléculas (SCHRÖDINGER, 1926). Um conjunto de base na química teórica e computacional é um conjunto de funções (chamadas funções de base) que é usado para representar a função de onda eletrônica no método Hartree-Fock, a fim de transformar as equações diferenciais parciais do modelo em equações algébricas adequadas para implementação eficiente em um computador. Por sua vez, destaca-se neste trabalho o conjunto de base TZVP (“Triple-Zeta Valence with Polarization”) (SCHÄFER; HUBER; AHLRICH, 1994).

Com o intuito da criação de um novo banco de dados de perfis sigma para uso em modelos tipo COSMO, diferentes conjuntos de funções de base e de teorias para o cálculo da estrutura eletrônica foram testados e avaliados em um trabalho recente (FERRARINI et al., 2018b). Com base nos resultados obtidos, o modelo COSMO-SAC apresentou um bom desempenho na predição dos valores de CADIs e, com relação aos métodos de cálculos utilizados, a teoria de Hartree-Fock utilizando como função de base TZVP mostrou-se como a melhor combinação para a geração dos perfis sigma, pois apresentou menores desvios em relação aos dados experimentais. Com base nestes resultados, selecionou-se esta mesma combinação de modelos para a parametrização das moléculas e predição de CADIs desenvolvida neste trabalho.

#### **3.4. Adsorção de metais pesados por microalgas**

Nesta seção é apresentada revisão bibliográfica referente ao tópico de adsorção de metais pesados com enfoque no uso de microalgas como bioissorventes. Trata-se de uma abordagem para a valorização da biomassa microalgal, *in natura* ou como resíduo originado em processos de extração, e, portanto, consiste em mais uma oportunidade para viabilizar economicamente o desenvolvimento de uma biorrefinaria microalgal.



### 3.4.1. Contaminação de efluentes industriais por metais pesados

Metais pesados são elementos com massa atômica entre 63,5 e 200,6 e uma densidade relativa maior que 5,0 (SRIVASTAVA; BALOMAJUMDER, 2008). Com o rápido desenvolvimento de indústrias como instalações de chapeamento de metais, operações de mineração, indústrias de fertilizantes, curtumes, baterias, indústrias de papel e pesticidas, etc., efluentes industriais contendo metais pesados vêm sendo direta ou indiretamente despejados no meio ambiente, especialmente nos países em desenvolvimento. Ao contrário dos contaminantes orgânicos, os metais pesados não são biodegradáveis e tendem a se acumular em organismos vivos, sendo que muitos íons de metais pesados são conhecidos por serem tóxicos ou cancerígenos. Metais pesados tóxicos de particular preocupação no tratamento de efluentes industriais incluem zinco, cobre, níquel, mercúrio, cádmio, chumbo, cromo, entre outros (FU; WANG, 2011). Deste grupo, os metais pesados abordados neste trabalho são destacados a seguir.

O zinco é um oligoelemento essencial para a saúde humana. Sua presença é importante para as funções fisiológicas dos tecidos vivos e ele regula muitos processos bioquímicos. No entanto, o excesso de zinco pode causar problemas de saúde, como cólicas estomacais, irritações na pele, vômitos, náuseas e anemia (NATHAN et al., 2007). Da mesma forma, o cobre tem um papel essencial no metabolismo animal. No entanto, sua ingestão excessiva acarreta sérias consequências toxicológicas, como vômitos, cólicas, convulsões ou mesmo morte (PAULINO et al., 2006).

O cromo é encontrado principalmente em dois estados: sua forma trivalente,  $\text{Cr}^{3+}$ , e sua forma hexavalente,  $\text{Cr}^{6+}$ . Em geral, o cromo hexavalente é a forma mais tóxica, afetando a fisiologia humana, acumulando-se na cadeia alimentar e causando graves problemas de saúde que vão desde simples irritações da pele até o câncer pulmonar (KHEZAMI; CAPART, 2005). Já no caso do ferro, sua ingestão excessiva pode levar ao comprometimento da hematopoiese, isto é, o desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). Se a sobrecarga de ferro não for tratada, pode levar à hemocromatose, que danifica diferentes órgãos do corpo. Doenças oculares como retinite, conjuntivite e coroidite, câncer e doenças cardíacas também são alguns dos problemas de saúde comuns enfrentados devido à alta concentração de ferro na água (KHATRI; TYAGI; RAWTANI, 2017).

Regulamentações ambientais cada vez mais rigorosas vêm sendo impostas, de modo que os metais pesados representam poluentes cuja mitigação tornou-se prioritária para a preservação do meio ambiente. Portanto, esses metais pesados tóxicos devem ser removidos dos efluentes industriais para proteger a população e os biomas das regiões de despejo. Diante desta necessidade de tratamento, uma breve revisão sobre alternativas tecnológicas é apresentada a seguir.

### **3.4.2. Processos de tratamento de efluentes contaminados por metais pesados**

Os metais pesados entram nas cadeias alimentares humanas por meio de mecanismos de bioacumulação e apresentam toxicidade aos sistemas biológicos devido ao aumento da concentração de íons metálicos ao longo do período. Esses metais pesados podem entrar facilmente no sistema aquático devido a descartes inadequados de efluentes industriais e agrícolas, aplicações domésticas e comerciais. Entre os diferentes métodos de tratamento disponíveis para a remoção de metais pesados tóxicos da água e de efluentes, tem-se precipitação química, coagulação e floculação, métodos eletroquímicos, filtração por membranas, troca iônica, biorremediação e adsorção (HARSHA; SENTHIL; PANDA, 2019). Embora o processo de adsorção venha sendo apontado como a estratégia mais eficiente, econômica e seletiva para a remoção de metais pesados de efluentes industriais, faz-se importante a contextualização desta tecnologia frente às demais alternativas atualmente disponíveis.

A precipitação química é amplamente utilizada na remoção de metais pesados de efluentes porque é uma tecnologia barata e relativamente simples de operar. O pH do efluente é ajustado para condições básicas no início do tratamento, e então o agente precipitante é adicionado. Ele reage com os íons de metais pesados presentes no efluente para formar precipitados insolúveis, os quais podem ser separados por operações de sedimentação ou filtração (BALTPURVINS et al., 1997). Os processos tradicionais de precipitação química incluem a formação de sulfetos e de hidróxidos. O processo de precipitação com hidróxidos é a técnica de precipitação química mais utilizada no tratamento de remoção de metais pesados de efluentes industriais, devido ao seu baixo custo, simplicidade e fácil controle de pH, e a cal vem sendo usada como um importante agente precipitante. A solubilidade dos diferentes hidróxidos de metal é limitada na faixa

de pH de 8,0 a 11,0. Os hidróxidos metálicos formados podem ser separados por floculação seguida das operações de sedimentação (BALLADARES et al., 2018).

A precipitação química através da formação de sulfetos, por sua vez, pode atingir um alto nível de remoção de metais em uma ampla faixa de pH em comparação com os métodos de precipitação de hidróxido. Em adição, os lodos formados exibem qualidades preferíveis de espessamento e desidratação em relação às lamas de hidróxido de metal (FU; WANG, 2011). Em qualquer caso, existem potenciais riscos na utilização do processo de precipitação de sulfetos. Em geral, os íons de metal pesado encontram-se em condições ácidas e o uso de precipitantes de sulfeto nestas condições pode resultar na formação do perigoso vapor de sulfeto de hidrogênio. Além disso, a precipitação de sulfetos de metal tende a formar precipitados coloidais que fornecem alguns problemas de separação em processos de filtração ou sedimentação. A precipitação química requer muitos produtos químicos para reduzir o teor de metais a um nível adequado para liberação no meio ambiente. Outras desvantagens ainda incluem uma grande geração de lodo, aumento do custo de disposição do lodo, precipitação mais lenta do metal, sedimentação pobre e os efeitos ecológicos de longo termo do descarte do lodo (YANG; FANE; MACNAUGHTON, 2001).

Tecnologias de coagulação e de floculação também podem ser utilizadas para tratar efluentes contaminados por metais pesados. Essencialmente, o tratamento de coagulação desestabiliza as partículas coloidais usando um coagulante químico e resulta em sedimentação. Geralmente, a coagulação é seguida pela floculação das partículas instáveis em flocos massivos para aumentar o tamanho de partícula, os quais irão sedimentar, depositando-se ao fundo de um tanque de sedimentação, sendo facilmente removidos por filtração ou flotação, por exemplo (TEH et al., 2016). A aplicação destas tecnologias à remoção de metais pesados apresenta entraves, uma vez que os principais objetos do tratamento de coagulação são os sólidos em suspensão e os coloides hidrofóbicos, e que os floculantes usualmente utilizados não podem ser utilizados diretamente para a remoção de íons metálicos tóxicos (BRATSKAYA et al., 2009). Geralmente, os metais pesados não podem ser completamente removidos pelas unidades de tratamento de coagulação/floculação sozinhas, algo que pode ser alcançado considerando outro tratamento em conjunto. Uma outra importante restrição consiste nos altos custos operacionais apresentados devido a uma grande quantidade de utilização de produtos químicos (NIDHEESH; SINGH, 2017).

Os métodos eletroquímicos vêm sendo apontados como altamente eficazes no tratamento de efluentes industriais, particularmente para a remoção de íons de metais pesados. Estes métodos envolvem a recuperação dos metais pesados no estado metálico elementar usando reações anódicas e catódicas em uma célula eletroquímica (HARSHA; SENTHIL; PANDA, 2019). Apesar da sua alta eficiência, estes métodos geralmente representam um investimento muito elevado e também um custo energético alto, o que tem limitado sua aplicação industrial (NARIYAN; AGHABABAEI; SILLANPÄÄ, 2017). Entre estas tecnologias, tem-se o processo de eletrocoagulação, o qual é composto por eletrodos que atuam como o ânodo e cátodo onde ocorrem as reações de oxidação e redução, respectivamente. Uma vantagem deste método é que não há a necessidade de adicionar produtos químicos, já que o elétron é o reagente essencial. Esse método é apontado como uma tecnologia ecologicamente correta quando comparado ao processo de coagulação, pois o processo de eletrocoagulação produz uma quantidade menor de lodo, que também é mais estável (AL-SHANNAG et al., 2015; WIDHIASTUTI et al., 2018). Outro método eletroquímico que vem sendo empregado na recuperação de metais pesados é a eletroporação. Trata-se de um método de tratamento limpo, uma vez que tampouco utiliza agentes químicos e não gera resíduos permanentes. As principais vantagens deste método incluem a recuperação do metal na sua forma mais pura, o custo operacional relativamente baixo e a ausência de problemas associados ao descarte de lodos (MEZINE et al., 2018). Por fim, a eletroflotação é um processo de separação sólido-líquido que transporta os metais pesados tóxicos para a superfície da água através de pequenas bolhas de gás oxigênio e hidrogênio, os quais são produzidos a partir da eletrólise da água (ADJEROUD et al., 2018). Em qualquer caso, os métodos eletroquímicos exigem maior investimento de capital inicial e apresentam consumo de energia altamente dispendioso.

Os métodos de tratamento por filtração por membranas vêm mostrando excelentes resultados para a remoção de metais pesados de efluentes industriais. As membranas em geral apresentam uma estrutura complexa que contém elementos dinâmicos em escala nanométrica. As membranas de sistemas de osmose reversa são comumente filmes finos de polímeros homogêneos apoiados por uma estrutura de suporte permeável. A permeabilidade da água através da membrana e a rejeição de íons de metais pesados dependem principalmente das propriedades químicas e físicas da membrana (DING et al., 2014). As principais vantagens destes métodos são a maior eficiência de remoção, menor

necessidade de espaço e operação mais fácil. Os diferentes tipos de processos de separação por membranas, que incluem osmose reversa, ultrafiltração, nanofiltração e eletrodialise, vêm sendo empregados com sucesso para a remoção de íons metálicos tóxicos de efluentes industriais. Entre algumas desvantagens importantes associadas a estes métodos, tem-se o tratamento do rejeito, a formação de incrustações na membrana (mais conhecida como “*fouling*”) e o alto custo energético operacional (HARSHA; SENTHIL; PANDA, 2019).

Ainda, processos de troca iônica vêm sendo amplamente empregados na remoção de metais pesados de efluentes industriais, devido às suas excelentes taxas de remoção, maior capacidade de tratamento e cinética rápida (KANG et al., 2004). Nesse processo, os íons (cátions ou ânions) em solução são substituídos pelos mesmos tipo de íons no material insolúvel, chamado de resina de troca iônica. O efluente contendo metais pesados entra na coluna de troca iônica em uma extremidade e percorre o leito fixo formado pela resina de troca iônica, que efetivamente remove os metais pesados do efluente. Quando a resina satura com os metais pesados, ela é regenerada por retrolavagem para remover os metais pesados depositados (INGLEZAKIS; GRIGOROPOULOU, 2003). A resina de troca iônica pode ser natural ou sintética, sendo materiais sintéticos, sobretudo resinas catiônicas, preferencialmente usados na remoção de metais pesados, pois apresentam maior eficiência de remoção (ALYÜZ; VELI, 2009). Embora o método de troca iônica seja amplamente utilizado, os produtos químicos usados para regenerar as resinas de troca iônica produzem poluentes secundários graves, sendo originada uma nova demanda por tratamento adequado. O processo de troca iônica é caro, porque em geral requer uma grande quantidade de resina para tratar altas vazões de efluentes, mesmo que estes contenham uma concentração baixa de íons metálicos (OBAID et al., 2018).

Um método que ainda deve ser destacado e que vem recebendo crescente atenção para o tratamento de efluentes contaminados por metais pesados é o processo de biorremediação. Trata-se de um método de tratamento através do qual sistemas biológicos vegetais, animais ou compostos por microrganismos são utilizados para remover poluentes tóxicos do ambiente aquático (HEAD, 1998). Recentemente, o processo de biorremediação assistida por microrganismos vem sendo amplamente utilizado na remoção de metais pesados de efluentes industriais. Esta tecnologia tem sido apontada como economicamente favorável, além de apresentar fácil manuseio, crescimento regular de microrganismos e baixo custo de manutenção (RAI, 2008). As plantas aquáticas

(incluindo algas e microalgas) apresentam propriedades favoráveis para remover metais pesados. Diversos gêneros de plantas aquáticas, que incluem *Typha*, *Eichhornia*, *Phragmites*, *Azolla* e *Lemna* foram utilizados para remover metais tóxicos de efluentes através de seu metabolismo de acumulação em processos de biorremediação (HARSHA; SENTHIL; PANDA, 2019).

Por sua vez, pode-se destacar o uso de microalgas na remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos de efluentes industriais através de biorremediação. Em específico, a remoção de metais pesados de efluentes industriais usando diferentes tipos de microalgas vem sendo bastante abordada na literatura (RAMIREZ et al., 2017). A parede celular das algas consiste de diferentes grupos funcionais, como amino, hidroxila, carboxila e sulfato, atuando como os principais locais de ligação para a remoção de metais pesados de efluentes. Os metais pesados geralmente entram na parede celular das algas (processo rápido), e em seguida difundem para o interior da célula (processo lento). De forma importante, a presença de metais pesados no interior destes microrganismos apresenta toxicidade, podendo causar a morte celular. Este é um aspecto que limita significativamente a aplicação da biorremediação de efluentes contaminados por íons metálicos (ARUNAKUMARA; ZHANG, 2008).

Diante do exposto, é possível verificar que existe atualmente uma vasta variedade de alternativas tecnológicas aplicáveis ao tratamento de efluentes contaminados por metais pesados. No entanto, uma das tecnologias que mais vêm se destacando neste contexto é a de adsorção. Este método é atualmente percebido como o mais econômico, eficiente e seletivo para a remoção de metais pesados de efluentes industriais, fornecendo flexibilidade na operação e *design*, alcançando a recuperação completa dos íons metálicos (DA'NA, 2017). Desta forma, é apresentada a seguir uma revisão sobre esta tecnologia, a qual consistiu em mais uma abordagem neste trabalho para utilização da biomassa microalgal e valorização no contexto de desenvolvimento de uma biorrefinaria.

### **3.4.3. Tecnologia de adsorção de metais pesados**

Para superar as diversas desvantagens apresentadas pelos métodos anteriormente apresentados, muitas abordagens vêm sendo propostas, as quais visam desenvolver métodos mais baratos e eficientes para melhorar a qualidade do tratamento de efluentes

contaminados por metais pesados. A maioria destas abordagens é baseada na utilização de processos de adsorção, uma vez que a adsorção afeta diretamente o transporte, toxicidade e biodisponibilidade de metais pesados em meio aquoso, especialmente em concentrações traço, além de se tratar de um processo de baixo custo e fácil de operar (LEUNG et al., 2000).

A adsorção é um processo de transferência de massa que consiste no fenômeno de sorção de gases ou solutos por superfícies sólidas ou líquidas. A adsorção na superfície sólida ocorre quando as moléculas ou átomos na superfície do sólido têm energia superficial residual devido a forças desequilibradas. Quando algumas substâncias colidem com a superfície sólida, elas são atraídas por essas forças desequilibradas e permanecem retidas nesta superfície (HU; XU, 2020). De acordo com as diferentes forças de adsorção, o processo de adsorção pode ser dividido em duas categorias: adsorção física e adsorção química.

A adsorção física é produzida pela interação de forças intermoleculares (isto é, forças de *van der Waals*), tendo como exemplo a adsorção de gases em carvão ativado. A adsorção física é geralmente realizada a baixa temperatura, apresenta taxas rápidas de adsorção e não é seletiva. Como o efeito da atração intermolecular é fraco, a estrutura das moléculas de adsorvato dificilmente muda, a energia de adsorção é pequena e a substância adsorvida é facilmente separada novamente (BURAKOV et al., 2017). Por sua vez, a adsorção que ocorre devido à formação de ligações químicas é denominada adsorção química. O processo de adsorção química inclui a formação e destruição de ligações químicas. A absorção ou liberação do calor de adsorção é maior e a energia de ativação necessária também é maior. A adsorção física e a adsorção química não ocorrem isoladas, mas sim frequentemente de forma combinada. Na tecnologia de tratamento de efluentes, a maior parte da adsorção resultante é o resultado de vários tipos de processos de adsorção. No entanto, devido à influência de adsorventes, adsorvatos ou outros fatores, algum tipo de adsorção pode desempenhar um papel mais importante (KARIMI; TAVAKKOLI, 2019).

No contexto da aplicação de tecnologia de adsorção para a remoção de metais pesados de efluentes industriais, o carvão ativado vem sendo o adsorvente mais amplamente utilizado em todo o mundo. Apesar de seu uso prolífico, o carvão ativado permanece um material caro, pois quanto maior for a qualidade do carvão ativado, maior será o seu custo. O carvão ativado também requer agentes complexantes para melhorar

seu desempenho de remoção de matéria inorgânica. Portanto, esta situação deixa de ser atraente para ser amplamente utilizado em indústrias de pequena escala devido à ineficiência de custo (BABEL; KURNIAWAN, 2003). A busca por adsorventes alternativos para substituir o carvão ativado se intensificou nos últimos anos. Devido ao seu baixo custo e disponibilidade local, materiais naturais como quitosana, zeólita, argila ou certos produtos residuais de operações industriais como cinzas volantes, carvão e óxidos são classificados como adsorventes de baixo custo (ERTO et al., 2013).

Em adição, nos últimos anos, a biomassa microbiana surgiu como uma opção para o desenvolvimento de processos de tratamento econômicos e ecologicamente benéficos. Trata-se do uso de uma bioissorção, que utiliza como adsorvente microrganismos como bactérias, fungos, leveduras, algas, entre outros (WANG; CHEN, 2009). A bioissorção pode ser definida como a capacidade dos materiais biológicos de acumular metais pesados através de vias de adsorção mediadas metabolicamente ou por interações físico-químicas (FOUREST; ROUX, 2004).

#### **3.4.4. Bioissorção de metais pesados**

A bioissorção pode ser simplesmente definida como a remoção de substâncias da solução por material biológico. Essas substâncias podem ser orgânicas ou inorgânicas, e em formas solúveis ou insolúveis (AHEMAD; MALIK, 2011). A bioissorção ocorre através de interações físico-químicas passivas e independentes do metabolismo entre íons de metais pesados e superfícies microbianas (KUYUCAK; VOLESKY, 1988).

De forma geral, em comparação com os métodos convencionais de remoção de metais pesados, as potenciais vantagens do processo de bioissorção incluem o uso de biomateriais renováveis naturalmente abundantes que podem ser produzidos a baixo custo, capacidade de tratar grandes volumes de efluentes devido à rápida cinética, alta seletividade de remoção e recuperação de metais pesados específicos, capacidade de lidar com vários metais pesados e resíduos mistos, alta afinidade, reduzindo a concentração residual de metais abaixo de 1 ppb em muitos casos (ABBAS et al., 2014).

Adicionam-se a estas vantagens ainda a menor necessidade de reagentes caros adicionais que normalmente causam problemas de descarte e armazenamento, e a possibilidade de operação em uma ampla gama de condições físico-químicas, incluindo



temperatura, pH e presença de outros íons. O investimento de capital é considerado relativamente baixo, assim como o custo operacional. Por fim, a recuperação de metais pesados ligados à biomassa é em geral muito melhorada em comparação a outros processos de adsorção, e ocorre, dessa forma, uma redução significativa do volume de resíduos perigosos produzidos (ABBAS et al., 2014).

A biossorção depende de muitos fatores que podem afetar significativamente a qualidade de remoção de metais pesados alcançada. Alguns desses fatores estão relacionados à biomassa e metal, enquanto outros estão relacionados às condições operacionais. A natureza da biomassa pode ser considerada um dos fatores mais importantes, incluindo o seu preparo nas diferentes aplicações, como por exemplo, o uso de suspensão livre, células imobilizadas, biofilmes vivos, etc. Tratamentos físicos como fervura, secagem, autoclavagem e ruptura mecânica afetarão as propriedades de ligação, enquanto os tratamentos químicos, como tratamento alcalino ou ácido, muitas vezes irão melhorar a capacidade de biossorção (WANG; CHEN, 2006). A forma como a biomassa utilizada foi cultivada também pode influenciar a biossorção, devido a mudanças no tamanho da célula, composição da parede, formação de produtos extracelulares, entre outros fatores (ABDI; KAZEMI, 2015). A razão entre área superficial e volume é também importante tanto para células como agregados de partículas, uma vez que uma relação mais elevada significará um aumento da área superficial disponível para transferência de massa no processo de biossorção (GADD; WHITE, 1985).

No que se refere às condições de processo, em geral, é considerado que a eficiência de biossorção permanece inalterada na faixa de temperaturas de 20 – 35 °C, reduzindo com o aumento da temperatura além deste intervalo (WHITE; SAYER; GADD, 1997). O pH, no entanto, é um dos parâmetros mais importantes nos processos de biossorção. Tratam-se de processos semelhantes ao de troca iônica, isto é, a biomassa pode ser considerada como material de troca iônica natural, que contém principalmente grupos fracamente ácidos e básicos. Portanto, o pH da solução influencia a natureza dos locais de ligação da biomassa e a solubilidade do metal; afeta, assim, a química de solução dos metais, a atividade dos grupos funcionais na biomassa e a competição dos íons metálicos presentes em solução (FIORE; MOON; TREVORS, 1998). A biossorção de metais frequentemente tem se mostrado fortemente dependente do pH em quase todos os sistemas examinados, incluindo bactérias, cianobactérias, algas e fungos. A competição entre cátions e prótons por sítios de ligação significa que a biossorção de metais como

Cu, Cd, Ni, Co e Zn é frequentemente reduzida em baixos valores de pH (DENG; WANG, 2012). Geralmente, para a maioria dos tipos de biomassa, a adsorção de metal pesado diminui significativamente quando o pH das soluções de metal diminui de pH 6,0 para 2,5. Em pH inferior a 2, há remoção mínima ou insignificante de íons metálicos das soluções. A adsorção de metal aumenta quando o pH aumenta de 3,0 para 5,0. O valor ótimo de pH é muito importante para obter a maior sorção de metal, e essa capacidade diminuirá com o aumento do valor de pH (MODAK; NATARAJAN, 1995).

A concentração de biomassa utilizada é ainda uma varável importante, existindo em geral uma concentração ótima, além da qual é verificada uma queda na capacidade de sorção. A interação eletrostática entre as células desempenha um papel importante na adsorção de metais. Em concentrações mais baixas de biomassa, a adsorção específica de metais é aumentada porque um aumento na concentração de bioissorvente leva à interferência entre estas ligações, isto é, a alta concentração de biomassa restringe o acesso de íons metálicos aos locais de ligação (MALKOC; NUHOGLU, 2005). Por outro lado, a concentração inicial do íon metálico em solução é também uma importante variável, já que fornece a força motriz para superar toda a resistência de transferência de massa do metal entre as fases aquosa e sólida (ZOUBOULIS; MATIS; HANCOCK, 1997). O aumento da quantidade de metal adsorvido pela biomassa aumentará com o aumento da concentração inicial de metais, no entanto, a capacidade de sorção eventualmente alcançará saturação acima de certa concentração inicial de metal limite (MONTEIRO et al., 2012), através de um comportamento que é geralmente previsto por isotermas clássicas de adsorção (OMAR, 2002).

Por fim, pode-se mencionar a afinidade entre o metal e o bioissorvente como um importante fator que irá influenciar a bioissorção. Quando a afinidade intrínseca é baixa, podem-se utilizar pré-tratamentos físicos ou químicos que afetam a permeabilidade e as cargas superficiais da biomassa e criam sítios ativos acessíveis para a formação de ligações com o metal. A afinidade pode ser manipulada por pré-tratamento da biomassa com álcalis, detergentes ácidos e calor, o que pode aumentar a adsorção do metal (AHALYA; RAMACHANDRA; KANAMADI, 2003).

### 3.4.5. Aplicação de microalgas na bioadsorção de metais pesados

A utilização da biomassa inativa de microalgas como bioadsorventes para remoção de metais pesados de efluentes industriais vem ganhando atenção aumentada, apesar de ainda existir escassez de trabalhos abordando este tópico em particular na literatura. A biomassa seca das plantas aquáticas *Potamogeton lucens*, *Salvinia herzogii* e *Eichhornia crassipes* foram testadas para remover  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Cr^{3+}$  de efluentes industriais sintéticos (SCHNEIDER, 1995). Este estudo apontou que a remoção dos metais era controlada pelo equilíbrio do pH do meio. Isso foi corroborado quando *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus armatus* foram modificados com uma solução 1M de  $HNO_3$  a fim de determinar a influência do tratamento com ácido na remoção de  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Cd^{2+}$  de efluentes de galvanoplastia (ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK; RYGAL, 2017). O referido estudo mostrou que o processo de adsorção de metais pesados era altamente dependente do pH e que as diferenças entre a adsorção por biomassa não modificada e modificada por ácido eram relativamente pequenas, resultado que foi atribuído ao fato de que a biomassa de algas não modificada já apresentava alta capacidade de sorção. Uma revisão sobre o estado da arte dos processos de bioadsorção com algas marrons, vermelhas e verdes também destacou a importância de trabalhar em um pH ideal e avaliou o efeito dos pré-tratamentos na adsorção de metais pesados (ROMERA et al., 2008). As diferenças encontradas na literatura indicam que o pré-tratamento da biomassa geralmente melhora a adsorção do metal, mas o aumento geralmente não tem se mostrado significativo no caso da aplicação de algas. Portanto, a aplicação de pré-tratamentos da biomassa deve ser avaliada considerando o impacto econômico que pode representar para o processo como um todo.

Embora o uso da microalga *H. luteoviridis* como bioadsorvente esteja praticamente ausente na literatura até o momento, a microalga *C. sorokiniana* foi testada tanto como um adsorvente vivo quanto sem vida. Uma maior capacidade de adsorção das células mortas foi observada quando comparada ao uso de *C. sorokiniana* viva (LIANG et al., 2017), e remoções de metais variando de 53,1 % a 74,7% foram encontradas na adsorção de Pb. Além disso, o potencial de *C. sorokiniana* imobilizada por alginato para remover íons  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Cd^{2+}$  de soluções aquosas também foi investigado, e as maiores remoções de metais pesados alcançadas experimentalmente foram 97,1%, 50,9% e 64,6%, respectivamente (PETROVIČ; SIMONIČ, 2016). Em outros estudos, a adsorção de  $Ni^{2+}$  e  $Cr^{3+}$  de soluções aquosas pela biomassa de *Chlorella sorokiniana* imobilizada

em esponja (bucha) foi testada (AKHTAR et al., 2008; AKHTAR; IQBAL; IQBAL, 2004). Remoções de metais máximas de cerca de 75,0 % de  $\text{Ni}^{2+}$  e 50,0 %  $\text{Cr}^{3+}$ , e capacidades de sorção de 48,08  $\text{mg g}^{-1}$   $\text{Ni}^{2+}$  e 58,8  $\text{mg g}^{-1}$   $\text{Cr}^{3+}$  foram encontradas para a biomassa livre de *C. sorokiniana*, enquanto aumentos nas capacidades de sorção foram observados quando a biomassa foi imobilizada em bucha (25,3 % e 17,8 %, para  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$ , respectivamente). É importante ressaltar que uma diminuição significativa na adsorção de  $\text{Ni}^{2+}$  pela biomassa livre foi observada após a concentração do bioissorvente ser aumentada de 1,0 para 2,5  $\text{g L}^{-1}$ , um efeito que foi atribuído à ocorrência de agregação celular.

Diante dos resultados atualmente disponíveis na literatura, percebe-se que esta tecnologia simples de aplicação de microalgas inativas como bioissorventes na remoção de metais pesados de efluentes industriais se mostra promissora. No entanto, dada a baixa densidade de resultados experimentais na literatura e a necessidade de ampliar o conhecimento a respeito desta tecnologia, justifica-se a continuidade da promoção de estudos experimentais abordando novas espécies de microalgas e novas estratégias para o processo de adsorção. Com isso, buscou-se no presente trabalho também aplicar a biomassa *in natura* das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Heterochlorella luteoviridis* como bioissorventes na remoção de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , e  $\text{Zn}^{2+}$  de soluções monoelementares desses metais com concentrações semelhantes às aquelas em que são encontrados em efluentes provenientes de curtumes e indústrias de galvanoplastia. É importante ressaltar que, até o momento, este é o primeiro uso relatado da microalga *H. luteoviridis* como bioissorvente.

---

## **CAPÍTULO 4 – EXTRAÇÃO DE CLOROFILAS E CAROTENOIDES DAS MICROALGAS *CHLORELLA SOROKINIANA* E *HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS***

Este capítulo apresenta os estudos de extração realizados no presente trabalho: 1) avaliação da tecnologia de extração com solventes orgânicos na recuperação de pigmentos das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Heterochlorella luteoviridis*; 2) avaliação da tecnologia de extração com fluido sub e supercrítico na recuperação de clorofilas e carotenoides da microalga *Chlorella sorokiniana* utilizando misturas de CO<sub>2</sub> e etanol. Primeiramente, são apresentadas as metodologias empregadas para o cultivo das microalgas, para realização dos processos de extração avaliados, bem como para as análises dos compostos extraídos. Os resultados desses estudos são apresentados na forma de dois artigos, ambos já publicados em revistas indexadas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Ambientais (LAPA), e no Laboratórios de Operações Unitárias (LOPE), localizados na Escola Politécnica da PUCRS, e no Laboratório de Bioengenharia (BioEng), localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

### **4.1. Materiais e métodos**

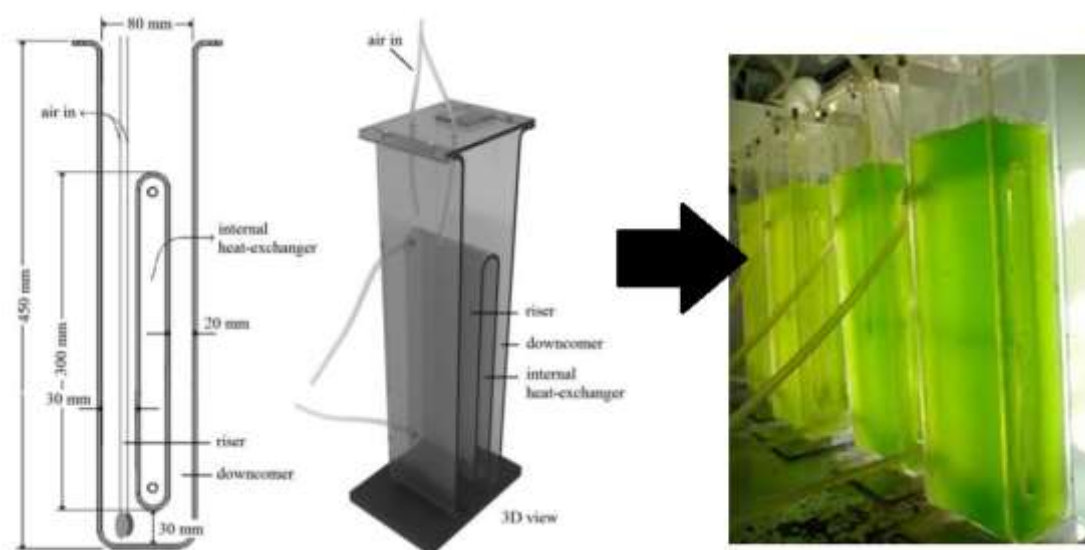
#### **4.1.1. Solventes orgânicos**

Após análise das sobreposições entre as legislações e a faixa de aplicação dos solventes orgânicos, etanol, acetona, acetato de etila e hexano foram selecionados para este estudo, visando maior cobertura de mercado para os extratos potencialmente produzidos por extração sólido-líquido. Para todos os experimentos de extração e procedimentos analíticos, foram usados solventes com pureza acima de 96 % (Merck®, Alemanha).

#### 4.1.2. Cultivo de biomassa

*H. luteoviridis* foi cultivada em fotobiorreatores de placas planas do tipo *airlift* (**Figura 5**) com aeração realizada pela aspersão por pedra difusora pelo fundo do fotobiorreator com vazão de  $1 \text{ L min}^{-1}$  de ar comprimido filtrado com membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  (Midistart 2000, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha), seguindo uma metodologia adaptada (JAESCHKE et al., 2016). O inóculo foi cultivado em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio de cultivo sob agitação de 120 rpm e incidência de luz (Tachibra, Brasil, 13 W, luz branca) durante 7 dias. Após inoculação, as vazões de ar foram controladas utilizando rotômetros (Dwyer Instruments, EUA) e os cultivos foram iluminados artificialmente de forma homogênea e ininterrupta utilizando um painel composto por 12 lâmpadas eletrônicas. Os inóculos e cultivos em fotobiorreatores foram realizados utilizando meio de cultivo f1/2 modificado com concentração de  $\text{NaNO}_3$  adaptada para  $600 \text{ mg L}^{-1}$ . Os nutrientes foram mantidos através da adição diária ao fotobiorreator de uma solução  $1 \text{ mL L}^{-1}$  de fosfato ( $5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e  $1 \text{ mL L}^{-1}$  de uma solução de metais-traço ( $9,8 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $22 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $180 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $6,3 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $4,36 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  e  $3,15 \text{ g}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Os frascos contendo meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

**Figura 5** - Fotobiorreatores do tipo *airlift* com trocador de calor interno desenvolvidos por Kochem et al. (2014).



Fonte: Adaptado de KOCHER et al. (2014)

A linhagem da microalga foi doada pela Universidade Federal Fluminense (Niterói, Brasil). O cultivo foi realizado em regime semicontínuo, de forma que, após os 7 dias iniciais de cultivo, metade do volume do fotobiorreator foi removido a cada 48 horas e substituído por meio fresco. Esses ciclos intermitentes de alimentação foram mantidos por mais 14 dias e então novos cultivos foram iniciados. Cada ciclo (isto é, volume removido do fotobiorreator) foi centrifugado a 10.000 g a 10 ° C durante 10 min (Hitachi, CR 21GIII). A biomassa foi então liofilizada (LIOTOP, Modelo L101, Brasil) e mantida a -18 ° C no escuro.

Já no caso da biomassa de *C. sorokiniana* utilizada neste trabalho, amostras em pó (**Figura 6**) foram adquiridas de uma empresa especializada no cultivo de microalgas (Taiwan Chlorella Manufacturing CO Ltd, Taiwan) por meio de um representante no Brasil (Paversul, Flores da Cunha-RS). Trata-se de uma linhagem de microalgas de água doce de alto rendimento, cultivada em lagoas abertas. Essa biomassa foi submetida a uma técnica patenteada de ruptura celular por alta pressão e a homogeneização antes de sua comercialização.

**Figura 6** - Apresentação da biomassa em pó da microalga *C. sorokiniana* produzida pela empresa Chlorella Manufacturing CO Ltd (Taiwan).



#### 4.1.3. Experimentos de seleção de solventes

Os experimentos de extração sólido-líquido foram realizados empregando três relações solvente/biomassa: 1000:1, 200:1 e 100:1 (mililitros de solvente:gramas de

biomassa). A biomassa microalgal foi pesada em balança analítica (BEL Engineering®, Itália) e transferida para frascos agitados de 250 mL contendo 50 mL de solvente. O contato entre a biomassa e o solvente foi mantido por agitação a 150 rpm em temperatura controlada ( $25 \pm 2$  ° C) por 16 h em agitador orbital (Novatecnica, NT 155, Brasil). Após a conclusão do processo de extração sólido-líquido, o conteúdo foi centrifugado a 10.000 g (FANEM, 206-R, Brasil) por 10 min, e o extrato sobrenadante foi separado para análise espectrofotométrica. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

#### **4.1.4. Experimentos de extração com fluido sub e supercrítico**

Os experimentos de extração com fluido sub e supercrítico foram realizados de acordo com um delineamento experimental descrito a seguir.

##### **4.1.4.1. Delineamento experimental e análise de resultados**

Um planejamento composto central de três fatores incluindo experimentos em triplicata no ponto central foi empregado para avaliar as melhores condições experimentais para a extração de pigmentos (**Tabela 4.1**), com temperaturas variando de 40 a 60 ° C, pressões variando de 100 a 300 bar e composições de etanol variando de 0 a 10 % (v/v). As temperaturas foram selecionadas dentro da faixa mencionada devido a indicações na literatura de que a alta degradação térmica dos carotenoides começa a partir de 60 ° C (PASQUET et al., 2011b); a faixa de pressão testada corresponde aos limites operacionais do aparato experimental utilizado neste trabalho; e a faixa selecionada para adição de cossolvente baseou-se em dados da literatura específica sobre a extração de carotenoides e clorofilas de microalgas (GONG; BASSI, 2016a; HALIM et al., 2010; MEZZOMO; FERREIRA, 2016). É importante ressaltar que condições sub e supercríticas foram contempladas neste estudo, pois há evidências indicando que ambos os estados renderam uma boa recuperação de pigmento de microalgas. Os *loci* de pontos críticos para misturas binárias de CO<sub>2</sub>+etanol foram consultados na literatura para indicar a condição correspondente a cada ponto no planejamento experimental (YEO et al., 2000). O tempo de extração máximo foi fixado em 3 h após experimentos preliminares, sendo cada corrida experimental finalizada em um tempo inferior a este, após verificação de que a continuidade do processo não resultaria em maior recuperação de extrato.



**Tabela 4.1:** Planejamento composto central utilizado em experimentos de extração sub e supercrítica neste trabalho.

Corrida	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Etanol (% v/v)
1	-1	-1	-1	44,2	142,3	2,1
2	1	-1	-1	55,8	142,3	2,1
3	-1	1	-1	44,2	257,7	2,1
4	1	1	-1	55,8	257,7	2,1
5	-1	-1	1	44,2	142,3	7,9
6	1	-1	1	55,8	142,3	7,9
7	-1	1	1	44,2	257,7	7,9
8	1	1	1	55,8	257,7	7,9
9	-1,73	0	0	40,0	200,0	5,0
10	1,73	0	0	60,0	200,0	5,0
11	0	-1,73	0	50,0	100,0	5,0
12	0	1,73	0	50,0	300,0	5,0
13	0	0	-1,73	50,0	200,0	0,0
14	0	0	1,73	50,0	200,0	10,0
15	0	0	0	50,0	200,0	5,0
16	0	0	0	50,0	200,0	5,0
17	0	0	0	50,0	200,0	5,0

As corridas experimentais foram realizadas em uma ordem aleatória e a análise dos dados dos resultados experimentais, incluindo ajuste do modelo e análise de variância (ANOVA), foi realizada usando Statistica 13 (TIBCO Software Inc., 2018), a um nível de significância de 0,05. Utilizou-se inicialmente um modelo considerando os efeitos linear, quadrático e bidirecional das variáveis estudadas e posteriormente reduzido removendo-se incrementalmente os efeitos menos significativos, de forma a se obter uma equação ajustada simples com alto coeficiente de regressão, composta por efeitos estatisticamente significativos. O modelo completo pode ser representado genericamente pela Equação 4.1:

$$R = \alpha + \beta_1 T + \gamma_1 T^2 + \beta_2 p + \gamma_2 p^2 + \beta_3 E + \gamma_3 E^2 + \delta_1 TP + \delta_2 TE + \delta_3 PE \quad (4.1)$$

Onde  $R$  = resposta (variável dependente);

$T$  = Temperatura (°C);

$p$  = Pressão (bar);

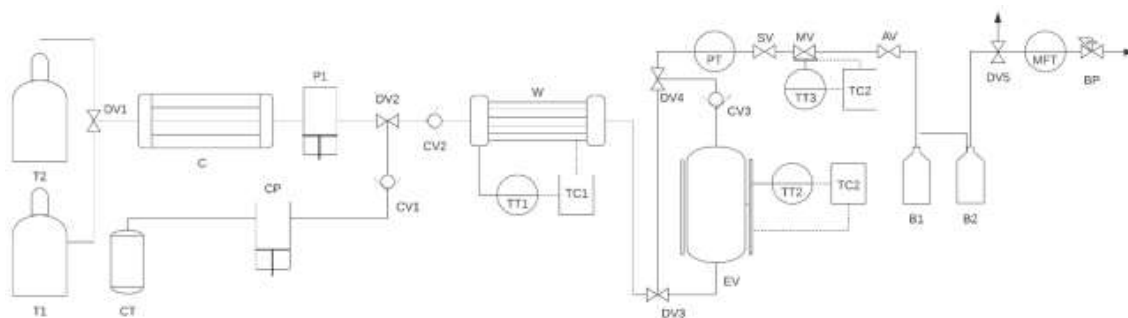
$E$  = porcentagem volumétrica de etanol na mistura solvente (% v/v);

$\alpha, \beta_i, \gamma_i, \delta_i$  = parâmetros da equação.

#### 4.1.4.2. Aparato experimental

O solvente usado neste trabalho foi dióxido de carbono com 99,9% de pureza (Air Products, EUA) com vazão de 1 kg h<sup>-1</sup>; e etanol (pureza de 99,5%, Merck, Alemanha) foi usado como cossolvente. A mistura supercrítica foi direcionada através de um vaso de extração de 100 mL completamente preenchido com biomassa de microalgas (cerca de 55,0 g). As condições de extração variaram de acordo com a metodologia de superfície de resposta. A **Figura 7** mostra um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para extrações neste trabalho. Ele incluiu uma bomba de deslocamento de líquido positivo (Thar P-200, EUA) para solvente, uma bomba para cossolvente (ISCO 260D), um recipiente de extração de alta pressão de 100 mL e um frasco de separação. As vazões de CO<sub>2</sub> foram medidas por um medidor de vazão mássica, e válvulas micrométricas foram usadas para controle de fluxo em todo o aparelho. A pressão no extrator foi monitorada com sistema transdutor digital (Novus 8800021600, Novus Produtos Eletrônicos, Brasil) com precisão de ± 1,0 bar. A temperatura do vaso de extração foi mantida constante pelo controle automático de uma camisa de aquecimento; o sistema de controle foi conectado a sensores de temperatura PT-100 com precisão de 0,5 °C. A tubulação em todas as seções de extração e separação foi mantida em temperatura constante pelo uso de fitas de aquecimento. Isso evitou o congelamento dos solventes e a precipitação do soluto sólido após a despressurização, permitindo uma operação estável. As amostras foram coletadas continuamente e os frascos de separação substituídos sempre que preenchidos com os extratos.

**Figura 7** - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado neste trabalho.



(*T*) cilindro de CO<sub>2</sub>; (*CT*) tanque de cossolvente; (*DV*) Válvula direcional; (*C*) condensador; (*P*) Bomba de CO<sub>2</sub>; (*CP*) Bomba de cossolvente; (*CV*) Válvula de checagem; (*W*) Pré-aquecedor; (*TT*) Transmissor de temperatura; (*TC*) Controlador de temperatura; (*EV*) Vaso de extração; (*PT*) Transmissor de temperatura; (*SV*) Válvula de “shut-off”; (*MV*) Válvula micrométrica; (*AV*) Válvula de alívio; (*B*) Vaso de separação; (*MFT*) Transmissor de vazão mássica; (*BP*) Regulador de contrapressão.

Fonte: O Autor.

#### 4.1.5. Extração exaustiva

A determinação do teor total de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais na biomassa utilizada nos experimentos foi realizada em duplicata por extração exaustiva realizada com metodologia adaptada (MANDELLI et al., 2012a). A biomassa foi macerada com grau e pistilo e centrifugada a 10.000 g, 10 ° C por 10 min (Hitachi, CR 21GIII) repetidamente usando acetato de etila e metanol alternadamente até que a biomassa perdesse completamente sua pigmentação.

#### 4.1.6. Análise de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais

Os extratos obtidos nos experimentos de extração em batelada e na metodologia de extração exaustiva foram quantitativamente transferidos e concentrados em evaporador rotativo a 30 ° C (Fisatom, Modelo 450-5, Brasil), e submetidos a um procedimento analítico para a determinação de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais por espectrofotometria. Para evitar a degradação dos carotenoides durante as análises, a manipulação da biomassa e dos extratos foi realizada sob luz fraca e temperatura ambiente controlada (25 ± 2 ° C).

As análises para determinar as concentrações de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais foram realizadas através da determinação da absorvância das amostras nos comprimentos de onda de 470 nm, 649 nm e 664 nm, respectivamente, (GEHAKA, UV-330G, Brasil), de acordo com metodologia espectrofotométrica adaptada (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001), e as concentrações foram calculadas por equações ajustadas. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

#### **4.1.7. Determinação do perfil de carotenoides**

Os extratos obtidos na metodologia de extração exaustiva para caracterização da biomassa, bem como uma duplicata dos extratos em batelada para cada solvente (relação solvente/biomassa de 200:1) foram submetidos à análise do perfil de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia descrita por Diprat et al. (2017). O extrato concentrado foi transferido para uma mistura de éter de petróleo:éter etílico (1: 1 volume) e saponificado com solução metanólica de KOH por 16 h em temperatura ambiente ( $22 \pm 3$  °C). O álcali foi removido por lavagem com água destilada até pH neutro, e o solvente foi removido por evaporação rotativa (30 °C). As amostras foram então secadas pela aspensão de gás nitrogênio à temperatura ambiente e foram armazenadas congeladas a -18 °C. A análise dos carotenoides foi realizada por meio de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, Kyoto, Japão) com um detector de arranjo de diodos (DAD) e uma coluna YMC C30 (5 µm, 250 mm × 4,6 mm), usando um sistema com gradiente linear de metanol/MTBE como fase móvel (0,9 mL min<sup>-1</sup>, 29 °C). Os espectros foram medidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 450 nm. Toda a manipulação de amostras foi realizada na ausência de luz.

#### **4.1.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A superfície da biomassa microalgal empregada neste trabalho foi estudada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Central e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS (Porto Alegre, Brasil). As células liofilizadas foram colocadas em um suporte de carbono de camada dupla condutiva, revestido com uma camada de ouro (Oerlikon Balzers, modelo SCD050, Suíça), e examinadas por

microscopia eletrônica de varredura usando um microscópio Philips-FEI Quanta 200 SEM-FEG equipado com um canhão de emissão de campo fornecendo uma corrente de feixe de 20 kV.

#### 4.1.9. Cálculo da eficiência de extração e análise estatística dos dados

Para calcular rendimentos de extração para diferentes compostos, a Equação 4.2 foi usada:

$$\text{Eficiência de extração (\%)} = \frac{m_{ext}}{m_0} \times 100 \quad (4.2)$$

onde

$m_{ext}$  = massa do composto recuperado no extrato por grama de biomassa seca (mg g<sup>-1</sup>)

$m_0$  = composição mássica do composto na biomassa seca (mg g<sup>-1</sup>)

O efeito do uso de diferentes solventes e diferentes razões de solvente para biomassa nas eficiências de extração de cada pigmento foi avaliado por ANOVA individualmente para cada biomassa microalgal testada a um nível de significância de 0,05. Além disso, para determinar o melhor pareamento de solvente e condição de extração para cada composto, as eficiências de extração foram submetidas ao teste de Tukey, apresentado pelo uso de letras que identificam resultados estatisticamente semelhantes. Todas as análises estatísticas dos dados foram realizadas usando Statistica 10 (StatSoft Inc.).

#### 4.1.10. Geração de perfis Sigma e cálculos de CADIs

O *software* JCOSMO foi usado para visualizar superfícies de distribuição de carga, gerar perfis sigma e calcular CADIs de todas as moléculas de interesse. Este programa consiste em uma implementação *open-source* do modelo COSMO-SAC na linguagem de programação Java (GERBER; SOARES, 2010). Antes de todos os procedimentos, a geometria das moléculas analisadas foi otimizada pelo método de minimização de energia de descida mais íngreme empregando o *software* Avogadro, um

construtor molecular de código aberto e ferramenta de visualização (HANWELL et al., 2012). COSMO-SAC-HB2 foi o modelo selecionado, e o pacote de química quântica GAMESS foi empregado com o método semi-empírico TVZP ("*Triple Zeta Valence plus Polarization*") para calcular as estruturas eletrônicas de moléculas e calcular CADIs para todos os solventes e solutos pareados.

#### **4.2.Artigo 1**

Nesta seção é apresentado o primeiro artigo gerado neste trabalho de doutorado, publicado no periódico internacional *Chemical Engineering & Technology* (<https://doi.org/10.1002/ceat.202100008>). Em concordância com as regras de formatação deste periódico, o artigo foi segmentado entre o manuscrito principal, contendo o desenvolvimento e discussão do trabalho, e um documento de informações suplementares, contendo a descrição estendida da metodologia, a apresentação dos resultados experimentais e a discussão mais aprofundada de alguns tópicos entre os resultados encontrados no trabalho.

## Extraction of chlorophylls and carotenoids from microalgae: COSMO-SAC assisted solvent screening

### Abstract

Efficient pigment extraction is a key-factor influencing the economic feasibility of microalgal biorefineries. Ethanol, acetone, ethyl acetate and hexane were evaluated for the batch extraction of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids from *Chlorella sorokiniana* and *Heterochlorella luteoviridis*. Solvent to biomass ratios did not affect extraction results in most cases. Ethanol showed the highest efficiency in the recovery of chlorophylls, presenting high extraction yields. Acetone figured among the most efficient solvents to extract violaxanthin, lutein, zeaxanthin and carotene from both microalgae, proving to be generally suitable to this application. COSMO-SAC corroborated experimental results, proving to be an important tool in the screening of solvents for extraction processes.

**Keywords:** Carotenoids; Chlorophyll; COSMO-SAC; Microalgae;

### 4.2.1. Introduction

Microalgae are fast-growing photosynthetic single-celled organisms that convert sunlight, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and a low amount of nutrients into biomass (RAMMUNI et al., 2018; SHAH et al., 2016). In the industrial sector, microalgae find application because they are able to use CO<sub>2</sub> as the sole carbon source, acting in its capture and potentially producing high value-added metabolites, and they have been used in human food and animal feed for their nutritional value. In addition, microalgal biomass contains a large number of compounds that may be potentially applied in the medical and pharmaceutical industries, such as chlorophyll and carotenoids (DI LENA et al., 2019).

Due to an inherently high chemical complexity, it is impracticable to have only one extraction method for the wide range of compounds generally present in microalgae. Several bioproducts, such as microalgae-produced pigments, are retained in organelles within cells or in the cytoplasm. The cell wall surrounding the cell acts as a semipermeable barrier making it difficult to extract these compounds (GONG; BASSI, 2016b).

Nevertheless, the use of organic solvents is a simple, easy and accessible option for extraction, except when these are very costly or when large quantities are required (RAMMUNI et al., 2018). Compared to other methods, solvent extraction often achieves sufficient efficiencies and extract purities to make it scalable to large industrial processes (CERÓN-GARCÍA et al., 2018). Also, the broad know-how on the construction and operation of multistage equipment for solid-liquid contact renders its application to recover microalgal compounds more attractive compared to more expensive emerging technologies. However, local legislations restrict the use of solvents in food and pharmaceutical applications. As an example, European legislation allows among liquids only ethanol, acetone and ethyl acetate (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2009). In turn, in countries such as Brazil and the USA, hexane is also listed and has been widely employed in industrial extraction processes (POTRICH et al., 2020).

The addition of a biological macromolecule to a solvent gives rise to thermodynamic non-ideality of the solution. In the case of solvent extraction of microalgal compounds, the required proportions between the solvent and the solute renders the infinite dilution activity coefficient

(IDAC) an important indicator, since selectivity and capacity at infinite dilution, which are functions of IDAC values, quantify the applicability of solvents and may be used for the purpose of screening (ANANTHARAJ; BANERJEE, 2010). Among recently developed models, COSMO-based activity coefficient models have become an interesting alternative to the prediction of the behavior of substances in a mixture and have been employed with the aforementioned purpose (ANANTHARAJ; BANERJEE, 2010; BENVENUTTI et al., 2020; JACOTET-NAVARRO et al., 2018; MOITY et al., 2012; WOJECCHOWSKI et al., 2020; YARA-VARÓN et al., 2016). They are quantum-chemistry-based predictive equilibrium models in which the activity coefficient is calculated from the solvation-free energy of the molecules in a solution (GERBER; SOARES, 2013). A variant of this group is COSMO-SAC (Conductor-like Screening Model for Real Solvent Segment Activity), a model that requires the sigma profile, the van der Waals surface area and the volume of each molecule of the mixture to calculate the activity coefficient (LIN; SANDLER, 2002). It has had several applications in complex systems, such as the prediction behavior of polymeric solutions and ionic liquids (FERRARINI et al., 2018b).

Considering the scarce number of experimental studies focusing on the evaluation of commonly used organic solvents permitted by legislation for the extraction of microalgal compounds, on this work, the aforementioned assessment was carried out aiming at the extraction of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids from *Heterochlorella luteoviridis* and *Chlorella sorokiniana*. The solvents allowed by European legislation (namely, ethanol, acetone and ethyl acetate), as well as the commonly employed hexane were tested in a batch solid-liquid extraction process. The carotenoid profiles of the extracts were analyzed and the applicability of simple solvent extraction technology was evaluated with the objective of indicating the best solvents for the recovery of each compound. This wide experimental approach was, to date, absent in literature. Finally, aiming to corroborate the experimental results achieved in this work, COSMO-SAC was employed for the qualitative comparison of the sigma profiles of key compounds and solvents, and the prediction of IDACs.

## **4.2.2. Materials and methods**

### **4.2.2.1. Organic solvents**

After analysis of the overlaps between legislations and the range of application of organic solvents, ethanol, acetone, ethyl acetate and hexane were selected for this study, aiming at larger market coverage for the extracts produced by solid-liquid extraction. For all extraction experiments and analytical procedures, solvents with purity above 96 % were used (Merck®, Germany).

### **4.2.2.2. Biomass cultivation**

*H. luteoviridis* was cultivated in flat-plate photobioreactors following an adapted methodology (JAESCHKE et al., 2016). The microalgal strain was donated by the Fluminense Federal University (Niterói, Brazil). Cultivation was performed on a semi-continuous regimen, so that,



after the initial 7 days of cultivation, half of the photobioreactor volume was replaced with fresh medium every 48 hours. These intermittent feeding cycles were maintained for 14 days and then new cultivations were initiated. Each cycle, i.e., volume removed from the photobioreactor, was centrifuged at 10,000 *g* at 10 °C for 10 min (Hitachi, CR 21GIII). Biomass was then lyophilized (LIOTOP, Model L101, Brazil) and stored at -18 °C in the dark.

As for *C. sorokiniana*, lyophilized biomass was purchased in powdered form from a company specialized in microalgae cultivation (Taiwan Chlorella Manufacturing CO Ltd, Taiwan) through a representative in Brazil (Paversul, Flores da Cunha-RS). It is a high-yielding freshwater microalgal strain grown in open ponds. The biomass was submitted to a patented high-pressure cell-disruption and homogenization technique prior to its commercialization.

#### **4.2.2.3.Solvent selection experiments**

The solid-liquid extraction experiments were performed employing three solvent to biomass ratios: 1000:1, 200:1 and 100:1 (milliliters of solvent:grams of biomass). Microalgal biomass was weighed in an analytical scale (BEL Engineering®, Italy) and transferred to 250 mL shake flasks containing 50 mL of solvent. Contact was maintained by agitation at 150 rpm at controlled temperature (25 ± 2 °C) for 16 h on orbital shaker (Nova Técnica, NT 155, Brazil).

After the extraction process, the content was centrifuged at 10,000 *g* (FANEM, 206-R, Brazil) for 10 min, and the supernatant was separated for spectrophotometric analysis. All experiments were performed in duplicates.

#### **4.2.2.4.Exhaustive extraction**

The determination of the total content of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids in the biomass used in the experiments was carried out in duplicates by exhaustive extraction performed using an adapted methodology (MANDELLI et al., 2012b). The biomass was macerated with solvent using pistil grade and centrifuged at 10,000 *g*, 10 °C for 10 min (Hitachi, CR 21GIII) repeatedly using ethyl acetate and methanol alternately until the biomass completely lost its pigmentation.

#### **4.2.2.5.Analysis of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids**

The extracts obtained in batch extraction experiments and in the exhaustive extraction methodology were analyzed to determine the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids by spectrophotometry (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

#### 4.2.2.6. Determination of carotenoid profile

Extracts obtained in the exhaustive extraction methodology for characterization of biomass as well as one duplicate of batch extracts for each solvent (200:1 ratio) were submitted to analysis of the carotenoid profile by adapting a high performance liquid chromatography (HPLC) methodology previously described in literature (DIPRAT et al., 2017a).

#### 4.2.2.7. Scanning electron microscopy

The surface of the microalgal biomass employed in this work was studied by scanning electron microscopy (SEM) at the Central Microscopy and Microanalysis Laboratory (LabCEMM) of PUCRS (Porto Alegre, Brazil). Freeze-dried cells were placed on a conductive double layer carbon support, coated with a layer of gold (Oerlikon Balzers, model SCD050, Switzerland), and examined using a Philips-FEI Quanta 200 SEM-FEG microscope equipped with a canon delivering a 20 kV beam current.

#### 4.2.2.8. Extraction yield calculations and statistical analysis of data

To calculate compound yields in batch extractions, equation (1) was used:

$$yield (\%) = \frac{m_{ext}}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

with,

$m_{ext}$  = mass of compound recovered in extract per gram of dry biomass ( $\text{mg g}^{-1}$ )

$m_0$  = mass of the compound in the dry biomass recovered by exhaustive extraction ( $\text{mg g}^{-1}$ )

Statistical analysis of data was performed by applying ANOVA and Tukey's test using Statistica 10 (StatSoft Inc.).

#### 4.2.2.9. Sigma-profile generation and IDAC calculations

In this work, COSMO-SAC was employed for the qualitative assessment of each solvent's performance in the solvation of key-carotenoids by the prediction of IDACs. COSMO parametrizations of the carotenoids from this work have been incorporated to LVPP's sigma-profile and COSMO parametrizations database and can be freely consulted at <https://github.com/lvpp/sigma/> (SOARES et al., 2020). A detailed explanation of the procedures applied in this methodology is found within **Supporting Information**.

### 4.2.3. Results and discussion

#### 4.2.3.1. Biomass characterization

Both the *C. sorokiniana* and the *H. luteoviridis* biomasses used in this work presented chlorophyll a content higher than chlorophyll b (Tab. 1). This result is explained by the fact that chlorophyll a is the principal pigment in microalgae, whereas chlorophyll b is an accessory pigment that collects energy, which is then passed on to chlorophyll a (NOR et al., 2017). The chlorophyll a and total carotenoid contents in *C. sorokiniana* were slightly higher than those found in *H. luteoviridis*, while the chlorophyll b content was higher in the latter.

**Table 1.** Characterization of *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* biomasses used in this work.

	<i>C. sorokiniana</i>	<i>H. luteoviridis</i>
Chlorophyll a (mg g <sup>-1</sup> )	12.66 ± 0.05	10.86 ± 0.06
Chlorophyll b (mg g <sup>-1</sup> )	4.81 ± 0.23	6.66 ± 0.31
Total carotenoids (mg g <sup>-1</sup> )	3.82 ± 0.06	2.71 ± 0.04

The carotenoid identification (Tab. S1 in Supporting information) showed that the major carotenoids in *C. sorokiniana* were all-*trans*-lutein and all-*trans*-β-carotene (representing 60.0 % and 8.0 %, in mass, of the total carotenoid content). Carotenoid contents found in the commercial *C. sorokiniana* sample used in this work are similar to those previously reported by other authors (CORDERO et al., 2011; DIPRAT et al., 2020a), which highlighted the concentration of lutein and β-carotene in this particular strain. As for *H. luteoviridis*, all-*trans*-lutein, all-*trans*-β-carotene and all-*trans*-zeaxanthin were the major carotenoids (representing 28.3 %, 13.9 % and 13.6 % weight of the total carotenoid content, respectively). These results are consistent with those previously found in literature (DIPRAT et al., 2017a).

#### 4.2.3.2. Solvent selection

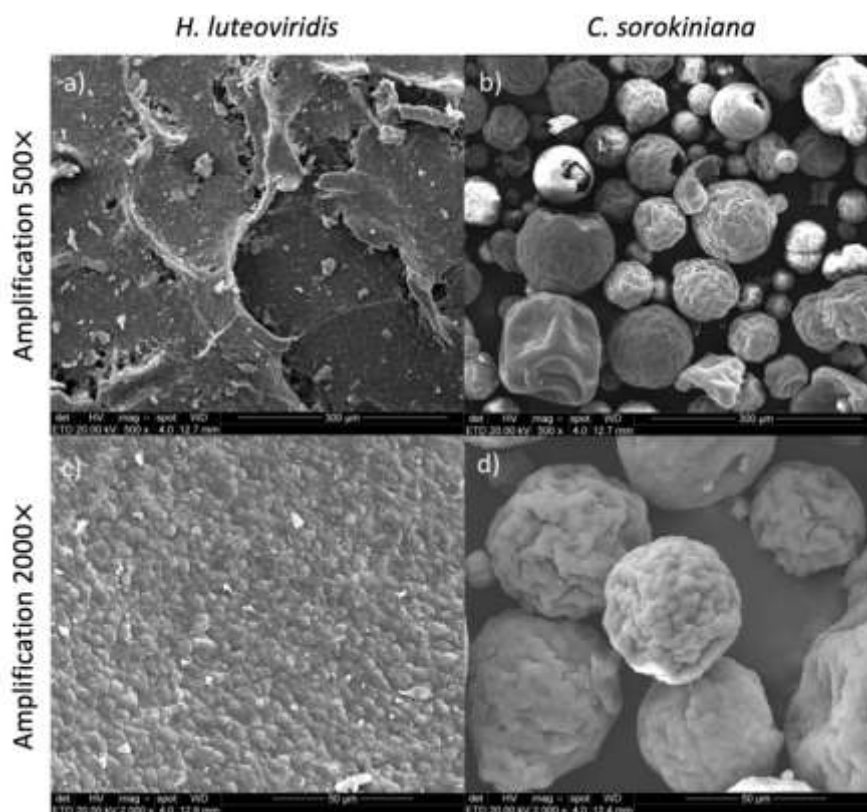
Batch extractions using *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* dry biomass employing ethanol, hexane, acetone and ethyl acetate were performed with the purpose of solvent selection. The yields of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids (Tab. S2 and S3 in Supporting information) indicated that chlorophyll can be more easily extracted from microalgal biomass by solvent extraction when compared to carotenoids. Ethanol was able to extract 55.9 % chlorophyll a and 96.1 % chlorophyll b from *C. sorokiniana*, and 47.6 % chlorophyll a and 38.8 % chlorophyll b from *H. luteoviridis* in the best conditions. Overall, batch extraction presented low total carotenoid yields. Acetone and ethyl acetate showed to be the best solvents for this purpose, presenting 15.4 % and 16.2 % yields for *C. sorokiniana*, and 14.8 % and 13.6 % for *H. luteoviridis*, respectively. These experimental results represent the chemical equilibrium achieved after single contact with solvents, an extraction condition that is rarely employed industrially. The quality of these results should be examined from the standpoint of assessing the potential for countercurrent multistage solvent extraction to exhaust substrate.

In this context, the observed extraction yields are considered favorable to a large-scale application.

The choice of solvent proved to be significant ( $p < 0.05$ ) for both microalgae. Ethanol was the most polar molecule among the tested solvents; therefore, its particularly good performance in the extraction of chlorophylls can be explained by the higher polarity of these solutes compared to carotenoids. In turn, acetone and ethyl acetate were the best solvents in the extraction of total carotenoids from *C. sorokiniana*, and together with ethanol were the best in the extraction of total carotenoids from *H. luteoviridis*. It should be noted that hexane presented substantially lower extraction yields for both microalgae, although it is largely considered to be suited for carotenoid extraction. Hexane presents lower affinity with lutein, zeaxanthin, and violaxanthin, which contain more polar groups, as opposed to with the essentially non polar carotenes. The better performance of the aforementioned solvents and the poor performance of hexane are corroborated by the carotene content in the biomass, which was 18.1 % in *C. sorokiniana* and 42.1 % in *H. luteoviridis*.

With few exceptions, the solvent to biomass ratio did not influence extraction yields significantly. This determined that proportionally different amounts of solvent to biomass were equally able to recover the tested compounds, only changing their final concentration in the extract. It is concluded that the proportions tested did not represent a limitation to the mass transfer process in most cases, presenting as similar conditions due to the high concentration gradient initially established.

Noticeably, higher yields were found for *C. sorokiniana* compared to *H. luteoviridis*. This difference is attributed to the application of a pre-treatment consisting of cell wall disruption and homogenization to the *C. sorokiniana* biomass used in this work, as reported by the manufacturer. On contrary, *H. luteoviridis* biomass obtained by cultivation did not undergo any equivalent treatment. With the purpose of assessing the effects of cell structure, the surface of the microalgal biomass was inspected using SEM at various magnifications (selected images shown in Figure 1). *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* formed differently structured clusters while presenting similar particle sizes (*circa* 5  $\mu\text{m}$ ). Average cell size had been previously reported by studies describing the morphology of these microalga species (KIM et al., 2017; NOR et al., 2017). *C. sorokiniana* formed well-defined spherical clusters with rough surfaces, ranging 50-200  $\mu\text{m}$  in average. These are believed to allow for solvent contact in their interior as they either presented openings (Figure 1b) or were inherently open structures (Figure S1 in Supporting Information). In contrast, *H. luteoviridis* forms clusters presenting as wide plaques, suggesting stronger aggregation. Microalgae assume the form of polymicrobial aggregates at the interface due to excretions known as extracellular polymeric substances (EPS), composed of a complex mixture of biopolymers. These EPS significantly alter the physicochemical properties of algae aggregates, such as surface charge, viscosity, flocculation, structure, and settling properties (XIAO; ZHENG, 2016). Overall, the observed structures indicated that the total surface area available for mass transfer was larger for *C. sorokiniana*. This observation may corroborate the higher chlorophyll and total carotenoids yields found in this work for *C. sorokiniana* for all tested solvents.



**Figure 1.** SEM images of the freeze-dried biomass employed in this work. Microalgal sample and amplifications: (a) *H. luteoviridis*, 500 $\times$ , (b) *C. sorokiniana*, 500 $\times$ , (c) *H. luteoviridis*, 2,000 $\times$ , (d) *C. sorokiniana*, 2,000 $\times$ .

#### 4.2.3.3. Carotenoid profile of extracts

In order to assess the performance of the tested solvents in the extraction of the different carotenoids, the extracts obtained in batch experiments (200:1 ratio) were identified and quantified by HPLC (Tab. S4 and S5 in Supporting information). All solvents were capable of extracting carotenoids, although with different yields. The extracts from *C. sorokiniana* presented lutein as the main carotenoid. In turn, all extracts from *H. luteoviridis* presented a mixture of xanthophylls and carotenes. These results are consistent with the compositions of both microalgal biomasses, since the main carotenoids in extracts were respectively the most available solutes found in substrates for extraction. Comparing the carotenoid profiles of extracts (Figure S2 in Supporting Information), a variable distribution was found. Mostly, the solvents recovered xanthophylls at different amounts, but at similar proportions, indicating that a solvent affinity to either lutein, violaxanthin or zeaxanthin showed great similarity, as these molecules present small differences in structure. In contrast, the carotene to xanthophyll ratio varied significantly. Contact with hexane (a nonpolar solvent) coherently produced extracts containing non-polar carotenes as the major pigments.

Again, total carotenoid yields obtained by chromatography were compatible with those found by the spectrophotometric methodology previously employed. They were 8.1 %, 18.6 %, 14.2 % and 7.9 %, when ethanol, acetone, ethyl acetate and hexane were used with *C. sorokiniana*, respectively. For *H. luteoviridis*, total carotenoid yields were 12.8 %, 16.5 %, 14.2 % and 7.9 %, when ethanol, acetone, ethyl acetate and hexane were used, respectively.

12.6 % and 5.1 %, respectively. Acetone proved to produce the highest total carotenoid yields for both microalgae. While mostly *trans* isomers were recovered, a distribution of isomers was found for all analyzed compounds. This isomer distribution may hinder potential food and pharmaceutical applications of extracts due to the specificity of an organism's capacity to absorb and metabolize different structural arrangements of the same compound. A previous study reviewed *in-vivo* structural alterations of the all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* isomers of beta-carotene (COSTA; ORTEGA-FLORES; PENTEADO, 2002). The preferential absorption and transport of the all-*trans* isomer to the detriment of 9-*cis* in lipoproteins in human plasma was indicated. However, the fast conversions of 9-*cis*-beta-carotene either into vitamin A or into its all-*trans* isomer make the correct assessment of this issue inconclusive.

The solvents' capacities to better extract different compounds were evaluated by grouping isomers of violaxanthin, lutein, zeaxanthin and carotene, and evaluating their yields. Tukey's test was applied and the best solvents for extraction of each group of isomers are summarized in Table 2. Acetone was the only solvent to render the best results for all tested carotenoids and both microalgal biomasses. It was able to recover 30.0 % violaxanthin, 20.3 % lutein, 17.3 % zeaxanthin and 9.2 % carotene from *C. sorokiniana*, and 46.1 % violaxanthin, 16.7 % lutein, 5.6 % zeaxanthin and 13.4 % carotene from *H. luteoviridis*. It is therefore suggested to be the most suited organic solvent permitted by legislation for extraction of carotenoids and its high capacity to recover violaxanthin is highlighted.

**Table 2.** Best solvents for extraction of each group of carotenoids from *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis*.

Microalga	Total carotenoids	Violaxanthins	Luteins	Zeaxanthins	Carotenes
<i>C. sorokiniana</i>	Acetone, Ethyl Acetate	Acetone, Ethyl Acetate	Acetone, Ethyl Acetate	Indifferent	Indifferent
<i>H. luteoviridis</i>	Acetone	Acetone	Ethanol, Acetone, Ethyl Acetate	Ethanol, Acetone, Ethyl Acetate	Ethanol, Acetone

#### 4.2.3.4. COSMO-SAC

The logarithms of IDACs calculated at 25 °C are presented in Table 3. All key-carotenoids presented the lowest values when paired with acetone. Results indicated this solvent as especially suited for the extraction of xanthophylls, but also to extract all-*trans*-beta-carotene, surpassing hexane, which has been regarded as the best option (YARA-VARÓN et al., 2016). Although hexane was coherently indicated to present affinity for carotenes, positive logarithms of IDACs were observed for all xanthophylls paired with this solvent. Hence, hexane was deemed suited for the selective extraction of carotenes, a result that had been shown by experimental approach. COSMO-SAC widely corroborated the experimental results found in this work that indicated acetone as the better-suited solvent for the extraction of all key-carotenoids. While other system properties may contribute to solvent extraction results,

solubility (here indirectly indicated by the thermodynamic interaction between solute and solvent) proved to be a determining factor. The use of COSMO-SAC is highlighted as an effective resource for screening solvents for extraction processes. For an extended discussion, see section 2.4 in Supporting Information.

**Table 3.** IDACs calculated by COSMO-SAC at 25 °C for all pairs of solutes and solvents tested in this work.

	all- <i>trans</i> -betacarotene	all- <i>trans</i> -lutein	all- <i>trans</i> -violaxanthin	all- <i>trans</i> -zeaxanthin
Ethanol	2.233	-3.761	-4.535	-3.741
Acetone	-2.304	-5.577	-5.271	-5.218
Ethyl Acetate	-1.217	-3.629	-3.229	-3.295
Hexane	-1.791	2.789	4.507	3.261

#### 4.2.4. Conclusions

The experimental approach in this work found that solvent extraction, a rather simple technology, is a viable alternative for the extraction of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids from microalgal biomass. Solvent selection proved to be a key factor, as the tested solvents rendered fundamentally different extraction results. In this context, COSMO-SAC was shown as a powerful tool for the screening of solvents to extract carotenoids. Overall, solvent extraction is recommended for the industrial extraction of pigments from microalgae, depending on further optimization to achieve the economic feasibility of a microalgal biorefinery.

#### 4.2.5. References

- ABBAS, S. H. et al. Biosorption of Heavy Metals : A Review. n. January, 2014.
- ABDI, O.; KAZEMI, M. A review study of biosorption of heavy metals and comparison between different biosorbents. **J Mater Environ Sci**, v. 6, n. 5, p. 1386–1399, 2015.
- ADJEROUD, N. et al. Effect of *Opuntia ficus indica* mucilage on copper removal from water by electrocoagulation-electroflotation technique. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 811, p. 26–36, 2018.
- AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 163, n. 6, p. 739–744, set. 2000.
- AGRAWAL S; RAO AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Cmaj**, v. 163, n. 6, p. 739–44, 2000.
- AHALYA, N.; RAMACHANDRA, T. V; KANAMADI, R. D. Biosorption of heavy metals. **Res. J. Chem. Environ**, v. 7, n. 4, p. 71–79, 2003.
- AHAMED, T. et al. A generalized approach to thermodynamic properties of biomolecules for use in bioseparation process design. **Fluid Phase Equilibria**, v. 241, n. 1–2, p. 268–282, 2006.
- AHEMAD, M.; MALIK, A. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated

from agricultural soils irrigated with wastewater. **Bacteriol. J**, v. 2, n. 1, p. 12–21, 2011.

AKHTAR, N. et al. Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr(III). **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 2, p. 231–239, 2008.

AKHTAR, N.; IQBAL, J.; IQBAL, M. Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. **Journal of hazardous materials**, v. 108, n. 1–2, p. 85–94, abr. 2004.

AL-SHANNAG, M. et al. Heavy metal ions removal from metal plating wastewater using electrocoagulation: Kinetic study and process performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 749–756, 2015.

ALFONSI, K. et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2008.

ALYÜZ, B.; VELI, S. Kinetics and equilibrium studies for the removal of nickel and zinc from aqueous solutions by ion exchange resins. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1, p. 482–488, 2009.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. DE A. C. E S.; FARO, Z. P. DE. **Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A Revista de Nutrição scielo** , , 2006.

ANANTHARAJ, R.; BANERJEE, T. COSMO-RS-based screening of ionic liquids as green solvents in denitrification studies. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 18, p. 8705–8725, 2010.

ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; ZHANG, X. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 1, p. 60–64, 2008.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics. **Journal of Molecular Recognition**, v. 17, n. 3, p. 236–247, 2004.

BABEL, S.; KURNIAWAN, T. A. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water : a review. v. 97, p. 219–243, 2003.

BAICHA, Z. et al. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016.

BALASUBRAMANIAN, S. et al. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system--design, optimization, and quality characterization. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3396–3403, fev. 2011.

BALLADARES, E. et al. Neutralization and co-precipitation of heavy metals by lime addition to effluent from acid plant in a copper smelter. **Minerals Engineering**, v. 122, p. 122–129, 2018.

BALTPURVINS, K. A. et al. Effect of electrolyte composition on zinc hydroxide precipitation by lime. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 973–980, 1997.

BARREIRO, M. F. Review and Industry and Market Trend Analysis. p. 1–23, 2020.

BEGUM, H. et al. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, 2016a.

BEGUM, H. et al. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, out. 2016b.



- BELAY, A. et al. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235–241, 1993.
- BENVENUTTI, L. et al. NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from Myrciaria cauliflora fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. **Journal of Molecular Liquids**, v. 315, p. 113761, 2020.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, ago. 1959.
- BOONNOUN, P. et al. Wet extraction of lipids and astaxanthin from Haematococcus pluvialis by liquefied dimethyl ether. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 5, 2014.
- BOUKHLIFI, F. Characterization and Treatment of Real Wastewater from an Electroplating Company by Raw Chitin. In: [s.l: s.n.].
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 2015.
- BRATSKAYA, S. Y. et al. Heavy metals removal by flocculation/precipitation using N-(2-carboxyethyl)chitosans. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 339, n. 1, p. 140–144, 2009.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (EDS.). **Carotenoids**. [s.l.] Birkhäuser Basel, 2008.
- BROOKS, R. Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals. In: [s.l: s.n.]. p. 87–105.
- BURAKOV, A. E. et al. Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes : A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. November, p. 702–712, 2017.
- CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927–934, 2007.
- CASAS CARDOSO, L. et al. Extraction of Carotenoids and Fatty Acids from Microalgae Using Supercritical Technology. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, p. 877–883, 1 jan. 2012.
- CEPEDA, A.; FENTE, C.; REGAL, P. Trends in Analytical Chemistry Review of methods for analysis of carotenoids q. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49–73, 2014.
- CERÓN-GARCÍA, M. C. et al. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). **Food Chemistry**, v. 257, 1 mar. 2018.
- CHEAH, W. Y. et al. Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.
- CHEN, J. H. et al. Enhancing lutein production with mixotrophic cultivation of Chlorella sorokiniana MB-1-M12 using different bioprocess operation strategies. **Bioresource Technology**, v. 278, n. January, p. 17–25, 2019.
- CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource**

**Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.

COÊLHO, D. D. F. *Microalgae : Cultivation Aspects and Bioactive Compounds*. v. 62, 2019.

CONDE, E.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 957–964, 2015.

CORDERO, B. F. et al. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. **Marine drugs**, v. 9, n. 9, p. 1607–1624, 2011.

COSTA, M. A. L. DA; ORTEGA-FLORES, C. I.; PENTEADO, M. DE V. C. **Alterações estruturais in vivo dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do b-caroteno** **Food Science and Technology** sciELO , , 2002.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients. . 2009, p. OJ L 141, 6.6.2009, 3–11.

CRAMPON, C.; BOUTIN, O.; BADENS, E. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Molecules of Interest from Microalgae and Seaweeds. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 15, p. 8941–8953, 3 ago. 2011.

CUARESMA, M. et al. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 352–359, 1 out. 2009.

CUBAS, C.; GLORIA LOBO, M.; GONZÁLEZ, M. Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by N,N-dimethylformamide using response surface methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 2, p. 125–133, 2008.

DA'NA, E. Adsorption of heavy metals on functionalized-mesoporous silica: A review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 247, p. 145–157, 2017.

DARANI, K. K.; MOZAFARI, M. R. Supercritical fluids technology in bioprocess industries: a review. **Journal of Biochemical Technology**, v. 2, n. 1, p. 144–152, 2010.

DEMING, D. M.; TEIXEIRA, S. R.; ERDMAN JR., J. W. All-trans  $\beta$ -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis  $\beta$ -Carotene in Gerbils Given Single Oral Doses of Each Isomer. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 9, p. 2700–2708, 1 set. 2002.

DENG, X.; WANG, P. Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. **Bioresource technology**, v. 121, p. 342–347, 2012.

DI LENA, G. et al. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. **Food Research International**, v. 120, p. 810–818, 2019.

DING, Z. et al. Filtration and transport of heavy metals in graphene oxide enabled sand columns. **Chemical Engineering Journal**, v. 257, p. 248–252, 2014.

DIPRAT, A. B. et al. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3463–3468, ago. 2017a.

DIPRAT, A. B. et al. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the Science of Food and**

**Agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3463–3468, 1 ago. 2017b.

DIPRAT, A. B. et al. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. **Lwt**, v. 134, n. August, p. 109974, 2020a.

DIPRAT, A. B. et al. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. **LWT**, v. 134, p. 109974, 2020b.

DIXIT, R. et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability (Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 2189–2212, 2015.

DONG, S. et al. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 694305, 2014.

ERTO, A. et al. A Comparison Between a Low-Cost Sorbent and an Activated Carbon for the Adsorption of Heavy Metals from Water. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, 1 abr. 2013.

EVANGELISTA, V. et al. **Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2008.

FAHMY, T. M. et al. Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 10, p. 1462–1469, 15 maio 1993.

FERRARINI, F. **Um banco de dados de perfis sigma aberto e extensível**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

FERRARINI, F. et al. An Open and Extensible Sigma-Profile Database for COSMO-Based Models. v. 64, n. 00, 2018a.

FERRARINI, F. et al. An open and extensible sigma-profile database for COSMO-based models. **AIChE Journal**, v. 64, n. 9, p. 3443–3455, 1 set. 2018b.

FERRUZZI, M.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research - NUTR RES**, v. 27, 2007.

FIORE, M. F.; MOON, D. H.; TREVORS, J. T. Metal Resistance and Accumulation in Cyanobacteria BT - Wastewater Treatment with Algae. In: WONG, Y.-S.; TAM, N. F. Y. (Eds.). . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 111–124.

FOLEY, P. M.; BEACH, E. S.; ZIMMERMAN, J. B. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. **Green Chem.**, v. 13, n. 6, p. 1399–1405, 2011.

FOUREST, E.; ROUX, J. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 399–403, 2004.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 3, p. 407–418, 2011.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Guia Técnico Ambiental de Curtumes**. Belo Horizonte: [s.n.]. Disponível em: <[http://biblioteca.meioambiente.mg.gov.br/publicacoes/BD\\_FEAM/Guia\\_Curtume\\_Final\\_logo\\_Governo.pdf](http://biblioteca.meioambiente.mg.gov.br/publicacoes/BD_FEAM/Guia_Curtume_Final_logo_Governo.pdf)>.

GADD, G. M.; WHITE, C. Copper Uptake by *Penicillium ochro-chloron*: Influence of pH on Toxicity and Demonstration of Energy-dependent Copper Influx Using Protoplasts. **Microbiology**, v. 131, n. 8, p. 1875–1879, 1985.

GERBER, R. P. **Modelo COSMO-SAC como ferramenta de engenharia química**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

GERBER, R. P.; SOARES, R. D. P. Prediction of infinite-dilution activity coefficients using UNIFAC and COSMO-SAC variants. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 16, p. 7488–7496, 2010.

GERBER, R. P.; SOARES, R. P. Assessing the reliability of predictive activity coefficient models for molecules consisting of several functional groups. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2013.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae : A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016a.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016b.

GONG, Z. et al. Computational method for inferring objective function of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. **Computational biology and chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1–6, fev. 2009.

GONZÁLEZ-DELGADO, A.; KAFAROV, V. Microalgae based biorefinery: Issues to consider. **CT y F - Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 4, p. 5, 1 dez. 2011.

GONZÁLEZ LÓPEZ, C. V. et al. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7587–7591, 2010.

GOVINDJEE et al. **Photosynthesis** McGraw-Hill Education, , 11 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.accessscience.com/content/photosynthesis/511700> OP - AccessScience>

HALIM, R. et al. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, 2010.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, ago. 2012.

HARSHA, K.; SENTHIL, P.; PANDA, R. C. A review on heavy metal pollution , toxicity and remedial measures : Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 111197, 2019.

HEAD, I. M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 599–608, 1998.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, n. 16, p. 2495–511, 2010.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.

HORWITZ, B. Role of chlorophyll in proctology. **The American Journal of Surgery**, v. 81, n. 1, p. 81–84, 1951.

HU, H.; XU, K. Chapter 8 - Physicochemical technologies for HRP and risk control. In: REN, H.; ZHANG, X. B. T.-H.-R. P. IN W. (Eds.). . [s.l.] Elsevier, 2020. p. 169–207.

HUMPHREY, A. M. Chlorophyll. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 57–67, 1980.

HUMPHREY, A. M. Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. C422–C425, 1 jun. 2004.

HUSAIN, A.; JAVED, I.; KHAN, N. A. Characterization and treatment of electroplating industry wastewater using Fenton’s reagent. **J Chem Pharm Res**, v. 6, n. 1, p. 622–627, 2014.

- IGBERASE, E.; AUGUSTINE, O.; OSIFO, P. Enhanced heavy metal ions adsorption by 4-aminobenzoic acid grafted on chitosan/epichlorohydrin composite: Kinetics, isotherms, thermodynamics and desorption studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, 1 nov. 2018.
- INANC, A. Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. **Akademik Gida**, v. 9, 1 jan. 2011.
- INGLEZAKIS, V. J.; GRIGOROPOULOU, H. P. Modeling of ion exchange of Pb<sup>2+</sup> in fixed beds of clinoptilolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 61, n. 1, p. 273–282, 2003.
- INTERNATIONAL., A. **Official methods of analysis of AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International.** [Gaithersburg, Md.]AOAC International, , [s.d.].
- ISMAIL, I.; MOUSTAFA, T. Biosorption of heavy metals. **Heavy Metals: Sources, Toxicity and Remediation Techniques**, n. October, p. 131–174, 2016.
- JACOTET-NAVARRO, M. et al. What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. **ELECTROPHORESIS**, v. 39, n. 15, p. 1946–1956, 1 ago. 2018.
- JAESCHKE, D. P. et al. Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1636–1643, 2016.
- JAESCHKE, D. P. et al. The effect of temperature and moderate electric field pre-treatment on carotenoid extraction from *Heterochlorella luteoviridis*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 2, p. 396–402, 2019.
- JAHAN, M. A. A. et al. Characterization of tannery wastewater and its treatment by aquatic macrophytes and algae. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 49, n. 4, p. 233–242, 2014.
- JAIME, L. et al. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 105–112, 2010.
- JEFFREY, S. W. et al. **Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods.** [s.l.] UNESCO Publishing, 1997.
- JOHNSON, E. J. The role of carotenoids in human health. **Nutrition in clinical care : an official publication of Tufts University**, v. 5, n. 2, p. 56–65, 2002.
- JUAN, J. C. et al. Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 452–460, 2011.
- KANDA, H. et al. **Extraction of Fucoxanthin from Raw Macroalgae excluding Drying and Cell Wall Disruption by Liquefied Dimethyl Ether Marine Drugs**, 2014.
- KANG, S.-Y. et al. Competitive adsorption characteristics of Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, and Cr<sup>3+</sup> by IRN-77 cation exchange resin in synthesized wastewater. **Chemosphere**, v. 56, n. 2, p. 141–147, 2004.
- KANG, Y.-R. et al. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. **Food Chemistry**, v. 245, p. 943–950, 2018.
- KAPLAN, D. Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. p. 602–611, 2013.
- KARIMI, S.; TAVAKKOLI, M. A comprehensive review of the adsorption mechanisms and factors influencing the adsorption process from the perspective of bioethanol dehydration. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. November 2018, p. 535–553, 2019.

- KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.
- KHATRI, N.; TYAGI, S.; RAWTANI, D. Recent strategies for the removal of iron from water: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 19, n. 13, p. 291–304, 2017.
- KHEZAMI, L.; CAPART, R. Removal of Chromium(VI) From Aqueous Solution by Activated Carbons: Kinetic and Equilibrium Studies. **Journal of hazardous materials**, v. 123, p. 223–231, 1 set. 2005.
- KHOO, H. H. et al. Life cycle energy and CO<sub>2</sub> analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5800–5807, 2011.
- KIM, D. et al. Bioresource Technology Cell-wall disruption and lipid / astaxanthin extraction from microalgae : Chlorella and Haematococcus. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 300–310, 2016.
- KIM, K. M. et al. Characterization of Heterochlorella luteoviridis (Trebouxiaceae, Trebouxiophyceae) isolated from the Port of Jeongja in Ulsan, Korea. **Journal of Marine Bioscience and Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 22–29, 2017.
- KIM, M. K.; AHN, S. H.; LEE-KIM, Y. C. Relationship of serum  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v. 21, n. 6, p. 797–809, 2001.
- KITADA, K. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment components with pharmaceutical importance from Chlorella vulgaris. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 657–661, 1 maio 2009.
- KLAMT, A. **COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design**. [s.l.] Elsevier Science, 2005.
- KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 5, p. 799–805, 1993.
- KLÄUI, H.; BAUERNFEIND, J. C. 2 - CAROTENOIDS AS FOOD COLORS. In: BAUERNFEIND, J. C. B. T.-C. AS C. AND V. A. P. (Ed.). **Food Science and Technology**. San Diego: Academic Press, 1981. p. 47–317.
- KOCHEM, L. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, 1 jan. 2014.
- KOHOUT, M.; SAVIN, A. Atomic shell structure and electron numbers. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 875–882, 15 nov. 1996.
- KORETSKY, M. D. **Engineering and Chemical Thermodynamics**. 2nd. ed. [s.l.] Wiley, 2012.
- KOUTRA, E. et al. Chapter 11 - Microalgal Biorefinery. In: YOUSUF, A. B. T.-M. C. FOR B. P. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 2020. p. 163–185.
- KULESHOVA, T. et al. Interrelation of Absorption Spectra of Plant Pigments and LED Lighting with Different Spectral Compositions. **Technical Physics**, v. 63, p. 1243–1247, 1 set. 2018.
- KUYUCAK, N.; VOLESKY, B. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. **Biotechnology letters**, v. 10, n. 2, p. 137–142, 1988.
- LANFER-MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M. C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. **Food Research International**, v. 38, n. 8, p. 885–891, 2005.

- LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771–782, 2001.
- LATA, S.; SINGH, P. K.; SAMADDER, S. R. Regeneration of adsorbents and recovery of heavy metals: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 4, p. 1461–1478, 2015.
- LEÓN-VAZ, A. et al. Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. **New Biotechnology**, 2019.
- LEUNG, W. C. et al. Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 12, p. 233–240, 1 jun. 2000.
- LIANG, S. et al. How *Chlorella sorokiniana* and its High Tolerance to Pb Might be a Potential Pb Biosorbent. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 3, p. 1139–1146, 2017.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4.3.1-F4.3.8, 1 ago. 2001.
- LIN, S.-T.; SANDLER, S. I. A Priori Phase Equilibrium Prediction from a Segment Contribution Solvation Model. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 5, p. 899–913, 1 mar. 2002.
- LU, J. et al. Optimization of subcritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Laminaria japonica* Aresch by response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 139–145, 15 jan. 2014.
- LUENGO, E. et al. Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. **The Journal of Membrane Biology**, v. 247, n. 12, p. 1269–1277, 2014.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 2, p. 245–251, 2005.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, n. 3, p. 323–329, 2007.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 8, p. 1352–1362, 2008.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948–952, 2009.
- MÄKI-ARVELA, P.; HACHEMI, I.; MURZIN, D. Y. Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 11, p. 1607–1626, 1 nov. 2014.
- MALKOC, E.; NUHOGLU, Y. Investigations of nickel (II) removal from aqueous solutions using tea factory waste. **Journal of hazardous materials**, v. 127, n. 1–3, p. 120–128, 2005.
- MANDELLI, F. et al. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4,

p. 1781–1790, 2012a.

MANDELLI, F. et al. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 126–134, 2012b.

MATSUKAWA, R. et al. Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 263–267, 2000.

MEHTA, S. K.; GAUR, J. P. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater : Progress and Prospects Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater : Progress and Prospects. v. 8551, 2008.

MENDES-PINTO, M. M. et al. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 1, p. 19–24, 2001.

MEZINE, Z. et al. Electrodeposition of copper oxides ( $Cu_xO_y$ ) from acetate bath. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 817, p. 36–47, 2018.

MEZZOMO, N. et al. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1383–1391, 2011.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Carotenoids Functionality , Sources , and Processing by Supercritical Technology : A Review. v. 2016, 2016.

MICHALAK, I. et al. **Supercritical Algal Extracts: A Source of Biologically Active Compounds from Nature** **Journal of Chemistry**, 2015.

MODAK, J. M.; NATARAJAN, K. A. Biosorption of metals using nonliving biomass—a review. **Mining, Metallurgy & Exploration**, v. 12, n. 4, p. 189–196, 1995.

MOITY, L. et al. Panorama of sustainable solvents using the COSMO-RS approach. **Green Chem.**, v. 14, n. 4, p. 1132–1145, 2012.

MOLAZADEH, P. et al. Adsorption of Lead by Microalgae *Chaetoceros* Sp. and *Chlorella* Sp. from Aqueous Solution. **Journal of Community Health Research**, v. 4, p. 114–127, 1 set. 2015.

MONTEIRO, C. M. et al. Metal Uptake by Microalgae : Underlying Mechanisms and Practical Applications. 2012.

NARIYAN, E.; AGHABABAEI, A.; SILLANPÄÄ, M. Removal of pharmaceutical from water with an electrocoagulation process; effect of various parameters and studies of isotherm and kinetic. **Separation and Purification Technology**, v. 188, p. 266–281, 2017.

NATHAN, O. et al. The contents of Pb, Cu, Zn and Cd in meat in Nairobi, Kenya. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 5, 1 jul. 2007.

NIDHEESH, P. V; SINGH, T. S. A. Arsenic removal by electrocoagulation process: Recent trends and removal mechanism. **Chemosphere**, v. 181, p. 418–432, 2017.

NISAR, N. et al. Carotenoid Metabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 68–82, 5 jan. 2015.

NIYOGI, K. K.; BJÖRKMAN, O.; GROSSMAN, A. R. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 14162 LP – 14167, 9 dez. 1997.

NOBRE, B. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids



- from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 6, p. 787–790, 2006.
- NOR, S. et al. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. 2017.
- NWOBA, E. et al. Microalgal Pigments: A Source of Natural Food Colors. In: [s.l: s.n.]. p. 81–123.
- OBAID, S. S. et al. Heavy metal ions removal from waste water by the natural zeolites. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 9, Part 3, p. 17930–17934, 2018.
- OMAR, H. H. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n. 2, p. 95–100, 2002.
- PAL, A.; PAUL, A. K. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. **Indian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 49–64, mar. 2008.
- PASQUET, V. et al. Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. **Marine drugs**, v. 9, n. 5, p. 819–831, 2011a.
- PASQUET, V. et al. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 59–67, 2011b.
- PATIL, P. D. et al. Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 118–122, 2011.
- PAULINO, A. T. et al. Novel adsorbent based on silkworm chrysalides for removal of heavy metals from wastewaters. **Journal of colloid and interface science**, v. 301, n. 2, p. 479–487, set. 2006.
- PEREIRA NETO, A. et al. **Alternativas para o tratamento de efluentes da indústria galvânica Engenharia Sanitaria e Ambiental** scielo , , 2008.
- PEREZ-GALVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Chemistry in the Bioactivity of Chlorophylls: An Overview. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 40, p. 4515–4536, 2017.
- PÉREZ, A. T. E. et al. Key challenges and requirements for sustainable and industrialized biorefinery supply chain design and management: a bibliographic analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, p. 350–359, 2017.
- PETERSEN, F. et al. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions. **WRC Report**, v. 1, n. 100, 2005.
- PETROVIČ, A.; SIMONIČ, M. Removal of heavy metal ions from drinking water by alginate-immobilised *Chlorella sorokiniana*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, n. 7, p. 1761–1780, 2016.
- POOJARY, M. M. et al. **Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds** *Marine Drugs*, 2016.
- POTRICH, E. et al. Replacing hexane by ethanol for soybean oil extraction: Modeling, simulation, and techno-economic-environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, p. 118660, 2020.
- PRAVEENKUMAR, R. et al. Breaking dormancy: an energy-efficient means of recovering astaxanthin from microalgae. **Green Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 1226–1234, 2015.

- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.
- QUEIROZ ZEPKA, L.; JACOB-LOPES, E.; ROCA, M. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 94–100, 2019.
- RAI, P. K. Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and its Phytoremediation using Wetland Plants: An ecosustainable approach. **International Journal of Phytoremediation**, v. 10, n. 2, p. 133–160, 3 abr. 2008.
- RAJESH BANU, J. et al. Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy-techno economic and life-cycle analysis. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122822, 2020.
- RAMIREZ, M. E. et al. Potential of microalgae in the bioremediation of water with chloride content. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 472–476, 2017.
- RAMMUNI, M. N. et al. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*. **Food Chemistry**, v. 277, 2018.
- REN, Q. et al. Recent advances in separation of bioactive natural products. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 9, p. 937–952, 2013.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.
- REVERCHON, E.; DONSI, G.; SESTI OSSEO, L. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 11, p. 2721–2726, 1 nov. 1993.
- REYES, A.; SIELFELD, C. S. Effect of high-pressure compaction on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Food Engineering**, v. 189, p. 123–134, 2016.
- ROMERA, E. et al. Biosorption with algae: a statistical review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 223–235, 2006.
- ROMERA, E. et al. Biosorption with Algae : A Statistical Review Biosorption with Algae : A Statistical Review. v. 8551, n. 2006, 2008.
- RUEN-NGAM, D. et al. Selective Extraction of Lutein from Alcohol Treated *Chlorella vulgaris* by Supercritical CO<sub>2</sub>. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 2, p. 255–260, 1 fev. 2012.
- RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. [s.l.] Wiley, 1984.
- SAFI, C. et al. Extraction of lipids and pigments of *Chlorella vulgaris* by supercritical carbon dioxide: Influence of bead milling on extraction performance. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 4, p. 1711–1718, 2014.
- SAINI, R. K.; KEUM, Y.-S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90–103, 2018.
- ŞANAL, İ. S. et al. Determination of optimum conditions for SC-(CO<sub>2</sub>+ ethanol) extraction of  $\beta$ -carotene from apricot pomace using response surface methodology. **The Journal of supercritical fluids**, v. 34, n. 3, p. 331–338, 2005.
- SANDLER, S. I. Infinite dilution activity coefficients in chemical, environmental and biochemical engineering. **Fluid Phase Equilibria**, v. 116, n. 1–2, p. 343–353, 1996.

- SANTIAGO-SANTOS, M. C. et al. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047–2052, 2004.
- SARTORY, D. P.; GROBBELAAR, J. U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. **Hydrobiologia**, v. 114, n. 3, p. 177–187, 1984.
- SASSO, S. et al. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 761–785, 1 jul. 2012.
- SCHÄFER, A.; HUBER, C.; AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. **The Journal of Chemical Physics**, v. 100, n. 8, p. 5829–5835, 15 abr. 1994.
- SCHMIDT, M. W. et al. General atomic and molecular electronic structure system. **Journal of Computational Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1347–1363, 1993.
- SCHNEIDER, I. A. H. **Biossorção de metais pesados com a biomassa de macrófitos aquáticos**. [s.l.] UFRGS, 1995.
- SCHRÖDINGER, E. An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules. **Physical Review**, v. 28, n. 6, p. 1049–1070, 1 dez. 1926.
- SHAH, M. M. R. et al. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 531, 2016.
- SHAHID, A. et al. Bioenergy potential of the residual microalgal biomass produced in city wastewater assessed through pyrolysis, kinetics and thermodynamics study to design algal biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121701, 2019.
- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. **Licopeno como agente antioxidante** *Revista de Nutrição scielo* , , 2004.
- SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 2014.
- SHI, J. et al. Solubility of lycopene in supercritical CO<sub>2</sub> fluid as affected by temperature and pressure. v. 66, p. 322–328, 2009.
- SICAIRE, A.-G. et al. **Alternative Bio-Based Solvents for Extraction of Fat and Oils: Solubility Prediction, Global Yield, Extraction Kinetics, Chemical Composition and Cost of Manufacturing** *International Journal of Molecular Sciences* , 2015.
- SIMON, D.; HELLIWELL, S. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. **Water Research**, v. 32, n. 7, p. 2220–2223, 1998.
- SOARES, A. T. et al. Improvement of the Extraction Process for High Commercial Value Pigments from. v. 27, n. 6, p. 1083–1093, 2016.
- SOARES, R. DE P. et al. *lvpp/sigma: LVPP sigma-profile database (20.06)*. 30 jun. 2020.
- SPEARS, K. Developments in food colourings: the natural alternatives. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 283–288, 1 nov. 1988.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.
- SRIVASTAVA, N.; BALOMAJUMDER, C. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. **Journal of hazardous materials**, v. 151, p. 1–8, 1 mar. 2008.

- TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing** Vienna, Austria, , 2013.
- TEH, C. Y. et al. Recent Advancement of Coagulation–Flocculation and Its Application in Wastewater Treatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 16, p. 4363–4389, 27 abr. 2016.
- THANA, P. et al. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3110–3115, 2008.
- TORRES, S. et al. Green Composites from Residual Microalgae Biomass and Poly(butylene adipate-co-terephthalate): Processing and Plasticization. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 4, p. 614–624, 6 abr. 2015.
- VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quimica Nova**, v. 32, p. 2429–2436, 2009.
- VANDANA, V.; TEJA, A. S. The solubility of paclitaxel in supercritical CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O. **Fluid Phase Equilibria**, v. 135, n. 1, p. 83–87, 1997.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M. et al. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142–149, 2013.
- VARELA, J. C. et al. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 3, p. 423–436, 2015.
- WANEES, S. et al. Adsorption Studies on the Removal of Hexavalent Chromium-Contaminated Wastewater Using Activated Carbon and Bentonite. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, p. 8245–8252, 1 nov. 2013.
- WANG, F. et al. Optimum Production Conditions, Purification, Identification, and Antioxidant Activity of Violaxanthin from Microalga *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae). **Marine drugs**, v. 16, n. 6, p. 190, 1 jun. 2018.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 427–451, 2006.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009.
- WANG, S.; SANDLER, S. I.; CHEN, C.-C. Refinement of COSMO-SAC and the Applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 22, p. 7275–7288, 1 out. 2007.
- WHITE, C.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS microbiology reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 503–516, 1997.
- WIDHIASTUTI, F. et al. Electrocoagulation of boron by electrochemically co-precipitated spinel ferrites. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 893–901, 2018.
- WOJEICCHOWSKI, J. P. et al. Using COSMO-RS in the Design of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Antioxidants from Rosemary. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 32, p. 12132–12141, 17 ago. 2020.
- XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1225–1244, 2016.
- YANG, X. J.; FANE, A. G.; MACNAUGHTON, S. Removal and recovery of heavy metals from wastewaters by supported liquid membranes. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 2, p.

341–348, 1 jan. 2001.

YARA-VARÓN, E. et al. Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A theoretical versus experimental solubility study. **RSC Adv.**, v. 6, n. 33, p. 27750–27759, 2016.

YE, Z.-W.; JIANG, J.-G.; WU, G.-H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 352–360, 2008.

YEN, H.-W. et al. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–174, 2013.

YEN, H.-W.; CHIANG, W.-C.; SUN, C.-H. Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, n. 1, p. 53–57, 2012.

YEN, H. W. et al. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 291–296, 2015.

YEO, S.-D. et al. Critical Properties of Carbon Dioxide + Methanol, + Ethanol, + 1-Propanol, and + 1-Butanol. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 45, n. 5, p. 932–935, 1 set. 2000.

ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK, M.; RYGĄŁ, A. The Effect of Biomass (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus armatus*) Concentrations on Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> Biosorption from Zinc Smelting Wastewater. **Engineering and Protection of Environment**, v. 20, p. 211–220, 1 abr. 2017.

ZENDRON, R. Mecanismos de neurotoxicidade e doenças neurológicas relacionadas à intoxicação por metais pesados. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v. 64, p. 45–51, 2015.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2018.

ZHANG, W. et al. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 329–335, 2014.

ZOU, T.-B. et al. **Response Surface Methodology for Ultrasound-Assisted Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*** *Marine Drugs*, 2013.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; HANCOCK, I. C. Biosorption of metals from dilute aqueous solutions. **Separation and Purification Methods**, v. 26, n. 2, p. 255–295, 1997.

## Table and Figure captions

**Table 1.** Characterization of *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* biomasses used in this work.

**Table 2.** Best solvents for extraction of each group of carotenoids from *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis*.

**Table 3.** IDACs calculated by COSMO-SAC at 25 °C for all pairs of solutes and solvents tested in this work.

**Figure 1.** SEM images of the freeze-dried biomass employed in this work. Microalgal sample and amplifications: (a) *H. luteoviridis*, 500×, (b) *C. sorokiniana*, 500×, (c) *H. luteoviridis*, 2,000×, (d) *C. sorokiniana*, 2,000×.

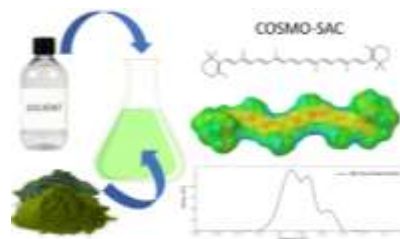
## Entry for the Table of Contents

**Research Article:** Solvent extraction of chlorophylls and carotenoids from *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* was carried out with full analysis of the carotenoid profiles of extracts. Ethanol proved to be best to extract chlorophylls, while acetone was shown to be a generally suited solvent for carotenoid extraction from microalgae. COSMO-SAC proved to be an important tool in the screening of solvents.

**Extraction of chlorophylls and carotenoids from microalgae: COSMO-SAC assisted solvent screening**

A. Morcelli\*, W. Andrade, C. Frankenberg, R. Rech, N. Marcílio

*Chem. Eng. Technol.* **2021**, *XX* (X),  
[XXXX...XXXX](#)



## 4.2.6. Supporting Information

### 4.2.6.1. Supporting Information to Materials and Methods

#### Analysis of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids

The extracts obtained in batch extraction experiments and in the exhaustive extraction methodology were quantitatively transferred and concentrated in rotary evaporator at 30 °C (Fisatom, Model 450-5, Brazil), and the analytical procedure for the determination of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids by spectrophotometry was performed. To avoid carotenoid degradation during analyses, the manipulation of biomass and extracts was carried out in dim light at controlled room temperature ( $25 \pm 2$  °C).

Analyses to determine the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids were carried out by determining the absorbance of samples at wavelengths of 470 nm, 649 nm and 664 nm (GEHAKA, UV-330G, Brazil), according to adapted spectrophotometric methodology (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001), and concentrations were calculated by adjusted equations. All analyses were performed in duplicates.

#### Determination of carotenoid profile

The concentrated extract was transferred into a mixture of petroleum ether:ethyl ether (1:1 volume) and saponified with methanolic KOH solution for 16 h at room temperature ( $22 \pm 3$  °C). The alkali was removed by washing with distilled water until neutral pH, and the solvent was removed by rotary evaporation (30 °C). Samples were then dried by sparging nitrogen gas at room temperature and were stored frozen at -18 °C. The analysis of carotenoids was carried out using a high-performance liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) with a diode array detector (DAD) and a YMC C30 column (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm) using a linear gradient of methanol/MTBE as mobile phase (0.9 mL min<sup>-1</sup>, 29 °C). The spectra were measured between 200 and 600 nm and the chromatograms were processed at 450 nm. All sample manipulation was carried out in the absence of light.

#### COSMO-SAC

In this work, COSMO-SAC was employed for the qualitative assessment of each solvent's performance in the solvation of key-carotenoids by the prediction of IDACs. As previously mentioned, in this model each molecule is described by an apparent surface charge density distribution, determined by the COSMO method. These charge densities are usually represented by a single variable function denoted as  $\sigma$ -profile, in order to simplify the mathematical treatment. The  $\sigma$ -profile of a given molecule is obtained from its electronic structure, computed by quantum chemistry methods which require parametrization. With this purpose, prior to procedures to obtain COSMO-SAC's parametrization, the geometries of key carotenoid molecules approached in this work were optimized by the steepest descent energy minimization method of Avogadro, an open-source molecular builder and visualization tool (HANWELL et al., 2012). The calculation of the electronic structure was carried out using the

freely available GAMESS quantum chemistry package (SCHMIDT et al., 1993). A combination of Hartree-Fock (HF) method with the TZVP (Triple Zeta Valence plus Polarization) basis was used, as this was considered as the best approach for the generation of  $\sigma$ -profiles among the studied methods in a previous work (FERRARINI et al., 2018a). These results have been incorporated to LVPP's sigma-profile and COSMO-SAC parametrizations database and can be freely consulted at <https://github.com/lvpp/sigma/> (SOARES et al., 2020). Finally, JCOSMO was used to visualize charge distribution surfaces, generate sigma profiles and calculate IDACs of all molecules of interest using the COSMO-SAC-HB2 model. JCSOMO consists of an open-source implementation of the COSMO-SAC model in the Java programming language (GERBER; SOARES, 2010). To calculate IDACs in JCOSMO, the molar compositions of the solutes were approximated as zero while the molar composition of the solvents were approximated to unity in each pairing.

#### **4.2.6.2. Supporting Information to Results and Discussion**

##### **Biomass characterization**

The total carotenoid content found by the HPLC methodology (4.08 mg g<sup>-1</sup> for *C. sorokiniana* and 2.81 mg g<sup>-1</sup> for *H. luteoviridis*) was consistent with the results achieved in this work using the simplified spectrophotometric methodology adapted from Lichtenthaler and Buschmann (2001), as previously shown. Since various plant pigments absorb light in overlapping spectral regions (KULESHOVA et al., 2018), the successful validation of this quick analytical method by comparison to the quantification of total carotenoids through a chromatographic methodology was considered important. This simpler methodology may be employed in lieu of the labor-intensive chromatographic approach when only the total carotenoid content of a sample is desired.

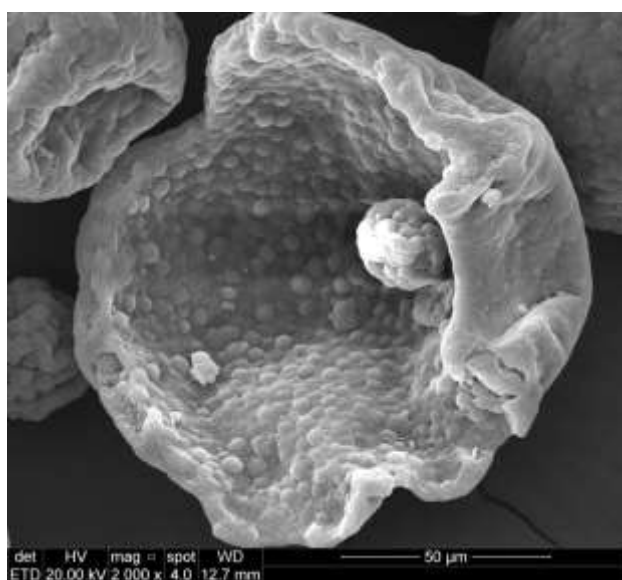
##### **Solvent selection**

As it is well established, the final concentration of each solute in extracts results from the extraction rate, which is directly proportional to the concentration gradient between the bulk solution (outside particles) and the solution retained within particles. Like the concentration gradient, the extraction rate will decrease throughout a batch extraction process, and contact time between solvent and solids will influence yields. Since a long and identical contact time between phases (16 h) was employed in this work, this variable influence was discarded in the analysis of results, and the effects of solvent to biomass ratios over yields were evaluated for each solvent. It is considered that the process time was sufficient to reach the thermodynamic equilibrium, represented by the absence of the driving force in the extraction process (when equal compound concentrations are achieved in both fluid phases).



**Table S1.** Carotenoid profiles of *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* biomasses used in this work.

Carotenoid	<i>C. sorokiniana</i>		<i>H. luteoviridis</i>	
	Content (mg g <sup>-1</sup> )	% of total carotenoids	Content (mg g <sup>-1</sup> )	% of total carotenoids
all-trans-violaxanthin	0.104 ± 0.013	2.5 ± 0.2%	0.127 ± 0.009	4.5 ± 0.0%
cis-violaxanthin	0.058 ± 0.006	1.4 ± 0.1%	0.123 ± 0.010	4.4 ± 0.0%
9-cis-violaxanthin	0.056 ± 0.003	1.4 ± 0.0%	0.025 ± 0.001	0.9 ± 0.0%
13-cis-lutein	0.234 ± 0.019	5.7 ± 0.2%	0.090 ± 0.010	3.2 ± 0.1%
13'-cis-lutein	0.149 ± 0.011	3.6 ± 0.1%	0.048 ± 0.009	1.7 ± 0.2%
all-trans-lutein	2.450 ± 0.070	60.0 ± 1.1%	0.793 ± 0.051	28.3 ± 0.3%
all-trans-zeaxanthin	0.110 ± 0.004	2.7 ± 0.0%	0.382 ± 0.022	13.6 ± 0.2%
cis-zeaxanthin	0.185 ± 0.005	4.5 ± 0.1%	0.037 ± 0.007	1.3 ± 0.2%
15-cis-β-carotene	0.063 ± 0.011	1.5 ± 0.2%	0.023 ± 0.007	0.8 ± 0.2%
all-trans-α-carotene	0.158 ± 0.014	3.9 ± 0.2%	0.360 ± 0.022	12.8 ± 0.2%
13-cis-β-carotene	0.051 ± 0.003	1.2 ± 0.0%	0.187 ± 0.017	6.7 ± 0.1%
all-trans-β-carotene	0.328 ± 0.023	8.0 ± 0.2%	0.389 ± 0.023	13.9 ± 0.2%
9-cis-β-carotene	0.139 ± 0.006	3.4 ± 0.0%	0.223 ± 0.016	8.0 ± 0.0%
Total carotenoids	4.083 ± 0.189		2.808 ± 0.206	
<u>Groups of carotenoids</u>				
Violaxanthins	0.217 ± 0.023	5.3 ± 0.3%	0.275 ± 0.021	9.8 ± 0.0%
Luteins	2.832 ± 0.099	69.4 ± 0.8%	0.931 ± 0.071	33.2 ± 0.1%
Zeaxanthins	0.295 ± 0.009	7.2 ± 0.1%	0.419 ± 0.030	14.9 ± 0.0%
Carotenes	0.740 ± 0.057	18.1 ± 0.6%	1.183 ± 0.085	42.1 ± 0.1%



**Figure S1.** Detailed scanning electron microscopy (SEM) image of a ruptured cell among the freeze-dried *C. sorokiniana* biomass used in this work (2,000× amplification).

**Table S2.** Chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoid extraction yields ( $\text{mg g}^{-1}$  dry biomass) and compound yields (% of total compound content in biomass, in parenthesis) from *C. sorokiniana*.

	Solvent/Biomass Ratio ( $\text{mL g}^{-1}$ )	Chlorophyll a ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Chlorophyll b ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Total carotenoids ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Ethanol	100:1	6.62 ± 0.08 (52.3 ± 0.7%) <sup>a</sup>	4.24 ± 0.06 (88.1 ± 1.3%) <sup>a b</sup>	0.12 ± 0.00 (3.1 ± 0.1%) <sup>f</sup>
	200:1	7.07 ± 0.07 (55.9 ± 0.5%) <sup>a</sup>	4.28 ± 0.28 (88.9 ± 5.9%) <sup>a b</sup>	0.24 ± 0.07 (6.3 ± 1.9%) <sup>e f</sup>
	1000:1	6.35 ± 0.60 (49.5 ± 4.1%) <sup>a</sup>	4.81 ± 0.15 (96.1 ± 3.2%) <sup>a</sup>	0.13 ± 0.02 (3.5 ± 0.4%) <sup>f</sup>
Hexane	100:1	1.25 ± 0.03 (9.9 ± 0.2%) <sup>c</sup>	0.98 ± 0.10 (20.4 ± 2.2%) <sup>e</sup>	0.14 ± 0.02 (3.7 ± 0.5%) <sup>f</sup>
	200:1	1.97 ± 0.35 (15.5 ± 2.7%) <sup>c</sup>	1.51 ± 0.28 (31.4 ± 5.9%) <sup>e</sup>	0.28 ± 0.04 (7.2 ± 1.2%) <sup>d e f</sup>
	1000:1	1.90 ± 0.15 (15.0 ± 1.2%) <sup>c</sup>	1.58 ± 0.03 (32.9 ± 0.7%) <sup>e</sup>	0.14 ± 0.00 (3.6 ± 0.1%) <sup>f</sup>
Acetone	100:1	4.11 ± 0.05 (32.5 ± 0.4%) <sup>b</sup>	3.55 ± 0.05 (73.7 ± 1.0%) <sup>b c</sup>	0.58 ± 0.03 (15.4 ± 0.7%) <sup>a</sup>
	200:1	4.02 ± 0.04 (31.7 ± 0.3%) <sup>b</sup>	3.33 ± 0.07 (69.2 ± 1.4%) <sup>c d</sup>	0.57 ± 0.00 (15.1 ± 0.1%) <sup>a b</sup>
	1000:1	3.76 ± 0.07 (29.7 ± 0.5%) <sup>b</sup>	3.08 ± 0.13 (64.0 ± 2.6%) <sup>c d</sup>	0.49 ± 0.00 (12.9 ± 0.1%) <sup>a b c</sup>
Ethyl acetate	100:1	3.35 ± 0.07 (26.5 ± 0.5%) <sup>b</sup>	2.89 ± 0.02 (60.1 ± 0.3%) <sup>c d</sup>	0.33 ± 0.02 (8.5 ± 0.4%) <sup>c d e</sup>
	200:1	3.44 ± 0.10 (27.2 ± 0.8%) <sup>b</sup>	2.65 ± 0.23 (55.2 ± 4.8%) <sup>d</sup>	0.41 ± 0.02 (10.8 ± 0.6%) <sup>b c d</sup>
	1000:1	3.40 ± 0.19 (26.9 ± 1.5%) <sup>b</sup>	1.76 ± 0.11 (36.7 ± 2.2%) <sup>e</sup>	0.62 ± 0.04 (16.2 ± 1.0%) <sup>a</sup>

Different letters in the same column means significant difference by Tukey's test at a significance level  $\alpha=0.05$ .

**Table S3.** Chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoid extraction yields ( $\text{mg g}^{-1}$  dry biomass) and compound yields (% of total compound content in biomass, in parenthesis) from *H. luteoviridis*.

	Solvent/Biomass Ratio ( $\text{mL g}^{-1}$ )	Chlorophyll a ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Chlorophyll b ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Total carotenoids ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Ethanol	100:1	5.17 ± 0.01 (47.6 ± 0.1%) <sup>a</sup>	2.53 ± 0.24 (37.9 ± 3.6%) <sup>a b</sup>	0.35 ± 0.01 (12.8 ± 0.4%) <sup>a b</sup>
	200:1	2.80 ± 0.01 (25.8 ± 0.1%) <sup>b c</sup>	2.48 ± 0.30 (37.2 ± 4.5%) <sup>a b</sup>	0.30 ± 0.13 (11.1 ± 4.9%) <sup>a b</sup>
	1000:1	3.19 ± 0.03 (29.4 ± 0.3%) <sup>b</sup>	2.58 ± 0.04 (38.8 ± 0.7%) <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02 (11.7 ± 0.6%) <sup>a b</sup>
Hexane	100:1	0.12 ± 0.00 (1.1 ± 0.0%) <sup>f</sup>	0.04 ± 0.02 (0.0 ± 0.0%) <sup>c</sup>	0.15 ± 0.00 (5.5 ± 0.0%) <sup>b</sup>
	200:1	0.10 ± 0.01 (1.0 ± 0.1%) <sup>f</sup>	0.04 ± 0.00 (0.5 ± 0.1%) <sup>c</sup>	0.11 ± 0.01 (4.2 ± 0.4%) <sup>b</sup>
	1000:1	0.12 ± 0.02 (1.1 ± 0.2%) <sup>f</sup>	0.09 ± 0.01 (1.4 ± 0.1%) <sup>c</sup>	0.15 ± 0.03 (5.4 ± 1.0%) <sup>b</sup>
Acetone	100:1	1.95 ± 0.16 (18.0 ± 1.5%) <sup>d e</sup>	2.34 ± 0.24 (35.2 ± 3.6%) <sup>a b</sup>	0.40 ± 0.04 (14.8 ± 1.4%) <sup>a</sup>
	200:1	2.10 ± 0.11 (19.3 ± 1.0%) <sup>c d</sup>	2.47 ± 0.02 (37.1 ± 0.3%) <sup>a b</sup>	0.38 ± 0.05 (14.1 ± 1.8%) <sup>a</sup>
	1000:1	2.00 ± 0.45 (18.4 ± 4.2%) <sup>c d</sup>	2.43 ± 0.52 (36.4 ± 7.8%) <sup>a b</sup>	0.37 ± 0.05 (13.6 ± 1.8%) <sup>a b</sup>
Ethyl acetate	100:1	1.28 ± 0.01 (11.8 ± 0.1%) <sup>e</sup>	1.43 ± 0.00 (21.4 ± 0.0%) <sup>b</sup>	0.36 ± 0.03 (13.3 ± 1.0%) <sup>a b</sup>
	200:1	1.36 ± 0.04 (12.5 ± 0.3%) <sup>d e</sup>	1.53 ± 0.08 (22.9 ± 1.2%) <sup>a b</sup>	0.35 ± 0.01 (13.1 ± 0.2%) <sup>a b</sup>
	1000:1	1.15 ± 0.00 (10.6 ± 0.0%) <sup>e</sup>	1.50 ± 0.02 (22.5 ± 0.3%) <sup>a b</sup>	0.27 ± 0.02 (9.9 ± 0.3%) <sup>a b</sup>

Different letters in the same column means significant difference by Tukey's test at a significance level  $\alpha=0.05$ .

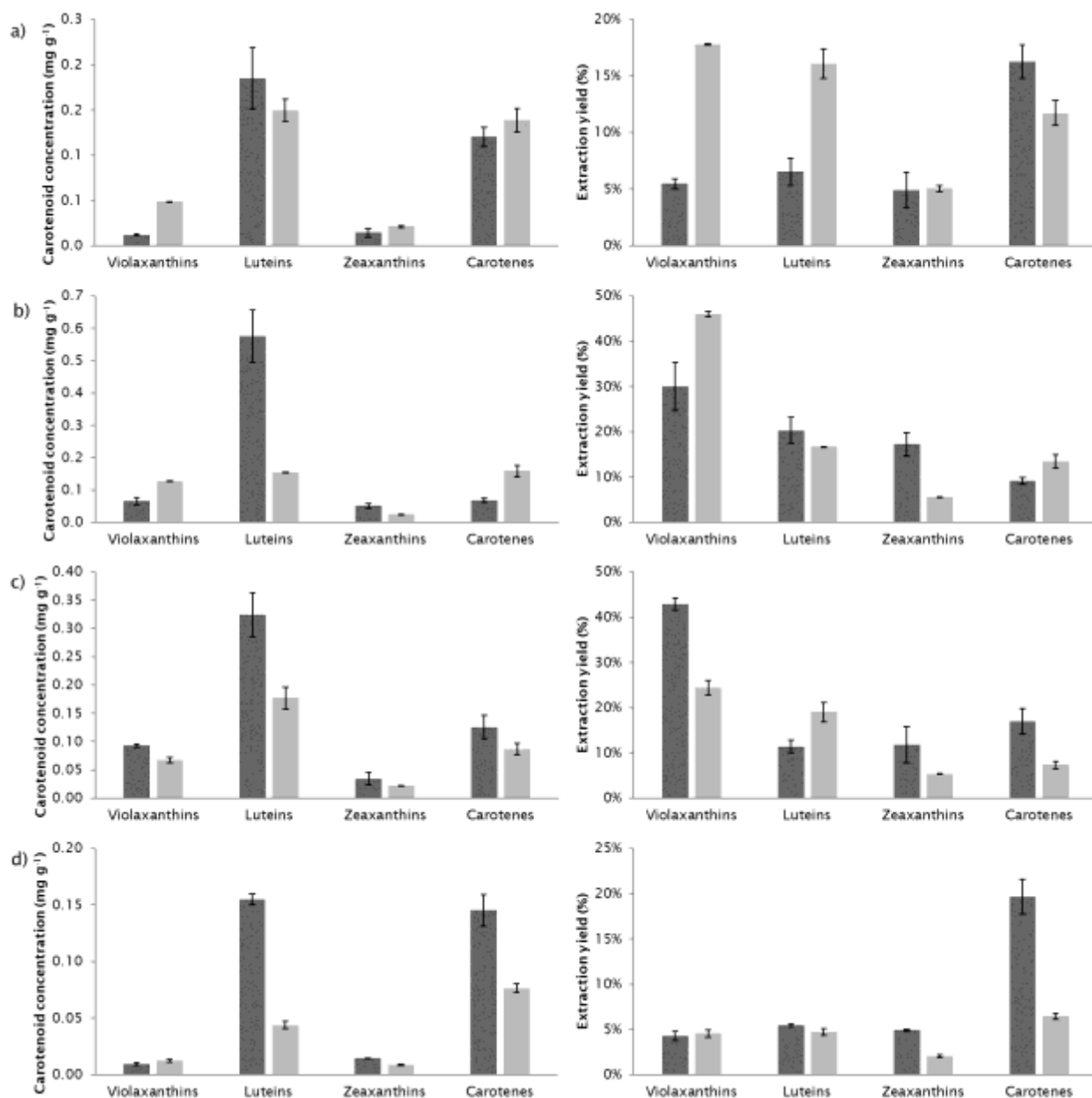
## Carotenoid profile of extracts

**Table S4.** Carotenoid profile of extracts of *C. sorokiniana*. Carotenoid concentrations (mg g<sup>-1</sup>) and extraction yields (in parenthesis, % of total content in biomass).

Carotenoid	Ethanol	Acetone	Ethyl acetate	Hexane
all-trans-violaxanthin	0.004 ± 0.000 (4.2 ± 0.1%)	0.032 ± 0.007 (31.1 ± 6.6%)	0.046 ± 0.009 (44.1 ± 8.7%)	0.003 ± 0.000 (2.6 ± 0.0%)
cis-violaxanthin	0.004 ± 0.001 (6.9 ± 1.5%)	0.024 ± 0.004 (41.8 ± 6.4%)	0.027 ± 0.004 (47.5 ± 7.5%)	0.003 ± 0.001 (5.6 ± 1.2%)
9-cis-violaxanthin	0.003 ± 0.000 (6.4 ± 0.3%)	0.009 ± 0.001 (15.8 ± 2.1%)	0.020 ± 0.007 (35.7 ± 13.5%)	0.003 ± 0.000 (6.0 ± 0.9%)
13-cis-lutein	0.003 ± 0.000 (1.2 ± 0.0%)	0.008 ± 0.001 (3.5 ± 0.5%)	0.018 ± 0.007 (7.5 ± 3.1%)	0.003 ± 0.000 (1.4 ± 0.1%)
13'-cis-lutein	0.006 ± 0.001 (4.1 ± 1.0%)	0.018 ± 0.001 (12.1 ± 0.8%)	0.012 ± 0.008 (8.1 ± 5.3%)	0.008 ± 0.000 (5.5 ± 0.3%)
all-trans-lutein	0.176 ± 0.032 (7.2 ± 1.3%)	0.549 ± 0.081 (22.4 ± 3.3%)	0.295 ± 0.038 (12.0 ± 1.5%)	0.144 ± 0.004 (5.9 ± 0.2%)
all-trans-zeaxanthin	0.011 ± 0.004 (10.3 ± 4.0%)	0.037 ± 0.006 (33.9 ± 5.2%)	0.026 ± 0.008 (23.4 ± 6.9%)	0.011 ± 0.000 (9.8 ± 0.1%)
cis-zeaxanthin	0.003 ± 0.000 (1.8 ± 0.1%)	0.014 ± 0.002 (7.4 ± 1.0%)	0.009 ± 0.004 (4.9 ± 2.2%)	0.004 ± 0.000 (2.0 ± 0.3%)
15-cis-β-carotene	0.002 ± 0.002 (3.1 ± 3.1%)	0.007 ± 0.000 (10.7 ± 0.8%)	0.004 ± 0.001 (5.9 ± 1.0%)	0.008 ± 0.001 (12.6 ± 0.9%)
all-trans-α-carotene	0.034 ± 0.002 (21.3 ± 1.6%)	0.004 ± 0.000 (2.3 ± 0.2%)	0.036 ± 0.002 (22.8 ± 1.2%)	0.037 ± 0.004 (23.6 ± 2.3%)
13-cis-β-carotene	0.005 ± 0.000 (10.1 ± 0.2%)	0.005 ± 0.000 (10.3 ± 0.5%)	0.009 ± 0.003 (16.9 ± 6.0%)	0.005 ± 0.000 (10.1 ± 0.7%)
all-trans-β-carotene	0.063 ± 0.005 (19.3 ± 1.6%)	0.046 ± 0.004 (14.1 ± 1.4%)	0.061 ± 0.018 (18.6 ± 5.5%)	0.077 ± 0.008 (23.5 ± 2.4%)
9-cis-β-carotene	0.016 ± 0.001 (11.8 ± 0.6%)	0.006 ± 0.000 (4.4 ± 0.3%)	0.016 ± 0.003 (11.8 ± 2.2%)	0.018 ± 0.002 (12.9 ± 1.2%)
<b>Total carotenoids</b>	<b>0.332 ± 0.050 (8.1 ± 1.2%)<sup>b</sup></b>	<b>0.759 ± 0.082 (18.6 ± 2.0%)<sup>a</sup></b>	<b>0.578 ± 0.074 (14.2 ± 1.8%)<sup>ab</sup></b>	<b>0.324 ± 0.017 (7.9 ± 0.4%)<sup>b</sup></b>
<b>Groups of carotenoids</b>				
Violaxanthins	0.012 ± 0.001 (5.5 ± 0.4%) <sup>b</sup>	0.065 ± 0.012 (30.0 ± 5.4%) <sup>a</sup>	0.093 ± 0.003 (42.9 ± 1.3%) <sup>a</sup>	0.009 ± 0.001 (4.3 ± 0.5%) <sup>b</sup>
Luteins	0.185 ± 0.034 (6.5 ± 1.2%) <sup>b</sup>	0.575 ± 0.081 (20.3 ± 2.9%) <sup>a</sup>	0.324 ± 0.039 (11.5 ± 1.4%) <sup>ab</sup>	0.155 ± 0.005 (5.5 ± 0.2%) <sup>b</sup>
Zeaxanthins	0.014 ± 0.005 (4.9 ± 1.6%) <sup>a</sup>	0.051 ± 0.008 (17.3 ± 2.6%) <sup>a</sup>	0.035 ± 0.012 (11.8 ± 4.0%) <sup>a</sup>	0.014 ± 0.000 (4.9 ± 0.1%) <sup>a</sup>
Carotenes	0.120 ± 0.011 (16.3 ± 1.5%) <sup>a</sup>	0.068 ± 0.005 (9.2 ± 0.7%) <sup>a</sup>	0.126 ± 0.021 (17.0 ± 2.8%) <sup>a</sup>	0.145 ± 0.014 (19.7 ± 1.9%) <sup>a</sup>

**Table S5.** Carotenoid profile of extracts of *H. luteoviridis*. Carotenoid concentrations (mg g<sup>-1</sup>) and extraction yields (in parenthesis, % of total content in biomass).

Carotenoid	Ethanol	Acetone	Ethyl acetate	Hexane
all-trans-violaxanthin	0.027 ± 0.003 (21.2 ± 2.3%)	0.077 ± 0.002 (60.4 ± 1.3%)	0.042 ± 0.004 (33.3 ± 3.0%)	0.006 ± 0.001 (5.0 ± 0.7%)
cis-violaxanthin	0.012 ± 0.003 (9.6 ± 2.7%)	0.024 ± 0.004 (19.2 ± 3.7%)	0.020 ± 0.009 (16.5 ± 7.0%)	0.003 ± 0.000 (2.3 ± 0.0%)
9-cis-violaxanthin	0.010 ± 0.000 (40.8 ± 0.9%)	0.026 ± 0.001 (104.3 ± 4.7%)	0.005 ± 0.000 (18.2 ± 1.4%)	0.003 ± 0.000 (13.2 ± 0.9%)
13-cis-lutein	0.005 ± 0.001 (5.1 ± 0.8%)	0.005 ± 0.001 (6.1 ± 0.9%)	0.007 ± 0.003 (8.0 ± 2.9%)	0.003 ± 0.000 (3.6 ± 0.1%)
13'-cis-lutein	0.005 ± 0.001 (10.7 ± 1.4%)	0.006 ± 0.000 (13.0 ± 0.8%)	0.006 ± 0.002 (12.8 ± 4.7%)	0.002 ± 0.000 (5.0 ± 0.0%)
all-trans-lutein	0.140 ± 0.011 (17.7 ± 1.3%)	0.143 ± 0.001 (18.1 ± 0.1%)	0.164 ± 0.020 (20.6 ± 2.5%)	0.038 ± 0.003 (4.8 ± 0.4%)
all-trans-zeaxanthin	0.018 ± 0.001 (4.6 ± 0.3%)	0.019 ± 0.000 (5.1 ± 0.1%)	0.017 ± 0.001 (4.4 ± 0.3%)	0.009 ± 0.001 (2.3 ± 0.2%)
cis-zeaxanthin	0.004 ± 0.000 (9.7 ± 0.3%)	0.004 ± 0.000 (11.7 ± 0.3%)	0.006 ± 0.001 (16.1 ± 3.9%)	0.000 ± 0.000 (0.0 ± 0.0%)
15-cis-β-carotene	0.004 ± 0.000 (15.9 ± 0.4%)	0.004 ± 0.001 (18.8 ± 4.0%)	0.002 ± 0.002 (7.2 ± 7.2%)	0.003 ± 0.000 (14.0 ± 0.1%)
all-trans-α-carotene	0.045 ± 0.004 (12.4 ± 1.2%)	0.054 ± 0.007 (14.9 ± 2.0%)	0.025 ± 0.005 (7.0 ± 1.4%)	0.024 ± 0.001 (6.8 ± 0.4%)
13-cis-β-carotene	0.016 ± 0.001 (8.8 ± 0.8%)	0.017 ± 0.006 (9.3 ± 3.0%)	0.008 ± 0.004 (4.2 ± 2.1%)	0.009 ± 0.000 (5.0 ± 0.2%)
all-trans-β-carotene	0.057 ± 0.005 (14.7 ± 1.4%)	0.065 ± 0.009 (16.7 ± 2.3%)	0.040 ± 0.001 (10.4 ± 0.3%)	0.030 ± 0.002 (7.9 ± 0.5%)
9-cis-β-carotene	0.017 ± 0.001 (7.5 ± 0.7%)	0.018 ± 0.005 (8.1 ± 2.3%)	0.012 ± 0.001 (5.3 ± 0.6%)	0.009 ± 0.000 (4.0 ± 0.2%)
Total carotenoids	0.359 ± 0.026 (12.8 ± 0.9%) <sup>b</sup>	0.464 ± 0.016 (16.5 ± 0.6%) <sup>a</sup>	0.353 ± 0.006 (12.6 ± 0.2%) <sup>b</sup>	0.142 ± 0.009 (5.1 ± 0.3%) <sup>c</sup>
<u>Groups of carotenoids</u>				
Violaxanthins	0.049 ± 0.000 (17.8 ± 0.0%) <sup>c</sup>	0.127 ± 0.002 (46.1 ± 0.6%) <sup>a</sup>	0.067 ± 0.004 (24.4 ± 1.6%) <sup>b</sup>	0.012 ± 0.001 (4.5 ± 0.4%) <sup>d</sup>
Luteins	0.150 ± 0.012 (16.1 ± 1.3%) <sup>a</sup>	0.155 ± 0.000 (16.7 ± 0.0%) <sup>a</sup>	0.177 ± 0.020 (19.0 ± 2.1%) <sup>a</sup>	0.044 ± 0.003 (4.7 ± 0.3%) <sup>b</sup>
Zeaxanthins	0.021 ± 0.001 (5.1 ± 0.3%) <sup>a</sup>	0.024 ± 0.000 (5.6 ± 0.0%) <sup>a</sup>	0.022 ± 0.000 (5.4 ± 0.1%) <sup>a</sup>	0.009 ± 0.001 (2.1 ± 0.2%) <sup>b</sup>
Carotenes	0.139 ± 0.013 (11.7 ± 1.1%) <sup>a</sup>	0.159 ± 0.018 (13.4 ± 1.5%) <sup>a</sup>	0.087 ± 0.001 (7.3 ± 0.8%) <sup>b</sup>	0.077 ± 0.004 (6.5 ± 0.3%) <sup>b</sup>



**Figure S2.** Carotenoid profile of extracts with grouped isomers of violaxanthin, lutein, zeaxanthin and carotene: (a) ethanol. (b) acetone. (c) ethyl acetate. (d) hexane.   
 ■ *C. sorokiniana*. ■ *H. luteoviridis*.

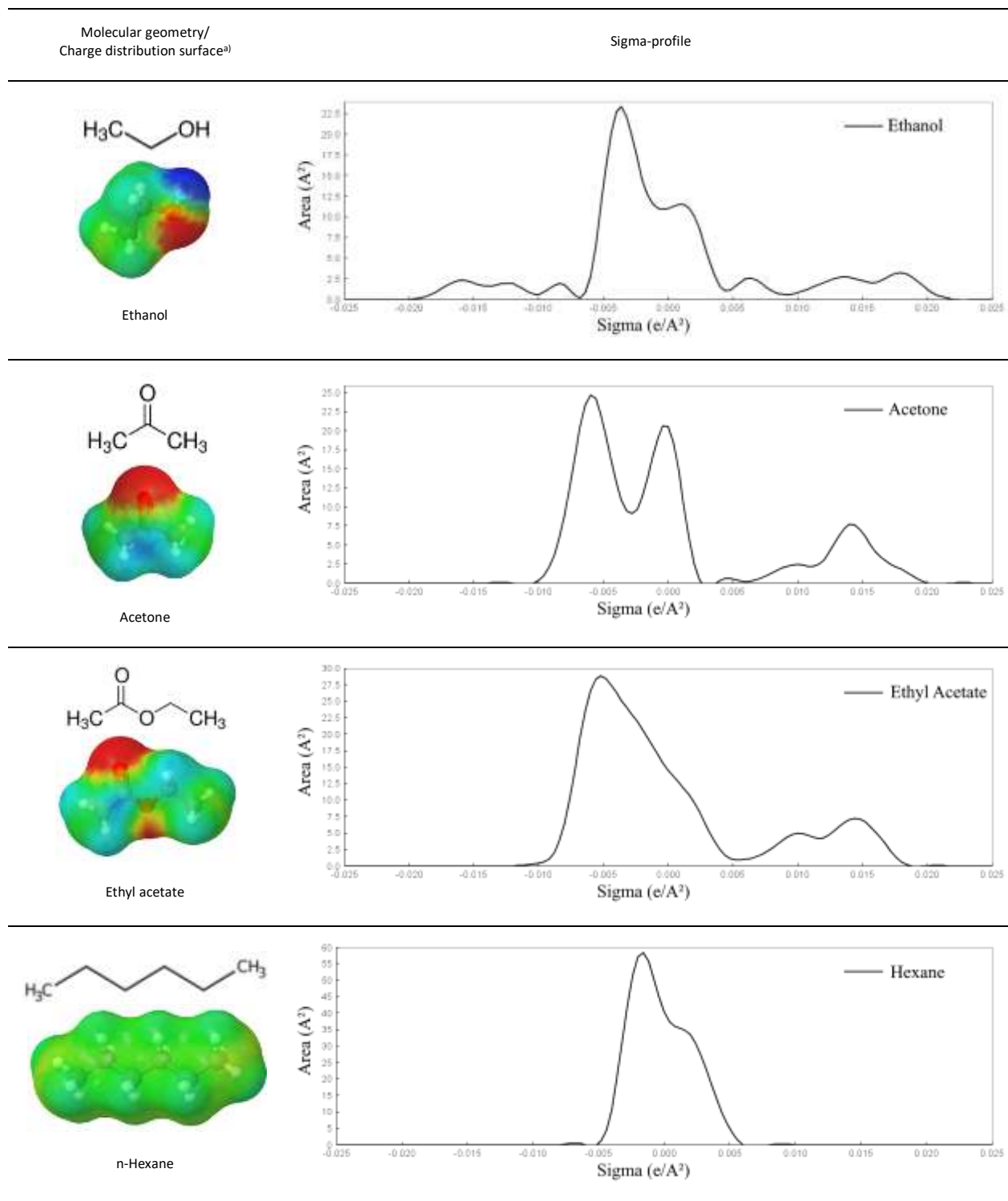
## COSMO-SAC

The activity coefficient is a thermodynamic measurement of the non-ideality of a mixture and is an indirect representation of a solute's affinity with the solvent it is diluted in. A value lower than unity for this property indicates that molecules present attractive forces as a result of similarities in polarity, hydrophilicity/lipophilicity, compatibility in partial charges, etc. Therefore, when a solute is diluted in a solvent it has affinity with, a highly negative value for the logarithm of its activity coefficient will be observed.

In this work, the tested ratios of solvent to solute were considered compatible with the premise of infinite dilution. This rendered IDACs an applicable assessment of the actual activity coefficients expected for the selected species in solution. Accordingly, the prediction of IDACs using COSMO-SAC was performed for the qualitative assessment of each tested solvent's capacity to solvate key-carotenoids studied in this work. The all-*trans* molecules of beta-carotene, lutein, violaxanthin and zeaxanthin were selected for this procedure, as these were the major isomers found by characterization of the *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana* biomasses used in this work. The molecule geometries, charge distribution surfaces and  $\sigma$ -profiles generated by COSMO calculations for solvents and all-*trans* isomers of carotenoids studied in this work are presented in Tables S6 and S7, respectively. Green areas are associated with non-polar regions in a molecule, while red and blue areas are associated with positive and negative charge distributions, respectively (KLAMT, 2005). As expected, the charge distribution predicted by COSMO calculations presented hexane as a non-polar molecule, while ethanol, acetone and ethyl acetate (known to be polar molecules) presented charge distributions associated with the presence of functional groups that importantly form hydrogen bonds (as hydrogen is bonded to oxygen in all these molecules). As for the key-carotenoids, all-*trans*-beta-carotene presented very low polarity while all xanthophylls presented charge distributions particularly associated with functional groups in their extremities. Strong hydrogen-bond interactions are present and have been accounted for and differentiated from other electrostatic contributions by COSMO-SAC.

The comparison of the electronic distribution in the molecules and of the  $\sigma$ -profiles of solvents and solutes give a better understanding of the results found for their pairings. Acetone's  $\sigma$ -profile presented an area distributed in the positive region of  $\sigma$  ( $e/\text{Å}^2$ ) in the range of 0.010 – 0.020. This positive charge distribution corresponds to the presence of the highly polar carbonyl group marked in red; it has an uneven distribution of electrons, which gives the carbon atom a partial positive charge. In turn, xanthophyll molecules showed charge distributions caused by the functional groups located in their extremities, and their  $\sigma$ -profiles presented an approximately similar area distributed in the same range of the negative region of  $\sigma$  ( $e/\text{Å}^2$ ). There is a compatibility both in polarity and in charge distribution which justifies acetone a good solvent for the extraction of these components.

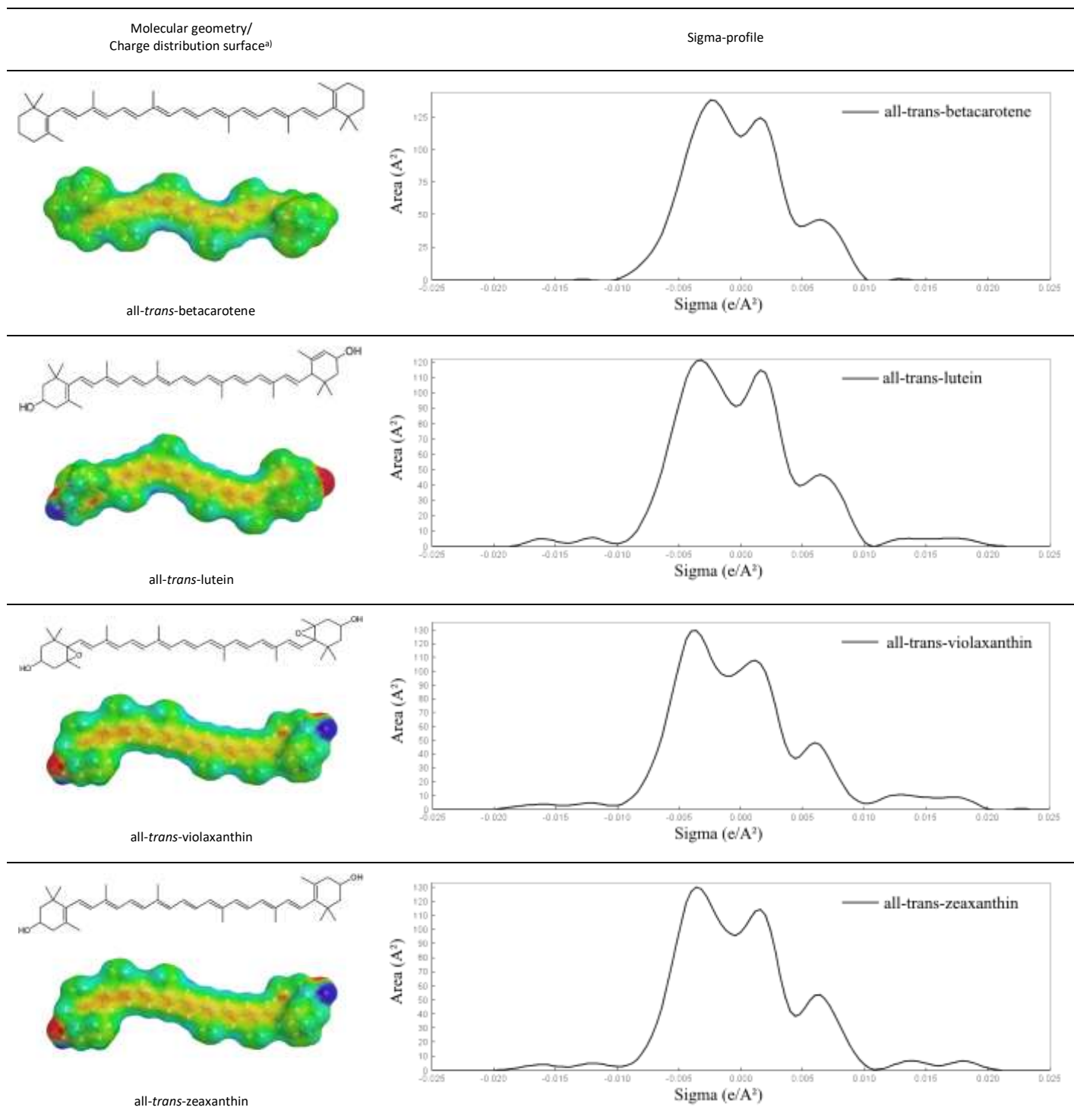
**Table S6.** Molecular geometries, charge distribution surfaces and sigma-profiles generated by COSMO-SAC for solvents used in this work.



<sup>a)</sup> Green areas are associated with non-polar regions in a molecule, while red and blue areas are associated with positive and negative charge distributions.



**Table S7.** Molecular geometries, charge distribution surfaces and sigma-profiles generated by COSMO-SAC for key-carotenoids evaluated in this work.



<sup>a)</sup> Green areas are associated with non-polar regions in a molecule, while red and blue areas are associated with positive and negative charge distributions.

### 4.2.6.3. References

- [22] H. K. Lichtenthaler, C. Buschmann, *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 2001, 1, F4.3.1.
- [23] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison, *J. Cheminform.* 2012, 4, 17.
- [24] M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. Su, T. L. Windus, M. Dupuis, J. A. Montgomery Jr, *J. Comput. Chem.* 1993, 14, 1347.
- [25] F. Ferrarini, G. B. Fl, A. R. Muniz, R. D. P. Soares, *P. May*, 2018, 64.
- [26] R. de P. Soares, G. B. Flôres, dudapelisser, vanessabx, F. Ferrarini, GabrielPastorello, annecarolinebelusso, 2020.
- [27] R. P. Gerber, R. D. P. Soares, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2010, 49, 7488.
- [28] T. Kuleshova, A. Likhachev, E. Pavlova, D. Kuleshov, A. Nashchekin, N. Gall, *Tech. Phys.* 2018, 63, 1243.
- [29] A. Klamt, *COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design*, Elsevier Science, 2005.

### **4.3.Artigo 2**

Nesta seção é apresentado o segundo artigo gerado neste trabalho de doutorado, publicado no periódico *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization* (<https://doi.org/10.1016/j.jcou.2021.101649>). Este estudo abordou a extração de pigmentos de microalgas empregando misturas de CO<sub>2</sub>+etanol sub e supercríticas.

**SUPERCRITICAL FLUID (CO<sub>2</sub>+ETHANOL) EXTRACTION OF CHLOROPHYLLS  
AND CAROTENOIDS FROM *Chlorella sorokiniana*: COSMO-SAC  
ASSISTED PREDICTION OF PROPERTIES AND EXPERIMENTAL APPROACH**

Allan Morcelli<sup>a,\*</sup>, Eduardo Cassel<sup>b</sup>, Rubem Vargas<sup>b</sup>, Rosane Rech<sup>a</sup>, Nilson Marcílio<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC  
91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil,

<sup>b</sup>Unit Operations Laboratory (LOPE), School of Technology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Av Ipiranga  
6681, Building 30, Block F, Room 208, ZC 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding author at: Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Av Ipiranga 6681, Building 30, Room F109, ZC  
90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail address: allan.morcelli@ufrgs.br (Allan Valcareggi Morcelli)

***Abstract***

In this work, COSMO-SAC was used to calculate infinite dilution activity coefficients ( $\gamma^\infty$ ) of carotenoids in CO<sub>2</sub>+ethanol mixtures as a theoretical approach to evaluate the effect of solvent composition on solute solubility. In an experimental approach, a central composite design was employed to evaluate the use of supercritical mixtures of CO<sub>2</sub>+ethanol to extract chlorophylls and carotenoids from the microalga *Chlorella sorokiniana*. The carotenoid profiles of extracts were fully evaluated, and the optimal conditions for the extraction of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenes, lutein, zeaxanthin and violaxanthin were differentiated. Extraction temperature, pressure and the composition of the solvent proved to be relevant factors, as the experimental conditions rendered fundamentally different extraction results. The presence of ethanol proved to be essential for the efficient extraction of chlorophylls and to substantially improve the recovery of carotenoids. Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate cell integrity, and indicated that the increase of pressure may have positively affected the extraction of compounds by causing disruption of the particles. The theoretical approach in this work was able to corroborate experimental results for the extraction of carotenoids from *C. sorokiniana*, reinforcing the hypothesis that carotenoids are extracted from the microalgal biomass as aggregates, and showing that COSMO-SAC is an important tool for the selection of the supercritical solvent.

**Keywords:** *Microalgae. Supercritical Fluid Extraction. COSMO-SAC. Carotenoids. Chlorophyll.*

#### 4.3.1. Introduction

Microalgae are single-celled photosynthetic organisms that are naturally present in different aqueous environments, and have been widely investigated due to their potential as biocatalysts or as raw materials for the production of biofuels, as well as for the mitigation of CO<sub>2</sub> emissions [1]. Nevertheless, they can be employed in the production of a broader spectrum of bioproducts, such as fuels, chemicals, materials, animal feed and food supplements [2]. Microalgal biomass has been preferred in comparison to other more traditional feedstocks for presenting productivities 10–100 times higher than land crops, highly efficient carbon capture, and for generally accumulating high concentrations of lipids and pigments. The cultivation of microalgae is a versatile nonseasonal process that does not require arable land to be used and may employ seawater, brackish water or even wastewater as media, allowing for year-long harvesting of biomass [3].

Among microalgal species that have been studied for their nutritional value, *Chlorella sorokiniana* has been highlighted as a rich source of carbohydrates, vitamins and proteins, and has to date been more widely employed in human and animal nutrition. It presents a high CO<sub>2</sub> fixation potential and is a valuable resource in the commercial production of important antioxidants such as lutein,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene [4]. *C. sorokiniana* has been reported to present high tolerance to high temperatures and solar radiation levels, features that render it suited for simpler cultivation in open ponds [5]. This microalgal species has been recently highlighted for its pigment content, as it is considered a rich source of chlorophyll and carotenoids [6]. However, there is limited knowledge to date specifically related to the extraction of these compounds from *C. sorokiniana* [7,8].

Chlorophyll is one of the valuable bioactive compounds synthesized by microalgae and it has been used as a coloring agent due to its selective absorbance of light in the red and blue regions, as changes in market and legislation generated a renewed demand for natural coloring for food products in preference to artificial colorings [9,10]. Importantly, the consumption of chlorophyll has also been associated to many medicinal benefits [11–13]. Due to its similar chemical structure to that of hemoglobin, chlorophyll stimulates tissue growth through the facilitation of a rapid carbon dioxide and oxygen interchange, and this property has made it applicable in the treatment of ulcers, oral sepsis, in proctology, while it is also suggested to play a key role in cancer prevention [14,15].

In turn, carotenoids are lipophilic pigments widely found in nature, that usually present a yellow, orange or red color. Among them, carotenes are hydrocarbon-only structures, while xanthophylls are the oxygenated derivatives of carotenes; the latter are relatively hydrophilic compounds due to the presence of hydroxyl groups and keto-groups at the end rings. In plant cells, the thylakoid membrane is the site of the light-dependent reactions of photosynthesis inside chloroplasts and cyanobacteria, and the photosynthetic pigments are embedded directly in it [16]. Carotenoids present high anti-oxidant activity, a property that allows them to protect cells from reactive radicals, prevent lipid peroxidation, and promote the stability and functionality of the photosynthetic apparatus [17]. However, this also renders carotenoids generally sensitive to light, oxygen and heat, making it more difficult to adequately produce, handle and store them [18]. Carotenoids have been studied for their many potential benefits to human health, such as strengthening the immune system, reducing the risk of degenerative diseases, acting in the neutralization of free radicals due to their antioxidant properties, and even for antiobesity/hypolipidemic activities [19]. Both vitamin A precursors (such as  $\beta$ -carotene) and non-precursors (such as lutein, zeaxanthin, and lycopene) have been shown to provide protective action against cancer [20], and act in the inhibition of other diseases where the neutralization of free radicals plays an important role [21]. However, concerns regarding the safety of chemically synthesized carotenoids to human consumption have surfaced, making the biotechnological production of carotenoids an emerging market [22]. Microalgae have been indicated as some of the best-suited biocatalysts for the mass production of carotenoids, due to their potentially high carotenoid content and fast growth when high efficiency photobioreactors and optimized growth conditions are employed in the cultivation steps [18].

The process of extracting value-added compounds from microalgae begins with dewatering the usually highly dilute microalgal culture, and then employing technology such as freeze or spray-drying to obtain cells with very low moisture content; chlorophylls and carotenoids can then be extracted from the dried biomass [9,23]. Supercritical fluid extraction (SFE) with CO<sub>2</sub> is regarded as a promising technique and an alternative to conventional solvent extraction methods to extract pigments from microalgae due to several distinct properties presented by fluids in this state of aggregation [24,25]. In general, studies that employed SFE with microalgae contemplated the extraction of

chlorophylls in conjunction with carotenoids [26,27]. In addition, ethanol has been the most widely used cosolvent, since it is generally permitted by legislations for food and pharmaceutical applications and increases the polarity of the otherwise non-polar solvent [28–30].

The development of efficient downstream processes for the purification of biomolecules depends on the acquisition of knowledge on the properties of the chemical species involved [31], as the overall distribution coefficient in extraction processes depends, to a variable extent, on a wide range of properties, such as the molecular size, charge, hydrophobicity, solubility and affinity between molecules [32]. In this context, the activity coefficient, a mixture property that provides a measurement of the non-ideality of the solution phase, is an important physicochemical property which fundamentally influences the partition coefficient for a species between phases. More specifically, infinite dilution activity coefficients ( $\gamma^\infty$ ) are of great value when accessing the equilibrium behavior of a compound very dilute in a phase [33], a condition that is compatible to that of the supercritical extraction of microalgal compounds. This renders the  $\gamma^\infty$  an important indicator of the affinity between solvent and solute in this type of separation process, and indirectly, of the extraction efficiency that can be achieved.

Therefore, the development and application of suitable thermodynamic models for the prediction of  $\gamma^\infty$  of biological molecules in solution is important. Quantum-chemistry-based predictive equilibrium models, known as COSMO-based models, are among recent developments in this field. Through them, the activity coefficient is calculated from the solvation-free energy of the molecules in a solution [34]. They depend on the pure substance information known as sigma-profile ( $\sigma$ -profile), which establishes a relationship between the fraction of the molecular surface to a corresponding charge density. A variant in the aforementioned group is COSMO-SAC (Conductor-like Screening Model for Real Solvent Segment Activity), a model that has had many applications in complex systems, such as the prediction behavior of polymer solutions and ionic liquids. In it, the calculation of the activity coefficient requires the  $\sigma$ -profile, the van der Waals surface area and the volume of each molecule in the mixture. It is, in essence, a predictive model, and has been gaining increased attention in the last years [35]. COSMO-SAC has been successfully employed for the prediction of properties of supercritical systems [36,37], although it has not been applied to carotenoids to date.

In this work, supercritical mixtures of CO<sub>2</sub>+ethanol were employed in the extraction of chlorophylls and carotenoids from the biomass of *Chlorella sorokiniana*, a novel approach to this microalgal species in particular. As a preliminary theoretical approach, COSMO-SAC was employed to assess the thermodynamic properties of the system through the prediction of infinite dilution activity coefficients ( $\gamma^\infty$ ) of different carotenoids as a function of solvent composition. In the experimental approach of this work, a central composite design (CCD) was used to evaluate the effects of process pressure, temperature and the volumetric fraction of ethanol over extraction efficiencies. In contrast to most studies present in literature to date, carotenoid profiles of extracts generated by this technology were fully evaluated, and the extraction of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenes, lutein, zeaxanthin and violaxanthin was differentiated. In addition, scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate cell disruption caused by the extraction processes and to correlate this factor to pigment recoveries.

#### 4.3.2. Materials and Methods

##### 1.1. Sigma-profile generation and $\gamma^\infty$ calculations

COSMO-SAC was employed for the qualitative assessment of the effect of the composition of solvent in the solvation of key-carotenoids found in *C. sorokiniana*. This was achieved by calculating the  $\gamma^\infty$  of key-carotenoids at infinite dilution ( $x \rightarrow 0$ ) and at constant temperature ( $T = 50$  °C, the center point of the experimental design), when these molecules were individually paired to varied molar compositions ( $x_i$ ) of CO<sub>2</sub> and ethanol. Solvent compositions were set at values contemplated within the range tested in the experimental approach of this work. In COSMO-SAC, each molecule is described by an apparent surface charge density distribution, which is determined by the method. This representation is usually simplified for better mathematical treatment as a single variable function known as a  $\sigma$ -profile, which, in turn, is obtained from the electronic structure of molecules, and computed by quantum chemistry methods which require parametrization. Therefore, prior to the parametrization of COSMO-SAC, the geometries of the *trans* isomers of  $\beta$ -carotene, lutein, violaxanthin and zeaxanthin were optimized by the steepest descent energy minimization method of Avogadro, an open-source molecular builder and visualization tool [38]. Then, the electronic structures of these molecules were calculated



using the freely available GAMESS quantum chemistry package [39]. A combination of Hartree-Fock (HF) method with the TZVP (Triple Zeta Valence plus Polarization) basis was used, as this was deemed to be the best approach for the generation of  $\sigma$ -profiles among the methods studied in a previous work [35]. These results have been incorporated to the sigma-profile and COSMO-SAC parametrizations database of LVPP and can be freely consulted at <https://github.com/lvpp/sigma/> [40]. JCOSMO was employed to generate  $\sigma$ -profiles and calculate  $\gamma^\infty$  using the COSMO-SAC-HB2 model. JCSOMO consists of an open-source implementation of the COSMO-SAC model in the Java programming language [41].

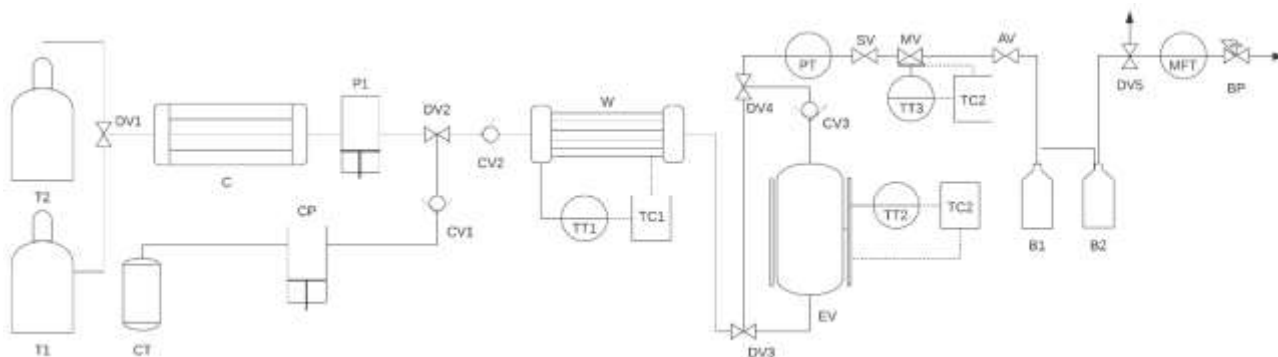
#### **4.3.2.1. Materials**

The biomass of *Chlorella sorokiniana* used in this work was purchased in powdered form from a company specializing in microalgal cultivation (Taiwan Chlorella Manufacturing CO Ltd, Taiwan) through a representative in Brazil (Paversul, Flores da Cunha-RS). This high-yielding freshwater microalgal strain was grown in open ponds and submitted to a patented high-pressure cell-disruption and homogenization technology prior to its commercialization. All biomass used in this work was homogenized prior to characterization procedures or extraction processes to avoid substrate variability. The moisture content in the biomass was determined by a standard thermogravimetric method in an oven at 105 °C (Method 44-15.0). The solvent used in supercritical fluid extraction experiments was carbon dioxide (99.9 % purity, Air Products, USA), and ethanol (99.5 % purity, Merck, Germany) was used as cosolvent. In addition, all materials used in the analytical methodology in this work presented high purity (> 96 %), and a certified reference all-*trans*- $\beta$ -carotene standard (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) was used in the high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses.

#### **4.3.2.2. Experimental apparatus**

The supercritical solvent was directed with a flow rate of 1 kg h<sup>-1</sup> through a 100 mL extraction vessel completely filled with microalgal biomass (*circa* 55.0 g). The

corresponding mass in each run was weighed using an analytical scale (BEL Engineering, Italy) and registered for yield calculations. Experimental conditions varied according to a central composite design, and the extraction time in all runs was 3 h. **Figure 1** shows a schematic diagram of the experimental apparatus used for extractions in this work [42]. It includes a positive liquid displacement pump (Thar P-200, USA) for solvent, a pump for cosolvent (ISCO 260D), a 100 mL high-pressure extraction vessel, and a separation flask. CO<sub>2</sub> flowrates were measured by a mass flowmeter and micrometering valves were used for flow control throughout the apparatus. Pressure in the extractor was monitored with a digital transducer system (Novus 8800021600, Novus Produtos Eletrônicos, Brazil) with a precision of  $\pm 1.0$  bar. The temperature of the extraction vessel was kept constant by automatic control of a heating jacket; the control system was connected to PT-100 thermocouples with an accuracy of 0.5 °C. Tubing throughout the extraction and separation sections was kept at constant temperature by the use of heating tapes. This prevented both freezing of the solvents and solid solute precipitation following depressurization, allowing for steady operation. Samples were collected continuously and separation flasks were replaced whenever they were filled with extracts.



**Figure 1:** schematic diagram of the experimental apparatus used in this work – (T) CO<sub>2</sub> cylinder; (CT) Cosolvent tank; (DV) Directional Valve; (C) condenser; (P) CO<sub>2</sub> Pump; (CP) Cosolvent Pump; (CV) Check Valve; (W) Pre-heater; (TT) Temperature Transmitter; (TC) Temperature Controller; (EV) Extraction Vessel; (PT) Pressure Transmitter; (SV) Shut-off Valve; (MV) “Micrometric” Valve; (AV) “Alluvium” Valve; (B) Separation Vessel; (MFT) Mass Flow Transmitter; (BP) Back Pressure Regulator.

#### 4.3.2.3. Experimental design and statistical analysis of data

A three-factor central composite design including triplicate experiments at the center

point was employed to evaluate the best experimental conditions for the extraction of pigments (**Table 1**), with temperatures ranging from 40 to 60 °C, pressures ranging from 100 to 300 bar and compositions of ethanol ranging from 0 to 10 % (v/v). Temperatures were selected within the aforementioned range due to indications in literature that high thermal degradation of carotenoids starts at 60 °C [43]; the pressure range tested corresponds to the operational limits of the experimental apparatus used in this work [44]; and the selected range for the addition of cosolvent was based on data from specific literature on the extraction of carotenoids and chlorophylls from microalgae [9,19,45] as well as results obtained in the theoretical approach in this work. The *locus* of the critical point for CO<sub>2</sub>+ethanol binary mixtures at different compositions was consulted in literature to indicate the condition correspondent to each point in the experimental design [47]. A subcritical condition was maintained in this study as there is indication in literature that subcritical extraction has rendered good pigment recovery from microalgae [46]. Experimental runs were performed at a randomized order and data analysis of experimental results, including model fitting and analysis of variance (ANOVA), was performed using Statistica 13 (TIBCO Software Inc., 2018), at a significance level of 0.05. A model considering the linear, quadratic and two-way effects of the studied variables was initially used and then reduced by incrementally removing the least significative effects, in such a way to obtain a simple fitted equation with a high regression coefficient composed of statistically significant effects. The full model may be generically represented by equation (1):

$$R = \alpha + \beta_1 T + \gamma_1 T^2 + \beta_2 p + \gamma_2 p^2 + \beta_3 E + \gamma_3 E^2 + \delta_1 TP + \delta_2 TE + \delta_3 PE \quad (1)$$

where  $R$  = the studied response (dependent variable);

$T$  = Temperature (°C);

$p$  = Pressure (bar);

$E$  = volumetric percentage of ethanol in the solvent (% v/v);

$\alpha, \beta_i, \gamma_i, \delta_i$  = parameters of the equation;

#### **4.3.2.4. Exhaustive extraction for the characterization of biomass**

The determination of the total amount of chlorophyll a, chlorophyll b, total carotenoids and the carotenoid profile of the biomass used in this work was carried out by exhaustive extraction performed using an adapted methodology [48]. The biomass was macerated with pistil grade and centrifuged at 10,000 g, 10 °C for 10 min (Hitachi, CR21GIII) repeatedly using ethyl acetate and methanol alternately until the biomass completely lost its pigmentation. This procedure was carried out at low light to prevent pigment degradation. When needed, overnight storage was done in amber flasks at -18°C in a freezer. Total extracts were generated in duplicates and submitted to the respective analytical procedures for quantification of chlorophyll and carotenoids, and the determination of the carotenoid profile.

#### **4.3.2.5. Total extract determination and sample preparation**

Extracts collected in the separation vessel in the experimental apparatus were quantitatively transferred by alternate washing with ethyl acetate and ethanol. This procedure was carried with the purpose of recovering both polar and non-polar extracted compounds that would otherwise be lost adhered to flasks. Samples were concentrated in a rotary evaporator at 30 °C (Fisatom, Model 450-5, Brazil), transferred into amber flasks and dried by the sparging of nitrogen gas at room temperature. The masses of total dry extracts were determined in an analytical scale (BEL Engineering, Italy) and samples were stored at -18°C in a freezer. All sample handling was carried out at low light at room-controlled temperature ( $23 \pm 2$  °C).

#### **4.3.2.6. Analysis of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids**

The extracts obtained in supercritical extraction experiments and in the exhaustive extraction methodology were submitted to an spectrophotometric analytical procedure for the determination of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids [49]. Pigment concentrations was determined by analyzing sample absorbance measured at wavelengths of 470 nm, 649 nm and 664 nm (GEHAKA, UV-330G, Brazil), and applying the adjusted equations of this methodology. All analyses were performed in duplicates.

#### **4.3.2.7.Determination of carotenoid profile**

The determination of the carotenoid profile of *C. sorokiniana* and of all extracts obtained experimentally in this work was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) according to a methodology previously described in literature [50]. Samples consisted of the total extract obtained from 5 mg dry biomass in the case of exhaustive extractions, and of a 1 mg dry extract sample in the case of supercritical extractions. Samples were saponified with a 10 % (w/w) methanolic KOH solution for 16 h at room temperature ( $23 \pm 2$  °C). After this saponification step was complete, samples were transferred into a mixture of petroleum ether:ethyl ether (1:1 v/v) and washing with distilled water was carried out to remove the alkali until neutral pH was achieved. The carotenoid-containing organic phase was separated and solvent was then removed by rotary evaporation (30 °C). Samples were completely dried by sparging nitrogen gas and stored frozen at -18 °C for a maximum period of 48 h (if needed) until chromatographic analyses were performed. The analysis of carotenoids was carried out using a high-performance liquid chromatograph (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japan) with a diode array detector (DAD) and a YMC C30 column (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm) using a linear gradient of methanol/MTBE as mobile phase (0.9 mL min<sup>-1</sup>, 29 °C). Samples were resuspended by mobile phase according to peak detection generated in chromatograms, and submitted to a quick application of ultrasound prior to injection. The spectra were measured between 200 and 600 nm and the chromatograms were processed at 450 nm. All sample manipulation was carried out in the absence of light.

#### **4.3.2.8.Scanning electron microscopy (SEM)**

The surface of *C. sorokiniana* and of the residual biomass from extraction processes was studied by scanning electron microscopy (SEM) at the Central Microscopy and Microanalysis Laboratory (LabCEMM) of PUCRS (Porto Alegre, Brazil). Freeze-dried cells were placed on a conductive double layer carbon support, coated with a layer of gold (Oerlikon Balzers, model SCD050, Switzerland), and examined using a Philips-FEI Quanta 200 microscope equipped with a field emission gun canon delivering a 20 kV

beam current. The qualitative assessment of the proportion of ruptured cells was carried out by the visual analysis of the generated images.

#### 4.3.2.9. Extraction efficiency calculation

The extraction efficiency achieved in each experimental condition has been calculated to facilitate the assessment of the quality of extractions. It represents the amount of each solute that could be recovered from its original content in the substrate (determined by characterization through exhaustive extraction), as pigment content in microalgae may vary substantially, depending on the strain and the cultivation conditions. Therefore, to calculate the extraction efficiency of each compound in supercritical fluid extractions, equation (2) was used:

$$\text{Extraction efficiency (\%)} = \frac{m_{ext}}{m_0} \times 100 \% \quad (2)$$

with,

$m_{ext}$  = mass of compound recovered in the extract per gram of dry biomass, mg g<sup>-1</sup>

$m_0$  = mass composition of the compound in the dry microalgal biomass (quantified by the exhaustive extraction methodology), mg g<sup>-1</sup>

### 4.3.3. Results and Discussion

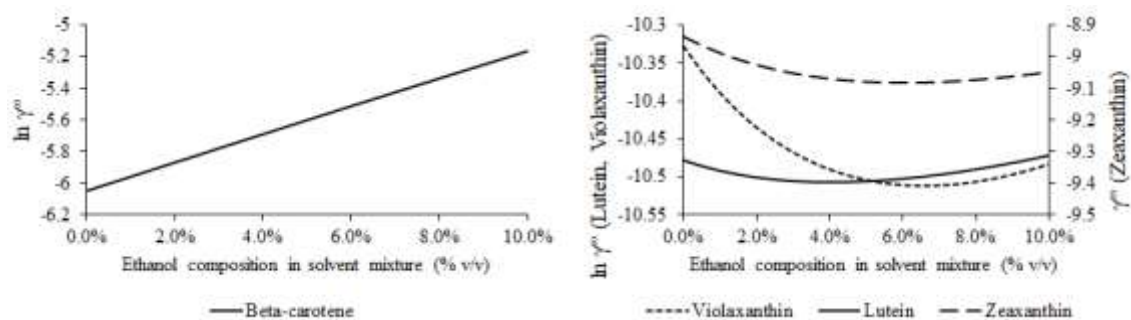
#### 4.3.3.1. Sigma-profiles and $\gamma^\infty$ calculated by COSMO-SAC

COSMO-SAC was employed to generate charge distribution surfaces and  $\sigma$ -profiles of the chemical species contemplated in this study (**Tables 2 and 3**). In these surface representations, green areas are associated with non-polar regions in a molecule, while red and blue areas are associated with positive and negative charge distributions. These, along with the single function mathematical representation of  $\sigma$ -profiles, allowed for the

assessment of the compatibility between solvent and solute. Molecules presenting similar polarities and complementary charge distributions (i.e., complementary  $\sigma$ -profiles) will present affinity for each other, while a difference in polarity and a similarity in charge distribution will result in a lack of affinity, and therefore reduced solubility.

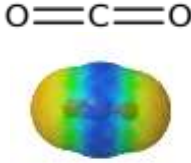
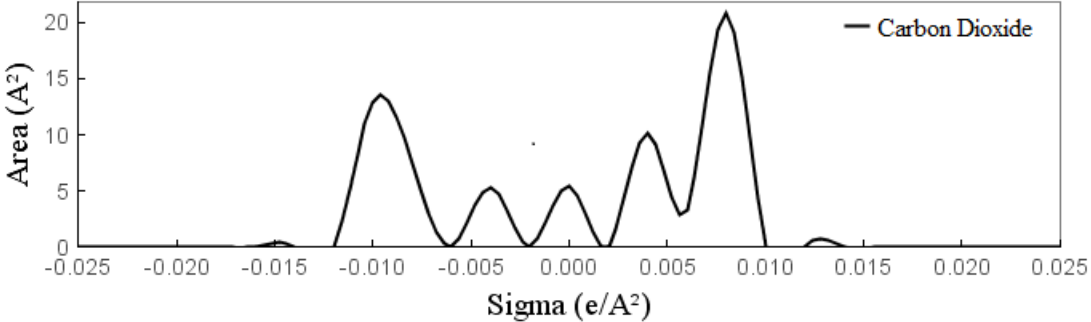
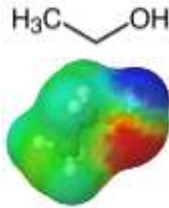
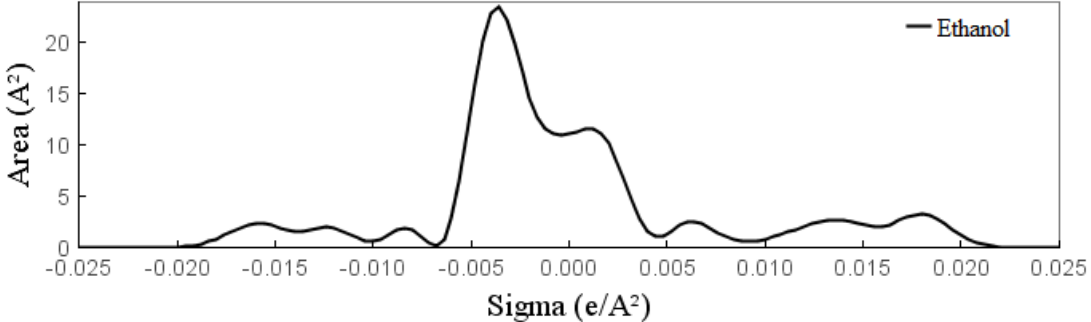
The  $\gamma^\infty$  of key-carotenoids were calculated at  $T = 50$  °C, the center point of the experimental design used in this work. Each molecule was individually paired with varied molar compositions ( $x_i$ ) of CO<sub>2</sub> and ethanol, and the qualitative assessment of the effect of the composition of the solvent was represented by the logarithm of the  $\gamma^\infty$ . The activity coefficient is a thermodynamic measurement of the non-ideality of a mixture and is an indirect representation of the affinity of a solute with the solvent it is diluted in as a result of similarities in polarity, hydrophilicity/lipophilicity, compatibility in partial charges, etc. The logarithms of  $\gamma^\infty$  are presented as a function of the volumetric composition of ethanol in the solvent (**Figure 2**).

The results were compatible with the differences in polarity found between the molecules and the increase in solvent polarity that results from increments in the ethanol composition.  $\beta$ -carotene, a non-polar molecule was predicted to present the highest affinity with pure CO<sub>2</sub>, which is also non-polar. The behavior of the logarithm of  $\gamma^\infty$  presented a minimum within the tested range for all xanthophylls. The predicted optimal composition of ethanol in the solvent was 4.0 % for lutein, 6.6 % for violaxanthin and 6.1 % for zeaxanthin. These theoretical results were used to establish the range of compositions to be tested in the experimental approach of this work (0 – 10 % v/v), as they composed an indication that the conditions of maximum extraction would be contained within it. Furthermore, results obtained by COSMO-SAC have been compared to the optimal conditions found in the experimental approach in this work, and further discussion can be found in the respective session. However, it should be noted that competition for solubility between solutes or even eventual positive synergies have not been taken into account in this theoretical approach. Offsets from modeling insights can be explained by the higher complexity of the SFE system in relation to this simplified study employing COSMO-SAC.



**Figure 2:** COSMO-SAC prediction of the logarithms of  $\gamma^\infty$  as a function of the ethanol composition in the solvent (% v/v)

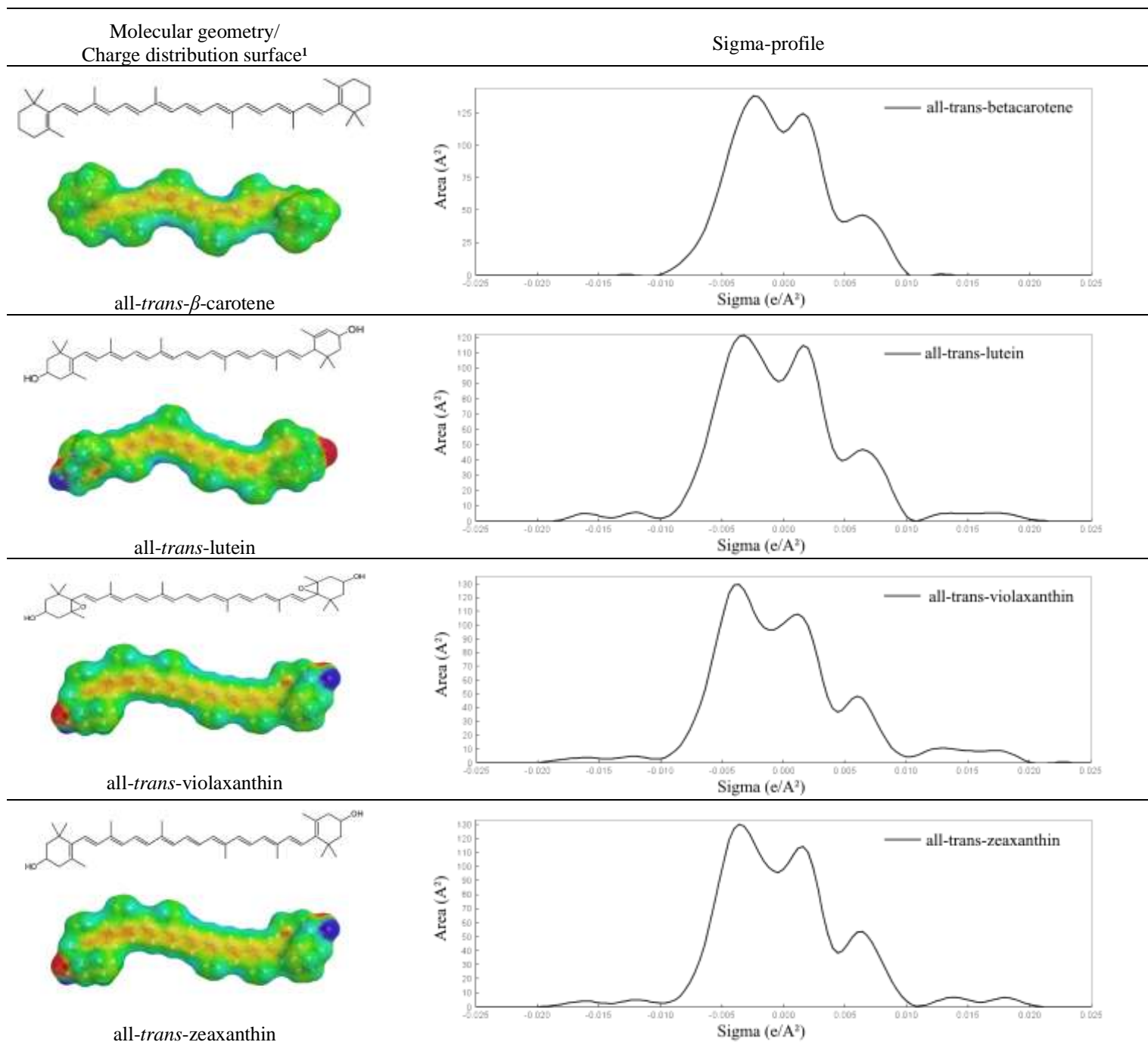
**Table 2:** molecular geometries, charge distribution surfaces and sigma-profiles generated by COSMO-SAC for solvents used in this work.

Molecular geometry/ Charge distribution surface <sup>1</sup>	Sigma-profile
 <p>Carbon Dioxide</p>	
 <p>Ethanol</p>	

<sup>1</sup> Green areas are associated with non-polar regions in a molecule, while red and blue areas are associated with positive and negative charge distributions.



**Table 3: molecular geometries, charge distribution surfaces and sigma-profiles generated by COSMO-SAC for key-carotenoids evaluated in this work.**



<sup>1</sup> Green areas are associated with non-polar regions in a molecule, while red and blue areas are associated with positive and negative charge distributions.

#### 4.3.3.2. Biomass characterization

The *C. sorokiniana* biomass used in this work presented itself as a fine powder with  $6.58 \pm 0.25$  % moisture content. Exhaustive extraction was carried out for the determination of its composition. A spectrophotometric analysis of the total extract showed that the pigment content in biomass was  $12.71 \pm 0.19$  mg g<sup>-1</sup> chlorophyll a,  $4.76 \pm 0.12$  mg g<sup>-1</sup> chlorophyll b, and  $3.91 \pm 0.10$  mg g<sup>-1</sup> total carotenoids (**Table 1**). These results are corroborated by those previously reported for *C. sorokiniana* [8] and the proportion between chlorophyll a and chlorophyll b is consistent with each of their roles in photosynthesis, as a primary and an accessory pigment, respectively [51]. The determination of the carotenoid profile of the biomass was carried out by HPLC analysis of the total extract (**Table 4**). This indicated a high lutein content as the major pigment in *C. sorokiniana* ( $2.797 \pm 0.051$  mg g<sup>-1</sup>), followed by a distribution of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene ( $0.756 \pm 0.052$  mg g<sup>-1</sup>), zeaxanthin ( $0.302 \pm 0.009$  mg g<sup>-1</sup>), and violaxanthin ( $0.215 \pm 0.018$  mg g<sup>-1</sup>). The all-*trans* isomers of these carotenoids were their primary conformation; however, a distribution of *cis* isomers was found for all molecules at lower concentrations. The carotenoid content found in *C. sorokiniana* was also similar to that previously reported in literature highlighting the concentration of lutein and  $\beta$ -carotene in this particular strain [8,52,53].

#### 4.3.3.3. Supercritical fluid extractions

##### Total extracts

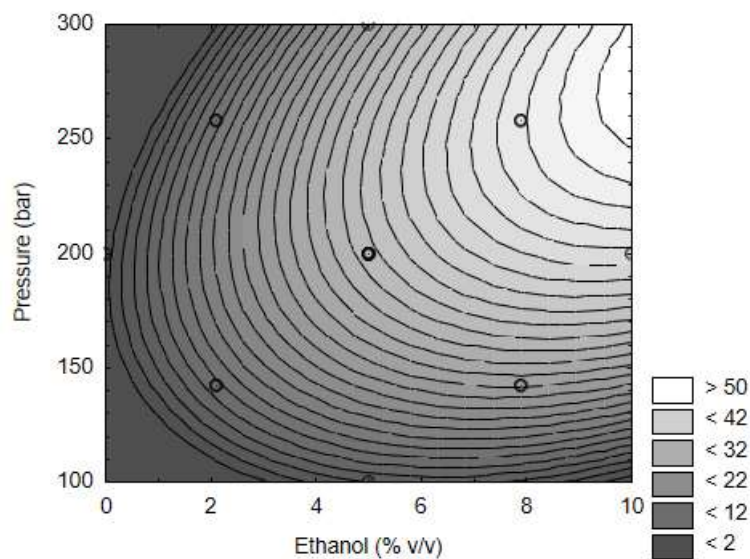
Total extract yield achieved by supercritical fluid extractions was determined gravimetrically and proved to be significantly influenced by pressure and by the amount of ethanol in the solvent (**Table 5, with pareto charts presented in Supplementary Material**). The observed behavior indicated that increasing the amount of ethanol rendered higher total extract yields, and that the increase of pressure at high ethanol amounts had the same effect, but was approximately indifferent at low amounts (**Figure 3**). The observed effect of pressure is in accordance with the fact that, at constant temperature, the fluid density increases with increasing pressure and the solubility of the solute is enhanced [54]. In turn, the increase of the ethanol composition in mixture with

CO<sub>2</sub> increases solvent polarity, solubilizing a vast array of microalgal compounds, including chlorophylls, as will be further discussed. In this context, it is important to note that a high total extract yield does not correspond to the generation of an extract rich in all pigments. Generally, high total extract yields correlated to high chlorophyll but low total carotenoid yields. Overall, highly variable experimental results were found for total extracts, which indicated that the extraction of microalgal compounds is strongly dependent on extraction conditions and the process could be optimized depending on the aim of the extraction. The lowest total extract yield (5.43 mg g<sup>-1</sup>) was observed at a low pressure and low ethanol condition (55.8 °C, 142.3 bar and 2.1 % ethanol), while the highest (59.03 mg g<sup>-1</sup>) corresponded to a high pressure and high ethanol condition (44.2 °C, 257.7 bar and 7.9 % ethanol).

**Table 5:** Estimated effect and analysis of variance ( $p < 0.05$ ) for total extract yield, and chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoid extraction efficiencies. The linear, quadratic and 2-way effects of temperature ( $T$ ), pressure ( $P$ ) and ethanol percentage in the solvent ( $E$ ) were considered.

Variable	Total extract		Chlorophyll a		Chlorophyll b		Total carotenoids <sup>1</sup>	
	Effects	$p$ -value	Effects	$p$ -value	Effects	$p$ -value	Effects	$p$ -value
$T$	-	-	4.548	0.198	3.756	0.589	0.779	0.750
$T^2$	-	-	-9.189	0.020	-20.980	0.022	-15.653	0.000
$P$	12.623	0.002	7.604	0.042	13.752	0.076	1.680	0.495
$P^2$	-12.060	0.004	-	-	-	-	-16.722	0.000
$E$	25.714	0.000	17.588	0.000	37.423	0.001	-4.962	0.063
$E^2$	-8.039	0.033	-7.907	0.039	-19.560	0.030	-13.138	0.000
$T \times P$	-	-	-	-	-	-	-	-
$T \times E$	-	-	-	-	-	-	-	-
$P \times E$	10.822	0.027	-	-	-	-	-	-
$R^2$	0.902		0.806		0.846		0.877	
$LOF$ $p$ -value	0.046		0.110		0.111		0.106	

<sup>1</sup> = Total carotenoid extraction efficiency analyzed by spectrophotometry;  $LOF$  = Lack of fit



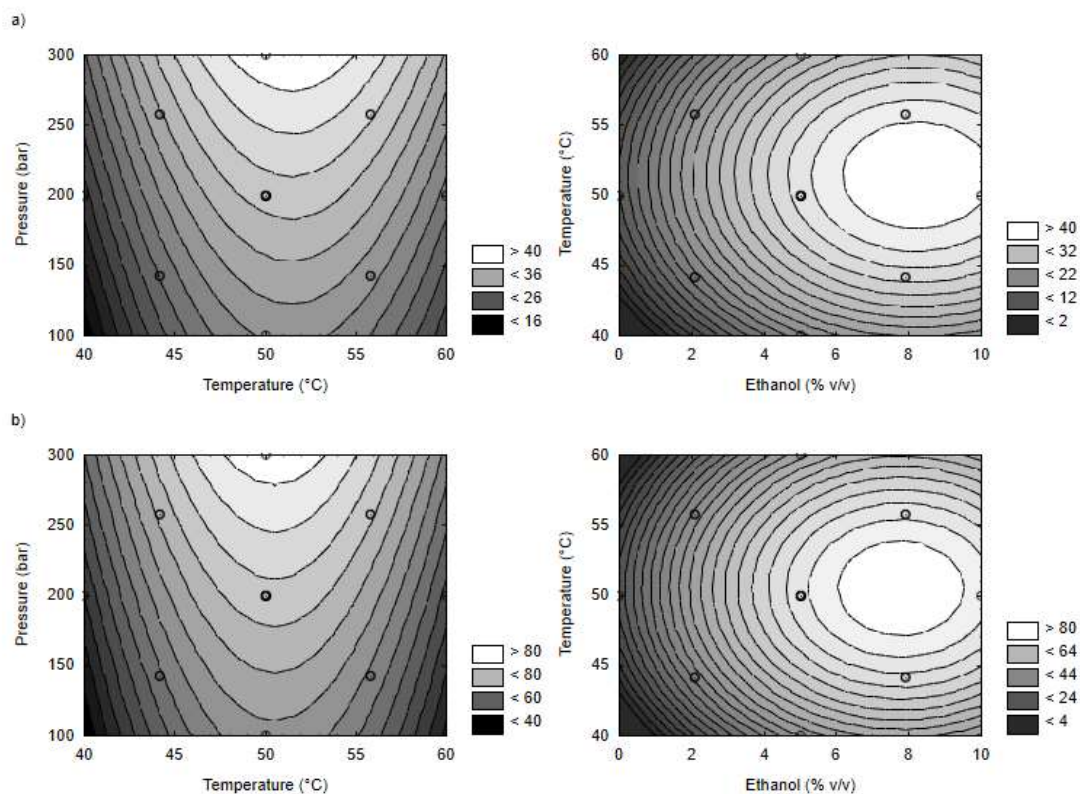
$$R = -60.925 + 6.722 \times 10^{-1} \cdot p - 1.811 \times 10^{-3} \cdot p^2 + 2.745 \cdot E - 4.780 \times 10^{-1} \cdot E^2 + 3.234 \times 10^{-2} \cdot p \cdot E$$

**Figure 3:** Contour plot showing total extract recovery ( $\text{mg g}^{-1}$ ) as a function of extraction pressure and the amount of ethanol in the solvent (% v/v). Slice at  $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Chlorophyll a and chlorophyll b

Temperature, pressure and the amount of ethanol in the solvent were all statistically significant factors influencing chlorophyll a and chlorophyll b extraction (**Table 5**), and a qualitatively similar dependence on these factors was found for both compounds. Increasing extraction efficiencies were found at higher pressures and higher amounts of ethanol, while an intermediate temperature rendered the best results (**Figure 4**). The increase in solubility with increasing temperatures is thought to be counter-balanced by chlorophyll degradation at higher temperatures, as chlorophyll is known to be highly reactive [9]. The similar dependence on pressure and ethanol found in the extraction of chlorophylls compared to the recovery of whole extracts suggests that this pigment group had a major impact in total extraction. The experimental results found in this work showed that the use of supercritical mixtures of  $\text{CO}_2$  and ethanol is an efficient technology for the extraction of chlorophylls from microalgal biomass. Temperature ranging  $50 - 52 \text{ }^\circ\text{C}$  and the application of high pressure (300 bar or higher) with a solvent containing 8.0 % v/v ethanol are suggested conditions to maximize recovery. In addition, it was found that chlorophyll-rich extracts may be achieved with high selectivity when carotenoids are also present in the substrate. Chlorophyll a recovery ranged from  $0.29 \pm 0.06 \text{ mg g}^{-1}$  ( $50.0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

200.0 bar and pure CO<sub>2</sub>) to  $6.15 \pm 0.07 \text{ mg g}^{-1}$  (55.8 °C, 257.7 bar and 7.9 % ethanol), while chlorophyll b recovery ranged from  $0.19 \pm 0.03 \text{ mg g}^{-1}$  (50.0 °C, 200.0 bar and pure CO<sub>2</sub>) to  $4.73 \pm 0.13 \text{ mg g}^{-1}$  (44.2 °C, 257.7 bar and 7.9 % ethanol). Importantly, when pure CO<sub>2</sub> (a non-polar solvent) was employed, an extract nearly free of polar chlorophylls was produced. However, the addition of the polar ethanol to the solvent rendered it capable of recovering chlorophylls efficiently, as the best extraction efficiencies in this work were  $48.4 \pm 0.5 \%$  chlorophyll a and  $99.4 \pm 2.7 \%$  chlorophyll b (**Table 1**).



$$R(a) = -362.293 + 14.049 \cdot T - 1.366 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 6.590 \times 10^{-2} \cdot p + 7.733 \cdot E - 4.701 \times 10^{-1} \cdot E^2$$

$$R(b) = -798.390 + 31.507 \cdot T - 3.118 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 1.192 \times 10^{-1} \cdot p + 18.081 \cdot E - 1.163 \cdot E^2$$

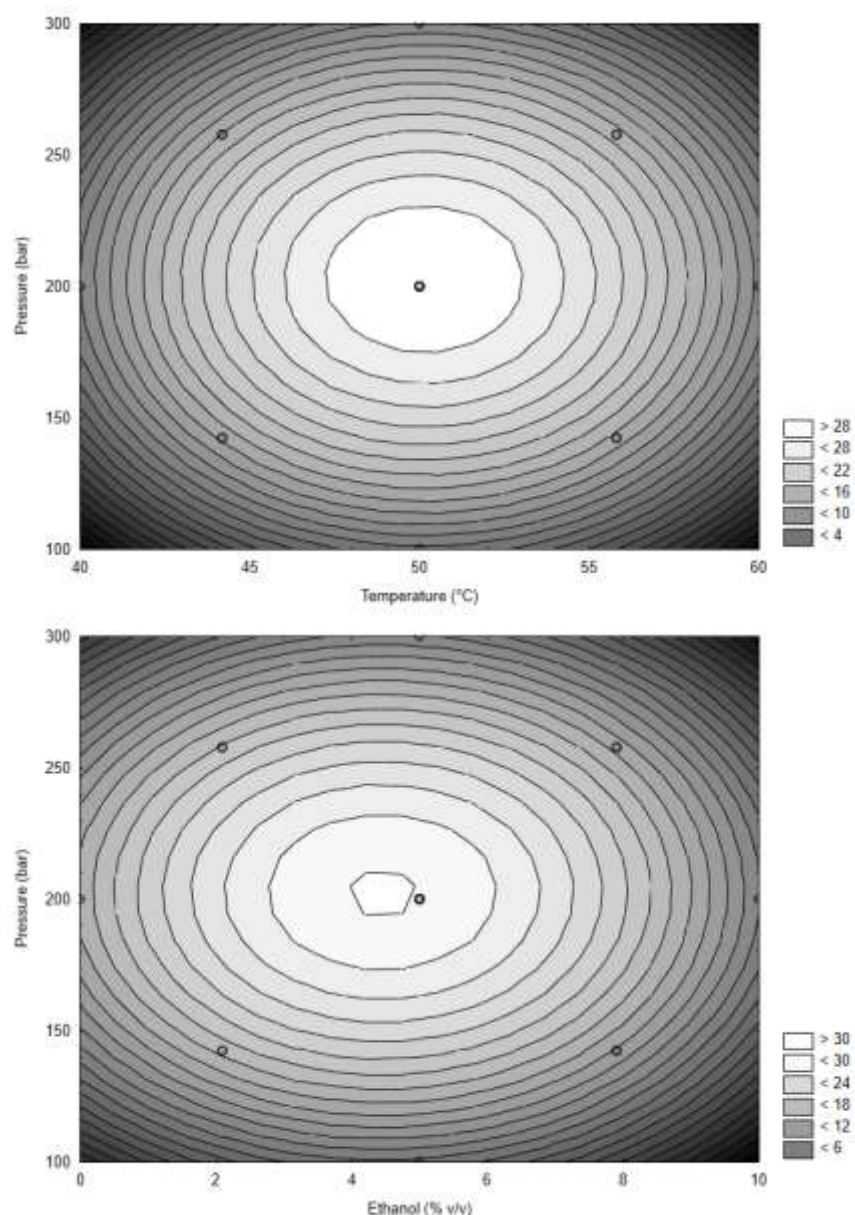
**Figure 4:** Contour plots showing extraction efficiency (%) as a function of the extraction pressure and temperature (slice at  $E = 5.0 \%$  v/v), and as a function of temperature and the amount of ethanol in the solvent (% v/v, slice at  $p = 200$  bar): (a) chlorophyll a, (b) chlorophyll b.

### Total carotenoids

The application of supercritical fluid extraction proved capable of extracting carotenoids from microalgal biomass, and again the process proved to be strongly dependent on the

experimental conditions. Coherently, temperature, pressure and the composition of solvent presented statistically significant effects on total carotenoid extraction efficiencies, and maximum extraction is predicted at 50.1 °C, 202.9 bar and 4.5 % ethanol (contour plots are shown in **Figure 5**). Overall, total carotenoid yields ranged from  $0.07 \pm 0.01 \text{ mg g}^{-1}$  (50.0 °C, 100.0 bar and 5.0 % ethanol – the only sub-critical condition tested) to an average  $1.17 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$  at the center point (50.0 °C, 200.0 bar and 5.0 % ethanol), corresponding to a maximum  $30.0 \pm 1.3 \%$  efficiency (**Table 1**). Comparing these two extreme results exemplifies how the change in pressure, and in this case, the resulting transition in the state of the solvent to supercritical, may highly influence carotenoid extraction. Importantly, pure CO<sub>2</sub> was highly selective to carotenoids, generating a rich extract ( $0.1 \text{ g carotenoids g}^{-1}$  dry extract), although at a lower total carotenoid extraction efficiency ( $21.0 \pm 0.4 \%$ ) compared to the aforementioned best condition.

The solubility of compounds in a supercritical fluid and the selectivity of the extraction process both depend greatly on the equilibrium between fluid density and solute vapor pressure, which are affected by temperature and pressure. Generally, at constant pressure, the increase of temperature reduces the density of the fluid, thus reducing its solvating power, but it enhances the vapor pressure of extractable compounds, consequently increasing analyte solubility and extraction yield [25]. Therefore, the increased capacity of the solvent to extract carotenoids at higher temperatures is believed to have been counterposed by the accompanied effect of greater carotenoid degradation, as this has been indicated to occur within the higher temperature range tested in this work [55]. Maximum carotenoid extraction will be found in an intermediate temperature (50.1 °C) at which these opposing effects are expected to allow for increased solvating power and lower degradation.



$$R = -673.607 + 23.332 \cdot T - 2.327 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 1.019 \cdot p - 2.511 \times 10^{-3} \cdot p^2 + 6.956 \cdot E - 7.811 \times 10^{-1} \cdot E^2$$

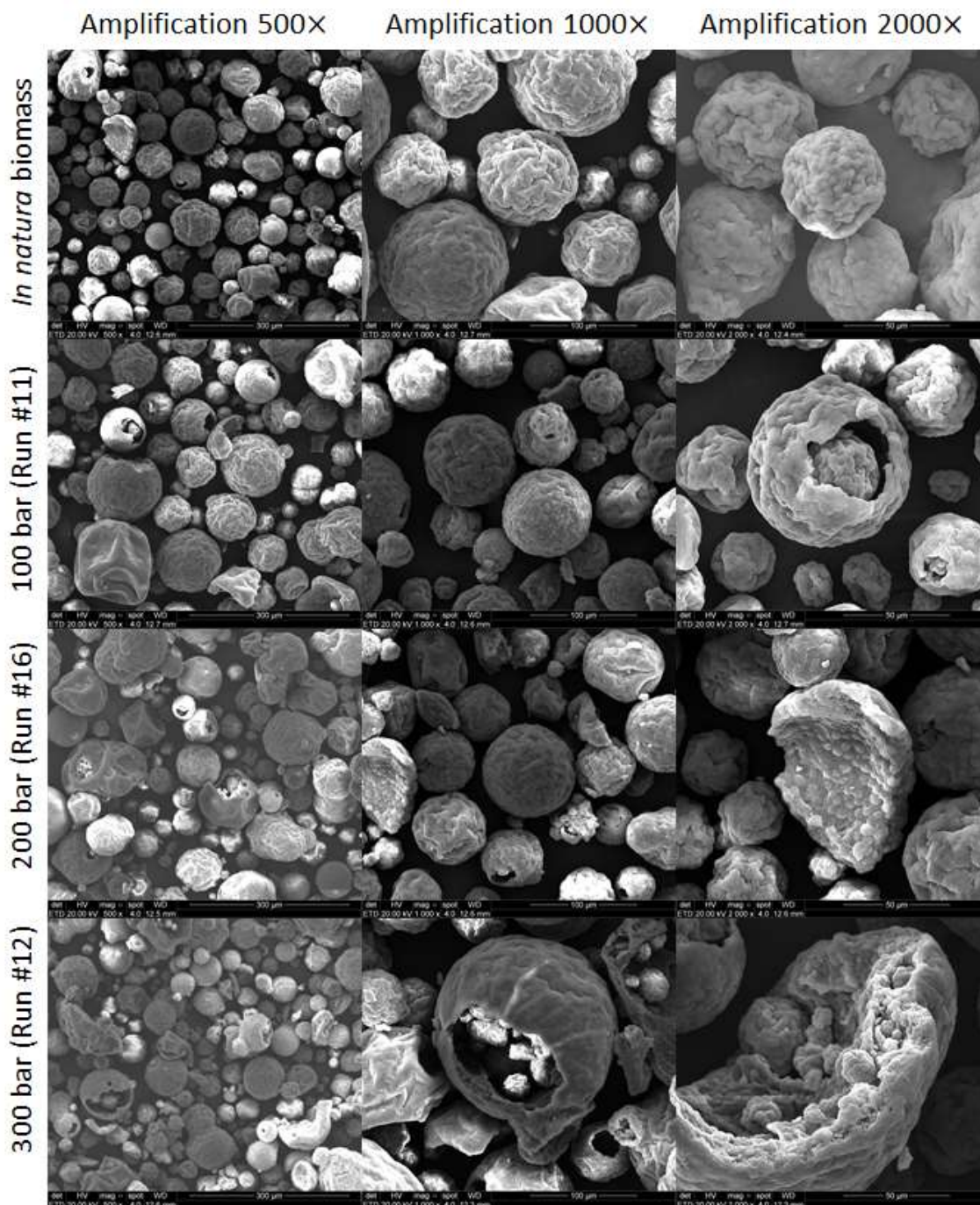
**Figure 5:** Contour plots showing total carotenoid extraction efficiency (%) as a function of the extraction pressure and temperature (slice at  $E = 5.0$  % v/v) and as a function of pressure and the amount of ethanol in the solvent (% v/v, slice at  $T = 50$  °C).

The fluid density increases with increasing pressure at constant temperature and, accordingly, increases the solubility of the analyte [54]. This positive effect of pressure over efficiency within the lower range is thought to have been aided by the resulting disintegration in microalgal clusters observed by SEM, as seen in selected images presented at various magnifications to evaluate the surface of the microalgal biomass

(Figure 6). The *in natura* *C. sorokiniana* biomass had an average cell size of 5  $\mu\text{m}$  and formed well-defined spherical clusters ranging 50-200  $\mu\text{m}$  in average, presenting rough surfaces. These morphological aspects had been previously reported, and cell clusters, known to be formed by the excretion of extracellular polymeric substances (EPS), are assumed to allow for solvent contact in their interior, as they either presented openings or were inherently open structures [8]. Increased particle disintegration was observed in the biomass after it had been submitted to the extraction procedure. Low-pressure conditions generally resulted in low disintegration, as represented by the 100 bar condition (Run #11). At higher pressure conditions, there was a substantial increase in disintegration, as seen for the biomass recovered after extraction at 200 bar (Run #16) and 300 bar (Run #12). Supercritical and high-pressure extraction technologies have been previously employed with the purpose of cell disruption to yeasts and bacteria, as the sudden release of the applied pressure will allow the solvent to penetrate into the cells, forcing the cell wall and causing cell disruption [56,57]. Regarding the expected effect of this phenomenon on extraction results, it is known that changes in particle size (and, in the case of the current study, in the aggregation of microalgal clusters) will result in an increase in the total area available for mass transfer and in the reduction of the diffusion path for the solvent, allowing for higher recovery.

However, at higher pressures, caking in the extraction vessel may have partially contributed to the observed decrease in extraction efficiency, as the *C. sorokiniana* biomass presented as a fine hygroscopic powder that was found tightly compacted at the end of extraction at higher pressures. When caking occurs, particles get consolidated within the packed bed extractor, opposing the passage of fluids and resulting in poor solvent contact caused by channeling through preferential pathways [58]. Caking is speculated to have been one of the factors contributing to the overall low extraction efficiencies found in this work. Altogether, the behavior found for total carotenoid extraction efficiency as a function of pressure is attributed to the balance between the increase in solubility and cell disintegration with increasing pressures and the counterposing effect of caking, resulting in the aforementioned optimal pressure (202.9 bar) to be an intermediate value.





**Figure 6:** Images generated by scanning electron microscopy (SEM) of the *C. sorokiniana* biomass used in this work *in natura* and after extractions at 100 bar, 200 bar and 300 bar at 500×, 1,000 × and 2,000 × amplifications.

As for the solvent employed for extraction, an intermediate amount of ethanol (4.5 %) led to more efficient carotenoid extraction; this is thought to be related to the high content of lutein and other xanthophylls in the biomass of *C. sorokiniana* used in this work, as these

molecules present higher polarity compared to non-polar carotenes. The addition of ethanol increased solvent polarity and therefore the mixture presented higher affinity with the xanthophylls. However, this change in polarity also notably enabled the solubilization of chlorophylls, to the detriment of extraction selectivity.

#### 4.3.3.4. Carotenoid profile of extracts

All extracts were analyzed by HPLC in order to differentiate the carotenoid composition in them, as changes in process conditions may be better suited for the extraction of different compounds (**Table 4**). Total carotenoid content was calculated as the sum of all detected carotenoids and the results found by this methodology importantly confirmed those previously reported for the corresponding samples as achieved by spectrophotometric analysis. *trans* isomers were the major form in which  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, lutein, violaxanthin and zeaxanthin were found; still, a distribution of *cis* isomers was found in all extracts to variable extents, indicating that the extraction procedure may have caused some stereochemical conversion. Nevertheless, the isomeric distribution found in extracts is thought to not represent a limitation to the use of supercritical fluid extraction of carotenoids for medicinal and nutraceutical applications. While the capacity of an organism to absorb and metabolize different structural arrangements of the same compound is specific, investigation regarding the possible higher bioavailability of the all-*trans* forms of carotenoids remains inconclusive. This assessment is made difficult by multiple factors, e.g. the fast conversions of 9-*cis*- $\beta$ -carotene either into vitamin A or into its all-*trans* isomer [59,60].

Isomers were grouped and a response surface methodology was employed to evaluate the best extraction conditions for key carotenoids found in *C. sorokiniana* biomass. Temperature, pressure and solvent composition proved to be statistically significant on the extraction of carotenes and of all xanthophylls (**Table 6, with pareto charts presented in Supplementary Material**). The general effects of temperature and pressure over individual yields and their respective speculated causes correspond to those previously reported for total carotenoid yields. The behavior of carotenes is presented in **Figure 7a** and the uniform behavior of xanthophylls is illustrated by lutein in **Figure 7b**. The optimal process temperature was invariably 50 °C, and optimal pressure ranged from

197.4 bar to 205.3 bar for all studied carotenoids. The fitted equations are presented in **Table 7**. These results indicated that changes in temperature and/or pressure alone cannot achieve the selective separation of any of the studied carotenoid groups while maintaining an efficient process - rather, employing an operational condition within this range should lead to extraction of all the studied carotenoids at proportions dependent on the presence of ethanol.

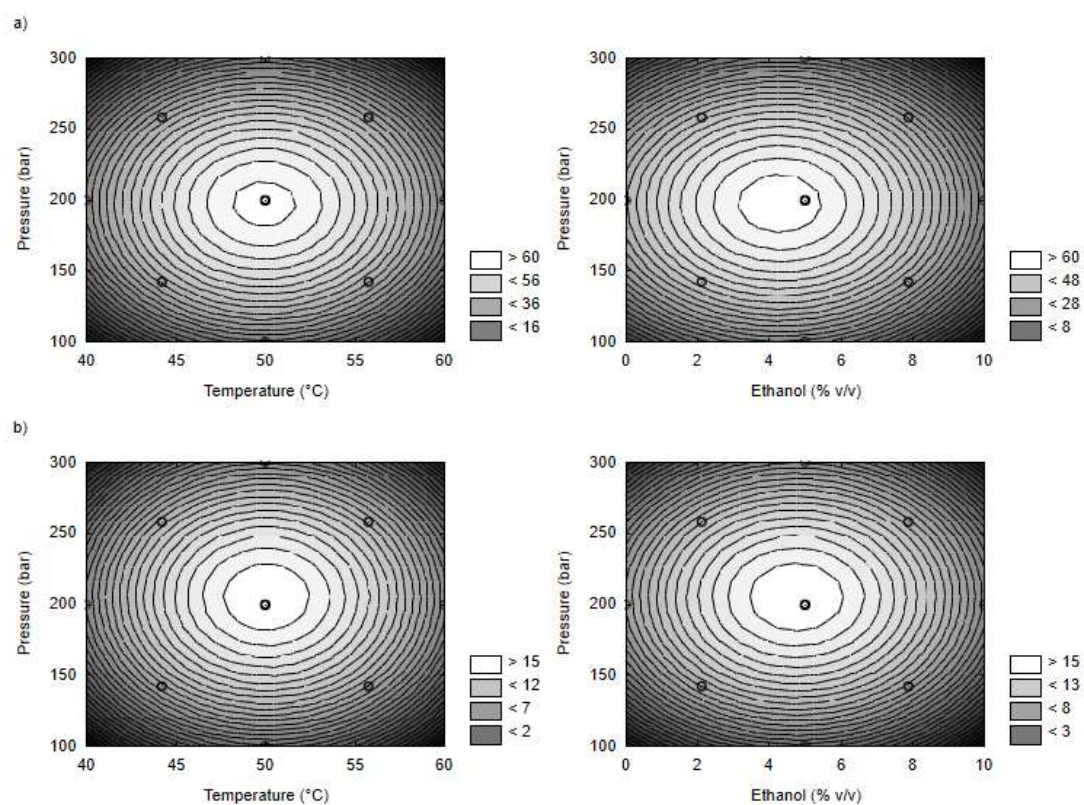
The optimal solvent composition to extract total carotenoids was shown to be 4.5 % v/v, the same value found using spectrophotometric results. Also, the effect of solvent composition in maximizing the extraction efficiency for lutein, violaxanthin and zeaxanthin at intermediate amounts of ethanol (4.7 % v/v) was coherent with the increase in solvent polarity and its consequential enhanced affinity with more polar xanthophylls. In turn, while the non-polarity of pure CO<sub>2</sub> could render the highest selectivity to carotene, this condition did not correspond to the highest carotene extraction efficiency. The optimal extraction of carotenes was predicted by the fitted model at 4.3 % v/v ethanol, a result that is contradictory to the non-polarity of this solute. In this context, a discrepancy has also been found between the rational theoretical result predicted by COSMO-SAC indicating pure CO<sub>2</sub> as the best condition for  $\beta$ -carotene extraction and the optimal conditions found experimentally for the same solute. Optimal solvent composition predicted by COSMO-SAC also presented higher deviations for the minority carotenoids, i.e., violaxanthin and zeaxanthin. These differences have been attributed to the existence of carotenoid aggregates within the cells, which would make the optimal solvent composition for extraction that whose properties would render the highest affinity with the carotenoid aggregate. It should be noted that the carotenoid-containing lipophilic phase in the microalgal biomass is composed of a mixture of compounds that is strain-specific, and in the case of the *C. sorokiniana* biomass used in this work, is represented by the composition presented in **Table 4**. The aforementioned results could therefore be explained by the coexistence of carotenes and xanthophylls in the microalgal organelles, where an aggregate complex of carotenoids is formed, presenting intermediate polarity and thus becoming more soluble in CO<sub>2</sub>+ethanol mixtures. The formation of carotenoid aggregates is a process of molecular self-assembly being largely driven by hydrophobic effects. In addition, weak and reversible intermolecular forces such as hydrogen bonds, dipole forces, and van der Waals interactions have an enormous effect on the type of

aggregate being formed. Typically, carotenoids tend to aggregate when present in lipid bilayers, in which long-range organization of carotenoid molecules is believed to influence physical and dynamic properties of lipid membranes and protect the bilayers against lipid peroxidation [61].

**Table 6:** Estimated effect and analysis of variance ( $p < 0.05$ ) for extraction efficiencies of different carotenoid groups. The linear, quadratic and 2-way effects of temperature ( $T$ ), pressure ( $P$ ) and ethanol percentage in the solvent ( $E$ ) were considered.

Variable	Carotene		Lutein		Violaxanthin		Zeaxanthin		Total carotenoids <sup>1</sup>	
	Effects	p-Value	Effects	p-Value	Effects	p-Value	Effects	p-Value	Effects	p-Value
$T$	-0.734	0.900	0.194	0.916	0.407	0.874	0.229	0.888	0.035	0.988
$T^2$	-35.915	0.000	-9.838	0.000	-12.622	0.000	-8.001	0.000	-14.694	0.000
$P$	-3.793	0.521	1.895	0.315	1.001	0.697	0.874	0.591	0.715	0.770
$P^2$	-41.565	0.000	-10.397	0.000	-14.391	0.000	-9.923	0.000	-16.364	0.000
$E$	-15.604	0.021	-1.493	0.425	-2.475	0.346	-1.663	0.317	-4.179	0.110
$E^2$	-31.933	0.000	-8.698	0.001	-11.363	0.002	-7.354	0.001	-13.055	0.000
$T \times P$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$T \times E$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$P \times E$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$R^2$	0.882		0.828		0.814		0.829		0.866	
$LOF$ p-value	0.149		0.326		0.746		0.754		0.106	
<u>Optimal extraction conditions</u>										
Temperature	50.0 °C		50.1 °C		50.1 °C		50.1 °C		50.0 °C	
Pressure	197.4 bar		205.3 bar		202.0 bar		202.5 bar		201.3 bar	
%Ethanol	4.3 %		4.7 %		4.7 %		4.7 %		4.5 %	

<sup>1</sup> = Total carotenoid extraction efficiency analyzed by HPLC as the sum of all detected carotenoids;  $LOF$  = Lack of fit



**Figure 7:** Contour plots showing the extraction efficiency (%) of (a) carotene and (b) lutein as a function of the extraction pressure and temperature (slice at  $E = 5.0$  % v/v) and as a function of pressure and the amount of ethanol in the solvent (% v/v, slice at  $T = 50^{\circ}\text{C}$ ). Uniform behavior was found for all xanthophylls.

**Table 7:** Fitted equations to predict carotenoid extraction efficiency.

Carotenoid	Fitted Equation
Carotene	$R = -1534.84 + 53.317 \cdot T - 5.338x10^{-1} \cdot T^2 + 2.464 \cdot p - 6.242x10^{-3} \cdot p^2 + 16.295 \cdot E - 1.898 \cdot E^2$
Lutein	$R = -424.953 + 14.639 \cdot T - 1.462x10^{-1} \cdot T^2 + 6.410x10^{-1} \cdot p - 1.561x10^{-3} \cdot p^2 + 4.914 \cdot E - 5.171x10^{-1} \cdot E^2$
Violaxanthin	$R = -547.420 + 18.795 \cdot T - 1.876x10^{-1} \cdot T^2 + 8.732x10^{-1} \cdot p - 2.161x10^{-3} \cdot p^2 + 6.329 \cdot E - 6.757x10^{-1} \cdot E^2$
Zeaxanthin	$R = -352.074 + 11.912 \cdot T - 1.189x10^{-1} \cdot T^2 + 6.037x10^{-1} \cdot p - 1.490x10^{-3} \cdot p^2 + 4.085 \cdot E - 4.372x10^{-1} \cdot E^2$
Total carotenoids	$R = -632.216 + 21.842 \cdot T - 2.184x10^{-1} \cdot T^2 + 9.892x10^{-1} \cdot p - 2.458x10^{-3} \cdot p^2 + 7.041 \cdot E - 7.762x10^{-1} \cdot E^2$

The extraction of carotenoids as an aggregate could also corroborate the optimal process conditions predicted for the maximum extraction of total carotenoids; these results correlate to the crossing of the carotenoid composition in *C. sorokiniana* and the optimal conditions for the recovery of each carotenoid group found experimentally in this work. To illustrate this, a weighted average could be employed to simply estimate the optimal solvent composition to extract total carotenoids (**Equation 3**), using the mass composition of each carotenoid group in *C. sorokiniana* (**Table 4**) and the predicted optimal composition of the solvent to extract each of them.

$$OE_{TC} = 0.19 * OE_C + 0.69 * OE_L + 0.05 * OE_V + 0.07 * OE_Z \quad (3)$$

where

$OE_i$  = optimal composition of ethanol in the solvent (% v/v) to extract  $i$ ;

$TC$  = total carotenoids;  $C$  = carotene;  $L$  = lutein;  $V$  = violaxanthin;  $Z$  = zeaxanthin.

By entering the optimal solvent compositions predicted by the fitted equations to each carotenoid (**Table 6**), the weighted average is calculated as 4.6 % v/v, while by entering

compositions predicted by COSMO-SAC it is 3.5 % v/v. Thus, with the consideration that the extraction of carotenoids occurred in aggregates, and knowing that COSMO-SAC predicted interaction of the solvent with isolated solutes, this thermodynamic model is considered to have been able to predict the optimal composition of the solvent to better extract carotenoids with satisfactory accuracy.

#### **4.3.4. Conclusions**

The experimental approach in this work showed that extraction using supercritical mixtures of CO<sub>2</sub>+ethanol was a viable alternative for the extraction of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids from microalgal biomass. All major factors studied, i.e., extraction temperature, pressure and composition of the solvent proved to be relevant factors, as the experimental conditions rendered fundamentally different extraction results. The presence of ethanol proved to be essential for the efficient extraction of chlorophylls; it should also be present for the extraction of carotenoids in order to modify the polarity of a supercritical solvent to better suit that of the carotenoid mixture in the microalga. This was considered an important finding, as both the experimental and the theoretical approaches in this work showed compatibility with the hypothesis that carotenoids are extracted as aggregates. In this context, COSMO-SAC was shown as a powerful tool for the prediction of solvent properties, a feature that could be further explored aiming at process optimization. The use of scanning electron microscopy (SEM) indicated that the increase of pressure may have positively affected the extraction of compounds by causing disintegration of the particles, facilitating solvent contact. However, the occurrence of caking was indicated as a possible effect to the detriment of process efficiency. It is suggested that this latter phenomenon should be further investigated and efficiently avoided in order to reach the actual potential of this technology.

#### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## **Acknowledgements**

This work has been supported by the following Brazilian research agencies: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS).



**Table 1:** coded and real levels for factors, and corresponding state of the solvent for all conditions in the central composite design employed in this work; Chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoid yields, mg g<sup>-1</sup> dry biomass (extraction efficiency presented in parenthesis, %).

Sample/Run	Temperature (*C)	Pressure (bar)	Ethanol (v/v %)	Solvent State	Total extract (mg dry extract g <sup>-1</sup> dry biomass)	Chlorophyll a (mg g <sup>-1</sup> dry biomass)	Chlorophyll b (mg g <sup>-1</sup> dry biomass)	Total carotenoids (mg g <sup>-1</sup> dry biomass)
<i>C. sorokiniana</i>	-	-	-	-	-	12.71 ± 0.19	4.76 ± 0.12	3.91 ± 0.10
1	44.2 (-1)	142.3 (-1)	2.1 (-1)	Supercritical	7.99	2.69 ± 0.19 (21.2 ± 1.5 %)	2.04 ± 0.24 (42.8 ± 5.0 %)	0.38 ± 0.13 (9.8 ± 3.3 %)
2	55.8 (+1)	142.3 (-1)	2.1 (-1)	Supercritical	5.43	3.12 ± 0.02 (24.6 ± 0.2 %)	2.51 ± 0.04 (52.8 ± 0.9 %)	0.33 ± 0.04 (8.5 ± 1.1 %)
3	44.2 (-1)	257.7 (+1)	2.1 (-1)	Supercritical	9.85	2.92 ± 0.06 (23.0 ± 0.5 %)	2.48 ± 0.07 (52.1 ± 1.4 %)	0.19 ± 0.03 (4.8 ± 0.9 %)
4	55.8 (+1)	257.7 (+1)	2.1 (-1)	Supercritical	9.44	4.82 ± 0.44 (37.9 ± 3.5 %)	3.08 ± 0.28 (64.6 ± 5.9 %)	0.14 ± 0.05 (3.6 ± 1.4 %)
5	44.2 (-1)	142.3 (-1)	7.9 (+1)	Supercritical	23.63	3.98 ± 0.09 (31.3 ± 0.7 %)	3.38 ± 0.09 (71.0 ± 1.9 %)	0.16 ± 0.04 (4.1 ± 1.1 %)
6	55.8 (+1)	142.3 (-1)	7.9 (+1)	Supercritical	25.50	3.95 ± 0.28 (31.1 ± 2.2 %)	3.00 ± 0.35 (63.0 ± 7.4 %)	0.18 ± 0.03 (4.6 ± 0.7 %)
7	44.2 (-1)	257.7 (+1)	7.9 (+1)	Supercritical	59.03	5.57 ± 0.12 (43.8 ± 1.0 %)	4.73 ± 0.13 (99.4 ± 2.7 %)	0.18 ± 0.06 (4.6 ± 1.5 %)
8	55.8 (+1)	257.7 (+1)	7.9 (+1)	Supercritical	39.26	6.15 ± 0.07 (48.4 ± 0.5 %)	4.43 ± 0.01 (93.1 ± 0.3 %)	0.45 ± 0.01 (11.5 ± 0.1 %)
9	40.0 (-1.73)	200.0 (0)	5.0 (0)	Supercritical	41.69	2.47 ± 0.18 (19.4 ± 1.4 %)	1.87 ± 0.22 (39.3 ± 4.6 %)	0.30 ± 0.03 (7.6 ± 0.8 %)
10	60.0 (+1.73)	200.0 (0)	5.0 (0)	Supercritical	36.04	3.13 ± 0.22 (24.6 ± 1.8 %)	2.37 ± 0.28 (49.8 ± 5.8 %)	0.31 ± 0.04 (8.0 ± 1.1 %)
11	50.0 (0)	100.0 (-1.73)	5.0 (0)	Subcritical	10.92	4.74 ± 0.08 (37.3 ± 0.6 %)	3.39 ± 0.22 (71.3 ± 4.7 %)	0.07 ± 0.01 (1.8 ± 0.3 %)
12	50.0 (0)	300.0 (+1.73)	5.0 (0)	Supercritical	30.18	5.35 ± 0.06 (42.1 ± 0.5 %)	3.85 ± 0.01 (80.9 ± 0.2 %)	0.39 ± 0.00 (10.0 ± 0.1 %)
13	50.0 (0)	200.0 (0)	0.0 (-1.73)	Supercritical	8.02	0.29 ± 0.06 (2.3 ± 0.4 %)	0.19 ± 0.03 (4.1 ± 0.6 %)	0.82 ± 0.01 (21.0 ± 0.4 %)
14	50.0 (0)	200.0 (0)	10.0 (+1.73)	Supercritical	45.48	5.79 ± 0.01 (45.6 ± 0.1 %)	4.25 ± 0.11 (89.2 ± 2.4 %)	0.08 ± 0.03 (2.0 ± 0.8 %)
15	50.0 (0)	200.0 (0)	5.0 (0)	Supercritical	33.55	4.77 ± 0.10 (37.6 ± 0.8 %)	4.06 ± 0.11 (85.2 ± 2.3 %)	1.19 ± 0.07 (30.3 ± 1.8 %)

16	50.0 (0)	200.0 (0)	5.0 (0)	<i>Supercritical</i>	36.42	4.78 ± 0.15 (37.6 ± 1.2 %)	4.00 ± 0.14 (84.1 ± 3.0 %)	1.23 ± 0.07 (31.4 ± 1.7 %)
17	50.0 (0)	200.0 (0)	5.0 (0)	<i>Supercritical</i>	35.12	4.26 ± 0.14 (33.5 ± 1.1 %)	3.69 ± 0.18 (77.5 ± 3.7 %)	1.10 ± 0.12 (28.2 ± 3.0 %)

**Table 4:** Carotenoid profile of the *C. sorokiniana* biomass and extracts obtained by supercritical fluid extraction at varied conditions; carotenoid yields, mg g<sup>-1</sup> dry biomass (extraction efficiency presented in parenthesis, %).

Sample/Run →	<i>C. sorokiniana</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperature (°C)	-	44.2	55.8	44.2	55.8	44.2	55.8	44.2	55.8
Pressure (bar)	-	142.3	142.3	257.7	257.7	142.3	142.3	257.7	257.7
Ethanol (v/v %)	-	2.1	2.1	2.1	2.1	7.9	7.9	7.9	7.9
<b>Carotenoid profile (mg g<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></b>									
all-trans-violaxanthin	0.103 ± 0.011	0.006 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.001 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.012 ± 0.002
cis-violaxanthin	0.058 ± 0.004	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.001 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.005 ± 0.003
9-cis-violaxanthin	0.054 ± 0.003	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.002	0.002 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.004 ± 0.000
13-cis-lutein	0.231 ± 0.011	0.005 ± 0.003	0.004 ± 0.000	0.002 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000
13'-cis-lutein	0.146 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.006 ± 0.001	0.009 ± 0.001
all-trans-lutein	2.419 ± 0.038	0.131 ± 0.011	0.075 ± 0.004	0.066 ± 0.027	0.027 ± 0.003	0.103 ± 0.000	0.068 ± 0.008	0.076 ± 0.025	0.239 ± 0.022
all-trans-zeaxanthin	0.113 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.006 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.002 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.005 ± 0.000	0.007 ± 0.001	0.016 ± 0.002
cis-zeaxanthin	0.189 ± 0.007	0.005 ± 0.002	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.001 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.000
15-cis-β-carotene	0.062 ± 0.009	0.007 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.003 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.000
all-trans-α-carotene	0.160 ± 0.009	0.069 ± 0.004	0.069 ± 0.004	0.025 ± 0.002	0.014 ± 0.006	0.034 ± 0.001	0.029 ± 0.003	0.025 ± 0.009	0.040 ± 0.002
13-cis-β-carotene	0.051 ± 0.001	0.006 ± 0.000	0.007 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.000
all-trans-β-carotene	0.345 ± 0.032	0.148 ± 0.011	0.144 ± 0.007	0.056 ± 0.007	0.032 ± 0.014	0.070 ± 0.004	0.059 ± 0.007	0.053 ± 0.021	0.086 ± 0.004
9-cis-β-carotene	0.138 ± 0.002	0.027 ± 0.002	0.027 ± 0.001	0.007 ± 0.000	0.003 ± 0.001	0.014 ± 0.000	0.012 ± 0.001	0.010 ± 0.003	0.015 ± 0.001
<b>Groups of carotenoids</b>									
Violaxanthins	0.215 ± 0.018	0.014 ± 0.004 (6.4 ± 1.7 %)	0.019 ± 0.004 (8.8 ± 2.1 %)	0.010 ± 0.002 (4.4 ± 1.0 %)	0.003 ± 0.001 (1.6 ± 0.6 %)	0.015 ± 0.001 (6.9 ± 0.4 %)	0.009 ± 0.001 (4.3 ± 0.3 %)	0.014 ± 0.000 (6.6 ± 0.0 %)	0.021 ± 0.005 (9.7 ± 2.2 %)
Luteins	2.797 ± 0.051	0.141 ± 0.013 (5.0 ± 0.5 %)	0.083 ± 0.004 (3.0 ± 0.2 %)	0.072 ± 0.026 (2.6 ± 0.9 %)	0.030 ± 0.004 (1.1 ± 0.2 %)	0.112 ± 0.000 (4.0 ± 0.0 %)	0.075 ± 0.008 (2.7 ± 0.3 %)	0.085 ± 0.026 (3.0 ± 0.9 %)	0.251 ± 0.023 (9.0 ± 0.8 %)
Zeaxanthins	0.302 ± 0.009	0.013 ± 0.003 (4.4 ± 0.9 %)	0.010 ± 0.001 (3.3 ± 0.2 %)	0.009 ± 0.001 (3.0 ± 0.3 %)	0.004 ± 0.001 (1.2 ± 0.5 %)	0.011 ± 0.001 (3.7 ± 0.2 %)	0.007 ± 0.001 (2.2 ± 0.2 %)	0.011 ± 0.001 (3.5 ± 0.3 %)	0.019 ± 0.002 (6.2 ± 0.6 %)
Carotenes	0.756 ± 0.052	0.257 ± 0.016 (34.0 ± 2.2 %)	0.253 ± 0.012 (33.5 ± 1.6 %)	0.094 ± 0.010 (12.4 ± 1.3 %)	0.052 ± 0.021 (6.9 ± 2.8 %)	0.127 ± 0.004 (16.8 ± 0.6 %)	0.108 ± 0.012 (14.2 ± 1.6 %)	0.096 ± 0.035 (12.7 ± 4.6 %)	0.150 ± 0.008 (19.8 ± 1.0 %)
Total carotenoids	4.071 ± 0.130	0.425 ± 0.028 (10.4 ± 0.7 %)	0.365 ± 0.022 (9.0 ± 0.5 %)	0.184 ± 0.016 (4.5 ± 0.4 %)	0.090 ± 0.029 (2.2 ± 0.7 %)	0.265 ± 0.006 (6.5 ± 0.1 %)	0.198 ± 0.021 (4.9 ± 0.5 %)	0.206 ± 0.061 (5.1 ± 1.5 %)	0.441 ± 0.038 (10.8 ± 0.9 %)

<sup>a</sup> Carotenoid profile obtained by high performance liquid chromatography

**Table 4 (cont.):** Carotenoid profile of the *C. sorokiniana* biomass and extracts obtained by supercritical fluid extraction at varied conditions; carotenoid yields, mg g<sup>-1</sup> dry biomass (extraction efficiency presented in parenthesis, %).

<i>Sample/Run</i> →	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Temperature (°C)	40.0	60.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Pressure (bar)	200.0	200.0	100.0	300.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Ethanol (v/v %)	5.0	5.0	5.0	5.0	0.0	10.0	5.0	5.0	5.0
<b>Carotenoid profile (mg g<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></b>									
all-trans-violaxanthin	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.010 ± 0.001	0.012 ± 0.003	0.005 ± 0.000	0.017 ± 0.003	0.023 ± 0.001	0.029 ± 0.004
cis-violaxanthin	0.004 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.007 ± 0.000	0.012 ± 0.003	0.002 ± 0.000	0.010 ± 0.001	0.018 ± 0.002	0.021 ± 0.003
9-cis-violaxanthin	0.005 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.000	0.013 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.016 ± 0.006	0.018 ± 0.005	0.017 ± 0.001
13-cis-lutein	0.010 ± 0.000	0.008 ± 0.003	0.002 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.012 ± 0.002	0.002 ± 0.000	0.009 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.022 ± 0.003
13'-cis-lutein	0.009 ± 0.000	0.009 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.012 ± 0.003	0.013 ± 0.002	0.002 ± 0.000	0.031 ± 0.002	0.026 ± 0.006	0.024 ± 0.004
all-trans-lutein	0.118 ± 0.001	0.124 ± 0.023	0.009 ± 0.000	0.195 ± 0.034	0.304 ± 0.018	0.041 ± 0.011	0.545 ± 0.005	0.497 ± 0.157	0.412 ± 0.071
all-trans-zeaxanthin	0.009 ± 0.000	0.011 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.012 ± 0.001	0.022 ± 0.003	0.004 ± 0.001	0.032 ± 0.001	0.034 ± 0.008	0.033 ± 0.004
cis-zeaxanthin	0.006 ± 0.000	0.010 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.012 ± 0.002	0.003 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.017 ± 0.004	0.029 ± 0.004
15-cis-β-carotene	0.006 ± 0.000	0.009 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.015 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.025 ± 0.002	0.023 ± 0.006	0.022 ± 0.003
all-trans-α-carotene	0.043 ± 0.002	0.037 ± 0.006	0.012 ± 0.000	0.035 ± 0.002	0.104 ± 0.012	0.003 ± 0.000	0.142 ± 0.007	0.154 ± 0.038	0.135 ± 0.015
13-cis-β-carotene	0.006 ± 0.000	0.007 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.017 ± 0.001	0.001 ± 0.000	0.016 ± 0.001	0.018 ± 0.003	0.022 ± 0.003
all-trans-β-carotene	0.093 ± 0.005	0.077 ± 0.012	0.021 ± 0.000	0.073 ± 0.003	0.205 ± 0.027	0.004 ± 0.001	0.303 ± 0.014	0.345 ± 0.082	0.294 ± 0.027
9-cis-β-carotene	0.015 ± 0.000	0.017 ± 0.003	0.005 ± 0.000	0.014 ± 0.001	0.045 ± 0.003	0.002 ± 0.000	0.059 ± 0.003	0.057 ± 0.016	0.056 ± 0.009
<b>Groups of carotenoids</b>									
Violaxanthins	0.017 ± 0.002 (8.1 ± 1.1 %)	0.021 ± 0.002 (9.6 ± 1.1 %)	0.006 ± 0.000 (2.8 ± 0.2 %)	0.020 ± 0.001 (9.2 ± 0.5 %)	0.038 ± 0.007 (17.5 ± 3.1 %)	0.008 ± 0.000 (3.9 ± 0.2 %)	0.043 ± 0.010 (20.2 ± 4.6 %)	0.059 ± 0.002 (27.4 ± 1.1 %)	0.067 ± 0.008 (31.3 ± 3.7 %)
Luteins	0.137 ± 0.001 (4.9 ± 0.0 %)	0.142 ± 0.021 (5.1 ± 0.8 %)	0.013 ± 0.000 (0.4 ± 0.0 %)	0.210 ± 0.037 (7.5 ± 1.3 %)	0.328 ± 0.022 (11.7 ± 0.8 %)	0.045 ± 0.011 (1.6 ± 0.4 %)	0.585 ± 0.010 (20.9 ± 0.4 %)	0.536 ± 0.165 (19.2 ± 5.9 %)	0.458 ± 0.072 (16.4 ± 2.6 %)
Zeaxanthins	0.015 ± 0.000 (5.0 ± 0.1 %)	0.021 ± 0.002 (6.9 ± 0.7 %)	0.004 ± 0.000 (1.2 ± 0.0 %)	0.014 ± 0.001 (4.7 ± 0.4 %)	0.034 ± 0.005 (11.4 ± 1.5 %)	0.007 ± 0.001 (2.5 ± 0.5 %)	0.040 ± 0.002 (13.2 ± 0.8 %)	0.051 ± 0.004 (16.9 ± 1.3 %)	0.062 ± 0.008 (20.4 ± 2.8 %)
Carotenes	0.163 ± 0.007 (21.5 ± 1.0 %)	0.147 ± 0.022 (19.4 ± 2.9 %)	0.042 ± 0.001 (5.6 ± 0.1 %)	0.130 ± 0.006 (17.2 ± 0.8 %)	0.387 ± 0.040 (51.2 ± 5.3 %)	0.012 ± 0.001 (1.6 ± 0.2 %)	0.545 ± 0.027 (72.1 ± 3.6 %)	0.597 ± 0.145 (79.0 ± 19.2 %)	0.529 ± 0.057 (69.9 ± 7.5 %)
Total carotenoids	0.332 ± 0.007 (8.2 ± 0.2 %)	0.330 ± 0.048 (8.1 ± 1.2 %)	0.065 ± 0.001 (1.6 ± 0.0 %)	0.374 ± 0.045 (9.2 ± 1.1 %)	0.787 ± 0.007 (19.3 ± 0.2 %)	0.073 ± 0.015 (1.8 ± 0.4 %)	1.213 ± 0.050 (29.8 ± 1.2 %)	1.244 ± 0.316 (30.6 ± 7.8 %)	1.115 ± 0.145 (27.4 ± 3.6 %)

<sup>a</sup> Carotenoid profile obtained by high performance liquid chromatography

#### 4.3.5. References

- [1] M.N. Rammuni, T. Ariyadasa, P.H. V Nimarshana, R. Attalage, Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*, *Food Chem.* 277 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.066>.
- [2] P.M. Foley, E.S. Beach, J.B. Zimmerman, Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges, *Green Chem.* 13 (2011) 1399–1405. <https://doi.org/10.1039/C1GC00015B>.
- [3] B.S.A.F. Brasil, F.C.P. Silva, F.G. Siqueira, Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective, *N. Biotechnol.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.04.007>.
- [4] R. Matsukawa, M. Hotta, Y. Masuda, M. Chihara, I. Karube, Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*, *J. Appl. Phycol.* 12 (2000) 263–267. <https://doi.org/10.1023/A:1008141414115>.
- [5] M. Cuaresma, M. Janssen, C. Vílchez, R.H. Wijffels, Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance, *Biotechnol. Bioeng.* 104 (2009) 352–359. <https://doi.org/10.1002/bit.22394>.
- [6] A.B. Diprat, R.C. Silveira Thys, E. Rodrigues, R. Rech, *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread, *LWT.* 134 (2020) 109974. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109974>.
- [7] L. Leonhardt, A. Käferböck, S. Smetana, R. de Vos, S. Toepfl, O. Parniakov, Bio-refinery of *Chlorella sorokiniana* with pulsed electric field pre-treatment, *Bioresour. Technol.* 301 (2020) 122743.
- [8] A.V. Morcelli, W. da S. Andrade, C.L.C. Frankenberg, R. Rech, N.R. Marcílio, Extraction of chlorophylls and carotenoids from microalgae: COSMO-SAC assisted solvent screening, *Chem. Eng. Technol.* n/a (2021). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ceat.202100008>.

- [9] R. Halim, A. Hosikian, S. Lim, M.K. Danquah, Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects, *Int. J. Chem. Eng.* 2010 (2010). <https://doi.org/10.1155/2010/391632>.
- [10] K. Spears, Developments in food colourings: the natural alternatives, *Trends Biotechnol.* 6 (1988) 283–288. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(88\)90126-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(88)90126-6).
- [11] A. Perez-Galvez, I. Viera, M. Roca, Chemistry in the Bioactivity of Chlorophylls: An Overview., *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 4515–4536. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170714102619>.
- [12] L. Queiroz Zepka, E. Jacob-Lopes, M. Roca, Catabolism and bioactive properties of chlorophylls, *Curr. Opin. Food Sci.* 26 (2019) 94–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.004>.
- [13] A. Inanc, Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils, *Akad. Gida.* 9 (2011).
- [14] M. Ferruzzi, J. Blakeslee, Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives, *Nutr. Res. - NUTR RES.* 27 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.12.003>.
- [15] U.M. Lanfer-Marquez, R.M.C. Barros, P. Sinnecker, Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives, *Food Res. Int.* 38 (2005) 885–891. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.012>.
- [16] Govindjee, R.E. Blankenship, G.A. Berkowitz, A.R. Portis Jr., R.J. Shopes, Photosynthesis, (2019). <https://doi.org/10.1036/1097-8542.511700>.
- [17] K.K. Niyogi, O. Björkman, A.R. Grossman, The roles of specific xanthophylls in photoprotection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997) 14162 LP – 14167. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14162>.
- [18] Z. Gong, C. Liu, E. Feng, Q. Zhang, Computational method for inferring objective function of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*., *Comput. Biol. Chem.* 33 (2009) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2008.06.005>.
- [19] N. Mezzomo, S.R.S. Ferreira, Carotenoids Functionality , Sources , and Processing by Supercritical Technology : A Review, 2016 (2016).

- [20] M.K. Kim, S.H. Ahn, Y.C. Lee-Kim, Relationship of serum  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer, *Nutr. Res.* 21 (2001) 797–809. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00300-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00300-1).
- [21] E.J. Johnson, The role of carotenoids in human health., *Nutr. Clin. Care.* 5 (2002) 56–65. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5408.2002.00004.x>.
- [22] Z.-W. Ye, J.-G. Jiang, G.-H. Wu, Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 352–360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.004>.
- [23] S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W.G. 78, S.W. Wright, U. Staff, I.C. of Scientific Unions. Scientific Committee on Oceanic Research, Unesco, *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, UNESCO Publishing, 1997. <https://books.google.com.br/books?id=3kYVAQAIAAJ>.
- [24] A. Molino, S. Mehariya, G. Di Sanzo, V. Larocca, M. Martino, G.P. Leone, T. Marino, S. Chianese, R. Balducci, D. Musmarra, Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: Role of key parameters, technological achievements and challenges, *J. CO2 Util.* 36 (2020) 196–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.11.014>.
- [25] E. Reverchon, I. De Marco, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *J. Supercrit. Fluids.* 38 (2006) 146–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>.
- [26] M.D. Macías-Sánchez, C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez De La Ossa, L.M. Lubián, O. Montero, Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*, *J. Food Eng.* 66 (2005) 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.021>.
- [27] M.D. Macías-Sánchez, C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L.M. Lubián, O. Montero, Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp., *J. Supercrit. Fluids.* 39 (2007) 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.008>.
- [28] İ.S. Şanal, E. Bayraktar, Ü. Mehmetoğlu, A. Çalımlı, Determination of optimum

- conditions for SC-(CO<sub>2</sub>+ ethanol) extraction of  $\beta$ -carotene from apricot pomace using response surface methodology, *J. Supercrit. Fluids*. 34 (2005) 331–338.
- [29] H.-W. Yen, W.-C. Chiang, C.-H. Sun, Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 43 (2012) 53–57.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.07.010](https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.07.010).
- [30] M.D. Macías-Sánchez, C.M. Serrano, M.R. Rodríguez, E.M. de la Ossa, L.M. Lubián, O. Montero, Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1352–1362. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700503>.
- [31] J.A. Asenjo, B.A. Andrews, Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics, *J. Mol. Recognit.* 17 (2004) 236–247.  
<https://doi.org/10.1002/jmr.676>.
- [32] T. Ahamed, M. Ottens, B.K. Nfor, G.W.K. Van Dedem, L.A.M. Van Der Wielen, A generalized approach to thermodynamic properties of biomolecules for use in bioseparation process design, *Fluid Phase Equilib.* 241 (2006) 268–282.  
<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2005.12.011>.
- [33] S.I. Sandler, Infinite dilution activity coefficients in chemical, environmental and biochemical engineering, *Fluid Phase Equilib.* 116 (1996) 343–353.  
[https://doi.org/10.1016/0378-3812\(95\)02905-2](https://doi.org/10.1016/0378-3812(95)02905-2).
- [34] R.P. Gerber, R.P. Soares, Assessing the reliability of predictive activity coefficient models for molecules consisting of several functional groups, *Brazilian J. Chem. Eng.* 30 (2013) 1–11. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322013000100002>.
- [35] F. Ferrarini, G.B. Fl, A.R. Muniz, R.D.P. Soares, P. May, An Open and Extensible Sigma-Profile Database for COSMO-Based Models, 64 (2018).  
<https://doi.org/10.1002/aic.16194>.
- [36] W.-L. Chen, C.-M. Hsieh, L. Yang, C.-C. Hsu, S.-T. Lin, A Critical Evaluation on the Performance of COSMO-SAC Models for Vapor–Liquid and Liquid–Liquid Equilibrium Predictions Based on Different Quantum Chemical



- Calculations, *Ind. Eng. Chem. Res.* 55 (2016) 9312–9322.  
<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b02345>.
- [37] C.-Y. Chen, L.-H. Wang, C.-M. Hsieh, S.-T. Lin, Prediction of solid-liquid-gas equilibrium for binary mixtures of carbon dioxide + organic compounds from approaches based on the COSMO-SAC model, *J. Supercrit. Fluids.* 133 (2018) 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.008>.
- [38] M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform., *J. Cheminform.* 4 (2012) 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- [39] M.W. Schmidt, K.K. Baldridge, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery Jr, General atomic and molecular electronic structure system, *J. Comput. Chem.* 14 (1993) 1347–1363. <https://doi.org/10.1002/jcc.540141112>.
- [40] R. de P. Soares, G.B. Flôres, dudapelisser, vanessabx, F. Ferrarini, GabrielPastorello, annecarolinebelusso, lvpp/sigma: LVPP sigma-profile database (20.06), (2020). <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3924076>.
- [41] R.P. Gerber, R.D.P. Soares, Prediction of infinite-dilution activity coefficients using UNIFAC and COSMO-SAC variants, *Ind. Eng. Chem. Res.* 49 (2010) 7488–7496. <https://doi.org/10.1021/ie901947m>.
- [42] B. Medeiros-Neves, K.A.P. Diel, V.L. Eifler-Lima, H.F. Teixeira, E. Cassel, R.M. Figueiró Vargas, G.L. von Poser, Influence of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction in the stability of the coumarins of *Pterocaulon lorentzii* (Asteraceae), *J. CO<sub>2</sub> Util.* 39 (2020) 101165.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101165>.
- [43] V. Pasquet, J.-R. Chérourvri er, F. Farhat, V. Thi ery, J.-M. Piot, J.-B. B erard, R. Kaas, B. Serive, T. Patrice, J.-P. Cadoret, L. Picot, Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction, *Process Biochem.* 46 (2011) 59–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>.

- [44] R. Scopel, R.G. Neto, M.A. Falcão, E. Cassel, R.M.F. Vargas, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Schinus molle* L with co- solvents: Mathematical modeling and antimicrobial applications, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 56 (2013) 513–519. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300020>.
- [45] M. Gong, A. Bassi, Carotenoids from microalgae : A review of recent developments, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>.
- [46] M.M. Poojary, F.J. Barba, B. Aliakbarian, F. Donsì, G. Pataro, D.A. Dias, P. Juliano, Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds, *Mar. Drugs.* 14 (2016) 1–34. <https://doi.org/10.3390/md14110214>.
- [47] S.-D. Yeo, S.-J. Park, J.-W. Kim, J.-C. Kim, Critical Properties of Carbon Dioxide + Methanol, + Ethanol, + 1-Propanol, and + 1-Butanol, *J. Chem. Eng. Data.* 45 (2000) 932–935. <https://doi.org/10.1021/je000104p>.
- [48] F. Mandelli, V.S. Miranda, E. Rodrigues, A.Z. Mercadante, Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2012) 1781–1790. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0993-y>.
- [49] H.K. Lichtenthaler, C. Buschmann, Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy, *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 1 (2001) F4.3.1-F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>.
- [50] A.B. Diprat, T. Menegol, J.F. Boelter, A. Zmozinski, M.G. Rodrigues Vale, E. Rodrigues, R. Rech, Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids., *J. Sci. Food Agric.* 97 (2017) 3463–3468. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8159>.
- [51] S.N.A. Azaman, N. Nagao, F.M. Yusoff, S.W. Tan, S.K. Yeap, A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions., *PeerJ.* 5 (2017) e3473. <https://doi.org/10.7717/peerj.3473>.
- [52] A.B. Diprat, R. Cruz, S. Thys, E. Rodrigues, R. Rech, *Chlorella sorokiniana* : A

- new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread, *LWT*. 134 (2020) 109974. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109974>.
- [53] B.F. Cordero, I. Obraztsova, I. Couso, R. Leon, M.A. Vargas, H. Rodriguez, Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis., *Mar. Drugs*. 9 (2011) 1607–1624. <https://doi.org/10.3390/md9091607>.
- [54] J. Shi, M. Khatri, S. Jun, G.S. Mittal, Y. Ma, D. Li, Solubility of lycopene in supercritical CO<sub>2</sub> fluid as affected by temperature and pressure, 66 (2009) 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.12.012>.
- [55] V. Pasquet, P. Morisset, S. Ihammouine, A. Chepied, L. Aumailley, J.-B. Berard, B. Serive, R. Kaas, I. Lanneluc, V. Thiery, M. Lafferriere, J.-M. Piot, T. Patrice, J.-P. Cadoret, L. Picot, Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts., *Mar. Drugs*. 9 (2011) 819–831. <https://doi.org/10.3390/md9050819>.
- [56] K.K. Darani, M.R. Mozafari, Supercritical fluids technology in bioprocess industries: a review, *J. Biochem. Technol.* 2 (2010) 144–152.
- [57] L. Zhao, X. Qin, Y. Wang, J. Ling, W. Shi, S. Pang, X. Liao, CO<sub>2</sub>-assisted high pressure processing on inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. CO<sub>2</sub> Util.* 22 (2017) 53–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.09.005>.
- [58] A. Reyes, C.S. Sielfeld, Effect of high-pressure compaction on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *J. Food Eng.* 189 (2016) 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.008>.
- [59] D.M. Deming, S.R. Teixeira, J.W. Erdman Jr., All-trans  $\beta$ -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis  $\beta$ -Carotene in Gerbils Given Single Oral Doses of Each Isomer, *J. Nutr.* 132 (2002) 2700–2708. <https://doi.org/10.1093/jn/132.9.2700>.
- [60] M.A.L. da Costa, C.I. Ortega-Flores, M. de V.C. Penteadó, Alterações estruturais in vivo dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do  $\beta$ -caroteno, *Food Sci. Technol.* 22 (2002) 224–228.

- [61] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, eds., Carotenoids, Birkhäuser Basel, 2008. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0>.

---

## **CAPÍTULO 5 – ADSORÇÃO DE METAIS PESADOS UTILIZANDO A BIOMASSA *IN NATURA* DAS MICROALGAS *CHLORELLA SOROKINIANA* E *HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS***

Este capítulo apresenta os estudos de adsorção de metais pesados realizados no presente trabalho, empregando a biomassa *in natura* das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Heterochlorella luteoviridis*. Primeiramente, são apresentadas as metodologias empregadas para o cultivo das microalgas, para realização do processo de adsorção em batelada, bem como para as análises da biomassa microalgal e do conteúdo de metais pesados nas amostras. Os resultados desse estudo são apresentados na forma de um artigo científico já submetido a revista indexada. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Ambientais (LAPA) e nos Laboratórios Especializados em Eletroeletrônica, Calibração e Ensaaios (LABELO), localizados na Escola Politécnica da PUCRS, e no Laboratório de Bioengenharia (BioEng), localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

### **5.1. Materiais e métodos**

#### **5.1.1. Cultivo da biomassa**

A biomassa microalgal de *Chlorella sorokiniana* e *Heterochlorella luteoviridis* utilizada nos experimentos de adsorção neste trabalho foi obtida ou cultivada através da mesma metodologia previamente descrita no item 4.1.2, referente à obtenção de biomassa para experimentos de extração.

#### **5.1.2. Caracterização da composição e morfologia da biomassa microalgal**

A composição centesimal da biomassa microalgal foi realizada de acordo com os métodos de análise aprovados pela American Association of Cereal Chemists

(INTERNATIONAL., [s.d.]). O teor de umidade foi determinado pelo método termogravimétrico em estufa a 105 ° C (Método 44-15,0). O teor de proteína, segundo foi quantificado pelo método Kjeldahl (Método 46-13,01) usando % N x 5,95, um fator de conversão de nitrogênio em proteína sugerido para microalgas (GONZÁLEZ LÓPEZ et al., 2010). O conteúdo lipídico total foi determinado pelo método de Bligh e Dyer (BLIGH; DYER, 1959). A análise do teor de cinzas foi realizada em mufla a 550 ° C (método 08-01.01).

A superfície da biomassa microalgal empregada neste trabalho foi estudada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Central e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS (Porto Alegre, Brasil). As células liofilizadas foram colocadas em um suporte de carbono de camada dupla condutivo, revestido com uma camada de ouro (Oerlikon Balzers, modelo SCD050, Suíça), e examinadas por microscopia eletrônica de varredura (Philips-FEI Quanta 200 SEM-FEG, com um canhão FEG fornecendo uma corrente de feixe de 20 kV), acoplada a um sistema de espectroscopia de raios-X de dispersão de energia (EDS) (modelo X-act, Oxford Instruments GmbH, Wiesbaden, Alemanha). Para análises quantitativas de elementos da biomassa microalgal, espectrogramas EDS foram registrados e analisados usando o software Oxford Aztec (AZtecOne, Oxford Instruments).

### 5.1.3. Preparo do efluente sintético

Amostras de efluentes sintéticos constituídos por soluções monoelementares de cada espécie iônica foram preparadas pela dissolução de sais em água ultrapura contendo os metais pesados de interesse (Milli-Q, Merck, Alemanha). Cada espécie foi testada individualmente para evitar efeitos sinérgicos. A concentração inicial de sal foi de 500 mg L<sup>-1</sup> (balanço analítica M214AIH, BEL Engineering, Itália) para gerar uma concentração de íons considerada alta nesses tipos de efluentes, com base em valores encontrados na literatura para indústrias de galvanoplastia (BOUKHLIFI, 2020; HUSAIN; JAVED; KHAN, 2014; PEREIRA NETO et al., 2008) e curtumes (FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, 2018; JAHAN et al., 2014), e o pH foi ajustado para 6,0. A **Tabela 5.1** apresenta os sais utilizados e a concentração resultante de cada um dos respectivos íons metálicos em solução, conforme análise por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

**Tabela 5.1:** Sais utilizados como fontes de íons metálicos e a concentração resultante de cada íon em solução.

Íon	Sal	Fórmula Molecular	Concentração do íon (mg L <sup>-1</sup> )
Cu <sup>2+</sup>	Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	129,0
Cr <sup>3+</sup>	Cloreto de cromo (III) hexahidratado	CrCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	98,8
Cr <sup>6+</sup>	Dicromato de potássio	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	178,9
Fe <sup>2+</sup>	Sulfato de ferro (II)	FeSO <sub>4</sub>	183,8
Fe <sup>3+</sup>	Nitrado de ferro (III)	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	118,1
Zn <sup>2+</sup>	Sulfato de zinco	ZnSO <sub>4</sub>	202,7

#### 5.1.4. Experimentos de adsorção em batelada

O contato do biossorvente com o efluente sintético foi promovido em frascos de 250 mL com 100 mL da mistura contendo 10 g L<sup>-1</sup> de biomassa liofilizada. As microalgas foram testadas separadamente, de forma que cada linhagem foi pareada com cada íon individualmente, e os experimentos foram realizados em duplicatas. A agitação foi realizada em agitador orbital (Nova Ética, modelo 109, Brasil) a 60 rpm por 24 h em temperatura ambiente (23 ± 2 °C), sem controle de pH. Após o contato, a solução tratada foi separada da biomassa microalgal por centrifugação a 4000 rpm por 10 min a 23 ± 2 °C (FANEM, 206-R, Brasil). O precipitado foi descartado e o centrifugado foi filtrado com membrana de nitrocelulose (5 µm, Merck, Irlanda) e analisado por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

#### 5.1.5. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foi empregada para analisar a concentração de íons metálicos nas amostras antes e após o processo de adsorção (Thermo Scientific, iCAP 6200, EUA). Os parâmetros analíticos do equipamento foram 1150 W de potência de radiofrequência, vazão de plasma de 15,0 L min<sup>-1</sup>, vazão de gás auxiliar de 0,5 L min<sup>-1</sup>, vazão de gás de nebulização de 0,5 L min<sup>-1</sup>, com o uso de nebulizador concêntrico e uma câmara de nebulização ciclônica. Os comprimentos de onda foram ajustados para cada metal: 324,7 nm para cobre, 283,5 nm para cromo, 238,3 nm para ferro e 213,8 nm para zinco. Curvas padrão

de 5 pontos foram preparadas pela diluição de uma solução padrão multi-elemento de alta pureza contendo os metais estudados neste trabalho, com  $R^2 > 0,995$  para todas as curvas. A diluição das amostras foi realizada com água ultrapura para obtenção de leituras dentro da faixa de trabalho das curvas de calibração. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

### 5.1.6. Cálculos de eficiência e capacidade de adsorção

A eficiência de adsorção de metais pesados pela biomassa foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Eficiência de adsorção} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100, \% \quad (5.1)$$

na qual:

$C_0$  – concentração inicial do íon metálico em solução ( $\text{mg L}^{-1}$ );

$C$  – concentração final do íon metálico em solução ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

A capacidade de adsorção da biomassa foi calculada utilizando a fórmula:

$$A (\text{mg g}^{-1}) = \frac{C_0 - C}{m} \times V \quad (5.2)$$

na qual,

$V$  – volume de amostra (L);

$m$  – massa de biomassa microalgal (g).

### 5.1.7. Análise por regressão

Os efeitos de diferentes variáveis nas capacidades de adsorção encontradas neste trabalho foram analisados usando R (v. 4.0.3 para Windows), um ambiente de *software* livre para computação estatística e geração de gráficos (Team 2013).



## 5.2. Artigo 3

Nesta seção é apresentado o terceiro artigo gerado neste trabalho de doutorado, submetido ao periódico internacional *Applied Microbiology and Biotechnology* (código de identificação do manuscrito: AMAB-D-21-01003). O artigo encontra-se apresentado seguindo a estrutura e formatação sugerida por este periódico.

REMEDIATION OF TANNERY AND ELECTROPLATING WASTEWATERS:  
ADSORPTION OF HEAVY METALS BY *CHLORELLA SOROKINIANA* AND  
*HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS*

Allan Morcelli<sup>a,\*</sup>, Gabriel Luiz Vencato<sup>b</sup>, Claudio L. C. Frankenberg<sup>b</sup>, Rosane Rech<sup>a</sup>,  
Nilson Romeu Marcílio<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Engenheiro Luiz Englert, Building  
12204, ZC 90040-040, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *Environmental Processes Laboratory (LAPA), School of Technology, Pontifical  
Catholic University of Rio Grande do Sul, Av Ipiranga 6681, Building 30, Block F,  
Room 109, ZC 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil*

\* *Corresponding author: [allan.morcelli@ufrgs.br](mailto:allan.morcelli@ufrgs.br)*

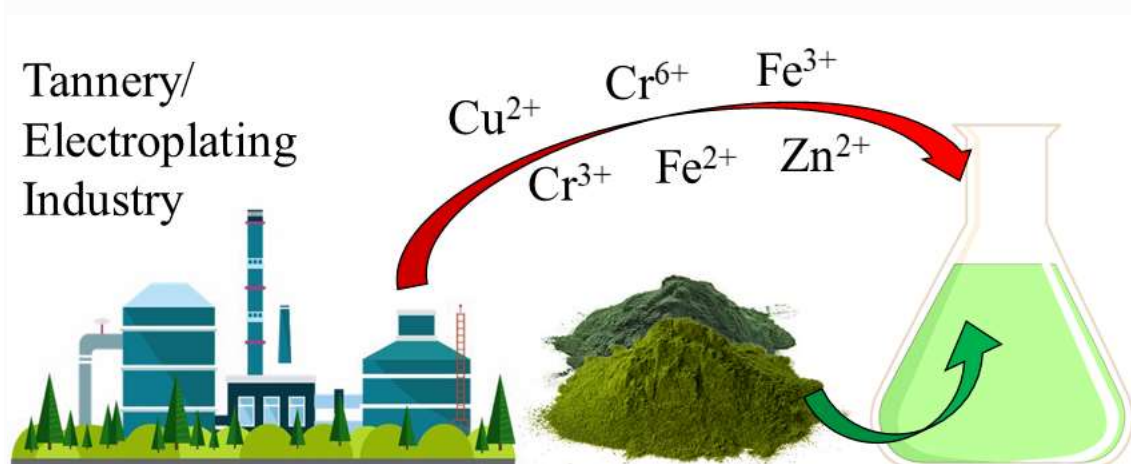
**Abstract**

The activities of tanneries and electroplating industries are hazardous in the context of water and soil contamination by heavy metals. The use of biological materials for the adsorption of heavy metals presents as an important treatment alternative. This work evaluated the capacity of *Chlorella sorokiniana* and *Heterochlorella luteoviridis* biomasses to absorb heavy metals commonly found in these industrial wastewaters. The heavy metal uptakes were 61.4 % Cu<sup>2+</sup>, 90.2 % Cr<sup>3+</sup>, 6.9 % Cr<sup>6+</sup>, 93.7 % Fe<sup>2+</sup>, 90.6 %, Fe<sup>3+</sup> and 70.3 % Zn<sup>2+</sup> for *H. luteoviridis*, and 65.6 % Cu<sup>2+</sup>, 75.7 % Cr<sup>3+</sup>, 5.4 % Cr<sup>6+</sup>, 86.0 % Fe<sup>2+</sup>, 63.5 %, Fe<sup>3+</sup> and 62.7 % Zn<sup>2+</sup> for *C. sorokiniana*. Regression analysis showed that sorption capacity was dependent on the microalga, the heavy metal

concentration in solution and the atomic number of the adsorbate. These results indicated that the use of microalgae as biosorbents is a promising alternative technology, and the efficient removal of iron has been highlighted.

**Keywords:** *Microalgae, Adsorption, Heavy metals, Tannery, Electroplating*

### **Graphical Abstract**



### **Key Points**

*C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* were tested to adsorb various heavy metals;

Both microalgae adsorbed heavy metals efficiently, with the exception of  $\text{Cr}^{6+}$ ;

The efficient biosorption of iron by microalgae has been highlighted;

Sorption capacity is dependent on microalga, metal concentration and atomic number;

### 5.2.1. Introduction

Contamination by heavy metals has become a global problem due to rapid urbanization and increased industrial activity. The heavy metals present in industrial effluents reduce the ability of water bodies to recover due to their toxic action on microorganisms; these microorganisms are responsible for the recovery of the waters through the decomposition of the organic matter present in the waters (IGBERASE; AUGUSTINE; OSIFO, 2018). The main aspect that generates interest in the removal of heavy metals from wastewaters is that these metals are non-degradable contaminants and their accumulation in human organisms is associated with the incidence of several degenerative diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's disease (MOLAZADEH et al., 2015; ZENDRON, 2015).

Among technological alternatives to treated wastewaters contaminated by heavy metals, adsorption has been highlighted as a simple mass transfer operation that explores the ability of certain solids to retain substances on their surface in liquid or gaseous fluids, allowing the separation of the components of these fluids (RUTHVEN, 1984). While the saturated adsorbent is a solid waste that will also require disposal, a wide variety of environmentally-safe materials have been tested, and the possibility of using adsorbents for many cycles by regeneration makes this technology attractive (LATA; SINGH; SAMADDER, 2015). The adsorption phenomena are the result of a combination of the types of forces involved in physical and chemical adsorption.

The use of biomass is called biosorption, whether the adsorbent is active or inactive (i.e., presenting or not metabolic activity). It is an alternative to traditional methods for the decontamination of wastewaters with heavy metals and has been investigated, with promising results reported in the literature (ROMERA et al., 2006). The removal of metal ions by inactive biomass is achieved through physical and chemical processes, as in the

case of the application of agricultural or industrial waste as biosorbents (BROOKS, 2008). Metal removal by non-living cells is metabolism independent and proceeds rapidly by complexation, ion exchange, physical adsorption, etc. Among its advantages, the absence of toxicity limitations and nutrient requirements in the feed solution and the possibility of reuse of the regenerated biomass can be cited (ISMAIL; MOUSTAFA, 2016). Adsorption by biosorbents is a process that can be reversible (with destructive regeneration or even without destruction of the biomass), making it possible to recover the adsorbed metal (by desorption or incineration of the biosorbents, or by the formation of metal oxides, for example). Contrary to what occurs in most conventional processes, the use of biosorbents presents high efficiency for the remediation of effluents containing low concentrations of metal ions (DIXIT et al., 2015). Potential alternatives in this area include the application of microalgae, which can be used as biosorbents, allowing the capture of these metals in the effluents by adsorption.

Research on the use of microalgae as biosorbents has grown in recent years, although there is still insufficient data on this technology. Different strains of microalgae have been investigated for the adsorption of heavy metals such as  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  in isolated forms and mixtures (ROMERA et al., 2006). However, given the low density of experimental results in the literature and the need to expand knowledge regarding this technology, the objective of this work was to use the *in natura* biomass of microalgae *Chlorella sorokiniana* and *Heterochlorella luteoviridis* as biosorbents in the removal of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  from monoelementary solutions of these metals with concentrations similar to those at which they are found in wastewater originating from tanneries and electroplating industries. Importantly, this is to date the first reported use of *H. luteoviridis* as a biosorbent.

## 5.2.2. Materials and Methods

### 5.2.2.1. Microalgal biomass

*C. sorokiniana* was purchased in dry powder form from a company specialized in the cultivation of microalgae (Taiwan Chlorella Manufacturing CO Ltd, Taiwan), through a representative in Brazil (Paversul, Flores da Cunha-RS). The biomass had been grown in open lagoons using fresh water, and separated by dewatering and spray-drying. Importantly, this biomass underwent a patented process for cell wall disruption (Taiwan Patent No. 183428).

In turn, the *H. luteoviridis* biomass used in this work was cultivated in the Laboratory of Microalgal Bioprocesses of the Institute of Food Sciences and Technology (ICTA/UFRGS, Porto Alegre, Brazil) using an adapted methodology (JAESCHKE et al., 2019). The strain was donated by the Universidade Federal Fluminense (Niterói, Brazil). *H. luteoviridis* was grown in aerated flat-plate airlift photobioreactors by adding 1 L min<sup>-1</sup> of filtered air (0.22 µm membrane, Midistart 2000, Sartorius Stedim Biotech, Germany) using diffusing stones (KOCHEM et al., 2014). The airflow rate was controlled using rotameters (Dwyer Instruments, USA) and the cultivation was homogeneously and continuously illuminated by artificial light, using a panel composed of 12 electronic lamps (Taschibra, Brazil, 13 W, White Light) at 18 klx. Cultures were performed using modified f1/2 culture medium with NaNO<sub>3</sub> concentration adapted to 600 mg L<sup>-1</sup>. The nutrient concentrations were maintained through the daily addition of a solution containing 1 mL L<sup>-1</sup> phosphate (5 g L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) and 1 mL L<sup>-1</sup> of a trace-minerals solution (9.8 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O, 22 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 mg L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 180 mg L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 6.3 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4.36 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA and 3.15 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O). The flasks containing culture media were sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 minutes. Cultivation was carried out under a semi-continuous regime so

that, after the first 7 days of cultivation, half the volume of the photobioreactor was removed every 48 h and replaced with fresh medium. These cycles of intermittent feeding were maintained for 14 days, and then new cultivations were started from scratch. At each cycle, the volume removed from the photobioreactor was centrifuged, (Hitachi, CR 21GIII, 10,000 g, 10 ° C, 10 min). The recovered biomass was then lyophilized (LIOTOP, Model L101, Brazil) and stored frozen (-18 ° C) until it was used in the adsorption experiments.

#### **5.2.2.2.Characterization of the microalgal biomass composition and morphology**

The proximate composition of the microalgae was carried out according to the methods of analysis approved by the American Association of Cereal Chemists (INTERNATIONAL., [s.d.]). The moisture content was determined by the thermogravimetric method in an oven at 105 °C (Method 44-15.0). The protein content, was quantified by the Kjeldahl method (Method 46-13.01) using % N x 5.95, a nitrogen-to-protein conversion factor suggested for microalgae (GONZÁLEZ LÓPEZ et al., 2010). The total lipid content was determined by the Bligh and Dyer method (BLIGH; DYER, 1959). The analysis of the ash content was carried out in a muffle furnace at 550 °C (method 08-01.01).

The surface of the microalgal biomass employed in this work was studied by scanning electron microscopy (SEM) at the Central Microscopy and Microanalysis Laboratory (LabCEMM) of PUCRS (Porto Alegre, Brazil). Freeze-dried cells were placed on a conductive double layer carbon support, coated with a layer of gold (Oerlikon Balzers, model SCD050, Switzerland), and examined by scanning electron microscopy using a Philips-FEI Quanta 200 SEM-FEG (field emission gun) microscope equipped with a FEG

canon delivering a 20 kV beam current, coupled to an energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) system (X-act model, Oxford Instruments GmbH, Wiesbaden, Germany). For quantitative element analyses of the microalgal biomass, EDS spectrograms were recorded and analyzed using the software Oxford Aztec (AZtecOne, Oxford Instruments).

### **5.2.2.3.Synthetic wastewater preparation**

Synthetic wastewater samples consisting of monoelementary solutions of each ionic species were prepared by the dissolution in ultrapure water salts containing the heavy metals of interest (Milli-Q, Merck, Germany). Each species was tested individually in order to avoid synergistic effects. The initial salt concentration was 500 mg L<sup>-1</sup> (M214AIH scale, BEL Engineering, Italy) to generate an ion concentration that was deemed high in these types of wastewater, based on values found in literature for electroplating industries (BOUKHLIFI, 2020; HUSAIN; JAVED; KHAN, 2014; PEREIRA NETO et al., 2008) and tanneries (FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, 2018; JAHAN et al., 2014), and the pH was adjusted to 6.0. Table 1 presents the utilized salts and the resulting concentration of each respective metal ion in solution, according to analysis by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES).

### **5.2.2.4.Batch adsorption experiments**

The contact between the biosorbent and the synthetic wastewater was promoted in 250 mL flasks with 100 mL of mixture containing 10 g L<sup>-1</sup> of lyophilized biomass. The microalgae were treated separately, so that each strain was paired with each ion individually, and experiments were performed in duplicates. Agitation was carried out in



an orbital shaker (Nova Ética, model 109, Brazil) at 60 rpm for 24 h at room temperature ( $23 \pm 2$  °C) with no pH control. After contact, the treated solution was separated from the microalgal biomass by centrifugation at 4000 rpm for 10 min at  $23 \pm 2$  °C (FANEM, 206-R, Brazil). The precipitate was discarded and the centrifugate was filtered with a nitrocellulose membrane (5  $\mu$ m, Merck, Ireland) and analyzed by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES).

**Table 1** Salts (ion sources) utilized and the resulting concentration of each respective metal ion in solution.

Ion	Salt	Molecular formula	Ion concentration (mg L <sup>-1</sup> )
Cu <sup>2+</sup>	Copper sulfate pentahydrate	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	129.0
Cr <sup>3+</sup>	Chromium(III) chloride hexahydrate	CrCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	98.8
Cr <sup>6+</sup>	Potassium dichromate	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	178.9
Fe <sup>2+</sup>	Iron(II) sulfate	FeSO <sub>4</sub>	183.8
Fe <sup>3+</sup>	Iron(III) nitrate	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	118.1
Zn <sup>2+</sup>	Zinc sulfate	ZnSO <sub>4</sub>	202.7

#### 5.2.2.5.ICP-OES

Optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES) was employed to analyze the concentration of metal ions in the samples before and after the adsorption process (Thermo Scientific, iCAP 6200, USA). The analytical parameters of the equipment were 1150 W radio frequency power, 15.0 L min<sup>-1</sup> plasma flow rate, 0.5 L min<sup>-1</sup> auxiliary gas flow rate, 0.5 L min<sup>-1</sup> nebulization gas flow rate, with the use of a concentric nebulizer and a cyclonic nebulizer chamber. The wavelengths were adjusted to each metal: 324.7 nm for copper, 283.5 nm for chromium, 238.3 nm for iron and

213.8 nm for zinc. 5-point standard curves were prepared by the dilution of a high purity multi-element standard solution containing the metals studied in this work, with  $R^2 > 0.995$  for all curves. The dilution of samples was performed using ultrapure water in order to obtain readings within the working range of the calibration curves. All analyses were performed in duplicates.

#### 5.2.2.6. Adsorbate uptake and sorption capacity calculations

Heavy metal uptake by biomass was calculated according to the formula:

$$Uptake = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100, \% \quad (1)$$

where:

$C_0$  – the initial metal concentration in solution ( $\text{mg L}^{-1}$ ),

$C$  – the final metal concentration in solution ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Sorption capacity of biomass was calculated according to the formula:

$$A (\text{mg g}^{-1}) = \frac{C_0 - C}{m} \times V \quad (2)$$

where:

$V$  – volume of the sample (L),

$m$  – mass of microalgal biomass (g).

### **5.2.2.7. Regression analysis**

The effects of different variables on the sorption capacities found in this work were analyzed using R (v. 4.0.3 for Windows), a free software environment for statistical computing and graphics (TEAM, 2013).

## **5.2.3. Results and Discussion**

### **5.2.3.1. Microalgal biomass characterization and morphology**

The main composition and the elemental analysis of the microalgae *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana* are shown in Table 2. In general, the biomass compositions found in this work were compatible with data previously reported in the literature (DIPRAT et al., 2017a, 2020b). The compositions of the two species presented substantial differences, as *H. luteoviridis* showed a higher carbohydrate content (55.2 %), and *C. sorokiniana* presented as a protein-rich microalgal biomass (62.1 %). Also, while *H. luteoviridis* presented a high lipid content (11.8 %), an attribute for which this species has been highlighted, *C. sorokiniana*'s showed a notably low lipid content (3.4 %).

The freeze-dried biomasses of the microalgae *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana* used in this work were also analyzed by scanning electron microscopy (SEM) with the purpose of assessing the effects of particle structure on adsorption results, and the images were generated at different amplifications (Fig. 1). The two microalgae formed differently structured particle clusters while presenting similar particle sizes (*circa* 5  $\mu\text{m}$ ). Average cell size had been previously reported by studies describing the morphology of these macroalga species (KIM et al., 2017; NOR et al., 2017). *C. sorokiniana* cells formed well-defined spherical clusters with rough surfaces, ranging 50-200  $\mu\text{m}$  in average. In contrast, *H. luteoviridis* forms clusters presented as wide plaques, suggesting strong aggregation. This observed phenomenon has been widely reported, as microalgae assume the form of

polymicrobial aggregates at the interface due to excretions known as extracellular polymeric substances (EPS), composed of a complex mixture of biopolymers comprising polysaccharides, proteins, nucleic acids, uronic acids, humic substances, lipids, etc. These EPS significantly alter the physicochemical properties of algae aggregates, such as surface charge, viscosity, flocculation, structure, and settling properties (XIAO; ZHENG, 2016). Furthermore, while cell integrity was verified for *H. luteoviridis*, the count in the generated images indicated that approximately 10 % of the *C. sorokiniana* cells were ruptured, an effect attributed to the pre-treatment that this biomass had undergone during processing.

**Table 2** Moisture, protein, lipid, ash content and elemental characterization of the *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana* biomasses used in this work.

	<i>H. luteoviridis</i> (% w/w)	<i>C. sorokiniana</i> (% w/w)
Moisture	5.1 ± 0.3	4.6 ± 0.1
Carbohydrates*	55.2 ± 1.1	29.9 ± 2.1
Protein*	27.9 ± 1.3	62.1 ± 2.4
Lipids*	11.8 ± 0.9	3.4 ± 0.3
Ashes	13.4 ± 0.9	6.8 ± 0.2
<u>Elemental analysis by EDS</u>		
Element	(% w/w)	(% w/w)
C	57.94 ± 0.00	54.24 ± 0.00
N	n.d.	13.99 ± 0.00
O	35.94 ± 0.00	28.32 ± 0.00
Mg	0.60 ± 0.00	0.40 ± 0.00
P	n.d.	1.59 ± 0.00
S	1.50 ± 0.00	0.77 ± 0.00
K	0.97 ± 0.00	0.70 ± 0.00
Cl	0.80 ± 0.00	n.d.
Ca	1.07 ± 0.00	n.d.
Cu	1.19 ± 0.00	n.d.

\*quantities expressed on a dry basis; n.d. = not detected.

### 5.2.3.2. Heavy metal uptake and sorption capacity of biomass

Batch adsorption experiments were carried out allowing the contact of the microalgal biomasses of *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana* with each mono-elementary solution individually. ICP-OES analysis of the treated solutions was carried out to determine the residual heavy metal concentration (Table 3). Adsorbate uptake and the sorption capacity of each microalgal biomass were calculated by Equation 1 and Equation 2, respectively.

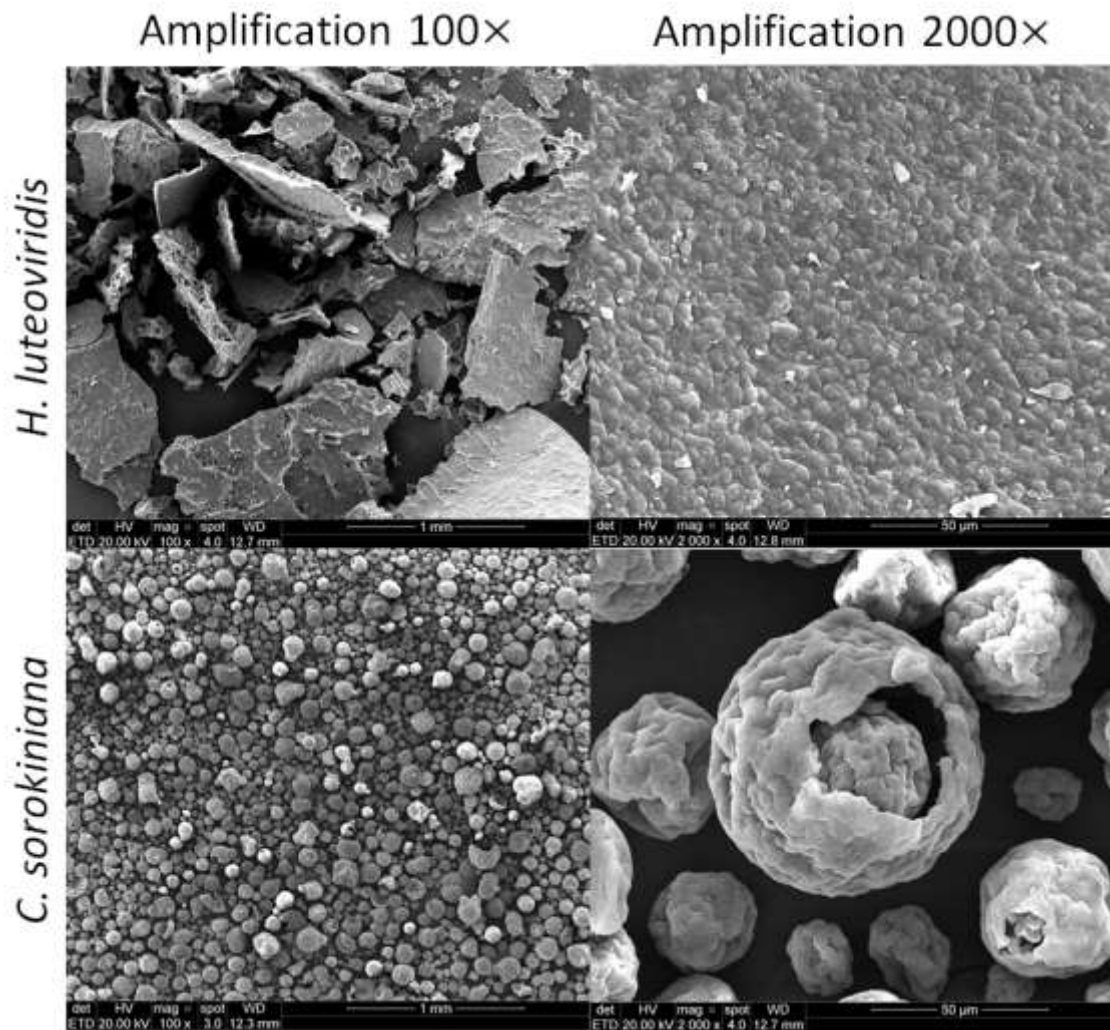


Fig. 1 SEM images of the freeze-dried biomass of *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana* employed in this work, at 100x and 2,000x amplifications.

*H. luteoviridis* and *C. sorokiniana* were both able to naturally adsorb all of the metal species studied in this work, although to different extents. This was shown by the changes in the metal concentrations in solution after contact with the untreated microalgal biomass (i.e, without the application of any pre-treatments aiming at activation). Through the analysis of the adsorbate uptakes achieved, it was observed that the microalgae presented qualitatively similar behaviors as adsorbents. High removal efficiencies were observed for  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . However, notably low removal efficiency was found for  $\text{Cr}^{6+}$ , a highly toxic and carcinogenic species that is commonly found in the wastewaters generated in tanneries and in electroplating industries. It should be noted that hexavalent chromium usually exists in wastewater as oxyanions such as chromate  $\text{CrO}_4^{2-}$  and dichromate  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  and is known to not precipitate easily using conventional precipitation methods (WANEES et al., 2013).

**Table 3** Residual ion concentrations, adsorbent uptakes and sorption capacities of *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana*.

Ion	<i>H. luteoviridis</i>			<i>C. sorokiniana</i>		
	Residual ion concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Uptake (%)	Sorption capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Residual ion concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Uptake (%)	Sorption capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ )
$\text{Cu}^{2+}$	$49.8 \pm 4.4$	$61.4 \pm 3.4$	$7.8 \pm 0.5$	$44.0 \pm 1.5$	$65.6 \pm 1.1$	$8.2 \pm 0.0$
$\text{Cr}^{3+}$	$9.7 \pm 0.2$	$90.2 \pm 0.2$	$8.7 \pm 0.3$	$24.0 \pm 3.9$	$75.7 \pm 4.0$	$6.9 \pm 0.0$
$\text{Cr}^{6+}$	$166.5 \pm 0.0$	$6.9 \pm 0.0$	$1.2 \pm 0.0$	$169.4 \pm 1.3$	$5.4 \pm 0.7$	$0.9 \pm 0.1$
$\text{Fe}^{2+}$	$11.6 \pm 1.0$	$93.7 \pm 0.5$	$16.6 \pm 0.5$	$25.7 \pm 1.0$	$86.0 \pm 0.6$	$14.7 \pm 0.1$
$\text{Fe}^{3+}$	$11.1 \pm 3.7$	$90.6 \pm 3.1$	$10.4 \pm 0.5$	$43.1 \pm 0.3$	$63.5 \pm 0.3$	$7.5 \pm 0.0$
$\text{Zn}^{2+}$	$60.1 \pm 2.6$	$70.3 \pm 1.3$	$13.2 \pm 0.2$	$75.7 \pm 3.3$	$62.7 \pm 1.6$	$11.8 \pm 0.6$

The high adsorbate uptakes achieved by both microalgae with most metal species are highlighted. The best uptake results for *in natura* *H. luteoviridis* - all above 90.0 % - were observed for  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Cr}^{3+}$  (93.7%, 90.6% and 90.2%, respectively). For this microalga, lower uptakes were achieved for  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  (70.3% and 61.4%, respectively), while its capacity to adsorb  $\text{Cr}^{6+}$  was remarkably the lowest (6.9%). In turn, the best results for *in natura* *C. sorokiniana* were found for  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{3+}$  (86.0% and 75.7%, respectively). These species were again seen as the most easily adsorbed in the process, although lower uptakes were found when compared to those achieved by *H. luteoviridis*. *C. sorokiniana* was also able to adsorb  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  with similar efficiency (with uptakes of 65.6%, 63.5%, and 62.7%, respectively). Again, the adsorption of  $\text{Cr}^{6+}$  achieved by this microalga was very low (5.4%).

Regarding the analysis of sorption capacity, the best results of this work were achieved in the removal of  $\text{Fe}^{2+}$  by *H. luteoviridis*, at  $16.6 \text{ mg g}^{-1}$ . This would signify a lower demand in the quantity of biosorbent necessary to treat wastewater contaminated by this metal. It is also important to note that this satisfactory result for sorption capacity for  $\text{Fe}^{2+}$  by *H. luteoviridis* also corresponded to a high uptake (93.7%). Good results were also found for this microalga's capacity to adsorb  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ , with sorption capacities of  $13.2 \text{ mg g}^{-1}$  and  $10.4 \text{ mg g}^{-1}$ , respectively. Lower sorption capacities were achieved for  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$  ( $7.8 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $8.7 \text{ mg g}^{-1}$  and  $1.2 \text{ mg g}^{-1}$ , respectively). It should be noted the aforementioned high  $\text{Cr}^{3+}$  uptake by *H. luteoviridis* (90.2%) was associated with a higher demand of the biosorbent (approximately twice the quantity necessary to adsorb  $\text{Fe}^{2+}$ , the best result achieved in this work, as denoted by the respective sorption capacities). Comparatively, a much lower sorption capacity was found for  $\text{Cr}^{6+}$  ( $1.2 \text{ mg g}^{-1}$ ). Moreover, when *C. sorokiniana* was tested, the sorption capacity for  $\text{Fe}^{2+}$  was also the highest ( $14.7 \text{ mg g}^{-1}$ ). For the other metals, this microalga showed lower sorption

capacities, with 11.8 mg g<sup>-1</sup> for Zn<sup>2+</sup>, 8.2 mg g<sup>-1</sup> for Cu<sup>2+</sup>, 7.5 mg g<sup>-1</sup> for Fe<sup>3+</sup> and 6.9 mg g<sup>-1</sup> for Cr<sup>3+</sup>. Again, much lower sorption capacity was found for Cr<sup>6+</sup> (0.9 mg g<sup>-1</sup>).

The effects of different variables on sorption capacities were tested by regression analysis to find a mathematical model that better represented the experimental results found in this work for all species, except Cr<sup>6+</sup>, as it is found as an oxyanion in solution, as previously discussed. Regression models considering the effects of the microalga, the cation charge (i.e., oxidation number), the initial concentration of the cation in the synthetic wastewater, the atomic number of the species, and the 2-way interactions of these factors were reduced by incrementally removing the least significant effects, in such a way to obtain a simple model with a high regression coefficient composed of statistically significant effects. Through this approach, a regression model presenting the microalga, the initial concentration of the metal in solution and the 2-way interaction of the latter effect with the atomic number presented a high correlation, with  $R^2 = 0.97$  (Table 4).

**Table 4** Regression analysis of the sorption capacities found in this work.  $C_0$ : initial concentration of the heavy metal in solution;  $AtN$ : atomic number of the adsorbate.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	-13.4932	11.27623	-1.197	0.2851
Microalga	1.52	0.482981	3.147	0.02546
$C_0$	0.312928	0.075872	4.124	0.00913
$AtN$	0.367687	0.426486	0.862	0.42802
$C_0:AtN$	-0.0081	0.002777	-2.915	0.0332

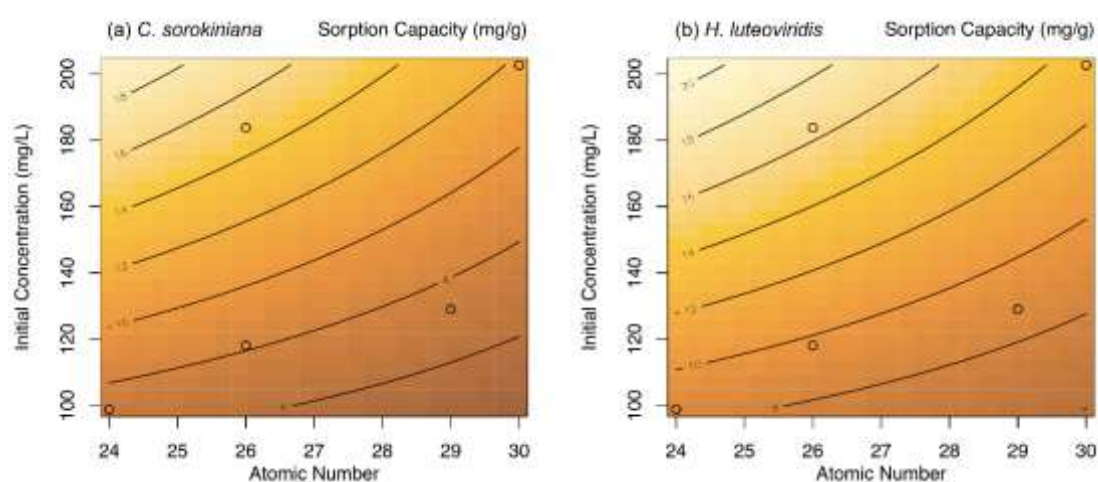
Residual standard error: 0.7637 on 5 degrees of freedom; Multiple  $R^2$ : 0.9713, Adjusted  $R^2$ : 0.9483;  $F$ -statistic: 42.29 on 4 and 5 DF,  $p$ -value: 0.0004789

The capacity of biomaterials to adsorb metals depends on the composition of their cellular surface, and some of the differences in elemental composition and morphology



between *C. sorokiniana* and *H. luteoviridis* have been discussed in this work, being correlated to cell disruption. In addition, as the proximal composition of the biomasses differed in many aspects, this factor has yet to be further studied in order to correlate it to the effective mechanisms of biosorption. Generally, the mechanisms of adsorption by inactive microalgal biomass is based on a number of metal-binding processes taking place with components of the cell wall, and is therefore dependent on its composition. The microalgal cell walls can reversibly biosorb metals, and thus function in a similar way to an ion-exchange resin (ISMAIL; MOUSTAFA, 2016). The microalgal cell wall generally has many functional groups, such as, hydroxyl (-OH), phosphoryl (-PO<sub>3</sub>O<sub>2</sub>), amino (-NH<sub>2</sub>), carboxyl (-COOH), sulfhydryl (-SH), among others, which confer negative charge to the cell surface, and concomitantly a high binding affinity for metal cations via counterion interactions (MEHTA; GAUR, 2008). The biosorption mechanism has been described as not involving van der Waals forces at the cellulose network of the cell walls, thus both ionic charge and covalent bonding are involved in the metal biosorption process. Covalent bonding could be expected with amino and carboxyl groups and ionic charge bonding with carboxyl and sulphate groups associated with these components (PETERSEN et al., 2005). Adsorption via ion exchange appears to contribute to about 90 % of the total amount of metal ions uptaken by microalgal cells (MONTEIRO et al., 2012). In addition, the aforementioned exopolymers formed by microalgae are known to play a crucial role in the biosorption of heavy metals, as they are polyanionic in nature and form complexes with metal cations resulting in metal immobilization within the exopolymeric matrix. These complexes generally result from electrostatic interactions between the metal ligands and negatively charged components of biopolymers (PAL; PAUL, 2008).

A combination of high initial concentration of the heavy metal in solution with a low atomic number correlated to increased sorption capacities (Fig. 2). The efficiency on the removal of metals by microalgae is known to depend on the original concentration of the metals in solution. The maximum sorption level initially increases with an increase in metal concentration and eventually reaches saturation after a certain metal concentration threshold is achieved (MONTEIRO et al., 2012), and this behavior is predicted by classical adsorption isotherms (OMAR, 2002). In addition, the sorption capacity decreases with the atomic number, and the effect of the concentration on the sorption capacity is stronger at low atomic numbers. As the atomic number increases along the same row of the periodic table ( $Zn > Cu > Fe > Cr$ ), the additional electrons go into the same outermost shell, causing the atomic radius to decrease due to the increasing nuclear charge (KOHOUT; SAVIN, 1996). It is speculated that the decrease in adsorbate size at lower atomic numbers may have facilitated adsorption, rendering the aforementioned effect that resulted in higher sorption capacities.



**Fig 2:** Contour plots showing the the effect of the initial heavy metal concentration and of the atomic number of the adsorbate on sorption capacity for (a) *C. sorokiniana*; (b) *H. luteoviridis*.

The results obtained in this work are further discussed in the light of studies currently available in literature using aquatic plant biomass and the reports addressing the application of microalgae as biosorbents. Dry biomass of the aquatic plants *Potamogeton lucens*, *Salvinia herzogii* and *Eichhornia crassipes* were tested to remove  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Cr^{3+}$  from synthetic industrial wastewaters (SCHNEIDER, 1995). This study pointed out that the removal of metals was controlled by the pH equilibrium of the medium. This has been corroborated when *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus armatus* were modified with 1M  $HNO_3$  in order to determine the influence of acid-treatment on the removal of  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  from zinc smelting wastewater (ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK; RYGAL, 2017). The aforementioned study showed that the sorption process of heavy metals was highly pH-dependent and that the differences between uptake by non-modified and acid-modified biomass were relatively small, a result that was attributed to the fact that the non-modified algal biomass already presented high sorption capacity. A review on the state of the art of biosorption processes with brown, red and green algae also highlighted the importance of working at optimal pH and assessed the effect of pre-treatments in adsorbate uptake (ROMERA et al., 2006). The differences found in literature indicated that the pre-treatment of the biomass generally improves metal uptake, but the increase has occasionally not been very significant in the case of algae; therefore, its application should be evaluated considering the economic impact it may represent to the overall process.

Although the use of *H. luteoviridis* as a biosorbent is virtually absent in the literature to date, *C. sorokiniana* has been tested both as a living and as a lifeless adsorbent. The greater adsorption capacity of lifeless cells was observed when compared to the use of living *C. sorokiniana* (LIANG et al., 2017), and uptakes ranging 53.1 – 74.7 % were found in the adsorption of Pb. Also, the potential of alginate-immobilized *C. sorokiniana*

for removing  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  ions from drinking water solutions has also been investigated, and the highest experimental heavy metal uptakes achieved were 97.1 %, 50.9 % and 64.6 %, respectively (PETROVIČ; SIMONIČ, 2016). In other studies, the adsorption of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{3+}$  from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana* were tested (AKHTAR et al., 2008; AKHTAR; IQBAL; IQBAL, 2004). Maximum uptakes of *circa* 75.0 %  $\text{Ni}^{2+}$  and 50.0 %  $\text{Cr}^{3+}$ , and sorption capacities of 48.08  $\text{mg g}^{-1}$   $\text{Ni}^{2+}$  and 58.8  $\text{mg g}^{-1}$   $\text{Cr}^{3+}$  were found for the free biomass of *C. sorokiniana*, while increases in sorption capacities were noted when the biomass was immobilized in loofa (25.3 % and 17.8 %, for  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{3+}$ , respectively). Importantly, a significant decrease in the uptake of  $\text{Ni}^{2+}$  by free biomass was noted after the biosorbent concentration was increased from 1.0 to 2.5  $\text{g L}^{-1}$ , an effect that has been attributed to the occurrence of cell aggregation.

Overall, the quality of the best results in this work was comparable to that of works found in literature using other biosorbents to remove heavy metals under optimized conditions. Also, the gain in process efficiency achieved in some of the aforementioned studies indicated that there is opportunity to improve the results here presented for the microalgae *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana*, especially for the metal species that presented low uptakes and sorption capacities when treated with *in natura* biomass. Particularly, it is believed that the process could be substantially improved under controlled pH conditions.

#### **5.2.4. Conclusions**

The ability of *H. luteoviridis* and *C. sorokiniana* biomasses to adsorb  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  has been demonstrated. Altogether, this work indicated the large

potential of the application of both microalgal biomasses as biosorbents to remediate tannery and electroplating wastewaters, as both microalgae were able to efficiently adsorb heavy metals typically contained in them, with the noted exception of Cr<sup>6+</sup>. Sorption capacity was proven to be dependent on the microalgal biomass, the initial metal concentration in solution and the atomic number of the adsorbent. Although the process was conducted without optimization, high uptakes were achieved, and the biosorption of iron has been highlighted. The disruption of particle aggregates has been deemed detrimental to the quality of adsorption, and one of the causes for the better performance of *H. luteoviridis*. To develop the full potential of this technology, it is suggested that the synergy of coexisting metals in solution should be investigated by performing experiments employing multielement synthetic wastewaters. Finally, the use of residual microalgal biomass from extraction processes should be studied in future works, aiming at the valorization of this residue to help develop an economically advantageous large-scale microalgal refinery.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### 5.2.5. References

ABBAS, S. H. et al. Biosorption of Heavy Metals : A Review. n. January, 2014.

ABDI, O.; KAZEMI, M. A review study of biosorption of heavy metals and comparison between different biosorbents. **J Mater Environ Sci**, v. 6, n. 5, p. 1386–1399, 2015.

ADJEROUD, N. et al. Effect of *Opuntia ficus indica* mucilage on copper removal from water by electrocoagulation-electroflotation technique. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 811, p. 26–36, 2018.

AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 163, n. 6, p. 739–744, set. 2000.

AGRAWAL S; RAO AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Cmaj**, v. 163, n. 6, p. 739–44, 2000.

AHALYA, N.; RAMACHANDRA, T. V; KANAMADI, R. D. Biosorption of heavy metals. **Res. J. Chem. Environ**, v. 7, n. 4, p. 71–79, 2003.

AHAMED, T. et al. A generalized approach to thermodynamic properties of biomolecules for use in bioseparation process design. **Fluid Phase Equilibria**, v. 241, n. 1–2, p. 268–282, 2006.

AHEMAD, M.; MALIK, A. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. **Bacteriol. J**, v. 2, n. 1, p. 12–21, 2011.

AKHTAR, N. et al. Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr(III). **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 2, p. 231–239, 2008.

AKHTAR, N.; IQBAL, J.; IQBAL, M. Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. **Journal of hazardous materials**, v. 108, n. 1–2, p. 85–94, abr. 2004.

AL-SHANNAG, M. et al. Heavy metal ions removal from metal plating wastewater using electrocoagulation: Kinetic study and process performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 749–756, 2015.

ALFONSI, K. et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2008.

ALYÜZ, B.; VELI, S. Kinetics and equilibrium studies for the removal of nickel and zinc from aqueous solutions by ion exchange resins. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1, p. 482–488, 2009.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. DE A. C. E S.; FARO, Z. P. DE. **Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A Revista de Nutrição scielo** , , 2006.

ANANTHARAJ, R.; BANERJEE, T. COSMO-RS-based screening of ionic liquids as green solvents in denitrification studies. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 18, p. 8705–8725, 2010.

ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; ZHANG, X. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 1, p. 60–64, 2008.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics. **Journal of Molecular Recognition**, v. 17, n. 3, p. 236–247, 2004.

BABEL, S.; KURNIAWAN, T. A. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water : a review. v. 97, p. 219–243, 2003.

BAICHA, Z. et al. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel**

**Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016.

BALASUBRAMANIAN, S. et al. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system--design, optimization, and quality characterization.

**Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3396–3403, fev. 2011.

BALLADARES, E. et al. Neutralization and co-precipitation of heavy metals by lime addition to effluent from acid plant in a copper smelter. **Minerals Engineering**, v. 122, p. 122–129, 2018.

BALTPURVINS, K. A. et al. Effect of electrolyte composition on zinc hydroxide precipitation by lime. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 973–980, 1997.

BARREIRO, M. F. Review and Industry and Market Trend Analysis. p. 1–23, 2020.

BEGUM, H. et al. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, 2016a.

BEGUM, H. et al. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, out. 2016b.

BELAY, A. et al. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235–241, 1993.

BENVENUTTI, L. et al. NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from *Myrciaria cauliflora* fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. **Journal of Molecular Liquids**, v. 315, p. 113761, 2020.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification.

**Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, ago. 1959.



- BOONNOUN, P. et al. Wet extraction of lipids and astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by liquefied dimethyl ether. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 5, 2014.
- BOUKHLIFI, F. Characterization and Treatment of Real Wastewater from an Electroplating Company by Raw Chitin. In: [s.l: s.n.].
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 2015.
- BRATSKAYA, S. Y. et al. Heavy metals removal by flocculation/precipitation using N-(2-carboxyethyl)chitosans. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 339, n. 1, p. 140–144, 2009.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (EDS.). **Carotenoids**. [s.l.] Birkhäuser Basel, 2008.
- BROOKS, R. Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals. In: [s.l: s.n.]. p. 87–105.
- BURAKOV, A. E. et al. Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes : A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. November, p. 702–712, 2017.
- CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927–934, 2007.
- CASAS CARDOSO, L. et al. Extraction of Carotenoids and Fatty Acids from

- Microalgae Using Supercritical Technology. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, p. 877–883, 1 jan. 2012.
- CEPEDA, A.; FENTE, C.; REGAL, P. Trends in Analytical Chemistry Review of methods for analysis of carotenoids q. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49–73, 2014.
- CERÓN-GARCÍA, M. C. et al. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). **Food Chemistry**, v. 257, 1 mar. 2018.
- CHEAH, W. Y. et al. Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.
- CHEN, J. H. et al. Enhancing lutein production with mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 using different bioprocess operation strategies. **Bioresource Technology**, v. 278, n. January, p. 17–25, 2019.
- CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.
- COÊLHO, D. D. F. Microalgae : Cultivation Aspects and Bioactive Compounds. v. 62, 2019.
- CONDE, E.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 957–964, 2015.
- CORDERO, B. F. et al. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. **Marine drugs**, v. 9, n. 9, p. 1607–1624, 2011.

COSTA, M. A. L. DA; ORTEGA-FLORES, C. I.; PENTEADO, M. DE V. C.

**Alterações estruturais in vivo dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do b-caroteno**  
**Food Science and Technology** scielo , , 2002.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients. . 2009, p. OJ L 141, 6.6.2009, 3–11.

CRAMPON, C.; BOUTIN, O.; BADENS, E. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Molecules of Interest from Microalgae and Seaweeds. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 15, p. 8941–8953, 3 ago. 2011.

CUARESMA, M. et al. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 352–359, 1 out. 2009.

CUBAS, C.; GLORIA LOBO, M.; GONZÁLEZ, M. Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by N,N-dimethylformamide using response surface methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 2, p. 125–133, 2008.

DA'NA, E. Adsorption of heavy metals on functionalized-mesoporous silica: A review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 247, p. 145–157, 2017.

DARANI, K. K.; MOZAFARI, M. R. Supercritical fluids technology in bioprocess industries: a review. **Journal of Biochemical Technology**, v. 2, n. 1, p. 144–152, 2010.

DEMING, D. M.; TEIXEIRA, S. R.; ERDMAN JR., J. W. All-trans  $\beta$ -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis  $\beta$ -Carotene in Gerbils Given

Single Oral Doses of Each Isomer. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 9, p. 2700–2708, 1 set. 2002.

DENG, X.; WANG, P. Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. **Bioresource technology**, v. 121, p. 342–347, 2012.

DI LENA, G. et al. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. **Food Research International**, v. 120, p. 810–818, 2019.

DING, Z. et al. Filtration and transport of heavy metals in graphene oxide enabled sand columns. **Chemical Engineering Journal**, v. 257, p. 248–252, 2014.

DIPRAT, A. B. et al. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3463–3468, ago. 2017a.

DIPRAT, A. B. et al. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3463–3468, 1 ago. 2017b.

DIPRAT, A. B. et al. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. **Lwt**, v. 134, n. August, p. 109974, 2020a.

DIPRAT, A. B. et al. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. **LWT**, v. 134, p. 109974, 2020b.

DIXIT, R. et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability (Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 2189–2212, 2015.

DONG, S. et al. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p.

694305, 2014.

ERTO, A. et al. A Comparison Between a Low-Cost Sorbent and an Activated Carbon for the Adsorption of Heavy Metals from Water. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, 1 abr. 2013.

EVANGELISTA, V. et al. **Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2008.

FAHMY, T. M. et al. Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 10, p. 1462–1469, 15 maio 1993.

FERRARINI, F. **Um banco de dados de perfis sigma aberto e extensível**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

FERRARINI, F. et al. An Open and Extensible Sigma-Profile Database for COSMO-Based Models. v. 64, n. 00, 2018a.

FERRARINI, F. et al. An open and extensible sigma-profile database for COSMO-based models. **AIChE Journal**, v. 64, n. 9, p. 3443–3455, 1 set. 2018b.

FERRUZZI, M.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research - NUTR RES**, v. 27, 2007.

FIGLIORE, M. F.; MOON, D. H.; TREVORS, J. T. Metal Resistance and Accumulation in Cyanobacteria BT - Wastewater Treatment with Algae. In: WONG, Y.-S.; TAM, N. F. Y. (Eds.). . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 111–124.

FOLEY, P. M.; BEACH, E. S.; ZIMMERMAN, J. B. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. **Green Chem.**, v. 13, n. 6, p. 1399–1405,

2011.

FOUREST, E.; ROUX, J. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 399–403, 2004.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 3, p. 407–418, 2011.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Guia Técnico Ambiental de Curtumes**. Belo Horizonte: [s.n.]. Disponível em: <[http://biblioteca.meioambiente.mg.gov.br/publicacoes/BD FEAM/Guia\\_Curtume\\_Final\\_logo\\_Governo.pdf](http://biblioteca.meioambiente.mg.gov.br/publicacoes/BD_FEAM/Guia_Curtume_Final_logo_Governo.pdf)>.

GADD, G. M.; WHITE, C. Copper Uptake by *Penicillium ochro-chloron*: Influence of pH on Toxicity and Demonstration of Energy-dependent Copper Influx Using Protoplasts. **Microbiology**, v. 131, n. 8, p. 1875–1879, 1985.

GERBER, R. P. **Modelo COSMO-SAC como ferramenta de engenharia química**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

GERBER, R. P.; SOARES, R. D. P. Prediction of infinite-dilution activity coefficients using UNIFAC and COSMO-SAC variants. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 16, p. 7488–7496, 2010.

GERBER, R. P.; SOARES, R. P. Assessing the reliability of predictive activity coefficient models for molecules consisting of several functional groups. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2013.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae : A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016a.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016b.

GONG, Z. et al. Computational method for inferring objective function of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. **Computational biology and chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1–6, fev. 2009.

GONZÁLEZ-DELGADO, A.; KAFAROV, V. Microalgae based biorefinery: Issues to consider. **CT y F - Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 4, p. 5, 1 dez. 2011.

GONZÁLEZ LÓPEZ, C. V. et al. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7587–7591, 2010.

GOVINDJEE et al. **Photosynthesis** McGraw-Hill Education, , 11 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.accessscience.com/content/photosynthesis/511700> OP - AccessScience>

HALIM, R. et al. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, 2010.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, ago. 2012.

HARSHA, K.; SENTHIL, P.; PANDA, R. C. A review on heavy metal pollution , toxicity and remedial measures : Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 111197, 2019.

HEAD, I. M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 599–608, 1998.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications.

**J. Chromatogr. A**, v. 1217, n. 16, p. 2495–511, 2010.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.

HORWITZ, B. Role of chlorophyll in proctology. **The American Journal of Surgery**, v. 81, n. 1, p. 81–84, 1951.

HU, H.; XU, K. Chapter 8 - Physicochemical technologies for HRP and risk control. In: REN, H.; ZHANG, X. B. T.-H.-R. P. IN W. (Eds.). . [s.l.] Elsevier, 2020. p. 169–207.

HUMPHREY, A. M. Chlorophyll. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 57–67, 1980.

HUMPHREY, A. M. Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. C422–C425, 1 jun. 2004.

HUSAIN, A.; JAVED, I.; KHAN, N. A. Characterization and treatment of electroplating industry wastewater using Fenton's reagent. **J Chem Pharm Res**, v. 6, n. 1, p. 622–627, 2014.

IGBERASE, E.; AUGUSTINE, O.; OSIFO, P. Enhanced heavy metal ions adsorption by 4-aminobenzoic acid grafted on chitosan/epichlorohydrin composite: Kinetics, isotherms, thermodynamics and desorption studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, 1 nov. 2018.

INANC, A. Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. **Akademik Gida**, v. 9, 1 jan. 2011.

INGLEZAKIS, V. J.; GRIGOROPOULOU, H. P. Modeling of ion exchange of Pb<sup>2+</sup> in fixed beds of clinoptilolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 61, n. 1, p.



273–282, 2003.

INTERNATIONAL., A. **Official methods of analysis of AOAC**

**International. Official methods of analysis of AOAC International.** [Gaithersburg, Md.] AOAC International, , [s.d.].

ISMAIL, I.; MOUSTAFA, T. Biosorption of heavy metals. **Heavy Metals: Sources, Toxicity and Remediation Techniques**, n. October, p. 131–174, 2016.

JACOTET-NAVARRO, M. et al. What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. **ELECTROPHORESIS**, v. 39, n. 15, p. 1946–1956, 1 ago. 2018.

JAESCHKE, D. P. et al. Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1636–1643, 2016.

JAESCHKE, D. P. et al. The effect of temperature and moderate electric field pre-treatment on carotenoid extraction from *Heterochlorella luteoviridis*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 2, p. 396–402, 2019.

JAHAN, M. A. A. et al. Characterization of tannery wastewater and its treatment by aquatic macrophytes and algae. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 49, n. 4, p. 233–242, 2014.

JAIME, L. et al. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 105–112, 2010.

JEFFREY, S. W. et al. **Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to**

**Modern Methods.** [s.l.] UNESCO Publishing, 1997.

JOHNSON, E. J. The role of carotenoids in human health. **Nutrition in clinical care : an official publication of Tufts University**, v. 5, n. 2, p. 56–65, 2002.

JUAN, J. C. et al. Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 452–460, 2011.

KANDA, H. et al. **Extraction of Fucoxanthin from Raw Macroalgae excluding Drying and Cell Wall Disruption by Liquefied Dimethyl Ether** *Marine Drugs* , 2014.

KANG, S.-Y. et al. Competitive adsorption characteristics of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Cr}^{3+}$  by IRN-77 cation exchange resin in synthesized wastewater. **Chemosphere**, v. 56, n. 2, p. 141–147, 2004.

KANG, Y.-R. et al. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. **Food Chemistry**, v. 245, p. 943–950, 2018.

KAPLAN, D. Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. p. 602–611, 2013.

KARIMI, S.; TAVAKKOLI, M. A comprehensive review of the adsorption mechanisms and factors influencing the adsorption process from the perspective of bioethanol dehydration. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. November 2018, p. 535–553, 2019.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.

- KHATRI, N.; TYAGI, S.; RAWTANI, D. Recent strategies for the removal of iron from water: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 19, n. 13, p. 291–304, 2017.
- KHEZAMI, L.; CAPART, R. Removal of Chromium(VI) From Aqueous Solution by Activated Carbons: Kinetic and Equilibrium Studies. **Journal of hazardous materials**, v. 123, p. 223–231, 1 set. 2005.
- KHOO, H. H. et al. Life cycle energy and CO<sub>2</sub> analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5800–5807, 2011.
- KIM, D. et al. Bioresource Technology Cell-wall disruption and lipid / astaxanthin extraction from microalgae : Chlorella and Haematococcus. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 300–310, 2016.
- KIM, K. M. et al. Characterization of Heterochlorella luteoviridis (Trebouxiaceae, Trebouxiophyceae) isolated from the Port of Jeongja in Ulsan, Korea. **Journal of Marine Bioscience and Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 22–29, 2017.
- KIM, M. K.; AHN, S. H.; LEE-KIM, Y. C. Relationship of serum  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v. 21, n. 6, p. 797–809, 2001.
- KITADA, K. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment components with pharmaceutical importance from Chlorella vulgaris. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 657–661, 1 maio 2009.
- KLAMT, A. **COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design**. [s.l.] Elsevier Science, 2005.

KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 5, p. 799–805, 1993.

KLÄUI, H.; BAUERNFEIND, J. C. 2 - CAROTENOIDS AS FOOD COLORS. In: BAUERNFEIND, J. C. B. T.-C. AS C. AND V. A. P. (Ed.). . **Food Science and Technology**. San Diego: Academic Press, 1981. p. 47–317.

KOCHEM, L. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, 1 jan. 2014.

KOHOUT, M.; SAVIN, A. Atomic shell structure and electron numbers. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 875–882, 15 nov. 1996.

KORETSKY, M. D. **Engineering and Chemical Thermodynamics**. 2nd. ed. [s.l.] Wiley, 2012.

KOUTRA, E. et al. Chapter 11 - Microalgal Biorefinery. In: YOUSUF, A. B. T.-M. C. FOR B. P. (Ed.). . [s.l.] Academic Press, 2020. p. 163–185.

KULESHOVA, T. et al. Interrelation of Absorption Spectra of Plant Pigments and LED Lighting with Different Spectral Compositions. **Technical Physics**, v. 63, p. 1243–1247, 1 set. 2018.

KUYUCAK, N.; VOLESKY, B. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. **Biotechnology letters**, v. 10, n. 2, p. 137–142, 1988.

LANFER-MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M. C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. **Food Research International**, v. 38, n. 8, p. 885–891, 2005.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product

studies — a practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771–782, 2001.

LATA, S.; SINGH, P. K.; SAMADDER, S. R. Regeneration of adsorbents and recovery of heavy metals: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 4, p. 1461–1478, 2015.

LEÓN-VAZ, A. et al. Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. **New Biotechnology**, 2019.

LEUNG, W. C. et al. Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 12, p. 233–240, 1 jun. 2000.

LIANG, S. et al. How *Chlorella sorokiniana* and its High Tolerance to Pb Might be a Potential Pb Biosorbent. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 3, p. 1139–1146, 2017.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4.3.1-F4.3.8, 1 ago. 2001.

LIN, S.-T.; SANDLER, S. I. A Priori Phase Equilibrium Prediction from a Segment Contribution Solvation Model. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 5, p. 899–913, 1 mar. 2002.

LU, J. et al. Optimization of subcritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Laminaria japonica* Aresch by response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 139–145, 15 jan. 2014.

LUENGO, E. et al. Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. **The Journal of Membrane Biology**, v.

247, n. 12, p. 1269–1277, 2014.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 2, p. 245–251, 2005.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, n. 3, p. 323–329, 2007.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 8, p. 1352–1362, 2008.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948–952, 2009.

MÄKI-ARVELA, P.; HACHEMI, I.; MURZIN, D. Y. Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 11, p. 1607–1626, 1 nov. 2014.

MALKOC, E.; NUHOGLU, Y. Investigations of nickel (II) removal from aqueous solutions using tea factory waste. **Journal of hazardous materials**, v. 127, n. 1–3, p. 120–128, 2005.

MANDELLI, F. et al. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1781–1790, 2012a.

MANDELLI, F. et al. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design.

**Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 126–134, 2012b.

MATSUKAWA, R. et al. Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 263–267, 2000.

MEHTA, S. K.; GAUR, J. P. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater : Progress and Prospects Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater : Progress and Prospects. v. 8551, 2008.

MENDES-PINTO, M. M. et al. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 1, p. 19–24, 2001.

MEZINE, Z. et al. Electrodeposition of copper oxides ( $Cu_xO_y$ ) from acetate bath. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 817, p. 36–47, 2018.

MEZZOMO, N. et al. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1383–1391, 2011.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Carotenoids Functionality , Sources , and Processing by Supercritical Technology : A Review. v. 2016, 2016.

MICHALAK, I. et al. **Supercritical Algal Extracts: A Source of Biologically Active Compounds from Nature** **Journal of Chemistry**, 2015.

MODAK, J. M.; NATARAJAN, K. A. Biosorption of metals using nonliving biomass—a review. **Mining, Metallurgy & Exploration**, v. 12, n. 4, p. 189–196, 1995.

MOITY, L. et al. Panorama of sustainable solvents using the COSMO-RS approach.

**Green Chem.**, v. 14, n. 4, p. 1132–1145, 2012.

MOLAZADEH, P. et al. Adsorption of Lead by Microalgae *Chaetoceros* Sp. and *Chlorella* Sp. from Aqueous Solution. **Journal of Community Health Research**, v. 4, p. 114–127, 1 set. 2015.

MONTEIRO, C. M. et al. Metal Uptake by Microalgae : Underlying Mechanisms and Practical Applications. 2012.

NARIYAN, E.; AGHABABAEI, A.; SILLANPÄÄ, M. Removal of pharmaceutical from water with an electrocoagulation process; effect of various parameters and studies of isotherm and kinetic. **Separation and Purification Technology**, v. 188, p. 266–281, 2017.

NATHAN, O. et al. The contents of Pb, Cu, Zn and Cd in meat in Nairobi, Kenya. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 5, 1 jul. 2007.

NIDHEESH, P. V; SINGH, T. S. A. Arsenic removal by electrocoagulation process: Recent trends and removal mechanism. **Chemosphere**, v. 181, p. 418–432, 2017.

NISAR, N. et al. Carotenoid Metabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 68–82, 5 jan. 2015.

NIYOGI, K. K.; BJÖRKMAN, O.; GROSSMAN, A. R. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 14162 LP – 14167, 9 dez. 1997.

NOBRE, B. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 6, p. 787–790, 2006.



NOR, S. et al. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. 2017.

NWOBA, E. et al. Microalgal Pigments: A Source of Natural Food Colors. In: [s.l: s.n.]. p. 81–123.

OBAID, S. S. et al. Heavy metal ions removal from waste water by the natural zeolites. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 9, Part 3, p. 17930–17934, 2018.

OMAR, H. H. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n. 2, p. 95–100, 2002.

PAL, A.; PAUL, A. K. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. **Indian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 49–64, mar. 2008.

PASQUET, V. et al. Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. **Marine drugs**, v. 9, n. 5, p. 819–831, 2011a.

PASQUET, V. et al. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 59–67, 2011b.

PATIL, P. D. et al. Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 118–122, 2011.

PAULINO, A. T. et al. Novel adsorbent based on silkworm chrysalides for removal of heavy metals from wastewaters. **Journal of colloid and interface science**, v. 301, n. 2,

p. 479–487, set. 2006.

PEREIRA NETO, A. et al. **Alternativas para o tratamento de efluentes da indústria galvânica Engenharia Sanitaria e Ambiental** scielo , , 2008.

PEREZ-GALVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Chemistry in the Bioactivity of Chlorophylls: An Overview. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 40, p. 4515–4536, 2017.

PÉREZ, A. T. E. et al. Key challenges and requirements for sustainable and industrialized biorefinery supply chain design and management: a bibliographic analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, p. 350–359, 2017.

PETERSEN, F. et al. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions. **WRC Report**, v. 1, n. 100, 2005.

PETROVIČ, A.; SIMONIČ, M. Removal of heavy metal ions from drinking water by alginate-immobilised *Chlorella sorokiniana*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, n. 7, p. 1761–1780, 2016.

POOJARY, M. M. et al. **Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds** **Marine Drugs**, 2016.

POTRICH, E. et al. Replacing hexane by ethanol for soybean oil extraction: Modeling, simulation, and techno-economic-environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, p. 118660, 2020.

PRAVEENKUMAR, R. et al. Breaking dormancy: an energy-efficient means of recovering astaxanthin from microalgae. **Green Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 1226–1234, 2015.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied**

**Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

QUEIROZ ZEPKA, L.; JACOB-LOPES, E.; ROCA, M. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 94–100, 2019.

RAI, P. K. Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and its Phytoremediation using Wetland Plants: An ecosustainable approach. **International Journal of Phytoremediation**, v. 10, n. 2, p. 133–160, 3 abr. 2008.

RAJESH BANU, J. et al. Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy- techno economic and life-cycle analysis. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122822, 2020.

RAMIREZ, M. E. et al. Potential of microalgae in the bioremediation of water with chloride content. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 472–476, 2017.

RAMMUNI, M. N. et al. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*. **Food Chemistry**, v. 277, 2018.

REN, Q. et al. Recent advances in separation of bioactive natural products. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 9, p. 937–952, 2013.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.

REVERCHON, E.; DONSI, G.; SESTI OSSEO, L. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 11, p. 2721–2726, 1 nov. 1993.

REYES, A.; SIELFELD, C. S. Effect of high-pressure compaction on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Food**

**Engineering**, v. 189, p. 123–134, 2016.

ROMERA, E. et al. Biosorption with algae: a statistical review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 223–235, 2006.

ROMERA, E. et al. Biosorption with Algae : A Statistical Review Biosorption with Algae : A Statistical Review. v. 8551, n. 2006, 2008.

RUEN-NGAM, D. et al. Selective Extraction of Lutein from Alcohol Treated *Chlorella vulgaris* by Supercritical CO<sub>2</sub>. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 2, p. 255–260, 1 fev. 2012.

RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. [s.l.] Wiley, 1984.

SAFI, C. et al. Extraction of lipids and pigments of *Chlorella vulgaris* by supercritical carbon dioxide: Influence of bead milling on extraction performance. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 4, p. 1711–1718, 2014.

SAINI, R. K.; KEUM, Y.-S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90–103, 2018.

ŞANAL, İ. S. et al. Determination of optimum conditions for SC-(CO<sub>2</sub>+ ethanol) extraction of β-carotene from apricot pomace using response surface methodology. **The Journal of supercritical fluids**, v. 34, n. 3, p. 331–338, 2005.

SANDLER, S. I. Infinite dilution activity coefficients in chemical, environmental and biochemical engineering. **Fluid Phase Equilibria**, v. 116, n. 1–2, p. 343–353, 1996.

SANTIAGO-SANTOS, M. C. et al. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047–2052, 2004.

SARTORY, D. P.; GROBBELAAR, J. U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. **Hydrobiologia**, v. 114, n. 3, p. 177–187, 1984.

SASSO, S. et al. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 761–785, 1 jul. 2012.

SCHÄFER, A.; HUBER, C.; AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. **The Journal of Chemical Physics**, v. 100, n. 8, p. 5829–5835, 15 abr. 1994.

SCHMIDT, M. W. et al. General atomic and molecular electronic structure system. **Journal of Computational Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1347–1363, 1993.

SCHNEIDER, I. A. H. **Biossorção de metais pesados com a biomassa de macrófitos aquáticos**. [s.l.] UFRGS, 1995.

SCHRÖDINGER, E. An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules. **Physical Review**, v. 28, n. 6, p. 1049–1070, 1 dez. 1926.

SHAH, M. M. R. et al. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 531, 2016.

SHAHID, A. et al. Bioenergy potential of the residual microalgal biomass produced in city wastewater assessed through pyrolysis, kinetics and thermodynamics study to design algal biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121701, 2019.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. **Licopeno como agente antioxidante** *Revista de Nutrição scielo* , , 2004.

SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction - A review.

**Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 2014.

SHI, J. et al. Solubility of lycopene in supercritical CO<sub>2</sub> fluid as affected by temperature and pressure. v. 66, p. 322–328, 2009.

SICAIRE, A.-G. et al. **Alternative Bio-Based Solvents for Extraction of Fat and Oils: Solubility Prediction, Global Yield, Extraction Kinetics, Chemical Composition and Cost of Manufacturing** **International Journal of Molecular Sciences**, 2015.

SIMON, D.; HELLIWELL, S. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. **Water Research**, v. 32, n. 7, p. 2220–2223, 1998.

SOARES, A. T. et al. Improvement of the Extraction Process for High Commercial Value Pigments from. v. 27, n. 6, p. 1083–1093, 2016.

SOARES, R. DE P. et al. lvpp/sigma: LVPP sigma-profile database (20.06). 30 jun. 2020.

SPEARS, K. Developments in food colourings: the natural alternatives. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 283–288, 1 nov. 1988.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

SRIVASTAVA, N.; BALOMAJUMDER, C. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. **Journal of hazardous materials**, v. 151, p. 1–8, 1 mar. 2008.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing** Vienna, Austria, , 2013.

TEH, C. Y. et al. Recent Advancement of Coagulation–Flocculation and Its Application in Wastewater Treatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 16, p. 4363–4389, 27 abr. 2016.

THANA, P. et al. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3110–3115, 2008.

TORRES, S. et al. Green Composites from Residual Microalgae Biomass and Poly(butylene adipate-co-terephthalate): Processing and Plasticization. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 4, p. 614–624, 6 abr. 2015.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429–2436, 2009.

VANDANA, V.; TEJA, A. S. The solubility of paclitaxel in supercritical CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O. **Fluid Phase Equilibria**, v. 135, n. 1, p. 83–87, 1997.

VANTHOOR-KOOPMANS, M. et al. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142–149, 2013.

VARELA, J. C. et al. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 3, p. 423–436, 2015.

WANEES, S. et al. Adsorption Studies on the Removal of Hexavalent Chromium-Contaminated Wastewater Using Activated Carbon and Bentonite. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, p. 8245–8252, 1 nov. 2013.

WANG, F. et al. Optimum Production Conditions, Purification, Identification, and Antioxidant Activity of Violaxanthin from Microalga *Eustigmatos cf. polyphem* (*Eustigmatophyceae*). **Marine drugs**, v. 16, n. 6, p. 190, 1 jun. 2018.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 427–451, 2006.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009.

WANG, S.; SANDLER, S. I.; CHEN, C.-C. Refinement of COSMO–SAC and the Applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 22, p. 7275–7288, 1 out. 2007.

WHITE, C.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS microbiology reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 503–516, 1997.

WIDHIASTUTI, F. et al. Electrocoagulation of boron by electrochemically co-precipitated spinel ferrites. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 893–901, 2018.

WOJECCHOWSKI, J. P. et al. Using COSMO-RS in the Design of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Antioxidants from Rosemary. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 32, p. 12132–12141, 17 ago. 2020.

XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances ( EPS ) and their applications. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1225–1244, 2016.

YANG, X. J.; FANE, A. G.; MACNAUGHTON, S. Removal and recovery of heavy metals from wastewaters by supported liquid membranes. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 341–348, 1 jan. 2001.

YARA-VARÓN, E. et al. Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A theoretical versus experimental solubility study. **RSC Adv.**, v. 6, n. 33, p. 27750–27759, 2016.



YE, Z.-W.; JIANG, J.-G.; WU, G.-H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 352–360, 2008.

YEN, H.-W. et al. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–174, 2013.

YEN, H.-W.; CHIANG, W.-C.; SUN, C.-H. Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, n. 1, p. 53–57, 2012.

YEN, H. W. et al. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 291–296, 2015.

YEO, S.-D. et al. Critical Properties of Carbon Dioxide + Methanol, + Ethanol, + 1-Propanol, and + 1-Butanol. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 45, n. 5, p. 932–935, 1 set. 2000.

ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK, M.; RYGAL, A. The Effect of Biomass (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus armatus*) Concentrations on Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> Biosorption from Zinc Smelting Wastewater. **Engineering and Protection of Environment**, v. 20, p. 211–220, 1 abr. 2017.

ZENDRON, R. Mecanismos de neurotoxicidade e doenças neurológicas relacionadas à intoxicação por metais pesados. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v. 64, p. 45–51, 2015.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2018.

ZHANG, W. et al. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 329–335, 2014.

ZOU, T.-B. et al. **Response Surface Methodology for Ultrasound-Assisted Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*** *Marine Drugs* , 2013.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; HANCOCK, I. C. Biosorption of metals from dilute aqueous solutions. **Separation and Purification Methods**, v. 26, n. 2, p. 255–295, 1997.

---

## CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho foram avaliadas para recuperação de clorofilas e carotenoides a partir de biomassa microalgal as tecnologias de extração com solventes orgânicos a partir de *Heterochlorella luteoviridis* e *Chlorella sorokiniana*, e de extração com misturas sub e supercríticas da biomassa de *C. sorokiniana*. Em adição, testou-se o uso da biomassa microalgal na adsorção de metais pesados comumente encontrados em efluentes industriais de curtumes e da indústria da galvanoplastia.

A abordagem experimental neste trabalho constatou que a extração por solvente, uma tecnologia bastante simples, é uma alternativa viável para a extração de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais da biomassa microalgal. Os rendimentos de extração e os perfis de carotenoides dos extratos resultantes do processo em batelada com etanol, acetona, acetato de etila e hexano, foram avaliados a fim de indicar a aplicabilidade desses solventes. A seleção de solvente provou ser um fator chave, pois resultados de extração fundamentalmente diferentes foram alcançados. O etanol apresentou a maior eficiência na recuperação de clorofilas de microalgas, com altos rendimentos, sendo, portanto, recomendado nesta aplicação. Quanto à recuperação de carotenoides, a acetona figurou entre os solventes mais eficientes na extração de violaxantina, luteína, zeaxantina e caroteno para ambas as biomassas de microalgas, demonstrando que este é um solvente orgânico geralmente adequado nesta aplicação. Três razões de solvente para biomassa foram testadas (100:1, 200:1 e 1000:1), entretanto esta variável não afetou os resultados na maioria dos casos. Ainda, o modelo COSMO-SAC mostrou-se uma ferramenta poderosa para a triagem de solventes para a extração de carotenoides, pois foi capaz de corroborar resultados experimentais.

Este trabalho também mostrou que a extração utilizando misturas supercríticas de CO<sub>2</sub> e etanol é uma alternativa viável e ambientalmente mais favorável para a extração de clorofila a, clorofila b e carotenoides da biomassa microalgal. Todos os principais fatores estudados, ou seja, temperatura de extração, pressão e composição da mistura

solvente mostraram-se fatores relevantes, uma vez que as condições experimentais renderam resultados de extração fundamentalmente diferentes. A presença de etanol mostrou-se essencial para a extração eficiente de clorofilas e este cossolvente deve também estar presente para a extração de carotenoides, a fim de modificar a polaridade da mistura em condição supercrítica para melhor se adequar à polaridade da mistura de carotenoides na microalga. Esta foi considerada uma observação importante, pois tanto a abordagem experimental, quanto a abordagem teórica neste trabalho mostraram compatibilidade com a hipótese de que os carotenoides são extraídos como agregados. Nesse contexto, o COSMO-SAC novamente se mostrou uma ferramenta poderosa para a predição de propriedades de misturas de solventes, recurso que poderia ser mais explorado, visando a otimização de processos. O uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicou que o aumento da pressão pode ter afetado positivamente a extração dos compostos, por causar rompimento das partículas, facilitando o contato com o solvente. No entanto, a ocorrência de compactação (“*caking*”) foi apontada como um efeito prejudicial à eficiência do processo.

Por fim, a capacidade das biomassas de *H. luteoviridis* e *C. sorokiniana* em adsorver  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  foi demonstrada. De forma geral, este trabalho indicou o grande potencial da aplicação de ambas as biomassas microalgais como biossorventes, uma vez que ambas as microalgas foram capazes de adsorver eficientemente os metais pesados tipicamente contidos nelas, com a notável exceção do  $\text{Cr}^{6+}$ . A capacidade de sorção mostrou-se dependente da biomassa microalgal, da concentração inicial do metal em solução e do número atômico do adsorvente. Embora o processo tenha sido conduzido sem otimização, altas remoções de metais foram alcançadas e a biossorção eficiente de ferro foi destacada. A ruptura de agregados de partículas foi considerada prejudicial à qualidade de adsorção e uma das causas para o melhor desempenho de *H. luteoviridis*.

### **6.1. Sugestões para trabalhos futuros**

De forma geral, a extração por solvente é recomendada para a extração industrial de pigmentos de microalgas, devendo, ainda, ser avaliada sob alguns aspectos. Como sugestão para a trabalhos futuros tem-se:

- aplicar a extração por solvente a um processo em múltiplos estágios e operado em contracorrente;

- estudar a otimização do processo de extração por solvente para alcançar a viabilidade econômica de uma biorrefinaria microalgal.

Com relação à extração de clorofila a, clorofila b e carotenoides da biomassa microalgal utilizando misturas supercríticas de CO<sub>2</sub> e etanol, a ocorrência de compactação (“*caking*”) foi apontada como um efeito prejudicial à eficiência do processo de extração. Assim, como sugestão para trabalhos futuros tem-se:

- investigar melhor a ocorrência do fenômeno de *caking* e estudar estratégias para evita-lo;

- estudar o potencial de utilização dessa tecnologia sob o ponto de vista técnico e econômico.

Quanto à capacidade das biomassas de *H. luteoviridis* e *C. sorokiniana* atuarem como biossorbentes de metais pesados contidos em efluentes industriais, este trabalho indicou o grande potencial da aplicação dessa tecnologia. Entretanto, alguns estudos ainda precisam ser aprofundados e como sugestão para trabalhos futuros, tem-se:

- estudar a sinergia de metais coexistentes em solução empregando efluentes sintéticos multielementares;

- avaliar a utilização de biomassa residual de microalgas de processos de extração, visando a valorização desse resíduo para auxiliar no desenvolvimento de uma refinaria de microalgas em larga escala economicamente vantajosa.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. H. et al. Biosorption of Heavy Metals : A Review. n. January, 2014.
- ABDI, O.; KAZEMI, M. A review study of biosorption of heavy metals and comparison between different biosorbents. **J Mater Environ Sci**, v. 6, n. 5, p. 1386–1399, 2015.
- ADJEROUD, N. et al. Effect of *Opuntia ficus indica* mucilage on copper removal from water by electrocoagulation-electroflotation technique. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 811, p. 26–36, 2018.
- AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 163, n. 6, p. 739–744, set. 2000.
- AGRAWAL S; RAO AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Cmaj**, v. 163, n. 6, p. 739–44, 2000.
- AHALYA, N.; RAMACHANDRA, T. V; KANAMADI, R. D. Biosorption of heavy metals. **Res. J. Chem. Environ**, v. 7, n. 4, p. 71–79, 2003.
- AHAMED, T. et al. A generalized approach to thermodynamic properties of biomolecules for use in bioseparation process design. **Fluid Phase Equilibria**, v. 241, n. 1–2, p. 268–282, 2006.
- AHEMAD, M.; MALIK, A. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. **Bacteriol. J**, v. 2, n. 1, p. 12–21, 2011.
- AKHTAR, N. et al. Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr(III). **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 2, p. 231–239, 2008.
- AKHTAR, N.; IQBAL, J.; IQBAL, M. Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. **Journal of hazardous materials**, v. 108, n. 1–2, p. 85–94, abr. 2004.

- AL-SHANNAG, M. et al. Heavy metal ions removal from metal plating wastewater using electrocoagulation: Kinetic study and process performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 749–756, 2015.
- ALFONSI, K. et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2008.
- ALYÜZ, B.; VELI, S. Kinetics and equilibrium studies for the removal of nickel and zinc from aqueous solutions by ion exchange resins. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1, p. 482–488, 2009.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. DE A. C. E S.; FARO, Z. P. DE. **Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A Revista de Nutrição scielo** , , 2006.
- ANANTHARAJ, R.; BANERJEE, T. COSMO-RS-based screening of ionic liquids as green solvents in denitrification studies. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 18, p. 8705–8725, 2010.
- ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; ZHANG, X. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 1, p. 60–64, 2008.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics. **Journal of Molecular Recognition**, v. 17, n. 3, p. 236–247, 2004.
- BABEL, S.; KURNIAWAN, T. A. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water : a review. v. 97, p. 219–243, 2003.
- BAICHA, Z. et al. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016.
- BALASUBRAMANIAN, S. et al. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system--design, optimization, and quality characterization. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3396–3403, fev. 2011.
- BALLADARES, E. et al. Neutralization and co-precipitation of heavy metals by lime addition to effluent from acid plant in a copper smelter. **Minerals Engineering**, v. 122,

p. 122–129, 2018.

BALTPURVINS, K. A. et al. Effect of electrolyte composition on zinc hydroxide precipitation by lime. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 973–980, 1997.

BARREIRO, M. F. Review and Industry and Market Trend Analysis. p. 1–23, 2020.

BEGUM, H. et al. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, 2016a.

BEGUM, H. et al. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, out. 2016b.

BELAY, A. et al. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235–241, 1993.

BENVENUTTI, L. et al. NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from Myrciaria cauliflora fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. **Journal of Molecular Liquids**, v. 315, p. 113761, 2020.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, ago. 1959.

BOGUE, J.; COLLINS, O.; TROY, A. J.. Market analysis and concept development of functional foods. In: Developing new functional food and nutraceutical products. **Academic Press**, 2017. p. 29-45.

BOONNOUN, P. et al. Wet extraction of lipids and astaxanthin from Haematococcus pluvialis by liquefied dimethyl ether. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 5, 2014.

BOUKHLIFI, F. Characterization and Treatment of Real Wastewater from an Electroplating Company by Raw Chitin. In: [s.l: s.n.].

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 2015.

BRATSKAYA, S. Y. et al. Heavy metals removal by flocculation/precipitation using N-(2-carboxyethyl)chitosans. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and**



**Engineering Aspects**, v. 339, n. 1, p. 140–144, 2009.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (EDS.). **Carotenoids**. [s.l.] Birkhäuser Basel, 2008.

BROOKS, R. Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals. In: [s.l: s.n.]. p. 87–105.

BURAKOV, A. E. et al. Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes : A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. November, p. 702–712, 2017.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927–934, 2007.

CASAS CARDOSO, L. et al. Extraction of Carotenoids and Fatty Acids from Microalgae Using Supercritical Technology. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, p. 877–883, 1 jan. 2012.

CEPEDA, A.; FENTE, C.; REGAL, P. Trends in Analytical Chemistry Review of methods for analysis of carotenoids q. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49–73, 2014.

CERÓN-GARCÍA, M. C. et al. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). **Food Chemistry**, v. 257, 1 mar. 2018.

CHEAH, W. Y. et al. Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.

CHEN, J. H. et al. Enhancing lutein production with mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 using different bioprocess operation strategies. **Bioresource Technology**, v. 278, n. January, p. 17–25, 2019.

CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives.

**Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.

COÊLHO, D. D. F. *Microalgae : Cultivation Aspects and Bioactive Compounds*. v. 62, 2019.

CONDE, E.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 957–964, 2015.

CORDERO, B. F. et al. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. **Marine drugs**, v. 9, n. 9, p. 1607–1624, 2011.

COSTA, M. A. L. DA; ORTEGA-FLORES, C. I.; PENTEADO, M. DE V. C. **Alterações estruturais in vivo dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do b-caroteno** **Food Science and Technology** scielo , , 2002.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients. . 2009, p. OJ L 141, 6.6.2009, 3–11.

CRAMPON, C.; BOUTIN, O.; BADENS, E. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Molecules of Interest from Microalgae and Seaweeds. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 15, p. 8941–8953, 3 ago. 2011.

CUARESMA, M. et al. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 352–359, 1 out. 2009.

CUBAS, C.; GLORIA LOBO, M.; GONZÁLEZ, M. Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by N,N-dimethylformamide using response surface methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 2, p. 125–133, 2008.

DA'NA, E. Adsorption of heavy metals on functionalized-mesoporous silica: A review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 247, p. 145–157, 2017.

DARANI, K. K.; MOZAFARI, M. R. Supercritical fluids technology in bioprocess

industries: a review. **Journal of Biochemical Technology**, v. 2, n. 1, p. 144–152, 2010.

DEMING, D. M.; TEIXEIRA, S. R.; ERDMAN JR., J. W. All-trans  $\beta$ -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis  $\beta$ -Carotene in Gerbils Given Single Oral Doses of Each Isomer. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 9, p. 2700–2708, 1 set. 2002.

DENG, X.; WANG, P. Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. **Bioresource technology**, v. 121, p. 342–347, 2012.

DI LENA, G. et al. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. **Food Research International**, v. 120, p. 810–818, 2019.

DING, Z. et al. Filtration and transport of heavy metals in graphene oxide enabled sand columns. **Chemical Engineering Journal**, v. 257, p. 248–252, 2014.

DIPRAT, A. B. et al. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3463–3468, ago. 2017a.

DIPRAT, A. B. et al. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3463–3468, 1 ago. 2017b.

DIPRAT, A. B. et al. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. **Lwt**, v. 134, n. August, p. 109974, 2020a.

DIPRAT, A. B. et al. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. **LWT**, v. 134, p. 109974, 2020b.

DIXIT, R. et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability (Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 2189–2212, 2015.

DONG, S. et al. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 694305, 2014.

ERTO, A. et al. A Comparison Between a Low-Cost Sorbent and an Activated Carbon

for the Adsorption of Heavy Metals from Water. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, 1 abr. 2013.

EVANGELISTA, V. et al. **Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2008.

FAHMY, T. M. et al. Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 10, p. 1462–1469, 15 maio 1993.

FERRARINI, F. **Um banco de dados de perfis sigma aberto e extensível**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

FERRARINI, F. et al. An Open and Extensible Sigma-Profile Database for COSMO-Based Models. v. 64, n. 00, 2018a.

FERRARINI, F. et al. An open and extensible sigma-profile database for COSMO-based models. **AIChE Journal**, v. 64, n. 9, p. 3443–3455, 1 set. 2018b.

FERRUZZI, M.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research - NUTR RES**, v. 27, 2007.

FIGLIORE, M. F.; MOON, D. H.; TREVORS, J. T. Metal Resistance and Accumulation in Cyanobacteria BT - Wastewater Treatment with Algae. In: WONG, Y.-S.; TAM, N. F. Y. (Eds.). . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 111–124.

FOLEY, P. M.; BEACH, E. S.; ZIMMERMAN, J. B. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. **Green Chem.**, v. 13, n. 6, p. 1399–1405, 2011.

FOUREST, E.; ROUX, J. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 399–403, 2004.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 3, p. 407–418, 2011.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Guia Técnico Ambiental de**

**Curtumes.** Belo Horizonte: [s.n.]. Disponível em:

<[http://biblioteca.meioambiente.mg.gov.br/publicacoes/BD FEAM/Guia\\_Curtume\\_Final\\_logo\\_Governo.pdf](http://biblioteca.meioambiente.mg.gov.br/publicacoes/BD FEAM/Guia_Curtume_Final_logo_Governo.pdf)>.

GADD, G. M.; WHITE, C. Copper Uptake by *Penicillium ochro-chloron*: Influence of pH on Toxicity and Demonstration of Energy-dependent Copper Influx Using Protoplasts. **Microbiology**, v. 131, n. 8, p. 1875–1879, 1985.

GERBER, R. P. **Modelo COSMO-SAC como ferramenta de engenharia química.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

GERBER, R. P.; SOARES, R. D. P. Prediction of infinite-dilution activity coefficients using UNIFAC and COSMO-SAC variants. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 16, p. 7488–7496, 2010.

GERBER, R. P.; SOARES, R. P. Assessing the reliability of predictive activity coefficient models for molecules consisting of several functional groups. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2013.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae : A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016a.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016b.

GONG, Z. et al. Computational method for inferring objective function of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. **Computational biology and chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1–6, fev. 2009.

GONZÁLEZ-DELGADO, A.; KAFAROV, V. Microalgae based biorefinery: Issues to consider. **CT y F - Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 4, p. 5, 1 dez. 2011.

GONZÁLEZ LÓPEZ, C. V. et al. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7587–7591, 2010.

GOVINDJEE et al. **Photosynthesis** McGraw-Hill Education, , 11 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.accessscience.com/content/photosynthesis/511700> OP - AccessScience>

HALIM, R. et al. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, 2010.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, ago. 2012.

HARSHA, K.; SENTHIL, P.; PANDA, R. C. A review on heavy metal pollution , toxicity and remedial measures : Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 111197, 2019.

HEAD, I. M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 599–608, 1998.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, n. 16, p. 2495–511, 2010.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.

HORWITZ, B. Role of chlorophyll in proctology. **The American Journal of Surgery**, v. 81, n. 1, p. 81–84, 1951.

HU, H.; XU, K. Chapter 8 - Physicochemical technologies for HRP and risk control. In: REN, H.; ZHANG, X. B. T.-H.-R. P. IN W. (Eds.). . [s.l.] Elsevier, 2020. p. 169–207.

HUMPHREY, A. M. Chlorophyll. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 57–67, 1980.

HUMPHREY, A. M. Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. C422–C425, 1 jun. 2004.

HUSAIN, A.; JAVED, I.; KHAN, N. A. Characterization and treatment of electroplating industry wastewater using Fenton's reagent. **J Chem Pharm Res**, v. 6, n. 1, p. 622–627, 2014.

IGBERASE, E.; AUGUSTINE, O.; OSIFO, P. Enhanced heavy metal ions adsorption by 4-aminobenzoic acid grafted on chitosan/epichlorohydrin composite: Kinetics,

isotherms, thermodynamics and desorption studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, 1 nov. 2018.

INANC, A. Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. **Akademik Gida**, v. 9, 1 jan. 2011.

INGLEZAKIS, V. J.; GRIGOROPOULOU, H. P. Modeling of ion exchange of Pb<sup>2+</sup> in fixed beds of clinoptilolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 61, n. 1, p. 273–282, 2003.

INTERNATIONAL., A. **Official methods of analysis of AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International.**[Gaithersburg, Md.]AOAC International, , [s.d.].

ISMAIL, I.; MOUSTAFA, T. Biosorption of heavy metals. **Heavy Metals: Sources, Toxicity and Remediation Techniques**, n. October, p. 131–174, 2016.

JACOTET-NAVARRO, M. et al. What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. **ELECTROPHORESIS**, v. 39, n. 15, p. 1946–1956, 1 ago. 2018.

JAESCHKE, D. P. et al. Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1636–1643, 2016.

JAESCHKE, D. P. et al. The effect of temperature and moderate electric field pre-treatment on carotenoid extraction from *Heterochlorella luteoviridis*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 2, p. 396–402, 2019.

JAHAN, M. A. A. et al. Characterization of tannery wastewater and its treatment by aquatic macrophytes and algae. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 49, n. 4, p. 233–242, 2014.

JAIME, L. et al. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 105–112, 2010.

JEFFREY, S. W. et al. **Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to**

**Modern Methods.** [s.l.] UNESCO Publishing, 1997.

JOHNSON, E. J. The role of carotenoids in human health. **Nutrition in clinical care : an official publication of Tufts University**, v. 5, n. 2, p. 56–65, 2002.

JUAN, J. C. et al. Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 452–460, 2011.

KANDA, H. et al. **Extraction of Fucoxanthin from Raw Macroalgae excluding Drying and Cell Wall Disruption by Liquefied Dimethyl Ether Marine Drugs** , 2014.

KANG, S.-Y. et al. Competitive adsorption characteristics of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Cr}^{3+}$  by IRN-77 cation exchange resin in synthesized wastewater. **Chemosphere**, v. 56, n. 2, p. 141–147, 2004.

KANG, Y.-R. et al. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. **Food Chemistry**, v. 245, p. 943–950, 2018.

KAPLAN, D. Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. p. 602–611, 2013.

KARIMI, S.; TAVAKKOLI, M. A comprehensive review of the adsorption mechanisms and factors influencing the adsorption process from the perspective of bioethanol dehydration. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. November 2018, p. 535–553, 2019.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.

KHATRI, N.; TYAGI, S.; RAWTANI, D. Recent strategies for the removal of iron from water: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 19, n. 13, p. 291–304, 2017.

KHEZAMI, L.; CAPART, R. Removal of Chromium(VI) From Aqueous Solution by Activated Carbons: Kinetic and Equilibrium Studies. **Journal of hazardous materials**, v. 123, p. 223–231, 1 set. 2005.



- KHOO, H. H. et al. Life cycle energy and CO<sub>2</sub> analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5800–5807, 2011.
- KIM, D. et al. Bioresource Technology Cell-wall disruption and lipid / astaxanthin extraction from microalgae : Chlorella and Haematococcus. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 300–310, 2016.
- KIM, K. M. et al. Characterization of Heterochlorella luteoviridis (Trebouxiaceae, Trebouxiophyceae) isolated from the Port of Jeongja in Ulsan, Korea. **Journal of Marine Bioscience and Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 22–29, 2017.
- KIM, M. K.; AHN, S. H.; LEE-KIM, Y. C. Relationship of serum  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v. 21, n. 6, p. 797–809, 2001.
- KITADA, K. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment components with pharmaceutical importance from Chlorella vulgaris. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 657–661, 1 maio 2009.
- KLAMT, A. **COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design**. [s.l.] Elsevier Science, 2005.
- KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 5, p. 799–805, 1993.
- KLÄUI, H.; BAUERNFEIND, J. C. 2 - CAROTENOIDS AS FOOD COLORS. In: BAUERNFEIND, J. C. B. T.-C. AS C. AND V. A. P. (Ed.). . **Food Science and Technology**. San Diego: Academic Press, 1981. p. 47–317.
- KOCHEM, L. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, 1 jan. 2014.
- KOHOUT, M.; SAVIN, A. Atomic shell structure and electron numbers. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 875–882, 15 nov. 1996.
- KORETSKY, M. D. **Engineering and Chemical Thermodynamics**. 2nd. ed. [s.l.] Wiley, 2012.

- KOUTRA, E. et al. Chapter 11 - Microalgal Biorefinery. In: YOUSUF, A. B. T.-M. C. FOR B. P. (Ed.). . [s.l.] Academic Press, 2020. p. 163–185.
- KULESHOVA, T. et al. Interrelation of Absorption Spectra of Plant Pigments and LED Lighting with Different Spectral Compositions. **Technical Physics**, v. 63, p. 1243–1247, 1 set. 2018.
- KUYUCAK, N.; VOLESKY, B. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. **Biotechnology letters**, v. 10, n. 2, p. 137–142, 1988.
- LANFER-MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M. C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. **Food Research International**, v. 38, n. 8, p. 885–891, 2005.
- LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771–782, 2001.
- LATA, S.; SINGH, P. K.; SAMADDER, S. R. Regeneration of adsorbents and recovery of heavy metals: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 4, p. 1461–1478, 2015.
- LEÓN-VAZ, A. et al. Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. **New Biotechnology**, 2019.
- LEUNG, W. C. et al. Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 12, p. 233–240, 1 jun. 2000.
- LIANG, S. et al. How *Chlorella sorokiniana* and its High Tolerance to Pb Might be a Potential Pb Biosorbent. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 3, p. 1139–1146, 2017.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4.3.1-F4.3.8, 1 ago. 2001.
- LIN, S.-T.; SANDLER, S. I. A Priori Phase Equilibrium Prediction from a Segment Contribution Solvation Model. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 5, p. 899–913, 1 mar. 2002.

LU, J. et al. Optimization of subcritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Laminaria japonica* Aresch by response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 139–145, 15 jan. 2014.

LUENGO, E. et al. Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*. **The Journal of Membrane Biology**, v. 247, n. 12, p. 1269–1277, 2014.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 2, p. 245–251, 2005.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, n. 3, p. 323–329, 2007.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 8, p. 1352–1362, 2008.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948–952, 2009.

MÄKI-ARVELA, P.; HACHEMI, I.; MURZIN, D. Y. Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 11, p. 1607–1626, 1 nov. 2014.

MALKOC, E.; NUHOGLU, Y. Investigations of nickel (II) removal from aqueous solutions using tea factory waste. **Journal of hazardous materials**, v. 127, n. 1–3, p. 120–128, 2005.

MANDELLI, F. et al. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1781–1790, 2012a.

MANDELLI, F. et al. Evaluation of biomass production, carotenoid level and

antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design.

**Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 126–134, 2012b.

MATSUKAWA, R. et al. Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 263–267, 2000.

MEHTA, S. K.; GAUR, J. P. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater : Progress and Prospects Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater : Progress and Prospects. v. 8551, 2008.

MENDES-PINTO, M. M. et al. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 1, p. 19–24, 2001.

MEZINE, Z. et al. Electrodeposition of copper oxides ( $Cu_xO_y$ ) from acetate bath. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 817, p. 36–47, 2018.

MEZZOMO, N. et al. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1383–1391, 2011.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Carotenoids Functionality , Sources , and Processing by Supercritical Technology : A Review. v. 2016, 2016.

MICHALAK, I. et al. **Supercritical Algal Extracts: A Source of Biologically Active Compounds from Nature****Journal of Chemistry**, 2015.

MODAK, J. M.; NATARAJAN, K. A. Biosorption of metals using nonliving biomass—a review. **Mining, Metallurgy & Exploration**, v. 12, n. 4, p. 189–196, 1995.

MOITY, L. et al. Panorama of sustainable solvents using the COSMO-RS approach. **Green Chem.**, v. 14, n. 4, p. 1132–1145, 2012.

MOLAZADEH, P. et al. Adsorption of Lead by Microalgae *Chaetoceros* Sp. and *Chlorella* Sp. from Aqueous Solution. **Journal of Community Health Research**, v. 4, p. 114–127, 1 set. 2015.

MONTEIRO, C. M. et al. Metal Uptake by Microalgae : Underlying Mechanisms and

Practical Applications. 2012.

NARIYAN, E.; AGHABABAEI, A.; SILLANPÄÄ, M. Removal of pharmaceutical from water with an electrocoagulation process; effect of various parameters and studies of isotherm and kinetic. **Separation and Purification Technology**, v. 188, p. 266–281, 2017.

NATHAN, O. et al. The contents of Pb, Cu, Zn and Cd in meat in Nairobi, Kenya. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 5, 1 jul. 2007.

NIDHEESH, P. V; SINGH, T. S. A. Arsenic removal by electrocoagulation process: Recent trends and removal mechanism. **Chemosphere**, v. 181, p. 418–432, 2017.

NISAR, N. et al. Carotenoid Metabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 68–82, 5 jan. 2015.

NIYOGI, K. K.; BJÖRKMAN, O.; GROSSMAN, A. R. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 14162 LP – 14167, 9 dez. 1997.

NOBRE, B. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 6, p. 787–790, 2006.

NOR, S. et al. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. 2017.

NWOBA, E. et al. Microalgal Pigments: A Source of Natural Food Colors. In: [s.l: s.n.]. p. 81–123.

OBAID, S. S. et al. Heavy metal ions removal from waste water by the natural zeolites. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 9, Part 3, p. 17930–17934, 2018.

OMAR, H. H. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n. 2, p. 95–100, 2002.

PAL, A.; PAUL, A. K. Microbial extracellular polymeric substances: central elements

in heavy metal bioremediation. **Indian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 49–64, mar. 2008.

PASQUET, V. et al. Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. **Marine drugs**, v. 9, n. 5, p. 819–831, 2011a.

PASQUET, V. et al. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 59–67, 2011b.

PATIL, P. D. et al. Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 118–122, 2011.

PAULINO, A. T. et al. Novel adsorbent based on silkworm chrysalides for removal of heavy metals from wastewaters. **Journal of colloid and interface science**, v. 301, n. 2, p. 479–487, set. 2006.

PEREIRA NETO, A. et al. **Alternativas para o tratamento de efluentes da indústria galvânica Engenharia Sanitaria e Ambiental** scielo , , 2008.

PEREZ-GALVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Chemistry in the Bioactivity of Chlorophylls: An Overview. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 40, p. 4515–4536, 2017.

PÉREZ, A. T. E. et al. Key challenges and requirements for sustainable and industrialized biorefinery supply chain design and management: a bibliographic analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, p. 350–359, 2017.

PETERSEN, F. et al. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions. **WRC Report**, v. 1, n. 100, 2005.

PETROVIČ, A.; SIMONIČ, M. Removal of heavy metal ions from drinking water by alginate-immobilised *Chlorella sorokiniana*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, n. 7, p. 1761–1780, 2016.

POOJARY, M. M. et al. **Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds** *Marine Drugs*, 2016.

POTRICH, E. et al. Replacing hexane by ethanol for soybean oil extraction: Modeling, simulation, and techno-economic-environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, p. 118660, 2020.

PRAVEENKUMAR, R. et al. Breaking dormancy: an energy-efficient means of recovering astaxanthin from microalgae. **Green Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 1226–1234, 2015.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

QUEIROZ ZEPKA, L.; JACOB-LOPES, E.; ROCA, M. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 94–100, 2019.

RAI, P. K. Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and its Phytoremediation using Wetland Plants: An ecosustainable approach. **International Journal of Phytoremediation**, v. 10, n. 2, p. 133–160, 3 abr. 2008.

RAJESH BANU, J. et al. Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy- techno economic and life-cycle analysis. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122822, 2020.

RAMIREZ, M. E. et al. Potential of microalgae in the bioremediation of water with chloride content. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 472–476, 2017.

RAMMUNI, M. N. et al. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*. **Food Chemistry**, v. 277, 2018.

REN, Q. et al. Recent advances in separation of bioactive natural products. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 9, p. 937–952, 2013.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.

REVERCHON, E.; DONSI, G.; SESTI OSSEO, L. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 11, p. 2721–2726, 1 nov. 1993.

REYES, A.; SIELFELD, C. S. Effect of high-pressure compaction on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Food Engineering**, v. 189, p. 123–134, 2016.

ROMERA, E. et al. Biosorption with algae: a statistical review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 223–235, 2006.

ROMERA, E. et al. Biosorption with Algae : A Statistical Review Biosorption with Algae : A Statistical Review. v. 8551, n. 2006, 2008.

RUEN-NGAM, D. et al. Selective Extraction of Lutein from Alcohol Treated *Chlorella vulgaris* by Supercritical CO<sub>2</sub>. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 2, p. 255–260, 1 fev. 2012.

RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. [s.l.] Wiley, 1984.

SAFI, C. et al. Extraction of lipids and pigments of *Chlorella vulgaris* by supercritical carbon dioxide: Influence of bead milling on extraction performance. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 4, p. 1711–1718, 2014.

SAINI, R. K.; KEUM, Y.-S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90–103, 2018.

ŞANAL, İ. S. et al. Determination of optimum conditions for SC-(CO<sub>2</sub>+ ethanol) extraction of β-carotene from apricot pomace using response surface methodology. **The Journal of supercritical fluids**, v. 34, n. 3, p. 331–338, 2005.

SANDLER, S. I. Infinite dilution activity coefficients in chemical, environmental and biochemical engineering. **Fluid Phase Equilibria**, v. 116, n. 1–2, p. 343–353, 1996.

SANTIAGO-SANTOS, M. C. et al. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047–2052, 2004.

SARTORY, D. P.; GROBBELAAR, J. U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. **Hydrobiologia**, v. 114, n. 3, p. 177–187, 1984.

SASSO, S. et al. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new



natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 761–785, 1 jul. 2012.

SCHÄFER, A.; HUBER, C.; AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. **The Journal of Chemical Physics**, v. 100, n. 8, p. 5829–5835, 15 abr. 1994.

SCHMIDT, M. W. et al. General atomic and molecular electronic structure system. **Journal of Computational Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1347–1363, 1993.

SCHNEIDER, I. A. H. **Biossorção de metais pesados com a biomassa de macrófitos aquáticos**. [s.l.] UFRGS, 1995.

SCHRÖDINGER, E. An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules. **Physical Review**, v. 28, n. 6, p. 1049–1070, 1 dez. 1926.

SHAH, M. M. R. et al. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 531, 2016.

SHAHID, A. et al. Bioenergy potential of the residual microalgal biomass produced in city wastewater assessed through pyrolysis, kinetics and thermodynamics study to design algal biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121701, 2019.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. **Licopeno como agente antioxidante** *Revista de Nutrição scielo* , , 2004.

SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 2014.

SHI, J. et al. Solubility of lycopene in supercritical CO<sub>2</sub> fluid as affected by temperature and pressure. v. 66, p. 322–328, 2009.

SICAIRE, A.-G. et al. **Alternative Bio-Based Solvents for Extraction of Fat and Oils: Solubility Prediction, Global Yield, Extraction Kinetics, Chemical Composition and Cost of Manufacturing** *International Journal of Molecular Sciences* , 2015.

SIMON, D.; HELLIWELL, S. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. **Water Research**, v. 32, n. 7, p. 2220–2223, 1998.

- SOARES, A. T. et al. Improvement of the Extraction Process for High Commercial Value Pigments from. v. 27, n. 6, p. 1083–1093, 2016.
- SOARES, R. DE P. et al. lvpp/sigma: LVPP sigma-profile database (20.06). 30 jun. 2020.
- SPEARS, K. Developments in food colourings: the natural alternatives. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 283–288, 1 nov. 1988.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.
- SRIVASTAVA, N.; BALOMAJUMDER, C. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. **Journal of hazardous materials**, v. 151, p. 1–8, 1 mar. 2008.
- TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing** Vienna, Austria, , 2013.
- TEH, C. Y. et al. Recent Advancement of Coagulation–Flocculation and Its Application in Wastewater Treatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 16, p. 4363–4389, 27 abr. 2016.
- THANA, P. et al. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3110–3115, 2008.
- TORRES, S. et al. Green Composites from Residual Microalgae Biomass and Poly(butylene adipate-co-terephthalate): Processing and Plasticization. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 4, p. 614–624, 6 abr. 2015.
- VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quimica Nova**, v. 32, p. 2429–2436, 2009.
- VANDANA, V.; TEJA, A. S. The solubility of paclitaxel in supercritical CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O. **Fluid Phase Equilibria**, v. 135, n. 1, p. 83–87, 1997.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M. et al. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142–149, 2013.

- VARELA, J. C. et al. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 3, p. 423–436, 2015.
- WANEES, S. et al. Adsorption Studies on the Removal of Hexavalent Chromium-Contaminated Wastewater Using Activated Carbon and Bentonite. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, p. 8245–8252, 1 nov. 2013.
- WANG, F. et al. Optimum Production Conditions, Purification, Identification, and Antioxidant Activity of Violaxanthin from Microalga *Eustigmatos* cf. *polyphem* (*Eustigmatophyceae*). **Marine drugs**, v. 16, n. 6, p. 190, 1 jun. 2018.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 427–451, 2006.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009.
- WANG, S.; SANDLER, S. I.; CHEN, C.-C. Refinement of COSMO–SAC and the Applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 22, p. 7275–7288, 1 out. 2007.
- WHITE, C.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS microbiology reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 503–516, 1997.
- WIDHIASTUTI, F. et al. Electrocoagulation of boron by electrochemically co-precipitated spinel ferrites. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 893–901, 2018.
- WOJEICCHOWSKI, J. P. et al. Using COSMO-RS in the Design of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Antioxidants from Rosemary. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 32, p. 12132–12141, 17 ago. 2020.
- XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1225–1244, 2016.
- YANG, X. J.; FANE, A. G.; MACNAUGHTON, S. Removal and recovery of heavy metals from wastewaters by supported liquid membranes. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 341–348, 1 jan. 2001.

YARA-VARÓN, E. et al. Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A theoretical versus experimental solubility study. **RSC Adv.**, v. 6, n. 33, p. 27750–27759, 2016.

YE, Z.-W.; JIANG, J.-G.; WU, G.-H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 352–360, 2008.

YEN, H.-W. et al. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–174, 2013.

YEN, H.-W.; CHIANG, W.-C.; SUN, C.-H. Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, n. 1, p. 53–57, 2012.

YEN, H. W. et al. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 291–296, 2015.

YEO, S.-D. et al. Critical Properties of Carbon Dioxide + Methanol, + Ethanol, + 1-Propanol, and + 1-Butanol. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 45, n. 5, p. 932–935, 1 set. 2000.

ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK, M.; RYGAL, A. The Effect of Biomass (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus armatus*) Concentrations on Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> Biosorption from Zinc Smelting Wastewater. **Engineering and Protection of Environment**, v. 20, p. 211–220, 1 abr. 2017.

ZENDRON, R. Mecanismos de neurotoxicidade e doenças neurológicas relacionadas à intoxicação por metais pesados. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v. 64, p. 45–51, 2015.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2018.

ZHANG, W. et al. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 329–335, 2014.

ZOU, T.-B. et al. **Response Surface Methodology for Ultrasound-Assisted**

**Extraction of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis** *Marine Drugs* , 2013.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; HANCOCK, I. C. Biosorption of metals from dilute aqueous solutions. **Separation and Purification Methods**, v. 26, n. 2, p. 255–295, 1997.