

Allan Valcareggi Morcelli

**TECNOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE
PIGMENTOS DE MICROALGAS
ASSISTIDAS POR MODELAGEM
TERMODINÂMICA**

 editora
itacaiúna

Allan Valcareggi Morcelli

Tecnologias de extração de pigmentos
de microalgas assistidas por modelagem
termodinâmica

1ª edição

Editora Itacaiúnas
Ananindeua – PA
2025

©2025 por Allan Valcareggi Morcelli.
Todos os direitos reservados.

1ª edição

Conselho editorial / Colaboradores

Márcia Aparecida da Silva Pimentel – Universidade Federal do Pará, Brasil
José Antônio Herrera – Universidade Federal do Pará, Brasil
Márcio Júnior Benassuly Barros – Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil
Miguel Rodrigues Netto – Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Wildoberto Batista Gurgel – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil
André Luiz de Oliveira Brum – Universidade Federal de Rondônia, Brasil
Mário Silva Uacane – Universidade Licungo, Moçambique
Francisco da Silva Costa – Universidade do Minho, Portugal
Ofélia Pérez Montero - Universidad de Oriente – Santiago de Cuba, Cuba

Editora-chefe: Viviane Corrêa Santos – Universidade do Estado do Pará, Brasil
Editor e web designer: Walter Luiz Jardim Rodrigues – Editora Itacaiúnas, Brasil
Editor e diagramador: Deivid Edson Corrêa Barbosa - Editora Itacaiúnas, Brasil

Editoração e diagramação: Walter Rodrigues
Foto de capa: Fornecida pelo autor.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

M833 Morcelli, Allan Valcareggi

Tecnologias de extração de pigmentos de microalgas assistidas por modelagem termodinâmica [recurso eletrônico] / Allan Valcareggi Morcelli. - Ananindeua : Editora Itacaiúnas, 2025.
163 p.: PDF ; 2 MB.

Inclui bibliografia e índice.
ISBN: 978-85-9535-330-5 (Ebook)
DOI: 10.36599/itac-978-85-9535-329-9

1. Microalgas. 2. Extração de pigmentos. 3. Biorrefinaria. 4. Modelagem termodinâmica. I. Título.

CDD: 660.6
CDU: 66.061:582.26

Índice para catálogo sistemático:

1. Tecnologia química: 660.6
2. Tecnologia de extração aplicada a microalgas: 66.061:582.26

E-book publicado no formato PDF (*Portable Document Format*). Utilize software [Adobe Reader](#) para uma melhor experiência de navegabilidade nessa obra.

Todo o conteúdo apresentado neste livro é de responsabilidade do(s) autor(es). Esta publicação está licenciada sob [CC BY-NC-ND 4.0](#)

Esta obra foi publicada pela **Editora Itacaiúnas** em junho de 2025.



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 β -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_2 +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.

Palavras-chave: Microalgas. Carotenoides. Extração com solventes. Extração com fluido supercrítico. COSMO-SAC.

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 β -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 CO₂+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.

Keywords: Microalgae. Carotenoids. Solvent extraction. Supercritical fluid extraction. COSMO-SAC.

Sumário

Capítulo 1 - Introdução.....	10
Capítulo 2 – Objetivos	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
Capítulo 3 - Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica	18
3.1. Microalgas.....	18
3.1.1. Classificação e relevância	18
3.1.2. O conceito de biorrefinaria microalgal.....	19
3.1.3. Aplicações nutricionais da tecnologia de microalgas.....	21
3.1.4. Pigmentos sintetizados por microalgas.....	22
3.2. Técnicas de extração de pigmentos produzidos por microalgas	28
3.2.1. Extração com solventes orgânicos (Extração sólido-líquido)	29
3.2.2. Extração de pigmentos de microalgas com solventes	31
3.2.3. Extração com fluido supercrítico.....	36
3.2.4. Extração com fluido supercrítico de pigmentos de microalgas	38
3.3. Termodinâmica de processos de extração.....	42
3.3.1. Equilíbrio de fases e a não-idealidade em solução	43
3.3.2. COSMO-SAC.....	46
Capítulo 4 – Extração de clorofilas e carotenoides das microalgas <i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>Heterochlorella luteoviridis</i>	51
4.1. Materiais e métodos	51
4.1.1. Solventes orgânicos.....	51
4.1.2. Cultivo de biomassa	52
4.1.3. Experimentos de seleção de solventes	54
4.1.4. Experimentos de extração com fluido sub e supercrítico	54
4.1.5. Extração exaustiva.....	58
4.1.6. Análise de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	58
4.1.7. Determinação do perfil de carotenoides	59
4.1.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59
4.1.9. Cálculo da eficiência de extração e análise estatística dos dados	60
4.1.10. Geração de perfis Sigma e cálculos de CADIs.....	60
4.2. Artigo 1.....	61
4.2.1. Introduction.....	61

4.2.2.	Materials and methods	63
4.2.3.	Results and discussion.....	65
4.2.4.	Conclusions.....	69
4.2.5.	References.....	69
4.2.6.	Supporting Information.....	84
4.3.	Artigo 2.....	95
4.3.1.	Introduction.....	96
4.3.2.	Materials and Methods	100
4.3.3.	Results and Discussion	106
4.3.4.	Conclusions.....	123
4.3.5.	References.....	128
Capítulo 5 – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros.....		136
5.1. Sugestões para trabalhos futuros.....		137
Referências.....		139

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes de rápido crescimento, que convertem a luz solar, dióxido de carbono (CO₂) 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 CO₂ 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 CO₂ e é uma alternativa valiosa na produção comercial de importantes antioxidantes como a luteína, α -caroteno e β -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 β -caroteno, na maioria dos casos, é o mais relevante (BEGUM et al., 2016a). O β -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 β -caroteno também é utilizado como corante para melhorar a aparência de margarinas, queijos, sucos, entre outros produtos. Este carotenoide apresenta propriedades imunomoduladoras e antienvelhecimento, e existem estudos que associam o β -caroteno à redução do risco de doenças degenerativas, como o câncer. Por exemplo, *Dunaliella sp.* contém estereoisômeros 9-

cis e total-*trans* de β -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 CO₂ 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 CO₂ 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).

Este livro está estruturado em 5 (cinco) capítulos. No primeiro capítulo, é feita uma introdução sobre a importância da extração de produtos de valor agregado a partir de microalgas. 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 CO₂ Utilization*. Finalmente, o capítulo 5 (cinco) 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 CO₂ 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 (CO₂+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 CO₂ 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;

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 (CO₂) 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 CO₂ 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 CO₂ 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 (COELHO, 2019). Neste trabalho, os variados benefícios atribuídos ao consumo de pigmentos produzidos por microalgas são destacados.

3.1.4. Pigmentos sintetizados por microalgas

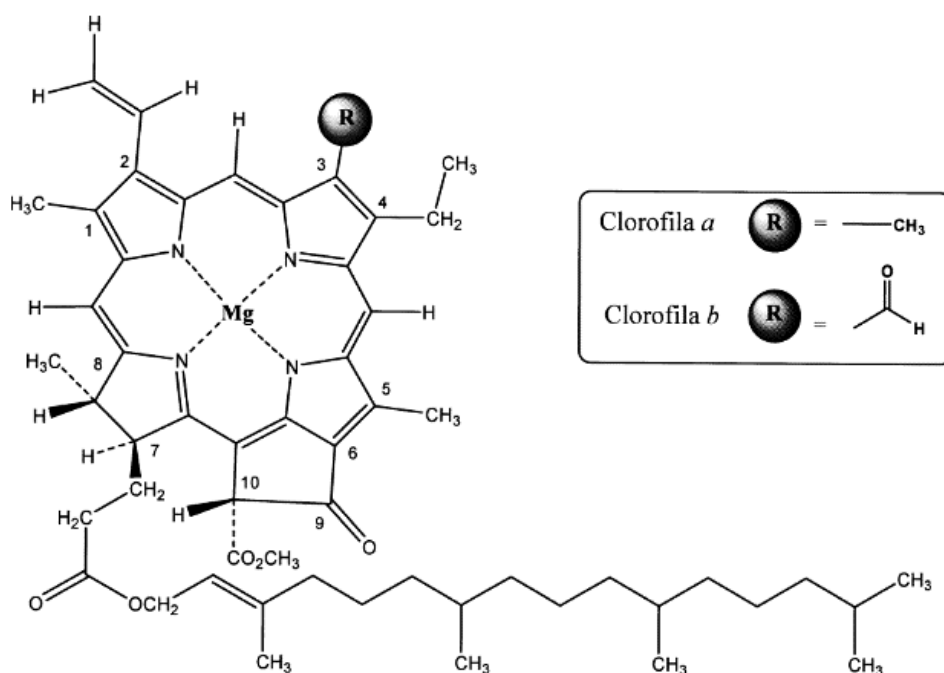
Dentre a grande variedade de compostos sintetizados por microalgas, os pigmentos naturais são um dos grupos mais relevantes a serem explorados. Os pigmentos naturais de microalgas apresentam benefícios à saúde por suas propriedades antioxidantes, anticâncer e anti-inflamatórias, e podem substituir os 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.

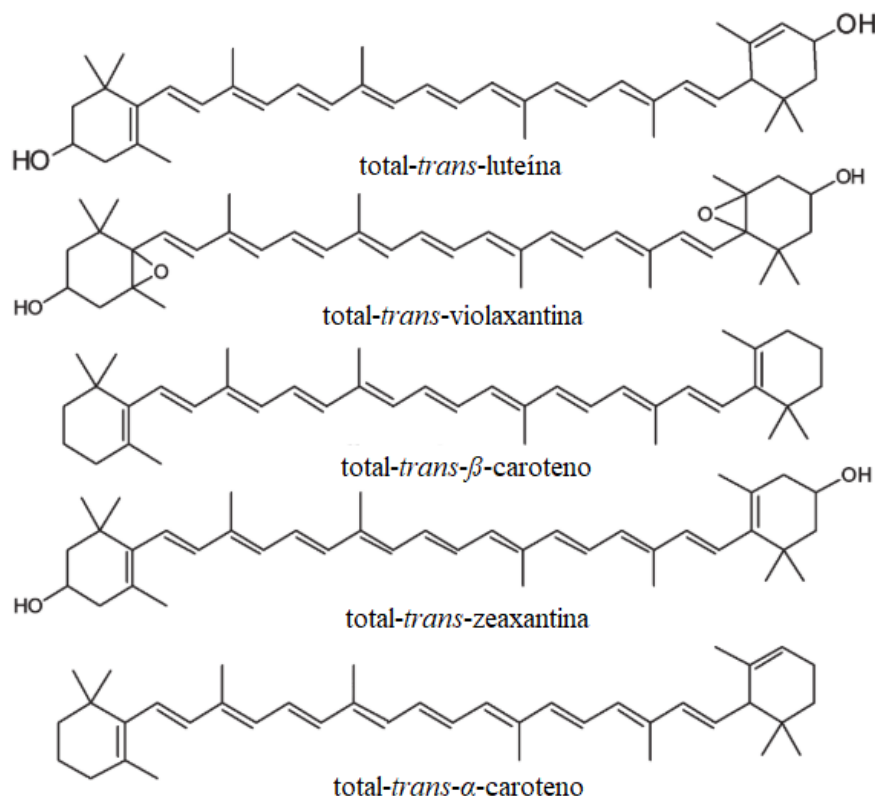
3.1.4.2.Carotenoides

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 β -caroteno que na maioria dos casos é o mais relevante (BEGUM et al., 2016a). O β -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 β -caroteno é também utilizado como corante para melhorar a aparência de margarinas, queijos, sucos, entre outros produtos. Há estudos que associam o β -caroteno com a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer. Ele apresenta propriedades imunomoduladoras e antienvhecimento. O β -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.

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).

Figura 2 - Estruturas moleculares dos principais carotenoides encontrados nas microalgas *C. sorokiniana* e *H. luteoviridis*.



Fonte: DIPRAT et al., 2017

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 CO₂ 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, importantemente, 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 β -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).

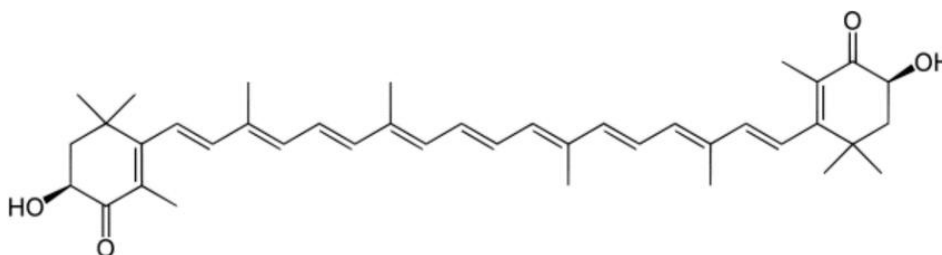
A maioria dos solventes (incluindo, etanol, hexano e acetona) usados para extração possuem riscos ambientais, à saúde (toxicidade) e segurança (decomposição, explosão). No entanto, com base em questões ambientais e de saúde e segurança, etanol e acetona vêm sendo considerados os solventes preferidos, 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 β -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, β -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 pg 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, consequentemente, 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 CO₂ supercrítico também é atraente devido à sua alta difusividade combinada com seu poder de solvatação facilmente ajustável. Outra vantagem é que o CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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. CO₂ 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 γ -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 CO₂ + 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 CO₂, 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 CO₂ causou menor recuperação de carotenoides e, por outro lado, alguns pesquisadores observaram uma redução na extração de carotenoides quando baixa pressão de CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ supercrítico é apolar, e a adição de uma pequena quantidade de cossolvente aumenta a capacidade do CO₂ 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 CO₂ 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 β -caroteno tenha aumentado com o uso de CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 α , β e π 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 (μ_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, μ_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 (γ_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).

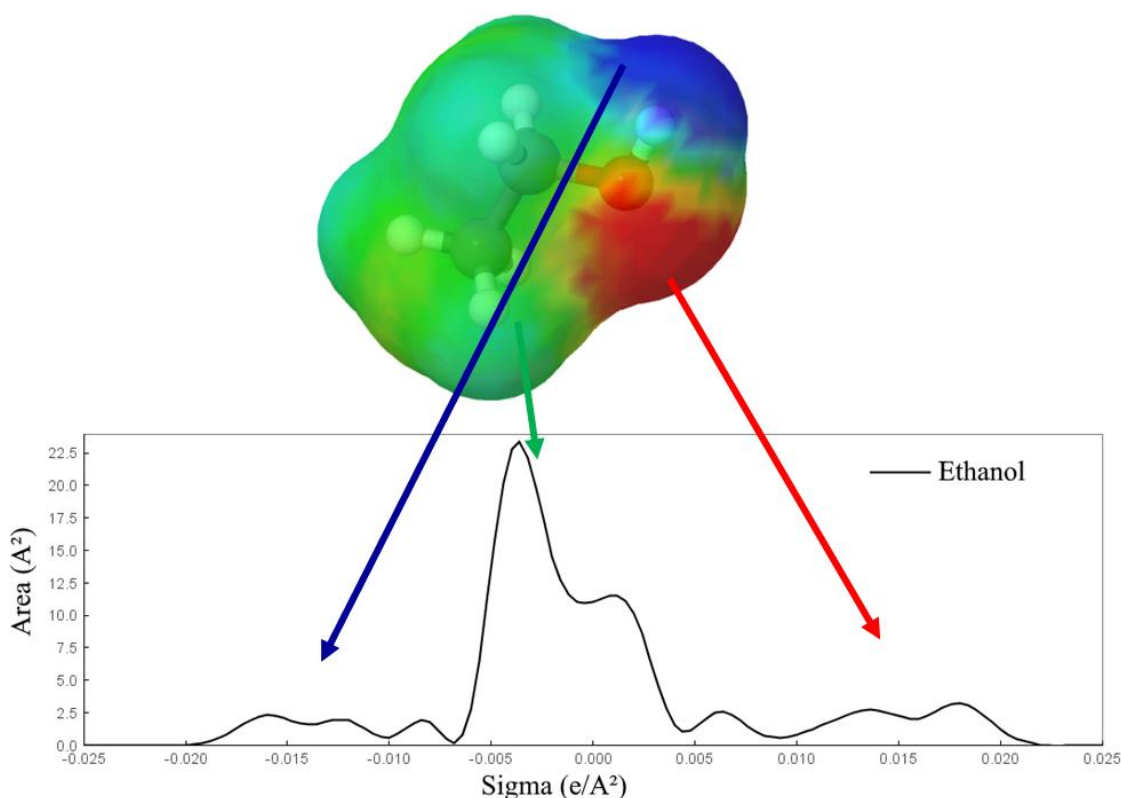
Uma variante do referido grupo de modelos é o COSMO-SAC (*Conductor-like Screening Model for Real Solvent Segment Activity*), um modelo que teve diversas aplicações em sistemas complexos, como o comportamento de predição de soluções poliméricas e líquidos iônicos. Nele, o cálculo do coeficiente de atividade 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 σ , induzida na superfície das moléculas, e esse valor usualmente varia entre $-0,025 \text{ e}/\text{\AA}^2$ e $0,025 \text{ e}/\text{\AA}^2$. No eixo das ordenadas tem-se a probabilidade de encontrar um elemento com densidade de carga σ_i em uma substância pura i multiplicado pela área superficial total da cavidade, resultando que esta variável apresente unidade de área ($\text{\AA}^2$). 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; AHLRICHS, 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.

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 CO₂ 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

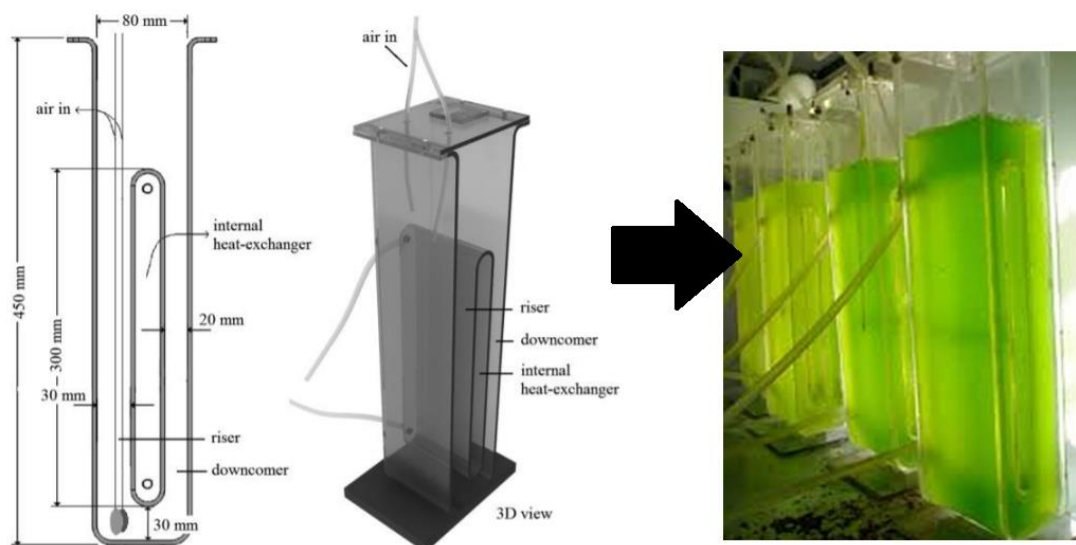
4.1.1. Solventes orgânicos

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 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 fl/2 modificado com concentração de NaNO_3 adaptada para 600 mg L^{-1} . Os nutrientes foram mantidos através da adição diária ao fotobiorreator de uma solução 1 mL L^{-1} de fosfato (5 g L^{-1} de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e 1 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 mg L^{-1} de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg L^{-1} de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 180 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 Na_2EDTA 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°C por 15 minutos.

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



Fonte: Adaptado de KOCHEM 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 ± 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 CO₂+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);

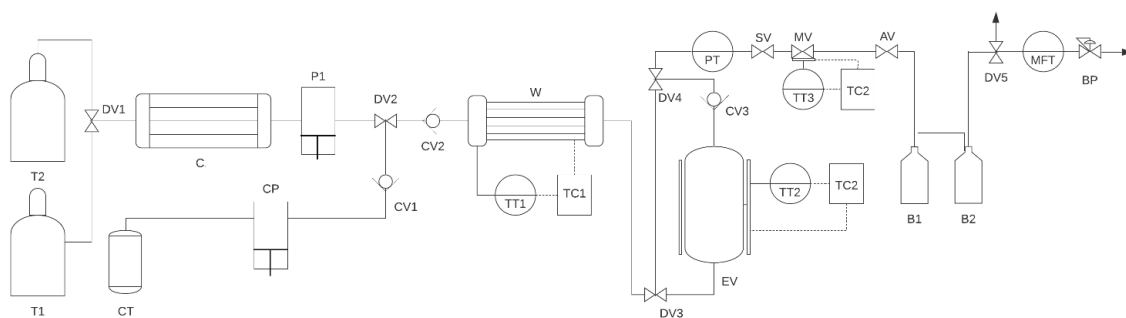
E = porcentagem volumétrica de etanol na mistura solvente (% v/v);

$\alpha, \beta_i, \gamma_i, \delta_i$ = 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⁻¹; 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 CO₂ 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 $\pm 1,0$ 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 CO₂; (*CT*) tanque de cossolvente; (*DV*) Válvula direcional; (*C*) condensador; (*P*) Bomba de CO₂; (*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 absorbância 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 ± 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 aspersão 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 díodos (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⁻¹, 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⁻¹)

m_0 = composição mássica do composto na biomassa seca (mg g⁻¹)

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 (CO₂) 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 CO₂ 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; WOJEICCHOWSKI 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 (mg g⁻¹)

m_0 = mass of the compound in the dry biomass recovered by exhaustive extraction (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 ⁻¹)	12.66 ± 0.05	10.86 ± 0.06
Chlorophyll b (mg g ⁻¹)	4.81 ± 0.23	6.66 ± 0.31
Total carotenoids (mg g ⁻¹)	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 to 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 μm). 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 μm 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.

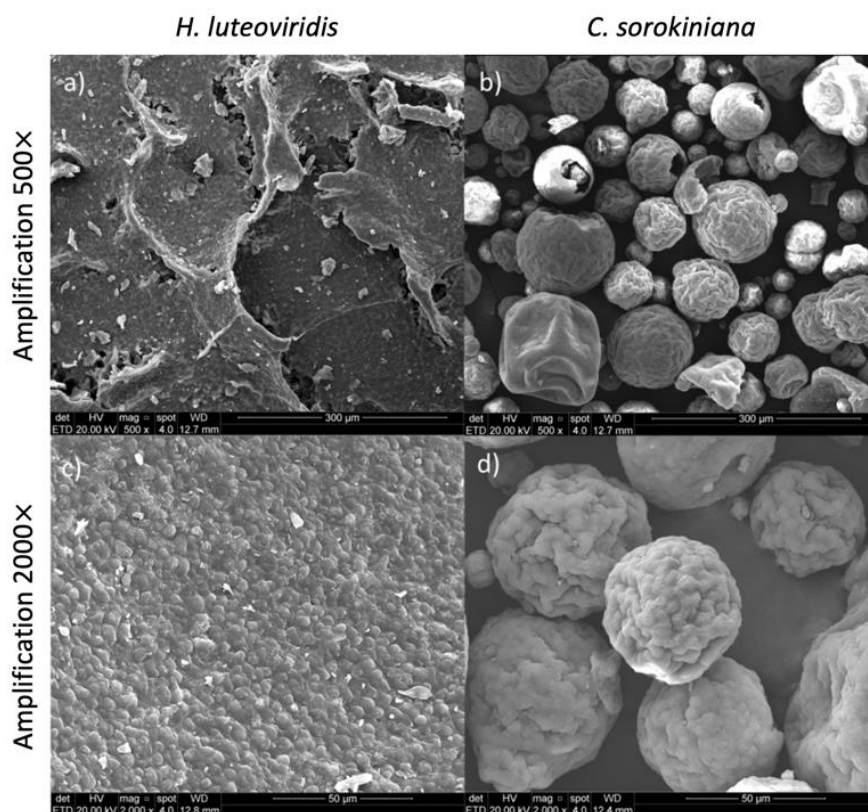


Figure 1. SEM images of the freeze-dried biomass employed in this work. Microalgal sample and amplifications: (a) *H. luteoviridis*, 500 $\times$, (b) *C. sorokiniana*, 500 $\times$, (c) *H. luteoviridis*, 2,000 $\times$, (d) *C. sorokiniana*, 2,000 $\times$.

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 %, 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.

	<i>all-trans</i> -betacarotene	<i>all-trans</i> -lutein	<i>all-trans</i> -violaxanthin	<i>all-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 CO₂ and flue gas-containing CO₂ 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 CO₂ 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 β -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis β -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>.
- 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 microalgae A 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 Gıda**, v. 9, 1 jan. 2011.
- INGLEZAKIS, V. J.; GRIGOROPOULOU, H. P. Modeling of ion exchange of Pb²⁺ 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 EtherMarine Drugs**, 2014.

KANG, S.-Y. et al. Competitive adsorption characteristics of Co^{2+} , Ni^{2+} , and 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_2 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 α -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 CO₂ 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.). **Food Science and Technology**. [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 β -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 CO₂ 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 CO₂. **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-(CO₂+ 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 CO₂ 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 CO₂ and N₂O. **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 Zn²⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺ 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×.

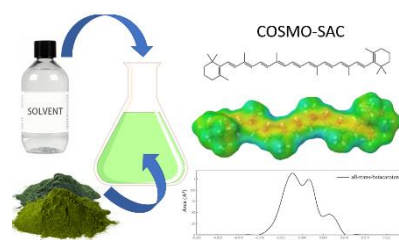
Entry for the Table of Contents

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 ± 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 ± 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 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm) using a linear gradient of methanol/MTBE as mobile phase (0.9 mL min⁻¹, 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 σ -profile, in order to simplify the mathematical treatment. The σ -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 σ -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⁻¹ for *C. sorokiniana* and 2.81 mg g⁻¹ 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.

	<i>C. sorokiniana</i>		<i>H. luteoviridis</i>	
Carotenoid	Content (mg g ⁻¹)	% of total carotenoids	Content (mg g ⁻¹)	% 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%

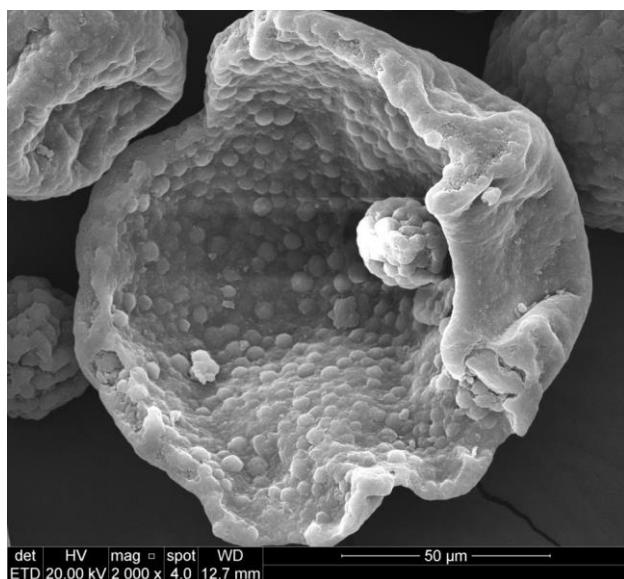


Figure S1. Detailed scanning electron microscopy (SEM) image of a ruptured cell among the freeze-dried *C. sorokiniana* biomass used in this work (2,000× amplification).

Table S2. Chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoid extraction yields (mg g⁻¹ dry biomass) and compound yields (% of total compound content in biomass, in parenthesis) from *C. sorokiniana*.

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

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 (mg g⁻¹ dry biomass) and compound yields (% of total compound content in biomass, in parenthesis) from *H. luteoviridis*.

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

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⁻¹) 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%)
Total carotenoids	0.332 ± 0.050 (8.1 ± 1.2%) ^b	0.759 ± 0.082 (18.6 ± 2.0%) ^a	0.578 ± 0.074 (14.2 ± 1.8%) ^{ab}	0.324 ± 0.017 (7.9 ± 0.4%) ^b
<u>Groups of carotenoids</u>				
Violaxanthins	0.012 ± 0.001 (5.5 ± 0.4%) ^b	0.065 ± 0.012 (30.0 ± 5.4%) ^a	0.093 ± 0.003 (42.9 ± 1.3%) ^a	0.009 ± 0.001 (4.3 ± 0.5%) ^b
Luteins	0.185 ± 0.034 (6.5 ± 1.2%) ^b	0.575 ± 0.081 (20.3 ± 2.9%) ^a	0.324 ± 0.039 (11.5 ± 1.4%) ^{ab}	0.155 ± 0.005 (5.5 ± 0.2%) ^b
Zeaxanthins	0.014 ± 0.005 (4.9 ± 1.6%) ^a	0.051 ± 0.008 (17.3 ± 2.6%) ^a	0.035 ± 0.012 (11.8 ± 4.0%) ^a	0.014 ± 0.000 (4.9 ± 0.1%) ^a
Carotenes	0.120 ± 0.011 (16.3 ± 1.5%) ^a	0.068 ± 0.005 (9.2 ± 0.7%) ^a	0.126 ± 0.021 (17.0 ± 2.8%) ^a	0.145 ± 0.014 (19.7 ± 1.9%) ^a

Table S5. Carotenoid profile of extracts of *H. luteoviridis*. Carotenoid concentrations (mg g⁻¹) 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%) ^b	0.464 ± 0.016 (16.5 ± 0.6%) ^a	0.353 ± 0.006 (12.6 ± 0.2%) ^b	0.142 ± 0.009 (5.1 ± 0.3%) ^c
<u>Groups of carotenoids</u>				
Violaxanthins	0.049 ± 0.000 (17.8 ± 0.0%) ^c	0.127 ± 0.002 (46.1 ± 0.6%) ^a	0.067 ± 0.004 (24.4 ± 1.6%) ^b	0.012 ± 0.001 (4.5 ± 0.4%) ^d
Luteins	0.150 ± 0.012 (16.1 ± 1.3%) ^a	0.155 ± 0.000 (16.7 ± 0.0%) ^a	0.177 ± 0.020 (19.0 ± 2.1%) ^a	0.044 ± 0.003 (4.7 ± 0.3%) ^b
Zeaxanthins	0.021 ± 0.001 (5.1 ± 0.3%) ^a	0.024 ± 0.000 (5.6 ± 0.0%) ^a	0.022 ± 0.000 (5.4 ± 0.1%) ^a	0.009 ± 0.001 (2.1 ± 0.2%) ^b
Carotenes	0.139 ± 0.013 (11.7 ± 1.1%) ^a	0.159 ± 0.018 (13.4 ± 1.5%) ^a	0.087 ± 0.001 (7.3 ± 0.8%) ^b	0.077 ± 0.004 (6.5 ± 0.3%) ^b

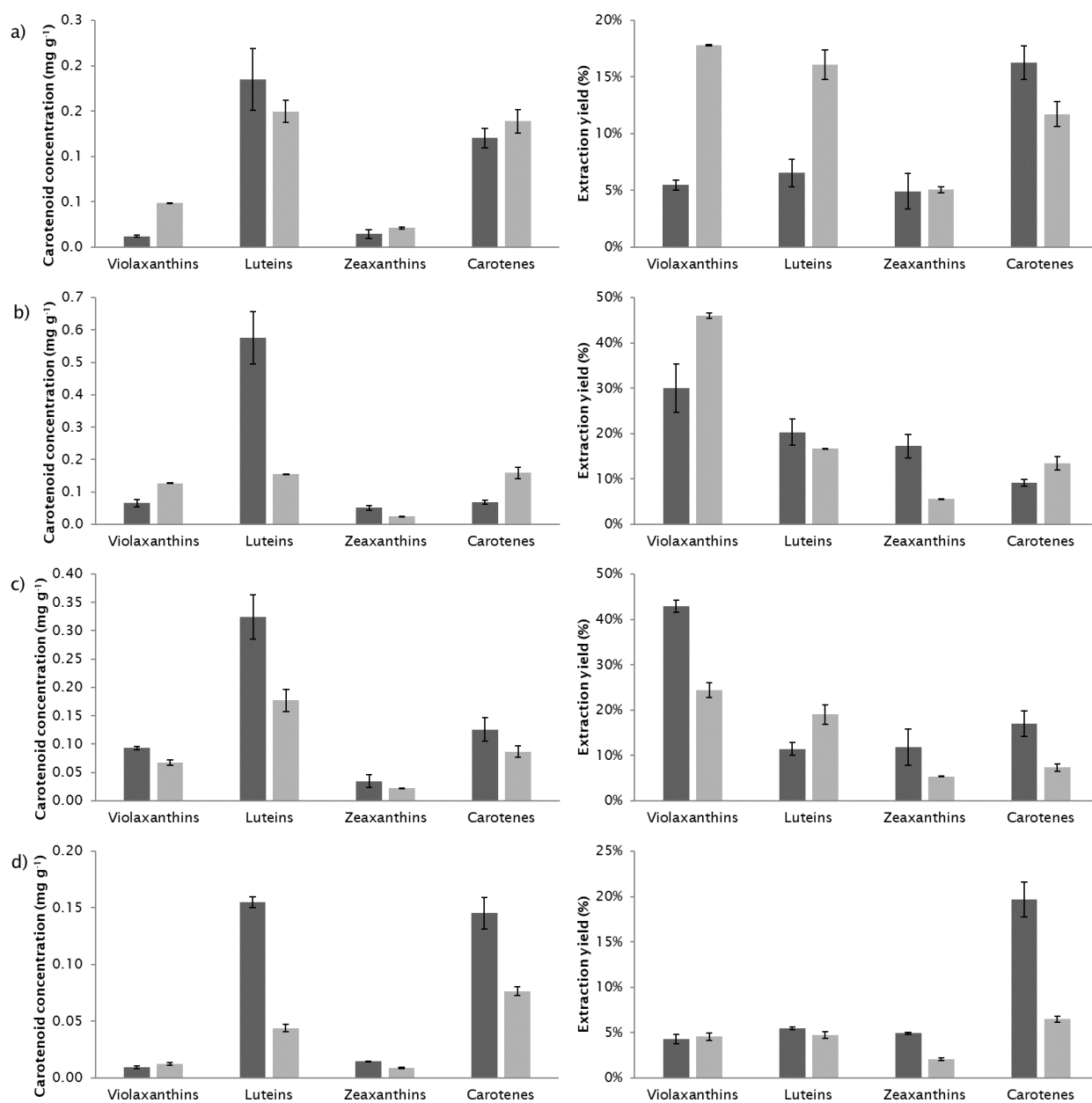


Figure S2. Carotenoid profile of extracts with grouped isomers of violaxanthin, lutein, zeaxanthin and carotene: (a) ethanol. (b) acetone. (c) ethyl acetate. (d) hexane. *C. sorokiniana*. *H. luteoviridis*.

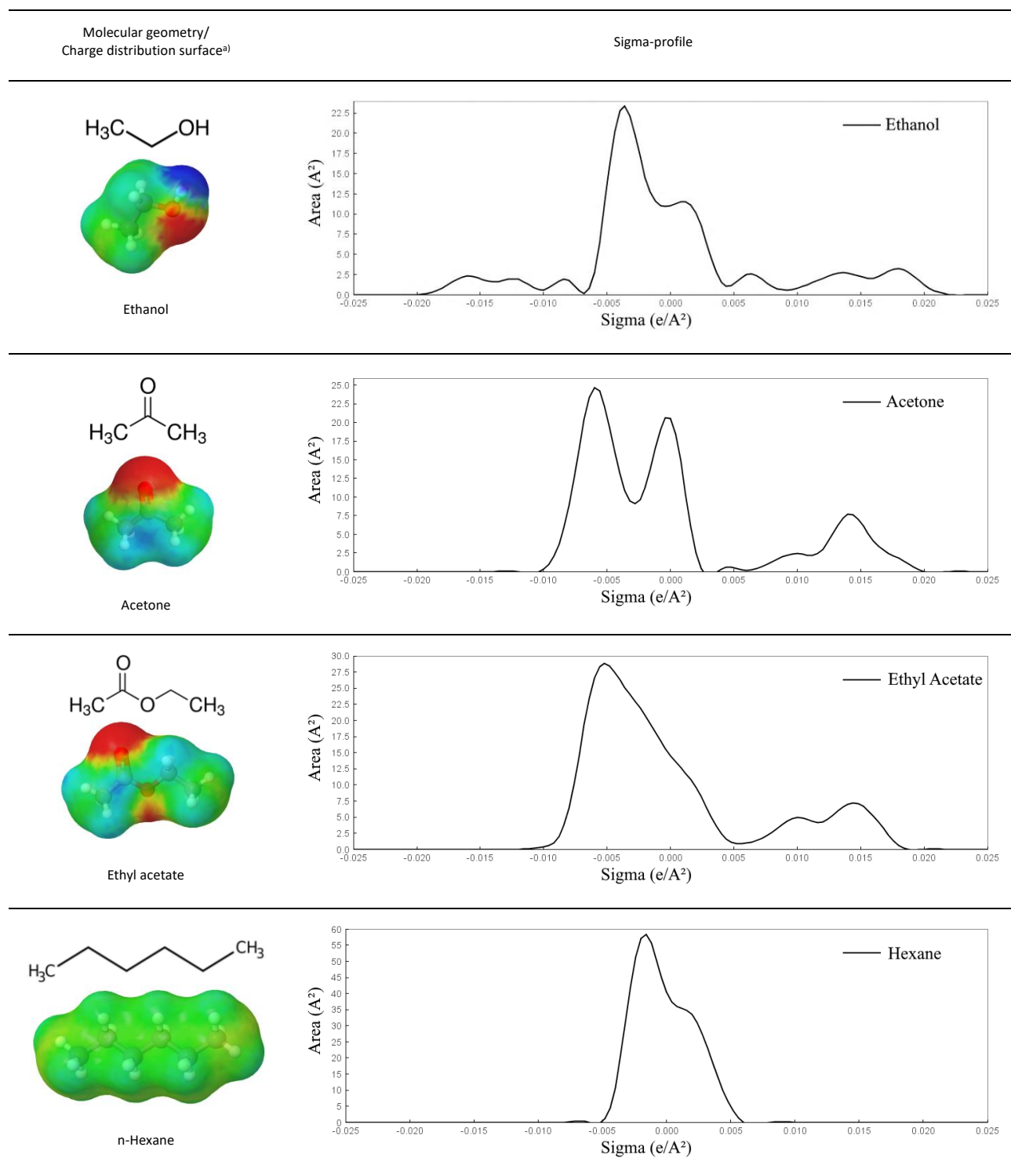
COSMO-SAC

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 σ -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.

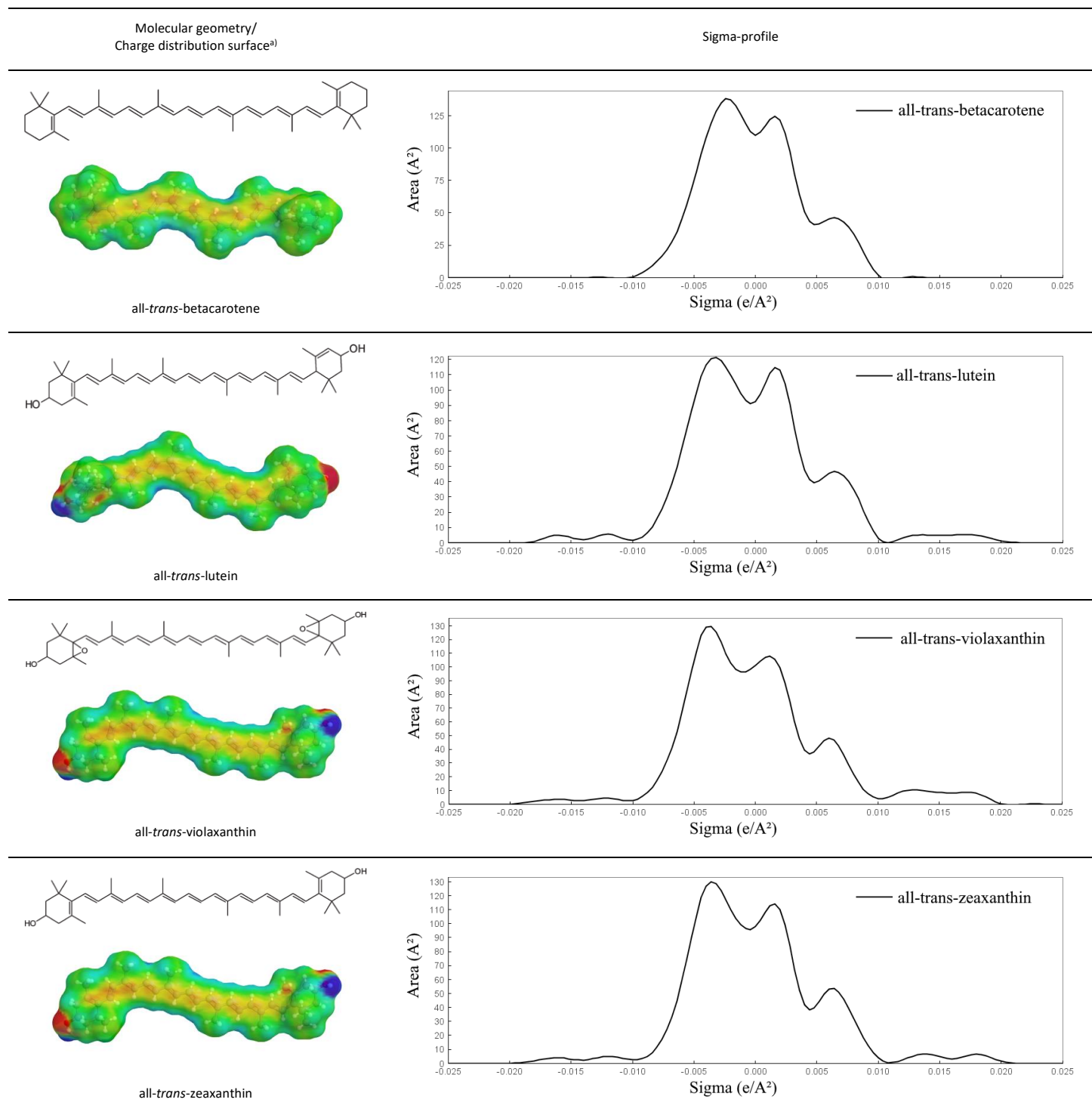
The comparison of the electronic distribution in the molecules and of the σ -profiles of solvents and solutes give a better understanding of the results found for their pairings. Acetone's σ -profile presented an area distributed in the positive region of σ (e/A^2) in the range of 0.010 – 0.020. This 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 σ -profiles presented an approximately similar area distributed in the same range of the negative region of σ (e/A^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.



^{a)} 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.



^{a)} 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. 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, 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 CO₂ Utilization* (<https://doi.org/10.1016/j.jcou.2021.101649>). Este estudo abordou a extração de pigmentos de microalgas empregando misturas de CO₂+etanol sub e supercríticas.

SUPERCRITICAL FLUID (CO₂+ETHANOL) EXTRACTION OF CHLOROPHYLLS AND CAROTENOIDS FROM *Chlorella sorokiniana*: COSMO-SAC ASSISTED PREDICTION OF PROPERTIES AND EXPERIMENTAL APPROACH

Allan Morcelli^{a,*}, Eduardo Cassel^b, Rubem Vargas^b, Rosane Rech^a, Nilson Marcílio^a

^aChemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil,

^bUnit 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 (γ^∞) of carotenoids in CO₂+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 CO₂+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 CO₂ 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 CO₂ fixation potential and is a valuable resource in the commercial production of important antioxidants such as lutein, α -carotene and β -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 β -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 CO₂ 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 (γ^∞) 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 γ^∞ 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 γ^∞ 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 (σ -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 σ -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 CO₂+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 (γ^∞) 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 γ^∞ 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 γ^∞ of key-carotenoids at infinite dilution ($x \rightarrow 0$) and at constant temperature ($T = 50\text{ }^\circ\text{C}$, the center point of the experimental design), when these molecules were individually paired to varied molar compositions (x_i) of CO_2 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 σ -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 β -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 σ -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 σ -profiles and calculate γ^∞ 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*- β -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⁻¹ 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. CO₂ 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 ± 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.

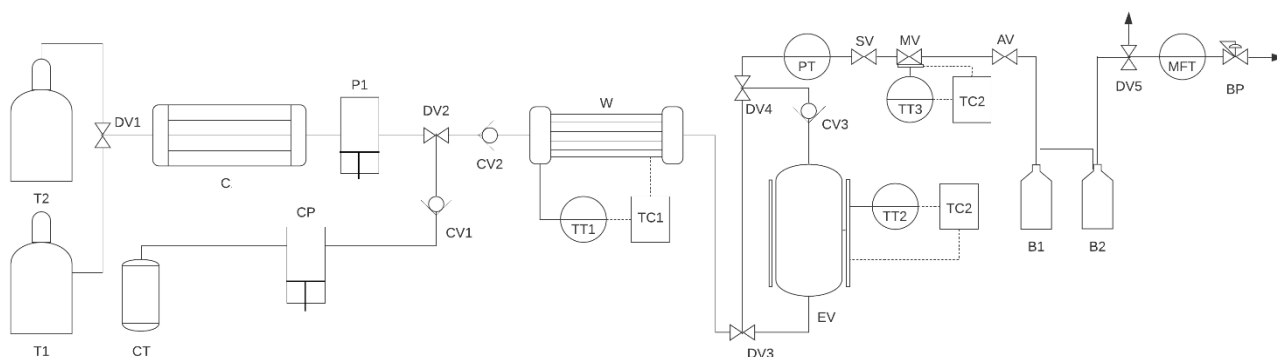


Figure 1: schematic diagram of the experimental apparatus used in this work – (T) CO₂ cylinder; (CT) Cosolvent tank; (DV) Directional Valve; (C) condenser; (P) CO₂ Pump; (CP) Cosolvent Pump; (CV) Check Valve; (W) Pre-heater; (TT) Temperature Transmitter; (TC) Temperature Controller; (EV) Extraction Vessel; (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 CO₂+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 ± 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 ± 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 µm, 250 mm × 4.6 mm) using a linear gradient of methanol/MTBE as mobile phase (0.9 mL min⁻¹, 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⁻¹

m_0 = mass composition of the compound in the dry microalgal biomass (quantified by the exhaustive extraction methodology), mg g⁻¹

4.3.3. Results and Discussion

4.3.3.1. Sigma-profiles and γ^∞ calculated by COSMO-SAC

COSMO-SAC was employed to generate charge distribution surfaces and σ -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 σ -profiles, allowed for the assessment of the compatibility between solvent and solute. Molecules presenting similar polarities and complementary charge distributions (i.e., complementary σ -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 γ^∞ of key-carotenoids were calculated at $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$, the center point of the experimental design used in this work. Each molecule was individually paired with varied molar compositions (x_i) of CO_2 and ethanol, and the qualitative assessment of the effect of the composition of the solvent was represented by the logarithm of the γ^∞ . 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 γ^∞ 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. β -carotene, a non-polar molecule was predicted to present the highest affinity with pure CO_2 , which is also non-polar. The behavior of the logarithm of γ^∞ 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.

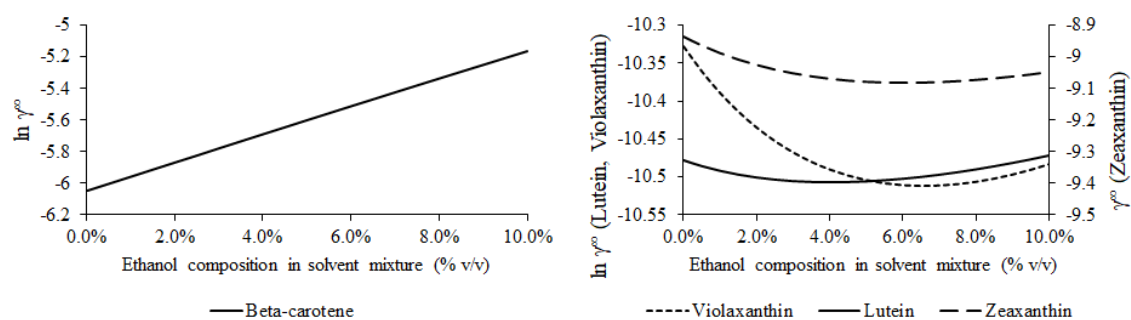
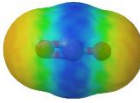
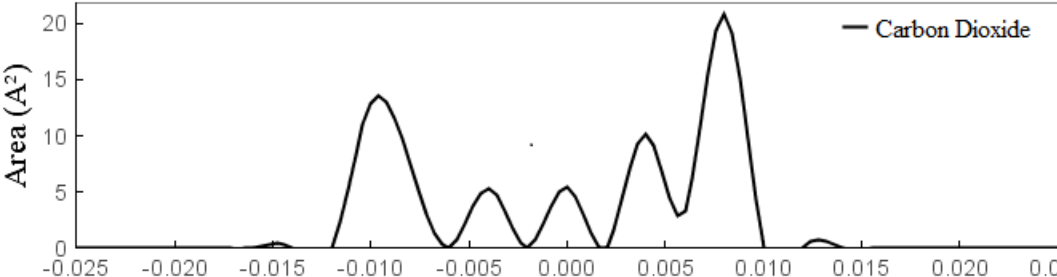
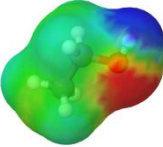
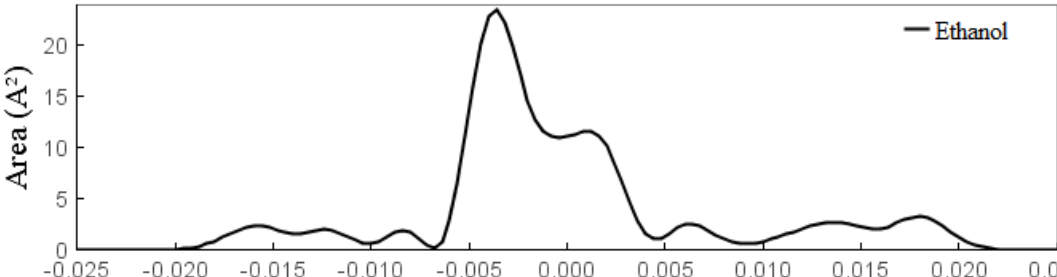


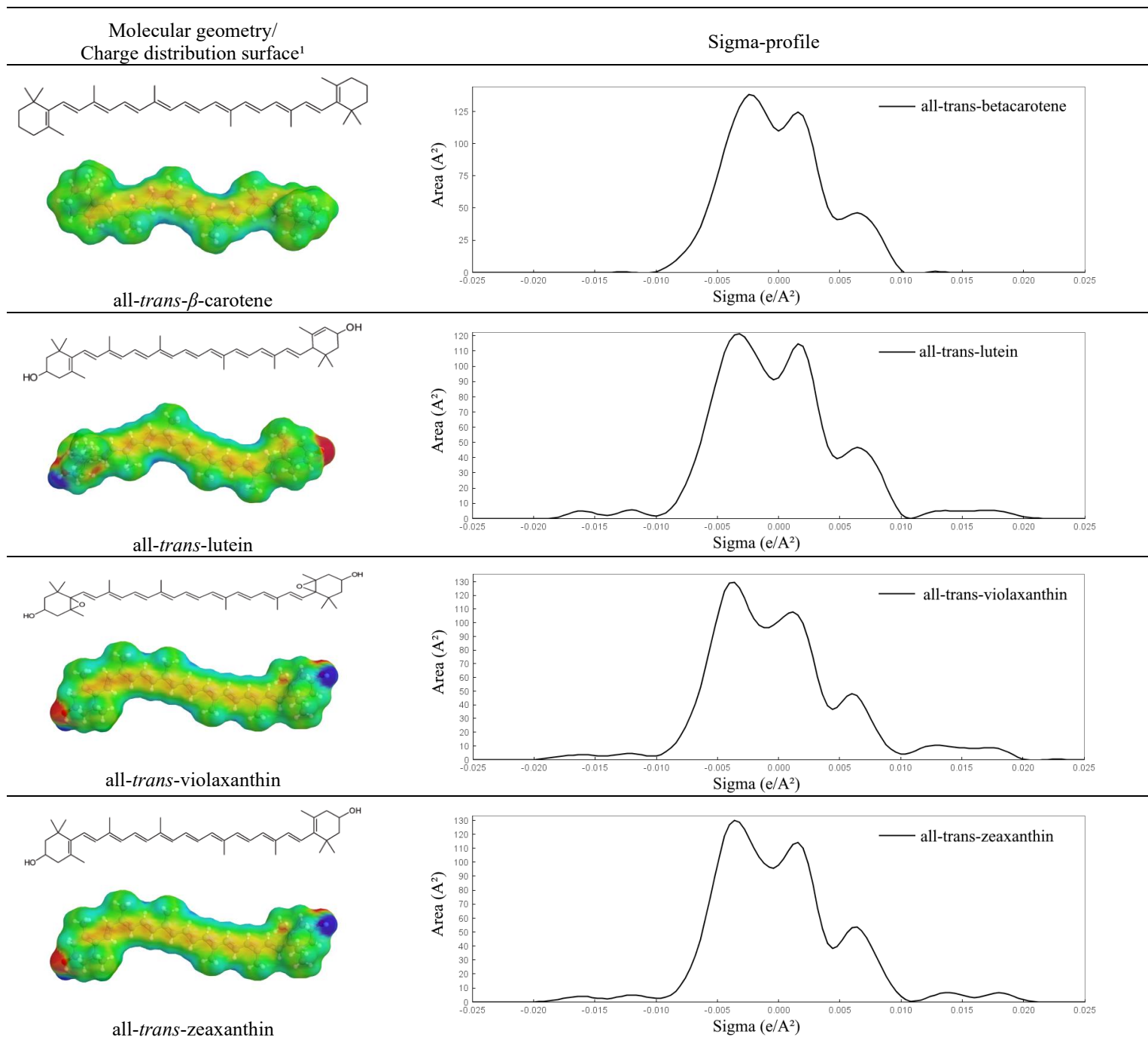
Figure 2: COSMO-SAC prediction of the logarithms of γ^∞ as a function of the ethanol composition in the solvent (% v/v)

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 ¹	Sigma-profile
$\text{O}=\text{C}=\text{O}$  Carbon Dioxide	 — Carbon Dioxide
$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$  Ethanol	 — Ethanol

¹ 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.



¹ 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 ± 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 ± 0.19 mg g⁻¹ chlorophyll a, 4.76 ± 0.12 mg g⁻¹ chlorophyll b, and 3.91 ± 0.10 mg g⁻¹ 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 ± 0.051 mg g⁻¹), followed by a distribution of α - and β -carotene (0.756 ± 0.052 mg g⁻¹), zeaxanthin (0.302 ± 0.009 mg g⁻¹), and violaxanthin (0.215 ± 0.018 mg g⁻¹). 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 β -carotene in this particular strain [8,52,53].

4.3.3.3. Supercritical fluid extractions

Total extracts

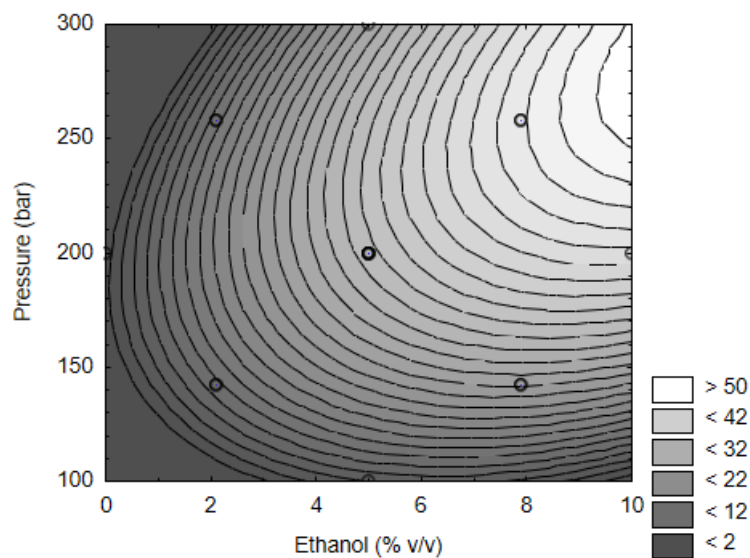
Total extract yield achieved by supercritical fluid extractions was determined gravimetrically and proved to be significantly influenced by pressure and by the amount of ethanol in the solvent (**Table 5, with pareto charts presented in Supplementary Material**). The observed behavior indicated that 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 CO₂ 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⁻¹) 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⁻¹) 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 ¹	
	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	

¹ = Total carotenoid extraction efficiency analyzed by spectrophotometry; LOF = Lack of fit



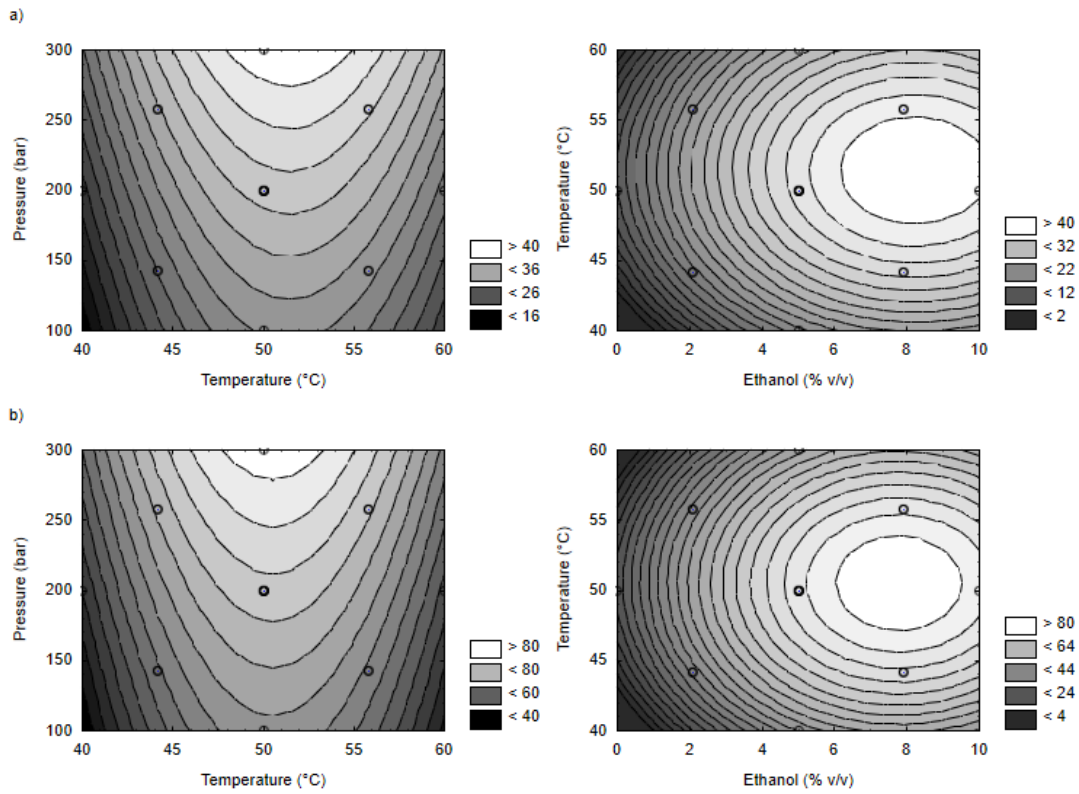
$$R = -60.925 + 6.722 \times 10^{-1} \cdot p - 1.811 \times 10^{-3} \cdot p^2 + 2.745 \cdot E - 4.780 \times 10^{-1} \cdot E^2 + 3.234 \times 10^{-2} \cdot p \cdot E$$

Figure 3: Contour plot showing total extract recovery (mg g⁻¹) as a function of extraction pressure and the amount of ethanol in the solvent (% v/v). Slice at T = 50 °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 CO₂ and ethanol is an efficient technology for the extraction of chlorophylls from microalgal biomass. Temperature ranging 50 – 52 °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 °C, 200.0 bar and pure CO₂) 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 CO₂) to $4.73 \pm 0.13 \text{ mg g}^{-1}$ (44.2 °C, 257.7 bar and 7.9 % ethanol). Importantly, when pure CO₂ (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**).



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

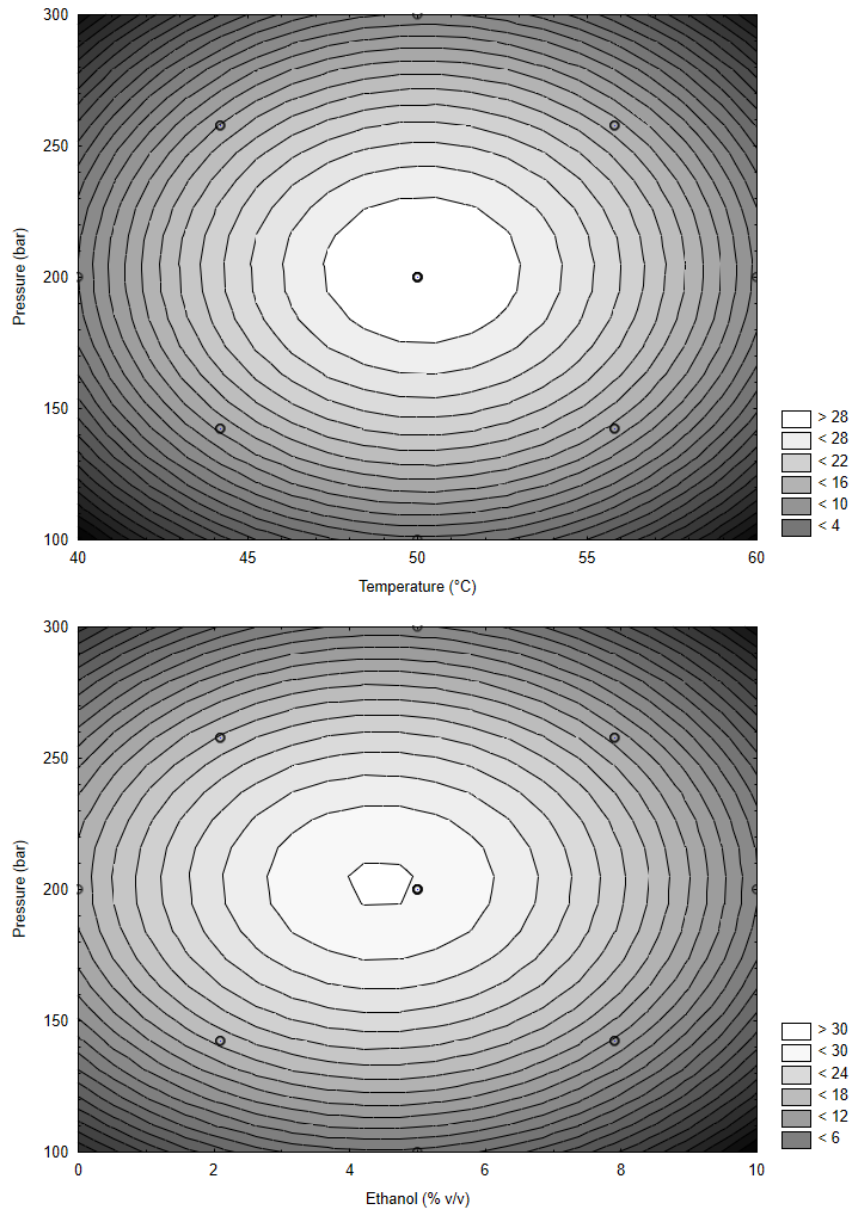
$$R(b) = -798.390 + 31.507 \cdot T - 3.118 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 1.192 \times 10^{-1} \cdot p + 18.081 \cdot E - 1.163 \cdot E^2$$

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 CO₂ 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 μm and formed well-defined spherical clusters ranging 50-200 μm 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.

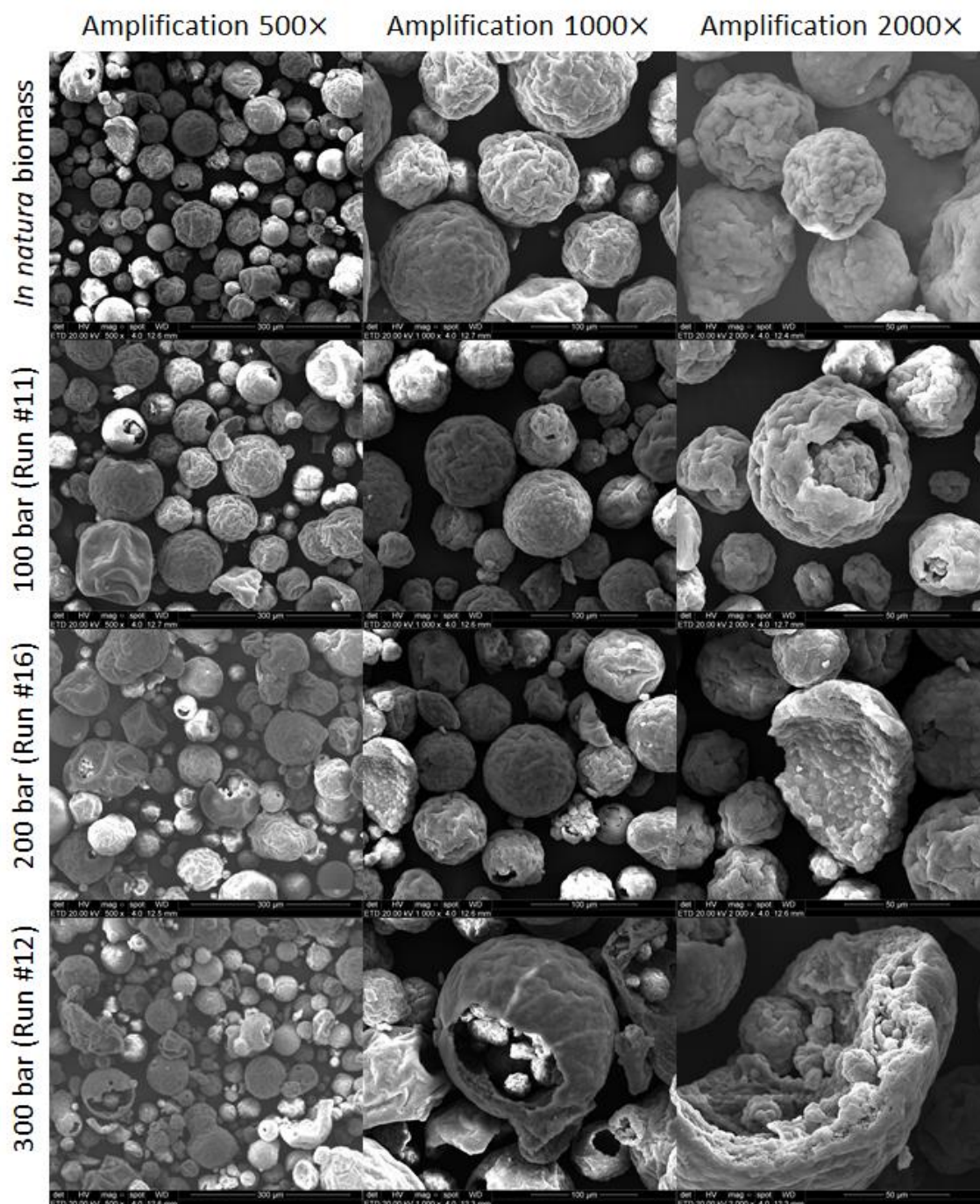


Figure 6: Images generated by scanning electron microscopy (SEM) of the *C. sorokiniana* biomass used in this work *in natura* and after extractions at 100 bar, 200 bar and 300 bar at 500×, 1,000 × and 2,000 × amplifications.

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 α - and β -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*- β -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 CO₂ 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 CO₂ as the best condition for β -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 CO₂+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 ¹	
	Effects	p-Value	Effects	p-Value	Effects	p-Value	Effects	p-Value	Effects	p-Value
<i>T</i>	-0.734	0.900	0.194	0.916	0.407	0.874	0.229	0.888	0.035	0.988
<i>T</i> ²	-35.915	0.000	-9.838	0.000	-12.622	0.000	-8.001	0.000	- 14.694	0.000
<i>P</i>	-3.793	0.521	1.895	0.315	1.001	0.697	0.874	0.591	0.715	0.770
<i>P</i> ²	-41.565	0.000	-10.397	0.000	-14.391	0.000	-9.923	0.000	- 16.364	0.000
<i>E</i>	-15.604	0.021	-1.493	0.425	-2.475	0.346	-1.663	0.317	-4.179	0.110
<i>E</i> ²	-31.933	0.000	-8.698	0.001	-11.363	0.002	-7.354	0.001	- 13.055	0.000
<i>T</i> × <i>P</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T</i> × <i>E</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P</i> × <i>E</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R</i> ²	0.882		0.828		0.814		0.829		0.866	
<i>LOF</i> <i>p</i> -value	0.149		0.326		0.746		0.754		0.106	
<i><u>Optimal extraction conditions</u></i>										
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 %	

¹ = Total carotenoid extraction efficiency analyzed by HPLC as the sum of all detected carotenoids;

LOF = Lack of fit

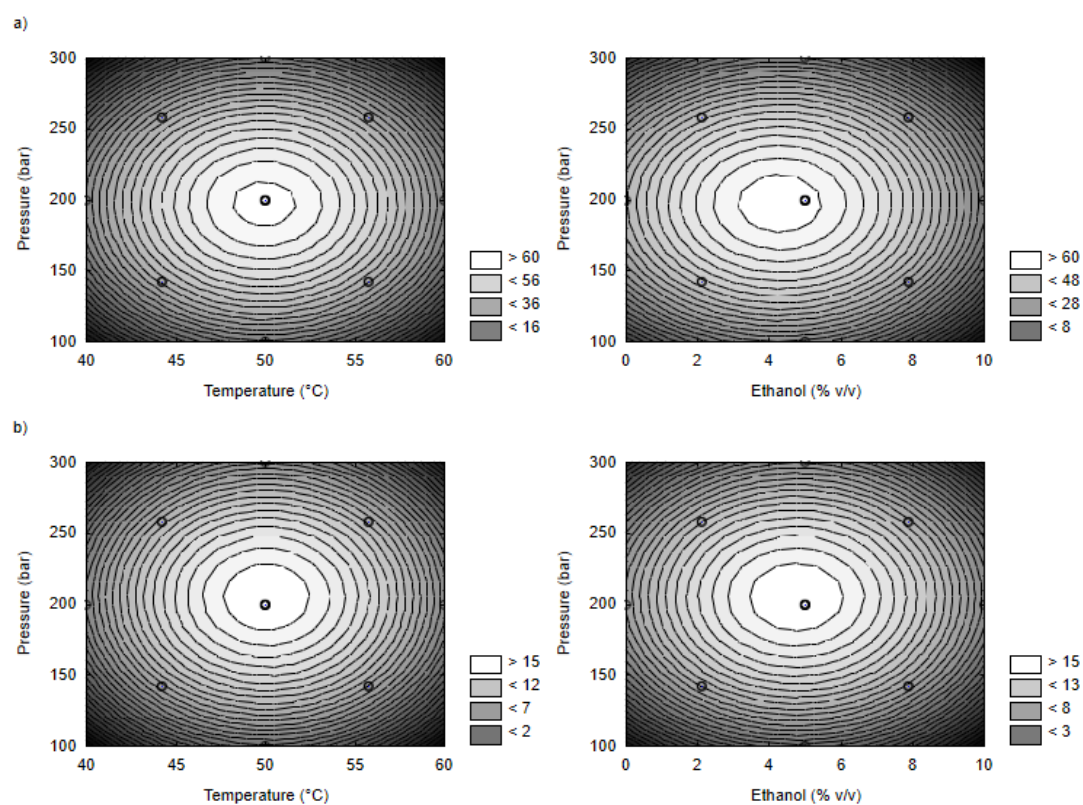


Figure 7: Contour plots showing the extraction efficiency (%) of (a) carotene and (b) lutein as a function of the extraction pressure and temperature (slice at $E = 5.0$ % v/v) and as a function of pressure and the amount of ethanol in the solvent (% v/v, slice at $T = 50^{\circ}\text{C}$). Uniform behavior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

Table 7: Fitted equations to predict carotenoid extraction efficiency.

Carotenoid	Fitted Equation
Carotene	$R = -1534.84 + 53.317 \cdot T - 5.338 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 2.464 \cdot p - 6.242 \times 10^{-3} \cdot p^2 + 16.295 \cdot E - 1.898 \cdot E^2$
Lutein	$R = -424.953 + 14.639 \cdot T - 1.462 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 6.410 \times 10^{-1} \cdot p - 1.561 \times 10^{-3} \cdot p^2 + 4.914 \cdot E - 5.171 \times 10^{-1} \cdot E^2$
Violaxanthin	$R = -547.420 + 18.795 \cdot T - 1.876 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 8.732 \times 10^{-1} \cdot p - 2.161 \times 10^{-3} \cdot p^2 + 6.329 \cdot E - 6.757 \times 10^{-1} \cdot E^2$
Zeaxanthin	$R = -352.074 + 11.912 \cdot T - 1.189 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 6.037 \times 10^{-1} \cdot p - 1.490 \times 10^{-3} \cdot p^2 + 4.085 \cdot E - 4.372 \times 10^{-1} \cdot E^2$
Total carotenoids	$R = -632.216 + 21.842 \cdot T - 2.184 \times 10^{-1} \cdot T^2 + 9.892 \times 10^{-1} \cdot p - 2.458 \times 10^{-3} \cdot p^2 + 7.041 \cdot E - 7.762 \times 10^{-1} \cdot E^2$

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 CO₂+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⁻¹ dry biomass (extraction efficiency presented in parenthesis, %).

Sample/Run	Temperature (°C)	Pressure (bar)	Ethanol (v/v %)	Solvent State	Total extract (mg dry extract g ⁻¹ dry biomass)	Chlorophyll a (mg g ⁻¹ dry biomass)	Chlorophyll b (mg g ⁻¹ dry biomass)	Total carotenoids (mg g ⁻¹ 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)	Supercritical	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)	Supercritical	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⁻¹ 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
Carotenoid profile (mg g⁻¹)^a									
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
Groups of carotenoids									
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 %)

^a 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⁻¹ dry biomass (extraction efficiency presented in parenthesis, %).

Sample/Run →	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
Carotenoid profile (mg g⁻¹)^a									
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
Groups of carotenoids									
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 %)

^a 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 β -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. Vilchez, 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 α -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. Balducchi, 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. Çalimli, Determination of optimum

- conditions for SC-(CO₂+ ethanol) extraction of β -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/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/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 CO₂ extraction in the stability of the coumarins of *Pterocaulon lorentzii* (Asteraceae), *J. CO₂ Util.* 39 (2020) 101165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101165>.
- [43] V. Pasquet, J.-R. Chérouvrier, F. Farhat, V. Thiéry, J.-M. Piot, J.-B. Bérard, 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/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 CO₂ 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/jc000104p>.
- [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 CO₂ 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, CO₂-assisted high pressure processing on inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, J. CO₂ 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 CO₂ 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 β -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis β -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. Pentead, Alterações estruturais in vivo dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do b-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 - 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 CO₂ 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

cosolvente 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.

5.1. 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 CO₂ 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 bioissorventes 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 CO₂ and flue gas-containing CO₂ 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 CO₂ 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 β -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis β -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.

IORE, 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 Gıda**, v. 9, 1 jan. 2011.

INGLEZAKIS, V. J.; GRIGOROPOULOU, H. P. Modeling of ion exchange of Pb²⁺ 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^{2+} , Ni^{2+} , and 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 CO₂ 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 α -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 CO₂ 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 β -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 CO₂ 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 CO₂. **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-(CO₂+ 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 CO₂ 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 CO₂ and N₂O. **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^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} 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.

