

NEUZA LILIANA CALVO MEROIÇO

EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *Tetrademus obliquus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra

Coorientadores: César Augusto Sodré da Silva
Marcio Arêdes Martins
Mauricio de Oliveira Leite

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M567e
2023 Meroiço, Neuza Liliana Calvo, 1979-
Extração de lipídios da microalga *Tetrademus obliquus*:
influência da extração proteica antes da extração lipídica / Neuza
Liliana Calvo Meroiço. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (56 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2023.

Referências bibliográficas: f. 41-48.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.122>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Lipídios na nutrição humana. 2. Algas. 3. Extração por
solventes. I. Coimbra, Jane Sélia dos Reis, 1962-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 612.397

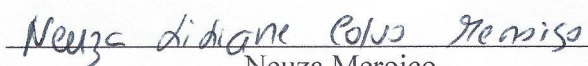
NEUZA LILIANA CALVO MEROIÇO

EXTRAÇÃO DE LÍPIDOS DA MICROALGA *Tetradismus obliquus*

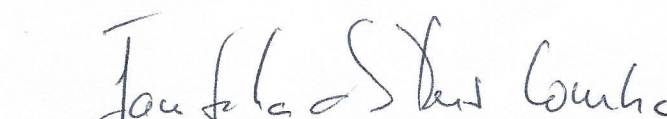
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 4 de janeiro de 2023.

Assentimento:



Neuza Meroiço
Autora



Jane Sélia dos Reis Coimbra
Orientadora

Aos meus pais, irmãos e todos que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, irmãos e todos os que deram força e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, ao Professor César A. Sodré Silva, ao Professor Márcio Arêdes Martins e ao Professor Maurício de Oliveira Leite pela orientação, confiança, paciência e ensinamentos.

Ao técnico do laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola Maurício de Oliveira Leite pela contribuição, disponibilidade e orientação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA-UFV) pelas contribuições e ensinamentos.

À professora Maria do Carmo Fontes de Oliveira e técnico de laboratório Ricardo de Brito Antonucci do Departamento de Nutrição e saúde, por toda a orientação, ajuda e disponibilidade

Aos colegas de laboratório pela convivência, respeito e ajuda perante todas as dificuldades.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desempenho e concretização deste trabalho.

Agradeço a todos vós.

RESUMO

MEROICO, Neuza Liliana Calvo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2023. **Extração de lipídios da microalga *Tetradismus obliquus***. Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Coorientadores: César Augusto Sodré da Silva, Marcio Arêdes Martins e Maurício de Oliveira Leite.

As células de microalgas são ricas em lipídios com características físico-químicas semelhantes aos óleos vegetais e apresentam-se como uma fonte alternativa para obtenção de ácidos graxos de cadeia longa para suplemento alimentar. Assim, este trabalho avaliou a extração por solvente de lipídios da biomassa microalgal de *Tetradismus obliquus*. A biomassa úmida foi liofilizada, as células da biomassa seca foram rompidas em moinho de bolas e a biomassa moída foi suspensa em água para obtenção de teores de sólidos de 5%, 10% m/v. Os lipídios foram extraídos da suspensão aquosa com dois solventes orgânicos, um solvente polar (etanol) e posteriormente um solvente apolar (hexano). A biomassa foi misturada com solvente na proporção 1:3 de biomassa:solvente, em que as proporções dos solventes foram de etanol:hexano de 1:1, 1:2 e 3:5 v/v. Também foram realizados testes com a biomassa desproteínizada para avaliar o efeito da proteína presente na extração de lipídios. A biomassa foi desproteínizada antes da extração dos lipídios com NaOH em pH 10. O maior teor de lipídios foi verificado para a proporção de solventes etanol:hexano 1:2. O menor teor de lipídios foi observado para a proporção de solventes 1:1. Na proporção de 3:5, as fases orgânica e aquosa emulsificaram devido à presença de lipoproteínas, dificultando a extração de lipídios. Nas condições estudadas, não foi observado o aumento no rendimento de extração de lipídios com o aumento do teor de sólidos ou desproteínização da biomassa.

Palavras-chave: Etanol. Hexano. Rompimento celular. Moinho de bolas. Lipoproteínas.

ABSTRACT

MEROICO, Neuza Liliana Calvo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January 2023. **Extraction of lipids from the microalgae *Tetradismus obliquus***. Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisers: César Augusto Sodré da Silva, Márcio Arêdes Martins and Maurício de Oliveira Leite.

Microalgae cells are rich in lipids with physical-chemical characteristics similar to vegetable oils and stand as an alternative source for obtaining long-chain fatty acids for food supplements. Thus, this work evaluated the solvent extraction of lipids from the microalgal biomass of *Tetradismus obliquus*. The wet biomass was freeze-dried, the cells of dried biomass were disrupted in a ball mill, and the milled biomass was suspended in water to obtain solid contents of 5% and 10% w v⁻¹. Lipids were extracted from the aqueous suspension with two organic solvents, a polar solvent (ethanol) and then an apolar solvent (hexane). The mixture of biomass:solvent in the proportion 1:3 was studied and the proportions of the solvent ethanol:hexane of 1:1, 1:2 and 3:5 v v⁻¹ were studied. Tests were also carried out with the deproteinized biomass to evaluate the effect of the protein present on lipid extraction. The biomass was deproteinized before lipid extraction with NaOH at pH 10. The highest lipid content was verified for the 1:2 ethanol:hexane ratio. The lowest content of lipids was observed for the 1:1 solvent ratio. At the 3:5 ratio, the organic and aqueous phases emulsified due to the presence of lipoproteins, thus hindering the lipid extraction process. Under the studied conditions, no increase in lipid extraction yield was observed with the increase in the solid content or biomass deproteinization.

Keywords: Ethanol. Hexane. Cell disruption. Ball mill. Lipoproteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

Quadro 1. Alguns produtos de microalgas	13
Quadro 2. Métodos de rompimento celular de microalgas e características de cada método...	15
Quadro 3. Conteúdo e produtividade de óleo de algumas espécies de microalgas	20
Quadro 4. Comparação entre as microalgas e outras fontes de óleo para fabricação de biodiesel	20

ESQUEMAS

Esquema 1. Intervenção dos carotenoides na prevenção de doenças crônicas.....	25
Esquema 2. Exemplo de reação de auto-oxidação de lipídios, tradicionalmente descrito como uma reação em cadeia.....	26

FIGURAS

Figura 1. Fluxograma representativo do processamento da biomassa seguida de liofilização.	49
Figura 2. Processo de destilação usado na caracterização de proteínas.	49
Figura 3. Cadinhos colocados na mufla na caracterização de cinzas.	49
Figura 4. Fluxograma representativo do método de Folch associado à hidrólise ácida	50
Figura 5. Fluxograma representativo da extração de proteínas	51
Figura 6. Fluxograma representativo do processo extrativo de lipídios.....	52
Figura 7. Tubo de Falcon após a centrifugação na extração lipídica (diferenciação de fases).....	53
Figura 8. Espectros de Infravermelho (FT-IR) da biomassa de microalgas <i>Tetrademus obliquus</i> rompida e não rompida, usada neste trabalho.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados experimentais obtidos na composição centesimal da microalga liofilizada <i>Tetrademus obliquus</i>	54
Tabela 2. Resultados obtidos durante a extração de lipídios contendo diferentes concentrações de biomassa e utilizando a proporção de solventes 1:2 (etanol:hexano).....	54
Tabela 3. Teor de proteína na biomassa residual após extração de lipídios.....	54
Tabela 4. Influência da desproteínização da biomassa na extração de lipídios em diferentes proporções de sólidos e diferentes proporções de solventes	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Microalgas e suas aplicações.....	12
2.2. Cultivo de microalgas.....	14
2.3. Ruptura celular das microalgas	14
2.4. Lipídios das microalgas.....	15
2.5. Extração de lipídios de microalgas por solventes orgânicos.....	17
2.6. Biomassa de microalgas marinhas com elevada umidade – uma avaliação positiva para extração eficiente de lipídios	18
2.7. Microalgas como matéria-prima na produção de biodiesel	19
2.7.1. Secagem e extração do óleo.....	20
2.8. Atividade antimicrobiana dos compostos de microalgas	22
2.9. Atividade antioxidante dos compostos de microalgas	24
3. OBJETIVO	28
3.1. Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Métodos experimentais	29
4.2. Reagentes e equipamentos	29
4.3. Processamento inicial da biomassa da microalga <i>Tetrademus obliquus</i>	30
4.4. Caracterização da biomassa liofilizada, antes e após o rompimento celular	30
4.4.1. Quantificação de lipídios.....	30
4.5. Extração de lipídios por solventes orgânicos da biomassa rompida e reidratada.....	31
4.6. Rompimento de células da biomassa com moinho de bolas	32
4.7. Teor de sólidos da biomassa	32
4.8. Desproteínização da biomassa.....	32

4.9. Metodologia de Análise de Infravermelho – FTIR.....	33
4.10. Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Composição aproximada da biomassa de microalgas em diferentes estágios do processo	35
5.2. Extração de lipídios	38
5.3. Análise de Infravermelho.....	38
6. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE A - Figuras referentes à execução experimental	49
APÊNDICE B - Resultados experimentais.....	54

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos capazes de fotossíntese usando dióxido de carbono e luz solar. As microalgas representam uma fonte de energia renovável com perspectivas promissoras que podem fornecer diversos bioprodutos e substâncias de valor econômico para aplicações em diferentes campos tecnológicos. Biocompostos derivados de microalgas incluem proteínas, pigmentos, polissacarídeos e lipídios. Os lipídios de microalgas consistem em glicerol ou bases esterificadas de ácidos graxos e podem ser saturados ou insaturados (NEOFOTIS et al., 2016). No grupo dos lipídios, estão presentes os lipídios neutros (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres) e os polares (fosfolipídios e glicolipídios). As células de microalgas são ricas em ácidos graxos com alto teor lipídico, apresentando cadeias entre 14-22 (GUNSTONE et al., 2007) carbonos e características físico-químicas semelhantes ao óleo produzido por óleos vegetais. Alguns ácidos graxos das famílias ômega-3 e ômega-6 fazem parte dos ácidos graxos encontrados em microalgas e são de interesse para a nutrição humana. Os ácidos graxos de cadeia mais longa presentes nestas microalgas podem ser utilizados como suplementos alimentares e em aplicações farmacêuticas ou terapêuticas (WONG et al., 2022). O cultivo pode ocorrer sob condições estressantes para aumentar a produção de bioprodutos de microalgas (LIANG et al., 2018). O estresse nutricional com privação de suplementação de fósforo, nitrogênio e ferro aumenta o acúmulo de lipídios em muitas espécies de microalgas, o que altera vários tipos de propriedades e usos associados. Os lipídios produzidos pelas microalgas são usados na produção de biocombustíveis, alimentos ou rações, produtos farmacêuticos, cosméticos, biofilmes, biorremediação e biofertilizantes de solo (AMORIM et al., 2021). Assim, este trabalho teve como objetivo otimizar a extração de lipídios da espécie microalgal *Tetrademus obliquus*. A parede celular da microalga foi rompida usando um moinho de bolas para obter alta recuperação de lipídios. Para beneficiar a extração de lipídios, as seguintes variáveis de processo foram avaliadas: o teor de sólidos das suspensões de biomassa reidratadas, as proporções de solventes e a presença ou ausência de proteínas durante a extração de lipídios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microalgas e suas aplicações

Microalgas são elementos de um grupo muito heterogêneo de organismos, estão naturalmente presentes em diferentes ambientes aquáticos/úmidos, incluindo água salgada, doce ou salobra, (rios, lagos, oceanos e solos). São organismos com dois tipos de estrutura celular: procariontes ou eucariontes, que podem formar colônias, com pouca ou nenhuma diferenciação celular além de serem dotados de pigmentos, responsáveis por coloração variada e por metabolismo fotoautotrófico.

As algas viabilizam cerca de metade do O_2 no planeta, consumindo grande percentagem do CO_2 , o que limita a poluição atmosférica (CHAPMAN, 2013).

O ecossistema terrestre possui dois tipos de algas: as microalgas e as macroalgas. As microalgas são unicelulares e microscópicas; as algas, ou macroalgas, são macroscópicas e podem ser multicelulares. Noutro conjunto de seres procariontes, existem as cianobactérias que em termos evolutivos se encontra mais próximo das bactérias do que das algas (LEE et al, 1998). Grande parte das microalgas têm coloração verde porque contém clorofila, um fotorreceptor da energia da luz que permite a fotossíntese. Também existem microalgas com coloração marrom ou vermelha, porque contêm xantofilas, pigmentos que escondem a cor verde (LEE et al, 1998). As espécies de microalgas são classificadas com base em diversos critérios como natureza química de seus produtos, tipos de pigmentos presentes na espécie, estrutura dos cloroplastos, composição química e estrutura de sua parede celular, estrutura de seus flagelos, e em outras características, ditas especiais (METTING JR, 1996). Entre as características especiais, destacam-se: a capacidade de cultivo em águas salgadas, doces e salobras e em terrenos não utilizados para culturas alimentares (HU et al, 2008); a capacidade de tratamento de efluentes (PARK et al, 2011); altas taxas de produtividade de hidratos de carbono por unidade de área (CHEN et al, 2013) e de lipídios por unidade de área (CHISTI, 2007); capacidade de captura de CO_2 com produção de O_2 , decorrentes da eficiência fotossintética e de maiores taxas de crescimento (SHENK et al, 2008); oportunidade de aproveitamento dos produtos secundários, como pigmentos e proteínas (HU et al, 2008); possibilidade de colheita diária (HU et al, 2008); sem necessidade do uso de pesticidas e herbicidas na cultura (SINGH E AHLUWALIA, 2013); e facilidade de manipulação (GOUVEIA, 2011).

Neste contexto, as microalgas possibilitam a obtenção de bioprodutos usados nos segmentos de alimentos (dietéticos, funcionais ou nutracêuticos como ácidos graxos

polinsaturados, antioxidantes, carotenoides, polissacarídeos, vitaminas, minerais, fitoesteróis ou outros suplementos alimentares), medicina, cosméticos, química fina, biomateriais, agricultura (preservação de solos para a área agrícola e biofertilização), aquacultura, tratamento de efluentes domésticos e industriais (biossorção de metais pesados), fixação de CO₂ (evitando o problema do efeito estufa) e bioenergia (GOUVEIA et al 2009; GOUVEIA, 2011; MARQUES, 2013).

A espécie de microalga *Tetrademus obliquus*, do gênero *Tetrademus sp.* e classe Chlorophyceas, será utilizada no presente trabalho. A *Tetrademus sp.* é um gênero de microalga aquática, dominante em lagos de água doce e rios, pertencem ao grupo das algas verdes (AN et al., 1999). O quadro 1, expõe alguns produtos obtidos de microalgas.

Quadro 1. Alguns produtos de microalgas

	Produtos	Aplicações
Biomassa	Biomassa	Alimentos naturais “health food” Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aquicultura Condicionador do solo
Corantes e antioxidantes	Xantofilas (astoxantina e cantaxantina) Luteína Beta-caroteno Vitamina C e E	Aditivos Alimentares
Ácidos graxos	Ácido Araquidônico – ARA Ácido eicosapentaenóico-EPA Ácido docosaheptaenóico-DHA Ácido gama-linolênico-GCA Ácido linoléico-LA	Cosméticos Aditivos Alimentares
Enzimas	Superóxido dismutase-SOD Fosfoglicerato quinase-PGK Luciferase e Luciferina Enzimas de restrição	
Polímeros	Polissacarídeos Amido Ácido poli-beta-hidroxibutirico - PHB Peptídeos	Alimentos naturais
Isótopos	Toxinas Isótopos Aminoácidos (prolina, arginina, ácido aspártico) Esteróis	Pesquisa Medicina Pesquisa Medicina

Fonte: Adaptado de BARBOSA (2003)

2.2. Cultivo de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em áreas fechadas ou abertas, com luz natural ou artificial, em água doce, salgada, águas salobras ou residuais, em terras não aráveis, onde elas se adaptam às diversas condições de cultivo, com reprodução e crescimento rápido. As colheitas podem ser realizadas em ciclos semanais durante todo o ano. O tempo de cultivo das microalgas é menor comparado com as plantações de grãos.

Nos sistemas abertos, o cultivo é realizado em lagoas naturais ou artificiais. Os sistemas abertos têm como vantagem a utilização da luz solar e podem expandir-se por grandes áreas. Nos sistemas fechados, assim como os fotobiorreatores, o cultivo pode ser realizado tendo o controle de todos os parâmetros essenciais para o rápido crescimento da biomassa microalgal (temperatura, iluminação, incluindo fotoperíodo, injeção ou não de CO₂, agitação, meio reacional com nutrientes) (FERREIRA et al, 2013; KWIETNIEWSKA et al, 2012; LOURENÇO, 2006).

As vantagens e desvantagens da utilização dos diferentes tipos de sistemas de cultivo devem ser avaliadas ao estipular o tipo de microalga a ser cultivado e os produtos que se deseja obter a partir de sua biomassa. Após o cultivo, ocorre a separação da biomassa do meio de cultivo e o pré-tratamentos da biomassa, como lavagem e concentração. Para a liberação dos compostos de interesse é necessário romper as paredes das células das microalgas.

2.3. Ruptura celular das microalgas

A ruptura da parede celular das microalgas é indispensável para a liberação dos metabólitos celulares de interesse e conseqüentemente permitir a sua extração. A parede celular é uma barreira física entre o solvente extrator e os biocompostos que se pretende extrair.

As composições químicas e estruturais das paredes celulares das microalgas variam de espécie para espécie. Grande parte das paredes celulares são compostas por estruturas com três camadas formadas por ácido urônico, celulose, manose, proteína e xilana. Também podem ser compostas por estruturas com três camadas compostas por glicoproteínas e alginato (LEE et al, 1998).

Processos mecânicos e não mecânicos (físicos, químicos e enzimáticos) são realizados visando a ruptura da parede celular e podem ser aplicados à biomassa de forma individual ou em conjunto (LEE et al., 2012). Há vários critérios a serem observados para a escolha do melhor processo a se aplicar, como custo da operação unitária, facilidade de aumento de escala,

possibilidade de dano ao produto/perda da atividade biológica, possibilidade e custo do agente químico (sobretudo enzima), tipo de organismo e rendimento. O quadro 2 expõe algumas características dos principais métodos de ruptura celular.

Quadro 2. Métodos de rompimento celular de microalgas e características de cada método

Método de ruptura celular	Caraterísticas dos métodos	Referências
Homogeneizador de alta pressão	<ul style="list-style-type: none"> Técnica com potencial de aplicação industrial devido: à escalabilidade, aplicabilidade em lamas algais altamente concentradas e eficácia na desagregação de espécies de microalgas de parede celular rígida. Aumento indesejável de temperatura para extratos sensíveis ao calor (enzimas, lipídios, pigmentos e proteínas); Alto consumo de energia. 	(LEE et al., 2012)
Ultrassom	<ul style="list-style-type: none"> Técnica realizada em banho e sonda ultrassônica. Através de fenômeno da cavitação, os efeitos causados pelas ondas ultrassônicas criam um ciclo de bolhas de gás e cavidades no solvente líquido. A cavitação aliada ao calor liberado no colapso das bolhas aumenta a solubilidade dos compostos e a eficiência da extração 	(VARDANEGA et al., 2014 CAVALHEIRO, 2013)
Agitação em moinho de bolas	<ul style="list-style-type: none"> Método simples e efetivo para o rompimento de paredes celulares mais rígidas. Operação unitária capaz de processar grande volume de biomassa por batelada e facilidade na separação da biomassa rompida por gravidade. Há moinho de bolas que possuem sistema de refrigeração ou controle de temperatura. A elevação de temperatura ocorre ligeiramente em razão do atrito e poderá aumentar dependendo do tempo de moagem. 	(D'HONDT et al., 2017)

Fonte: Próprio autor (2021).

2.4. Lipídios das microalgas

Os lipídios representam o conjunto de compostos químicos que ao contrário da maioria dos compostos orgânicos, não são caracterizados por um grupo funcional em comum, mas pela baixa solubilidade em água e pelo grau de solubilidade em solventes orgânicos (MARQUES, 2013).

De acordo com Salam, Velasquez-Orta e Harvey (2016), os lipídios são macromoléculas, classificadas como lipídios neutros ou apolares (simples), polares (compostos) e derivados. Na classe dos lipídios neutros, há duas subdivisões: as gorduras ou

óleos que são ésteres de ácidos graxos com gliceróis, também conhecidos como glicerídeo; e as ceras que são ésteres de ácidos graxos com álcoois de cadeia longa.

Os lipídios compostos têm um grupo éster ligado ao ácido graxo e apresentam outros grupos químicos, como por exemplo os fosfolipídios que são ésteres formados a partir de ácidos graxos, glicerol, ácido fosfórico e outros grupos usualmente nitrogenados.

Os lipídios derivados são adquiridos através da hidrólise dos lipídios apolares e compostos que apresentam propriedades de lipídios, como os hidrocarbonetos de cadeia longa, esteróis, vitaminas lipossolúveis e carotenoides (PRATOOMYOT et al, 2005).

Os triacilgliceróis (lipídios neutros) podem ser encontrados como produto de armazenamento energético de microalgas e os glicolipídios (lipídios compostos) são estruturas presentes na parede celular (KOLLER et al, 2014). Uma pequena quantidade de triglicerídeos é verificada na fase ótima de crescimento das microalgas, uma vez que a maioria dos recursos são utilizados para o crescimento celular. Mas as microalgas podem acumular uma quantidade significativa de triglicerídeos no período da estimulação ao estresse celular (RODOLFI et al., 2009).

De acordo com Fernandez et al. (2000), o conteúdo de ácidos graxos difere conforme a espécie da microalga. Isso ocasiona microalgas com diferentes conteúdos de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. Apesar da grande variedade na constituição dos ácidos graxos das microalgas há um predomínio em ácidos graxos insaturados como o palmitoleico, oleico, linoleico e linolênico. Segundo Knothe et al. (2003), há utilidade de ácidos graxos monoinsaturados para a produção de biodiesel, em produtos medicinais e produtos alimentares devido à sua menor estabilidade oxidativa. Os ácidos graxos saturados, como o palmítico e o esteárico são encontrados em menor quantidade (KNOTHE et al, 2003).

A produtividade de lipídios de microalgas e as respectivas composições em ácidos graxos está associada ao seu perfil genético e às condições de cultivo (HU et al, 2008). Assim, muitas pesquisas nesta área são direcionadas para a identificação e caracterização de espécies de microalgas com altas taxas de produção de lipídios e para a avaliação dos fatores ambientais que influenciam a sua produção.

Geralmente, quando as microalgas são cultivadas em um meio ideal de crescimento, grande parte dos ácidos graxos sintetizados são utilizados na formação de fosfolipídios e glicolipídios para as estruturas das membranas celulares (HU et al, 2008). A cultura deve ser mantida em stress nutricional (carência sobretudo de nitrogênio), de temperatura, luminosidade (intensidade e frequência da radiação incidente), de concentração de O₂, de CO₂, de salinidade e de pH visando direcionar para o aumento do teor de glicerídeos (CHISTI, 2007).

HU et al. (2008) constataram que o teor total de lipídios de uma microalga verde mantida em condições de stress aumentou de 26% para 46% do seu peso seco, essencialmente à custa da síntese adicional de glicerídeos. Contudo, embora haja aumento do conteúdo de glicerídeos, a imposição de stress sobre as células pode não se traduzir numa maior taxa de produtividade de lipídios, uma vez que o aumento é feito em detrimento do crescimento e da divisão celular (HALIM et al, 2012). Os resultados de Rodolfi et al. (2009) são um exemplo desse efeito.

Os lipídios de microalgas podem ser separados da biomassa por diferentes técnicas de extração. Há inúmeros métodos utilizados para a extração de lipídios: uso de água subcrítica; uso de diferença de potencial elétrico; uso de pulso eletromagnético; uso de fluído supercrítico; e extração via solventes orgânicos, que pode ser assistido por ultrassom ou por micro-ondas. Cada método referido pode apresentar vantagens e desvantagens. Alguns necessitam de alto investimento em equipamentos, manutenção e elevado consumo de energia (DU et al, 2015). No presente trabalho será usada a extração com solventes orgânicos.

2.5. Extração de lipídios de microalgas por solventes orgânicos

Os lipídios de microalgas podem ser separados da biomassa por meio de técnicas analíticas e preparativas de extrações com solventes orgânicos (apróticos e próticos), podendo citar as metodologias mais empregadas de metodologias Folch (1957), Bligh e Dyer (1957) e o uso dos solventes hexano:etanol.

A metodologia de extração inclui uma mistura binária entre um solvente polar (prótico) e apolar (aprótico) gerando duas fases: uma fase orgânica com lipídios totais e a outra fase aquosa com proteínas, carboidratos, etc. A técnica de extração com solventes fundamenta-se no uso de um solvente apolar para extrair os lipídios neutros e esterificáveis e num álcool moderadamente polar para os lipídios polares (SIERRA, 2018). Nesta metodologia, podem ser utilizados como solventes apolares:polares: o clorofórmio:metanol e o hexano:etanol.

A adição de um solvente não polar a um solvente polar permite maior facilidade da extração de lipídios neutros havendo também a extração dos lipídios polares (HALIM et al, 2012; SANTOS et al, 2015).

Conforme Sierra (2018), a mistura de solventes clorofórmio:metanol apresenta na sua estrutura química afinidade mais elevada por lipídios não polares ou neutros (acilgliceróis). É uma combinação que produz efeitos adversos na saúde humana e no meio ambiente. A mistura de solventes hexano:etanol também exhibe um bom rendimento na extração lipídica e é menos prejudicial ao homem e meio ambiente que a mistura clorofórmio:metanol.

A remoção da biomassa residual é feita após a extração de lipídios, utilizando-se um meio de separação sólido-líquido, como a centrifugação. Após a centrifugação haverá a formação de duas fases:

- A fase orgânica (predomínio do solvente apolar), enriquecida nos lipídios neutros e polares;
- A fase aquosa (permanência de água e solvente polar), enriquecida nos compostos não lipídicos, tais como proteínas e carboidratos.

A separação das duas fases permite a remoção da água residual e dos contaminantes não lipídicos da mistura de solventes orgânicos e lipídios. A fase orgânica coletada é evaporada, restando os lipídios brutos secos.

2.6. Biomassa de microalgas marinhas com elevada umidade – uma avaliação positiva para extração eficiente de lipídios

Através da biomassa de microalgas são fornecidos diferentes produtos e substâncias que têm diferentes aplicações e em diferentes campos tecnológicos. As microalgas são fontes prometedoras de energia renovável.

O campo energético, é um campo de elevada importância, obtendo-se matéria-prima para gerar biocombustíveis, como bioetanol e biodiesel. Não existe concorrência com fontes alimentares, tais como o milho ou a soja, possuindo um elevado rendimento por hectare. Convertem 3 a 8% da energia solar em biomassa, no entanto, as culturas terrestres rendem em média, apenas 0,5%.

A sua elevada produtividade, ajustada com a não concorrência com culturas alimentares e a capacidade de utilização do CO₂ industrial com função de combustível de crescimento, conferem às microalgas o potencial de fonte alternativa de biodiesel e outras substâncias consideráveis (LIU; SONG; QIU, 2017).

É explícita a influência do teor de umidade da biomassa de microalgas na capacidade de extração de lipídios via solventes. Consideraram-se diferentes espécies de microalgas marinhas: *Nannochloropsis gaditana*, *Dunaliella salina* e *Chlorella minutissima*, nas três percentagens de hidratação (64, 72 e 80%), havendo como referência de controle a extração de biomassa desidratada (ZORN et al. 2017) (ZORN, 2017).

Cultivar microalgas separadamente por efeito de meio f/2 de Guillard, dióxido de carbono ambiental e luz fluorescente em reatores tubulares de 40 L tipo coluna de bolhas em sistema descontínuo. Ajustando o teor de umidade das biomassas colhidas, para um nível

requisitado e extrair os lipídios totais por meio de solventes clorofórmio:metanol, utilizando o ultrassom como auxiliar no processo (ZORN et al. 2017), obtiveram-se resultados que justificam o uso de biomassa com 64% de umidade para maior eficiência na extração de lipídica, comparando com as restantes percentagens de umidade utilizadas, incluindo os valores obtidos pela biomassa liofilizada.

Nessas circunstâncias observou-se um equilíbrio entre a fase orgânica e a fase aquosa, simplificando a retenção e migração dos lipídios para a camada orgânica (ZORN et al. 2017).

A espécie *N. gaditana* mostra óleos ricos em ácidos graxos saturados e monossaturados sendo adequado para a produção de biocombustíveis, já a *D. salina* possui óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados e o óleo de *C. minutíssima* fornece composição favorável tanto para obtenção de ácidos graxos essenciais como para biocombustível (ZORN et al. 2017).

Perante este trabalho demonstrou-se que a extração de lipídios é possível com biomassa com elevada percentagem de umidade, proporcionando um melhor rendimento em lipídios extraídos, originando economia de energia da ordem de 89% do total de energia consumida no processo de biomassa e economia de tempo do processo (ZORN et al. 2017).

2.7. Microalgas como matéria-prima na produção de biodiesel

A grande preocupação ambiental tem aumentado a busca por combustíveis renováveis. O biodiesel apresenta vantagens a considerar, como a alta densidade energética e a permissão para substituir o diesel. Embora o biodiesel seja altamente vantajoso, a sua produção é muito dispendiosa devido, essencialmente, à matéria-prima. Nesse contexto, as microalgas solucionam essa condição, tendo como vantagem a alta taxa de crescimento, maior absorção de gás carbônico, acumulação de lipídios, não competição com culturas alimentícias por terras aráveis e capacidade de uso no tratamento de efluentes. Assim sendo, a presente revisão refere vantagens e desafios da utilização de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel, assim como as etapas das tecnologias de produção disponíveis em grande escala e os avanços futuros.

Quadro 3. Conteúdo e produtividade de óleo de algumas espécies de microalgas

Espécie de microalgas	Conteúdo de óleo por % da matéria seca	Produtividade de óleo (mgL ⁻¹ d ⁻¹)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22-30	84-142
<i>Chorella vulgaris</i>	5-50	-
<i>Dunaliella salina</i>	14-20	116
<i>Neochoris oleoabundans</i>	35-65	90-134
<i>Chlorella Sorokiniana</i>	19-22	45
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18-57	45
<i>Spirulina máxima</i>	4-9	-
<i>Chorococcum sp.</i>	19	54
<i>Chlorella protothecoides</i>	23-55	1214

Fonte: Mata *et al.* (2010)

Quadro 4. Comparação entre as microalgas e outras fontes de óleo para fabricação de biodiesel

Fonte de Óleo	Conteúdo de Óleo por % matéria seca	Produção de Óleo (L óleo ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Uso da terra (m ² kg biodiesel ⁻¹ ano ⁻¹)	Produtividade biodiesel (kg biodiesel ha ⁻¹ ano ⁻¹)
Milho	44	172	66	152
Cânhamo	33	363	31	321
Soja	18	636	18	562
Pinhão-Manso	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Canola	41	974	12	862
Girassol	40	1070	11	946
Mamona	48	1307	9	1156
Óleo de Palma	36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58700	0,2	51927
Microalga (médio teor de óleo)	50	97800	0,1	86515
Microalga (alto teor de óleo)	70	136900	0,1	121104

Fonte: Mata *et al.* (2010)

2.7.1. Secagem e extração do óleo

Depois da colheita, dá-se o processo de secagem das microalgas. Perante Lam e Lee (2012), a falta de umidade é importante para os processos de extração do óleo e transesterificação. Para o uso de um método mais simples e com menor custo, a secagem ao sol é o mais apropriado, embora exija grandes áreas de secagem, seja muito lento e proporcione perdas de material durante o processo (LAM e LEE, 2012).

O processo de secagem é impraticável em países de clima temperado. De acordo com Sander e Muthy (2010), o fato desses países terem temperaturas baixas, proporciona gastos de

combustível de forma a possibilitar a secagem, o que não compensa o uso de biodiesel. Possivelmente inviabiliza sua produção comercial.

Nesses casos, é indispensável o aperfeiçoamento de tecnologias de secagem ou o aperfeiçoamento de processos de extração e transesterificação que sejam mais resistentes à presença de água (LAM e LEE, 2012). Existem outros processos de secagem, tal como, a secagem em prateleiras e a liofilização, embora muito dispendiosos e não aplicáveis em larga escala. Devido a essa razão são viáveis, apenas, para produtos de alto valor agregado (GRIMA et al, 2003).

A extração de óleo de microalgas pode ser feita através de processos químicos, físicos, da combinação dos dois, com fluido supercrítico ou com enzimas. Segundo, Ferreira (2021), para que se extraia somente a fração desejada, o método usado desse ser o mais específico e seletivo possível.

Os autores explicam que existem diversos tipos de lipídios produzidos pelas microalgas. Assim como, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, glicolipídios e fosfolipídios, além de existirem outros componentes não lipídicos, proteínas, polissacarídeos e pigmentos. No entanto, de todos eles apenas os triacilgliceróis podem, mais facilmente, ser convertidos em biodiesel pelo processo de transesterificação. Este é o processo mais usado atualmente, em escala comercial. Outra hipótese seria a extração não seletiva e a empregabilidade dessas outras substâncias na indústria farmacêutica e alimentar, o que reduziria os custos de produção do biodiesel (FRANCO et al., 2013).

Existem processos mecânicos de extração, rompendo a parede celular das células. O que provoca a liberação do óleo (KIM et al., 2013). Perante Rashid et al. (2014), são usados vários métodos mecânicos. Cada um deles com vantagens e desvantagens. A eficácia obtida está associada à espécie de microalga em questão e existem melhores resultados quando se associa métodos mecânicos a processos químicos (RASHID et al., 2014).

Greenwell et al. (2010) esclarecem que na prensagem mecânica são usadas altas pressões de forma a existir o rompimento celular. Perante os autores a vantagem dos métodos mais comuns em relação aos restantes processos mecânicos, é a conservação das características químicas das substâncias presentes no interior da biomassa microalgal e a redução de riscos de contaminação da mesma. Existe outra técnica mecânica onde são usadas ondas de alta frequência que originam calor, microbolhas e ondas de choque que podem romper as paredes celulares das microalgas. Este método não deve ser usado em todas as espécies microalgais, além de consumir mais energia, o que dificulta sua aplicação em larga escala (RASHID et al., 2014). O método de pressão osmótica proporciona rompimento celular devido à redução

imediate da pressão osmótica. Este é um processo com menos custos, mas não tem capacidade de romper todas as células (FRANCO et al., 2013). Nos processos químicos utilizam-se solventes orgânicos e os mais utilizados são o hexano, clorofórmio, benzeno, etanol, ácidos e álcalis (RASHID et al., 2014). De acordo com os autores, para aumentar a eficiência do processo é necessário que o solvente penetre na totalidade na biomassa e contate com os lipídios. Além disso, deve haver insolubilidade do solvente em água, dissolvendo a substância que se pretende extrair, deve ter baixo ponto de ebulição e deve ter densidade bastante diferente da água, para que seja fácil a separação do solvente e do óleo após o processo de extração.

A extração com biomassa seca torna-se mais eficaz, uma vez que na presença de umidade há a redução da interação entre a biomassa e as moléculas de solvente (HALIM et al., 2012). A secagem tem elevados custos, dificultando economicamente a extração com biomassa seca. Perante Kim et al. (2013), existe uma elevada eficácia obtida com extração química, mas existem algumas desvantagens, tais como a necessidade de grandes quantidades de solvente para baixas concentrações de biomassa, elevados custos relativos à recuperação do solvente usado e a obtenção de grande quantidade de resíduos. Além do mais, o solvente utilizado pode transformar a composição da substância extraída.

2.8. Atividade antimicrobiana dos compostos de microalgas

Os antimicrobianos naturais são elementos produzidos por diferentes espécies (bactérias, vegetais, microalgas e fungos) que atuam com organismos pluri ou unicelulares, sendo capazes de causar a inibição do metabolismo celular dos microrganismos ou causar morte, tal como, inibir a sua reprodução deixando que o sistema imunológico do organismo hospedeiro consiga derrotar com mais influência a infecção (HECK, 2007; MATOS, 2015).

Alexander Fleming, em 1928, apresentou um antibiótico natural originado por um fungo (bolor presente no pão) que dificultou o crescimento de uma cultura de *Staphylococcus*. Fleming designou o fungo de penicilina, uma vez que o fungo que gerou a nova substância se designava por *Penicillium chrysogenum*.

A sua eficácia foi comprovada em 1941, na sua baixa toxicidade e na terapêutica humana. Foi o primeiro antibiótico a ser comercializado (HECK, 2007; MATOS, 2015).

Devido à eficácia do uso terapêutico de substâncias antimicrobianas naturais, gerou-se o incentivo científico, na busca de novas fontes desses compostos. Entre os quais, Selman Walksman, o chefe de um agregado de cientistas da Universidade de Rutgers, em Nova Jersey, EUA, que aprofundou o estudo de microrganismos de solo, particularmente os actinomicetos.

Em 1940 descobriu a actinomicina e em 1942 a estreptotricina. Ambos tóxicos para seres humanos. No entanto, em 1943 foi descoberta, por esse mesmo grupo, a estreptomomicina que revolucionou toda a terapêutica anti-infecciosa devido à sua ação contra bacilos gram negativos e acima de tudo contra *Mycobacterium tuberculosis* desencadeando a cura da tuberculose (CHAMBERS, 2003; HECK, 2007).

Presentemente, é imenso o número de pesquisas relativamente à extração e identificação de compostos com ação antifúngica e antibacterianos oriundos de diferentes fontes. Tais como microalgas, uma vez que os antibióticos tradicionais estão a decrescer sua eficácia devido à maior resistência dos agentes infecciosos.

Os compostos mencionados, podem ser metabólitos secundários tais como os antioxidantes, originados naturalmente pela célula ou podem ser de proveniência proteica (Como as enzimas, peptídeos e proteínas). Existem agentes antifúngicos usados para tratamento de pragas que afetam culturas agrícolas ou plantas domésticas, assim como a majusculamida C. Um agente de despolimerização de filamentos, extraídos de *Lyngbya majuscula* que demonstrou forte atividade fúngica (BATTAH et al., 2014).

Foram efetuados estudos com peptídeos cíclicos isolados da cianobactéria *Tolypotrix byssoides*. Esses estudos tiveram ação na inibição de crescimento da *Candida albicans*, levedura patógena de humanos.

Outros compostos, também foram observados por Ozdemir et al. (2004), com ação antifúngica, nesta mesma microalga, porém de natureza fenólica (JAKI et al., 2001; BATTAH et al., 2014). Três espécies de Oscillatoria, foram isoladas por Shanab (2012): *O. hamellii*, *O. plantensis* e *O. Rubescens*. Nos seus estudos foi diagnosticado que todas apresentavam eficácia contra o fungo *Aspergillus flavus* e a *C. albicans*. Foram testadas outras espécies de cianobactérias por Abedin e Taha (2008) como a *Spirulina Plantensis*, *Tolipotrix ceytonica* e *Anabaena oryza* quanto ao poder de impossibilitar a expansão de fungos geradores de doenças em humanos e plantas. Foram testados diversos microrganismos: *Penicillium herquei*, *Alternaria brassicae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium sp.* e *Candida albicans*. Foi descoberto que a *Anabaena Oryza* e a *Spirulina plantensise* tinham muita eficácia na atividade antifúngica para com todos os fungos analisados (BATTAH et al., 2014). Foi avaliado, por Battah et al. (2014), o aparecimento de agentes com atuação antifúngica no extrato de *Spirulina máxima*. Verificou-se que o extrato teve eficácia contra *Rhizoctonia solani* (20%), contra *Fusarium solani* (65%) e contra *Penicillium oxalicum* (91%) comparando com drogas antifúngicas experimentadas e aplicadas como controle. Houve uma avaliação feita por Medina-Jaritz et al. (2011) que estimou

a atividade antimicrobiana com diferentes concentrações do extrato metanólico e aquoso de *Artospira máxima*, experimentados utilizando a técnica de disco difusão contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*. Todos os extratos aquosos exprimem atividade contra os diversos organismos testados. Para *Bacillus subtilis* o extrato metanólico mostrou atividade antimicrobiana contra todos os testados exceto os extratos aquosos.

Muitas frações ativas no extrato aquoso de *Spirulina* com 10% de etanol foram encontradas por Santoyo et al. (2007).

Nos seus experimentos experimentou-se o extrato contra espécies microbianas diferentes, incluindo a bactéria gram positiva *S. aureus*, a bactéria gram negativa *E. coli*, o fungo *A. Niger* e a levedura *C. albicans*. Perante a consideração do perfil de diferentes extratos fenólicos de *Spirulina* através do método de cromatografia por HPLC, detectou-se um imenso número de flavonoides e ácidos fenólicos, em níveis alteráveis. O Ácido gálico, pinostrobin, clorogênico, cinnâmico e p-OH-benzóico, foram os constituintes mais abundantemente vistos nos diferentes extratos (BATTAH et al., 2014; ABD. EL-BAKY, EL-BAZ e EL-BAROTY, 2009).

2.9. Atividade antioxidante dos compostos de microalgas

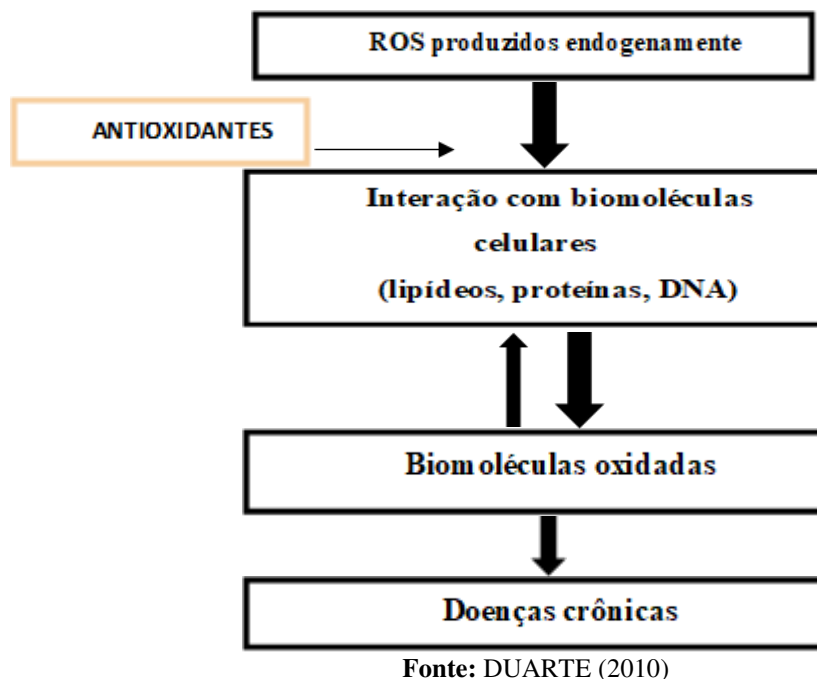
Define-se como antioxidantes, um conjunto heterogêneo de elementos formado por minerais, vitaminas, pigmentos naturais e substâncias como enzimas, que impedem o efeito prejudicial dos radicais livres. Os produtos derivados do metabolismo normal das células, são os ROS (Reactive Oxygen Species), onde estão associados com a regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, com a produção de energia, síntese de substâncias biológicas (DNA, proteínas, lipídios e carboidratos) e fagocitose. No entanto quando estão em excesso conduzem a um desequilíbrio onde o estado pró oxidante destaca o estado antioxidante, o qual é definido como stress oxidativo. Esse método ocasiona efeitos deletérios, assim como a destruição de proteínas estruturais, a peroxidação de lipídios das membranas e causa alteração e/ou perda da função dos carboidratos, ácidos e enzimas (DECLEVA, 2012; NAJI e DEVARAJ, 2016). São efeitos referentes a várias patologias assim como, doenças cardíacas, artrite, choque hipovolêmico, catarata, envelhecimento, disfunções cognitivas e câncer. Podem ser o fator agravante ou mesmo a causa (SOARES, 2016; SHU E LUNG, 2008).

Há compostos antioxidantes biológicos que contêm diversas enzimas, tais como a catalase, glutathione peroxidase, a superóxido dismutase. Os organismos são providos de um

sistema de defesa natural com a produção destes compostos antioxidantes biológicos que são um meio de proteção contra perdas causadas por radicais livres.

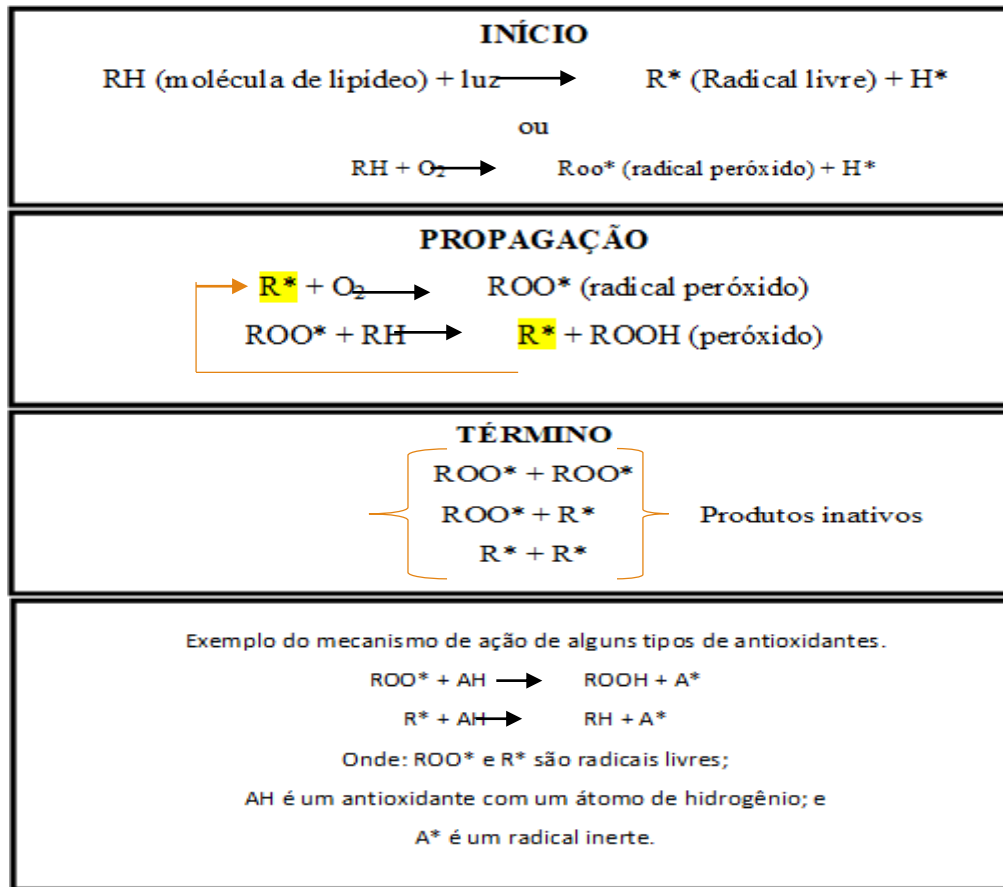
Os métodos de oxidação, ou stress oxidativo, provocados pelos radicais livres são capazes de ser evitados através do uso de compostos antioxidantes para reduzir ou prevenir reações oxidativas ou então, alterando as condições ambientais (SOARES, 2016).

Esquema 1. Intervenção dos carotenoides na prevenção de doenças crônicas.



No esquema 2, está exemplificado o ranço oxidativo (auto-oxidação ou rancificação auto-oxidativa). Ele é responsável pelo odor menos agradável dos alimentos com ranço. É necessário ter condições benéficas no estágio inicial da oxidação, como oxigénio, temperaturas altas e certos catalisadores, como radiação, luz e traços de metais (como cobalto, ferro, cobre, níquel e outros). É um caso em que existe a retirada de um hidrogénio do carbono alílico e uma quebra da molécula de lipídios, dando origem a radicais. Quando formados, ligam-se ao oxigénio gerando radicais peróxidos que conseguem recolher hidrogénio de outro ácido graxo originando novo peróxido e novo radical livre e assim se difundindo continuamente. Na teoria, a reação prossegue até que todo o oxigénio ou toda a molécula de ácido graxo tenha sido consumido ou impedida pela presença de um elemento antioxidante. Numa etapa final (término), os radicais responderão entre si, para desenvolver moléculas inativas (GAVA, SILVA E FRIAS, 2009).

Esquema 2. Exemplo de reação de auto-oxidação de lipídios, tradicionalmente descrito como uma reação em cadeia



Fonte: Adaptado de GAVA, SILVA E FRIAS (2009) e www.revista-fi.com

É de enorme interesse biotecnológico, a investigação de novas fontes naturais de compostos bioativos com efeito antioxidante, devido ao seu alto potencial terapêutico e profilático, além de menos agressivo à saúde (SOARES, 2016).

Diversos estudos confirmaram a aptidão das microalgas para produzir esses mesmos compostos, visto que pertencem ao seu metabolismo como reação a um estado de stress ou em condições naturais.

Elas absorvem luz solar ao realizar a fotossíntese, originando a produção de energia e oxigênio. Como existe a fácil conversão do oxigênio, pela radiação ultravioleta (UV) em espécies reativas de oxigênio (ROS), as microalgas fortaleceram mecanismos de proteção que compreendem a formação de compostos antioxidantes de modo a minimizar as concentrações ROS originadas (RODRIGUEZ-GARCIA e GUIL-GUERRERO, 2008; DUARTE, 2010).

A característica anticâncer e antioxidante dos extratos de microalgas foi analisada empregando as microalgas *Nostoc muscorum*, *Oscillatoria sp* e *Anabaena flous-aqua*.

Nessas mesmas análises mostraram-se as atividades antioxidantes mais elevadas (72,8%, 73,6%, 75,6%). A maior atividade antioxidante (75,9%) foi manifestada pelas cianobactérias *S. platenses*, com uma eficácia anticancerígena equilibrada (60,67% e 54,8% contra EACC e HepG2, nessa mesma ordem), em consequência de seu conteúdo total de pigmentos ficobiliproteína e metabólitos secundários elaborados em grande quantidade (SHANAB et al., 2012). A eficácia do extrato aquoso das microalgas *Oscillatoria sp.* e *Nostoc muscorum*, foi também comprovado no combate às células do carcinoma Ascítico de Ehrlich (EACC) e células de câncer hepatocelular humano (HepG2), comprovando atividade que alterou de 87,25% e 89,4% respectivamente. Em ambas as espécies de cianobactérias, a presença de ficobiliproteínas ocasionou a atividade anticâncer e a atividade antioxidante (SHANAB et al. 2012). Com microalgas do filo *Chlorophyta*, realizaram-se estudos de forma a confirmar a presença de carotenoides com atividade biológica em determinadas espécies. É obtido o β -caroteno, antioxidante, da espécie *Dunaliella salina* que comprova atividade imunomoduladora. Pode ser vista a astaxantina na *Chlorella vulgaris* com atividade antitumoral e xantofila na *Chlorella ellipsoidea*, apresentando, também, atividade tumoral (SOARES, 2016).

A luteína, pigmento carotenóide é produzida pelas microalgas do gênero *Chlorella*, *Scenedesmu* e *Muriellopsis* e tem ação contra a degeneração macular (DM), previne a formação de alguns tipos de câncer e a formação de cataratas (GARCÍA, 2013; GRANADO, OLMEDILLA e BLANCO, 2003). Um potencial farmacológico é característico da microalga *Scenedesmu sp.*, exibindo atividades antioxidante e anticâncer (ORDOG et al., 2004; NATRAH et al., 2007). Segundo Aremu et al. (2014) a bioatividade favorável das cepas de *Scenedesmus* analisada em seus experimentos, mostram competência como possíveis fontes alternadas de antioxidantes, exibindo um teor de inibidores de acetilcolinesterase (AChEI) e um teor fenólico de $3,6 \geq 0,42 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$.

3. OBJETIVO

Avaliar o uso de misturas de solventes polar/apolar (etanol:hexano) na extração lipídica da microalga *Tetrademus obliquus* com e sem prévia extração das proteínas da biomassa.

3.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a composição centesimal da biomassa microalgal antes do rompimento celular, após o rompimento celular, e após a extração de proteínas e de lipídios.
- Usar a técnica do moinho de bolas para romper a biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*.
- Determinar a proporção de sólidos na biomassa (5%, ou 10% (m/v)) capaz de proporcionar a maior extração de lipídios da microalga *Tetrademus obliquus*.
- Avaliar o comportamento da extração de lipídios da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*, na presença e ausência de proteínas na proporção biomassa:solvente de 1:3.
- Determinar a proporção dos solventes etanol:hexano (1:1, 1:2 ou 3:5 v/v) que promova a maior extração de lipídios da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Métodos experimentais

A biomassa congelada da microalga *Tetrademus obliquus* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

O trabalho foi desenvolvido em 09 etapas: (1) Lavagem das células da microalga; (2) Filtração; (3) Congelamento (-80 °C); (4) processamento de biomassa (liofilização); (5) caracterização da composição centesimal da biomassa seca; (6) ruptura celular da biomassa seca por moinho de bolas; (7) reidratação da biomassa para atingir teores de sólidos de 5% e 10% (m v^{-1}); (8) extração de lipídios de biomassa; e (9) desproteíntização da biomassa e extração de lipídios.

4.2. Reagentes e equipamentos

Reagentes

Os produtos químicos utilizados foram etanol ($\geq 99,5\%$ de pureza, Sigma - Aldrich, EUA), hexano (neon, Brasil), metanol (99,8% de pureza, Sigma - Aldrich, EUA) e clorofórmio ($\geq 99\%$ de pureza, Sigma - Aldrich, EUA).

Bicarbonato de sódio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido bórico, sulfato de potássio, sulfato de cobre, Corante Vermelho de metilo, verde de bromocresol, cloreto de sódio, fosfato de sódio, ácido fosfórico, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio e éter etílico, selênio.

Equipamentos

Banho Maria com Circulação (SL-153), Deionizador (Direct-Q 3 UV, Millipore, USA), estufa com circulação forçada (Q314M242, Quimis, Brasil), espectrofotômetro UV/VIS (Cary 50, Varian, Austrália), Microscópio óptico (BX53, Olympus Corporation, Japão), balança analítica (M-310, Denver Instrument, USA), balança analítica (AUY22, Shimadzu, Japão), Centrífuga (5430, Eppendorf, Alemanha), agitador de tubos, vórtex (AP56, Phoenix Lufenco, USA), leitora automática de microplacas (TP-Reader, Thermoplate, USA), ultrafreezer (GE, Double Integration, Brasil), refrigerador (Consul, PRACTICE 410 Biplex, Brasil), liofilizador

(LS 3000, Terroni, Brasil), incubadora (B.O.D) (SP500, SPLADOR, Brasil), ultracongelador (CL374-80V, ColdLab, Brasil), incubadora Shaker (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil).

4.3. Processamento inicial da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*

A biomassa foi descongelada para fracionamento, lavada com água deionizada, filtrada (meio filtrante de tecido de organza) para remover impurezas, acondicionada em recipientes e congelada em freezer (GE, Brasil) a -80 °C.

4.4. Caracterização da biomassa liofilizada, antes e após o rompimento celular

A biomassa congelada foi liofilizada (LS 3000, Terroni, Brasil), dando origem à biomassa seca. A biomassa seca foi caracterizada antes e depois da ruptura celular quanto à umidade (AOAC 950.43, 2005), cinzas (AOAC 923.03, 2005), lipídios (Folch et al., 1957), lipídios usando solventes etanol e hexano (Sierra, 2018) e proteína pelo método Kjeldahl (AOAC, 2005; fator Kjeldahl de nitrogênio de 5,89), para o qual o fator de correção para solução de HCl 0,05 N foi de 0,947, a proporção de corante vermelho de metila:verde de bromocresol foi de 1:6 e HCl 0,05 N em vez de 0,1 N.

Foi efetuado um infravermelho da amostra (FTIR-Técnica espectroscópica vibracional), rompida e não rompida de forma a detectar a existência de compostos polares (proteínas, carboidratos, pigmentos) e apolares (lipídios), que foram posteriormente caracterizados.

4.4.1. Quantificação de lipídios

Dois métodos foram aplicados para determinação de lipídios de acordo com a condição da estrutura celular, células inteiras e rompidas.

O método de Folch (FOLCH et al., 1957) foi aplicado para biomassa contendo células inteiras, ou seja, antes da ruptura celular. Assim, os solventes metanol e clorofórmio foram associados à hidrólise ácida (SIERRA, 2018) para quantificar lipídios em biomassa com células inteiras. A hidrólise ácida é um método destrutivo para obter o teor total de lipídios.

Um método gravimétrico baseado no princípio de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (SBR) (IDF, 1988) foi aplicado para quantificar lipídios na biomassa de microalgas após a ruptura celular com moinho de bolas. Os solventes etanol e hexano (VIEGAS, 2020) foram utilizados

como alternativas aos solventes clorofórmio e metanol, que possuem toxicidade que deve ser evitada podendo levar a problemas de saúde.

Método de Folch associado à hidrólise ácida para quantificação de lipídios em biomassa celular total

Metanol (10 mL) e HCl (5 mL, 3 M) foram adicionados à biomassa liofilizada (1 g) para hidrólise ácida em um tubo Falcon. Este tubo foi colocado em banho-maria a 65 °C (Solab, SL-153, Brasil), retirado após 10 min e resfriado à temperatura ambiente, sendo adicionado clorofórmio (20 mL). Em seguida, o método de Folch foi aplicado à mistura (Sierra, 2018).

Método de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (SBR) para quantificação de lipídios em biomassa celular interrompida

O método SBR, modificado segundo Vieira et al. (2021), usaram solventes etanol e hexano para quantificar o teor de lipídios nas suspensões de biomassa rompida e reidratadas contendo 5%, 10% e 36% $m\ v^{-1}$ de sólidos.

4.5. Extração de lipídios por solventes orgânicos da biomassa rompida e reidratada

Testes de extração lipídica foram conduzidos em suspensões de biomassa rompida e reidratada contendo 5% e 10% $m\ v^{-1}$ de sólidos. Testes de extração também foram realizados na biomassa com proteína e na biomassa desproteïnizada para definir os níveis de lipídios extraídos em ambos os casos. Os solventes utilizados na quantificação de lipídios SBR após a ruptura celular são os mesmos utilizados na extração lipídica da biomassa rompida e reidratada (DRB).

O etanol foi adicionado ao DRB em um tubo Falcon e agitado manualmente por 1 min. Em seguida, adicionou-se hexano e o sistema foi agitado até que a mistura estivesse completa. As proporções ($v\ v^{-1}$) de etanol (solvente polar) e hexano (solvente apolar) foram 1:1 (15:15 mL de etanol:hexano), 1:2 (10:20 mL de etanol:hexano) e 3:5 (11,25:18,75 mL de etanol:hexano) para um total de 30 mL de etanol e hexano. Os solventes foram adicionados na proporção de 3:1 solvente:biomassa microalgal. A mistura foi centrifugada (Eppendorf, 5430, Alemanha) para separar a fase superior orgânica (fase hexânica rica em lipídios) e a fase inferior aquosas (rica em proteínas e carboidratos). A fase superior que era a fase hexânica foi retirada

com pipeta volumétrica, colocada em erlenmeyer, seco em estufa a 102 °C, resfriada em dessecador e pesado. Este procedimento foi repetido quatro vezes. A cada repetição, o volume de hexano correspondente a cada proporção foi adicionado às misturas de DRB e etanol. Os volumes foram de 15 mL na proporção de 1:1, 20 mL na proporção de 1:2 e 18,75 mL na proporção de 3:5. Os volumes da fase orgânica foram coletados em um Erlenmeyer, e o hexano foi evaporado a 70 °C. Após a evaporação do solvente, as quantidades de lipídios extraídos foram obtidas por pesagem dos lipídios em um Erlenmeyer. Todo esse procedimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de lipídios extraídos da biomassa foi determinada conforme a Eq. (1):

$$\text{Lipídios (\%)} = 100 - [\text{Massa final de lipídios (g)} / \text{Massa inicial de biomassa (g)}] \quad (1)$$

4.6. Rompimento de células da biomassa com moinho de bolas

A biomassa foi rompida no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

As células de biomassa foram rompidas usando um moinho de bolas (Retsch, Modelo MM 400, Alemanha) com uma frequência de 30 kHz e um tempo de processamento de 90 s, tornando os compostos celulares acessíveis para separação. A biomassa liofilizada foi caracterizada antes e depois da ruptura celular para umidade, cinzas, lipídios e proteínas, de acordo com a seção 4.4.

4.7. Teor de sólidos da biomassa

A influência do teor de sólidos na quantificação e extração de lipídios foi estudada utilizando suspensões de biomassa liofilizada diluídas em água nas proporções de 5%, 10% e 36% (m v^{-1}). Água foi adicionada cuidadosamente para distribuir uniformemente sobre a biomassa, com agitação manual por 5 min em temperatura ambiente para completar a hidratação.

4.8. Desproteínização da biomassa

A influência da remoção de proteínas da biomassa na extração de lipídios foi avaliada após a ruptura celular, uma vez que as proteínas podem emulsificar em solventes utilizados para

extração de lipídios (AMORIN et al., 2021). Antes e após cada condição de teste de extração de lipídios, foram determinados os teores de proteínas e lipídios. Assim, pode-se avaliar a influência da desproteínização na extração lipídica.

A metodologia proposta por Silva, et al. (2021) foi usado para separação de proteínas antes da extração de lipídios. Uma quantidade de biomassa seca, já rompida em moinho de bolas (30 kHz e 90 min), foi pesada e diluída para se obter o percentual de sólidos desejado (5% ou 10% m v⁻¹). O pH foi ajustado para 10 com NaOH 1 M; a biomassa foi agitada manualmente (1 min) e então centrifugada (5430, Eppendorf, Alemanha) a 7500 × g por 10 min a 20 °C. O primeiro centrifugado (primeira biomassa residual), contendo lipídios e proteínas insolúveis, foi separado do primeiro sobrenadante, contendo proteínas solúveis, lipídios polares, pigmentos e outros bioprodutos solúveis. O primeiro sobrenadante foi armazenado para posterior extração das proteínas. O pH do primeira centrifugado foi ajustado para 12 com NaOH 1 M (99% de pureza, ACS científica, Brasil). A mistura foi agitada manualmente (1 min) e novamente centrifugada (7500 g, 10 min, 20 °C). O segundo centrifugado (segunda biomassa residual) foi separado do segundo sobrenadante, que foi armazenado. Este processo foi aplicado de forma semelhante para obter a terceira centrifugada (terceira biomassa residual), considerada a amostra de controle. O terceiro sobrenadante também foi armazenado.

Após todas as etapas de separação de proteínas, (1) o conteúdo lipídico foi determinado na terceira biomassa residual (amostra controle) com o método etanol:hexano. De acordo com Silva et al. (2021), o teor de proteína insolúvel presente na terceira biomassa residual é difícil de separar dela. (2) O teor de proteína solúvel foi determinado na mistura dos sobrenadantes armazenados (1, 2, 3). As proteínas solúveis foram extraídas em seu ponto isoelétrico (PI) de 2,55 após adição de HCl 1 M, agitação manual e repouso por três dias para precipitação das proteínas. Após a precipitação das proteínas, a centrifugação (7500 g, 10 min, 20 °C) foi usada para separar as proteínas solúveis.

Umidade, cinzas, lipídios e proteínas caracterizaram a biomassa desproteínizada.

4.9. Metodologia de Análise de Infravermelho – FTIR

O FTIR é uma técnica espectroscópica vibracional que permite a detecção dos diferentes grupos funcionais presentes em uma amostra. A espectroscopia FTIR é uma técnica rápida, não destrutiva, que requer preparação mínima de amostra a baixo custo (JEB R. G, 2022). A FTIR foi utilizada para detectar a presença de compostos polares e apolares.

Para se proceder à análise das amostras de microalga *Tetrademus obliquus* antes do rompimento e após o rompimento celular foi feito o uso da metodologia descrita por Jeb (2022).

De acordo com a metodologia, retirou-se aproximadamente 50 mg da amostra, para ser pressionada na placa ATR. As amostras foram escaneadas na faixa de 4000–400 cm^{-1} . Para cada espectro de FTIR, foram obtidos duzentos e cinquenta e quatro (254) scans, com resolução de 2 cm^{-1} . As varreduras foram então calculadas para produzir o espectro FTIR representativo das amostras.

4.10. Análise estatística

Os resultados da composição centesimal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, ao teste Tukey de médias a 5% de probabilidade. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada usando o software SAS licenciado (Statistical Analysis System, versão 9.2, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição aproximada da biomassa de microalgas em diferentes estágios do processo

A caracterização da biomassa das espécies permite compará-la com outras espécies de microalgas. A Tabela 1 mostra os resultados da composição centesimal da biomassa de *Tetrademus obliquus* para proteínas, cinzas, umidade, lipídios e carboidratos. Esses resultados são consistentes com o fato de que metodologias destrutivas foram usadas para quantificar os biocomponentes. O teor de proteína obtido antes da ruptura celular foi de $40,64 \pm 0,563\%$ e após a ruptura celular foi de $40,54 \pm 0,677\%$. Esses resultados estão na faixa daqueles relatados por Pereira et al. (2018) e Vieira et al. (2019) para *T. obliquus*.

O teor de proteína microalgal varia de acordo com a espécie e as condições de cultivo, como nitrogênio e disponibilidade de luz. *Spirulina platensis* pode atingir até 63% de proteína em sua biomassa, *Chlorella pyrenoidosa* e *Dunaliella salina* podem chegar a 57%, e *Acutodesmus obliquus* varia de 36 a 56% (AMORIM, 2021; RENUKA et al., 2017).

Os teores de cinzas estão listados na Tabela 1 e estão dentro da faixa encontrada na literatura (MIRANDA et al., 2018; TOMÁS-ALMENAR et al., 2018). O cultivo com fertilizantes agrícolas, que não possuem grau de pureza analítica e contém parcela significativa de compostos insolúveis, proporciona maiores porcentagens de cinzas (VIEIRA et al., 2019). Assim, o teor de cinzas também depende das condições de cultivo da microalga. Altas quantidades de cinzas na biomassa reduzem o poder calorífico da biomassa, uma vez que os materiais minerais não participam do processo de termodegradação (FAKAYODE et al., 2023).

O alto teor de cinzas apresentado pela biomassa pode ser atribuído aos resíduos inorgânicos (óxidos) formados após a calcinação da matéria orgânica e pode comprometer a qualidade dos extratos obtidos (por exemplo, metais pró-oxidantes em óleos), bem como a aplicação de esses extratos, por exemplo, para a produção de biodiesel, pois proporcionam danos aos motores por abrasividade (DOMINGOS et al., 2007).

Os teores de umidade estão na faixa relatada por Pereira et al. (2018). De acordo com Zorn et al. (2017), a extração de lipídios é diminuída em teores de umidade superiores a 64%, pois a água pode promover a formação de uma barreira polar entre o solvente e o lipídio, reduzindo a transferência de massa (ESCORSIM et al., 2019). No entanto, umidade superior a 64% em nosso trabalho facilitou a extração de lipídios, provavelmente devido à maior

diferenciação nas propriedades físico-químicas entre as fases aquosa e orgânica, favorecendo a extração de lipídios com solventes etanol e hexano.

A Tabela 1 mostra o conteúdo lipídico da biomassa obtida antes da ruptura celular de acordo com o método de Folch (razão metanol:clorofórmio de 1:2) associado à prévia hidrólise ácida com HCl da biomassa liofilizada (técnica de análise destrutiva). O teor de lipídios de $15,77 \pm 1,09\%$ (método de Folch) foi superior ao obtido para biomassa rompida e reidratada com proporção etanol:hexano de 1:2, ou seja, entre $5,10 \pm 0,37\%$ e $6,54 \pm 0,68\%$, para teores de sólidos de 5 %, 10%, 36% e 100%, como mostrado na Tabela 2.

Assim, a maior porcentagem de lipídios obtida com uma técnica celular destrutiva não está associada ao teor de água da biomassa microalgal (úmida ou liofilizada), mas com o tipo de solvente que permitiu a destruição total da parede celular, como o HCl (SIERRA, 2018; MARTINS et al., 2021).

Não foram observadas diferenças significativas entre os teores de lipídios após a ruptura celular para as suspensões de biomassa contendo os três teores de sólidos testados (5%, 10%, 36% e 100%). A porcentagem de lipídios extraídos em relação aos lipídios totais da biomassa foi calculada usando 15,77 como valor de lipídios totais (Tabela 1).

Assim, obtiveram-se porcentagens de lipídios extraídos variando de 32,34 a 41,98% (Tabela 2), demonstrando que a capacidade do método de extrair lipídios totais demonstra uma capacidade de extração de até 42% quando se utiliza um teor de sólidos de 10%.

Altos teores de lipídios extraídos de *Nannochloropsis oculata* com etanol foram relatados por Baumgardt et al. (2016) [11,33 g de ésteres metílicos de ácidos graxos por $(100 \text{ g})^{-1}$ de biomassa de microalga liofilizada] e de *Chlorella minutissima* por Zorn et al. (2017) (20% de lipídios) utilizando biomassa com percentagens de sólidos de 36% m v^{-1} . Zorn et al (2017) descreveram que a água afeta a separação de lipídios, e uma porcentagem de água menor que 36% (m v^{-1}) reduz a extração de lipídios.

A parede celular revela maior rigidez quando desidratada, dificultando a entrada do solvente na célula e a liberação celular do complexo lipídio-solvente. Uma vez que a água pode intensificar a ruptura celular e dissolver alguns polissacarídeos celulares, a permeabilidade do solvente através da parede celular pode ser aumentada, proporcionando uma extração lipídica eficiente (COHEN, 1999; ZORN et al., 2017), provavelmente devido à dissolução de lipídios polares na fase aquosa. No entanto, nossos resultados indicaram que os teores de lipídios foram estatisticamente semelhantes usando biomassa liofilizada com 5%, 10% e 36% de sólidos (m v^{-1}). Tais distinções de comportamento podem ser devidas a diferentes espécies de microalgas, condições de cultivo e solventes usados pelos autores e por nós. Assim, a porcentagem de

sólidos utilizada para permitir uma alta porcentagem de extração de lipídios foi selecionada usando poucas quantidades de biomassa e baixos volumes de solventes orgânicos (seleção econômica). Assim, a biomassa com 5% e 10% de sólidos (m v^{-1}) foi utilizada nas análises subsequentes.

O teor de carboidratos foi obtido pela diferença entre 100% e os demais teores de biocompostos (proteínas, umidade, cinzas e lipídios), calculado pela Eq. (2) e são apresentados nas Tabelas 1 e 2. O teor de carboidratos inclui fibras e glicogênio:

$$\% \text{ carboidrato (g/100 g)} = 100\% - (\% \text{ proteína} + \% \text{ umidade} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ lipídios}) \quad (2)$$

Determinação dos teores de proteínas apolares e cinzas na biomassa residual

Os teores de proteína da biomassa seca foram de aproximadamente 40% (Tabela 1). Após a extração lipídica, os teores de proteína microalgal na terceira biomassa residual foram $6,73 \pm 0,45\%$ (para biomassa desproteïnizada) e $9,85 \pm 0,19\%$ (sem desproteïnização). Pode-se observar na Tabela 3 que na extração de lipídios após a desproteïnização da biomassa (extração de proteínas solúveis) não ocorreu a formação de emulsões, enquanto na biomassa que não sofreu extração prévia de proteínas ocorreu a formação de emulsões. Duas possíveis razões podem justificar a baixa quantidade de proteínas na biomassa residual: o arraste de biocompostos apolares (como proteínas apolares) por solventes apolares (como hexano) e a partição de proteínas da fase aquosa para a orgânica. A formação de emulsões também foi verificada na interface de fase de alguns sistemas (sem extração prévia de proteínas) durante os experimentos de quantificação de proteínas, indicando a presença de proteínas no final do processo de extração de lipídios. Portanto, neste ponto, a extração de proteínas antes da extração de lipídios tem o potencial de prevenir a formação de emulsões, facilitando assim a extração de lipídios.

A Tabela 3 mostra que o maior teor de proteína na biomassa residual foi de $12,51 \pm 0,5\%$. Este resultado foi alcançado quando a emulsão formada durante a extração lipídica não foi coletada junto com a fase orgânica e para biomassa sem desproteïnização (biomassa com proteínas polares). O teor de proteína atingiu o menor valor ($6,73 \pm 0,45\%$) para a biomassa residual desproteïnizada (biomassa sem proteínas polares) e quando a emulsão foi coletada com a fase orgânica contendo os lipídios extraídos. Esse comportamento indica que a emulsificação apresentou proteínas e lipídios, o que concorda com Tavoni et al. (2020).

Os teores de cinzas da biomassa liofilizada antes e depois do rompimento foram maiores (21%; Tabela 1) do que a porcentagem de cinzas presentes na biomassa residual após a extração de lipídios com solvente etanol:hexano. Os valores de cinzas foram $4,68 \pm 0,50\%$ na biomassa residual desproteïnizada e $4,520 \pm 0,682\%$ na biomassa residual sem desproteïnização, apresentando igualdade estatística. A redução do teor de cinzas pode ter ocorrido devido à reidratação da biomassa utilizada para extrair os lipídios. A água adicionada à biomassa solubilizou parte das cinzas, pois existem cinzas solúveis e insolúveis em água. Após a extração lipídica, a biomassa residual foi seca e as cinzas foram quantificadas. Assim, grande parte da água contendo cinzas solúveis foi retirada para facilitar a secagem da biomassa na calcinação da mufla. Esse comportamento pode justificar a diminuição do teor de cinzas após a extração dos lipídios.

5.2. Extração de lipídios

A Tabela 4 apresenta os resultados da extração de lipídios nas diferentes condições experimentais quanto às relações etanol:hexano (1:1, 1:2, 3:5 v v⁻¹), teores de sólidos da biomassa (5% e 10% m v⁻¹) e desproteïnização da biomassa. A maior porcentagem de extração de lipídios foi obtida com a proporção de solvente etanol:hexano de 1:2. A análise estatística mostrou que o teor de lipídios não foi afetado pelos percentuais de sólidos (5% e 10% p v⁻¹) e desproteïnização da biomassa. A extração de lipídios utilizando os solventes orgânicos etanol e hexano é intensificada quando associada a um método físico para quebrar as paredes celulares de microalgas (SIERRA, 2018); assim, a moagem de bolas foi o método de rompimento celular utilizado neste trabalho. O teor de lipídios da biomassa liofilizada obtida após rompimento celular (trituração) de $6,54 \pm 0,68\%$ foi inferior ao obtido após hidrólise ácida de $15,77 \pm 1,09\%$, pois a degradação celular realizada por hidrólise ácida é mais eficaz para liberação de compostos intracelulares.

O teor de lipídios resultante da utilização da relação etanol:hexano de 1:1 foi o menor em todas as condições experimentais. Além disso, não foi observada emulsificação nesta proporção de solvente. A emulsificação foi verificada na proporção de solvente de 3:5, dificultando a extração de lipídios e tornando complexa a análise dos resultados.

5.3. Análise de Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho, mostra-nos bandas referentes a alguns elementos químicos e suas ligações. Nos espectros apresentados na Figura 8 é notável a presença de estiramento da ligação N-H e O-H em 3299 cm^{-1} , duas bandas de estiramento da ligação Csp³-H em 2919 e 2852 cm^{-1} , uma banda de deformação N-H em 1644 cm^{-1} e estiramento C-O e C-N em 1027 cm^{-1} .

Através dessas bandas podemos observar que a molécula possui um maior caráter polar, já que moléculas que apresentam essas ligações citadas acima tendem a ser polares. Não se verificaram diferenças significativas no infravermelho da amostra rompida e não rompida. Com esta metodologia de infravermelho foi comprovado a existência de biocompostos polares e apolares na biomassa.

6. CONCLUSÃO

Os maiores valores de extração de lipídios foram observados usando uma proporção de solvente (etanol:hexano) de 1:2. A desproteinização da biomassa e o teor de sólidos utilizado (5 e 10% p v-1) não influenciaram significativamente o teor de lipídios extraído. Porém, a desproteinização prévia influenciou na formação da não emulsão. Dentre as proporções de solventes avaliadas durante a extração lipídica, a proporção de 3:5 dificultou a extração pretendida devido à formação de uma emulsificação entre as fases orgânica e aquosa, dificultando a coleta do número correto de amostras para obtenção da extração lipídica pretendida. Esse comportamento provavelmente é respondido verificando a proporção de solvente para biomassa utilizada (3:1). O uso combinado de um solvente polar e apolar é uma estratégia para extração de lipídios da microalga *Tetrademus obliquus* capaz de extrair até 42% dos lipídios totais. Estudos futuros com combinações de técnicas de rompimento com técnicas de extração podem ser uma forma de otimizar uma maior extração de lipídios de microalgas.

REFERÊNCIAS

ABD EL-BAKY; FAROUK K. EL-BAZ; GAMAL S. EL-BAROTY, 2009. Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. **Published: Biology International Journal of Food Science and Technology**, 2009. Doi:10.1111/J.1365-2621.2009.01926.XCorpus. ID: 53605544

ABEDIN, R.M.A.; TAHA, H.M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burmann Design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, Egypt**, 2008, v. 3, n. 1, p. 22-31. Disponível em: <[www.idosi.org/gjbb/gjbb3\(1\)08/4.pdf](http://www.idosi.org/gjbb/gjbb3(1)08/4.pdf)>.

AMORIM, M. L. et al. Microalgae proteins: Production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2001, v.61, n.12, P.1976-2002. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>

AN, S.S.; T. FRIEDL E E. HEGEWALD. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus* like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons, **Plant Biology**, 1999, v.1 p.418-428, doi: 10.1111/j.1438-8677.1999.tb00724.x

AREMU, A. O. et al. Influence of culture age on the phytochemical content and pharmacological activities of five *Scenedesmus* strains. **Journal of Applied Phycology, Spring International**, 2014, vol. 26, ed.1, p. 407-415, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-0144-y>>.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Official Analytical Chemists, 2005, 18. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International.

BARBOSA, M.J.G.V. **Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation**, 2003, 166f. Tese (Doutorado em Ciências) - Wageningen University.

BATTAH, G., M., et al. Antifungal Agent from *Spirulina maxima*: Extraction and Characterization. **Global Journal of Pharmacology**, 2014, vol. 8, n. 2, p. 228–236, 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2014.8.2.8369>>.

BAUMGARDT, F. J., et al., 2016. Lipid content and fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2016, v.108, p.89-95. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.003>

CAVALHEIRO, C.V., 2013. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L.** Santa Maria–RS, 2013. (Dissertação). UFSM.

CHAMBERS, H. F. Antimicrobianos: considerações Gerais; In: Goodman, g. As bases farmacológicas da terapêutica. **Mc-Graw Hill, Rio de Janeiro**, 2003, 10 ed., p.859 – 875.

CHAPMAN, R.L. Algae: the world's most important plants an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2013, v.18 p.5-12, doi:10.1007/s11027-010-9255-90.

CHEN, C.-Y., et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, V. 78 p. 1-10, doi:10.1016/j.bej.

CHISTI. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, v. 25, n. 3, p. 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

COHEN, Z. *Chemicals from Microalgae (1st ed.)*. CRC Press, 1999, P. 419. <https://doi.org/10.1201/9781482295306>

D'HONDT, E. et al. Cell disruption technologies. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, [S.l.]: Woodhead Publishing, 2017, p. 133 – 154, Doi:10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6.

DECLEVA, D. V. L. *Atividade dos sistemas antioxidantes da microalga minutocellus polymorfhus frente a exposição ao cádmio*, 2012. Dissertação. Programa de pós Graduação em toxicologia e Análises Toxicológicas. Universidade de São Paulo – SP.

DOMINGOS, A. K. et al. The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2007 v.18, n.2, p.416-423. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000200026>

DUARTE, D. R. S. Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ómega 3. *Lisboa*, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10451/2424>>.

DU, Y. et al. Opportunities for switchable solvents for lipid extraction from wet algal biomass: na energy evaluation, *Algal Research*, 2015v.11, p.271-283, doi:10.1016/j.algal.2015.07.004.

ESCORSIM, A. Et al. Multifunctionality of zinc carboxylate to produce acylglycerols, free fatty acids and fatty acids methyl esters. *Fuel*, 2019 v.244: p.569-579. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.01.178>

FAKAYODE, O. et al. State-of-the-art co-pyrolysis of lignocellulosic and macroalgae biomass feedstocks for improved bio-oil production-A review. *Fuel*, 2023, v.332 p. 126071. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126071>

FERNANDEZ, et al., 2000. Modeling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricornutum* cultures in tubular photobioreactors: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, vol.68, p. 173-183, doi: 10.1002/(sici)1097-0290(19980620)58:6<605::aid-bit6>3.0.co;2-m.

FERREIRA, S. P. et al. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais Review: microalgae: na alternative source to obtain essential fatty acids. *SCAP Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal*, 2013, v. 36, p. 275-287. ISSN 0871-018X

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, 1957, v.226, p.497-509.

FRANCO, A. L. C., et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, 2013, v. 36, n. 3, p. 437–448. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000300015>

GARCÍA, M. C. C. Poducción de microalgas com aplicaciones nutricionales para humanos y animales. **Cuadernos de estudios agroalimentarios – CEA05**, 2013, p. 87-105.

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B. Y; BLANCO, I. Nutricional and clinical relevante of lutein in human health. **British Journal of Nutrition**, 2003, vol. 90, p. 487-502. Doi: 10.1079/bjn2003927

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. GAVA. Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações. **São Paulo: Nobel**, 2009, p. 512. Localização: BR67.1; 664, 108. 50794/2009

GOUVEIA, L. E A.C. OLIVEIRA. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2009 v.36 p.269-274. Doi: 10.1007/s10295-008-0495-6.

GOUVEIA, L. Microalgae as a feedstock for biofuels. **Springer**, 2011. Berlin.

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B. Y; BLANCO, I. Nutricional and clinical relevante of lutein in human health. **British Journal of Nutrition**, 2003, vol. 90, p. 487-502. Doi: 10.1079/bjn2003927

GREENWELL, H. C., et al. Placing microalgae onthe biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of The Royal Society Interface**, 2010, v. 7, n. 46, p. 703–726.

GRIMA M.; E.-H BELARBIA; F.G. ACIÉN FERNÁNDEZ; A. ROBLES MEDINA; YUSUF CHISTI. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, 2003, v. 20, p.491-515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)

GUNSTONE, F., D.; HARWOOD J., L.; DIJKSTRA, A., J. The Lipid Handbook with **CD-ROM**, 2007, 3rd Ed., 1472p. CRC press.

HALIM, R., et al. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, 2012, v.30 p.709-732. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.

HECK, M. G. **Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de Streptomyces sp. Linhagem 2s**, 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HU, C. C. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, 2008 v.54, p.621-639. Doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.

HU, C.C. et al. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. **Food Chemistry**, 2008 v. 109, p. 439-446. Doi:10.1016/j.foodchem. .

IDF. International Dairy Federation. International IDF Standard: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff Gravimetric Method (Reference Method). International Dairy Federation. **Caseins and caseinates - Determination of fat content**. 127A: 1988.

JAKI, B., ZERBE, O.; HEILMANN, J.; STICHER, O. Two novel cyclic peptides with antifungal activity from the cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea* (EAWAG 195). **Journal of Natural Products**, 2001, vol. 64, n. 2, p. 154-158. DOI: 10.1021/np000297e.

JEB R. et al. Diferenciação geográfica e entomológica do mel filipino por análise multivariada de espectros FTIR. **Revista de Composição e Análise de Alimentos**, 2022, V. 114, p.104853. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104853>.

QIAN ZJ.; JUNG; WK; KIM, SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresour Technol**. 2012, vol. 99, n. 6, p. 1690-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512726>. Acesso em: 22 jul. 2016

KIM K., Y. SHPRITS, J. LEE, J. HWANG. Empirically modeled global distribution of magnetospheric chorus amplitude using an artificial neural network, *J. Geophys. Res. [Space Physics]*, 2013, v.118, p.6243-6253, doi:10.1002/jgra.50595

KNOTHE et al. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in ignition quality tester. **Fuel**, 2003, v.82, n.8, p.971-975, doi:10.1016/S0016-2361(02)00382-4.

KOLLER, M; MUHR, A; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, 2014, v. 6, n. PA, p. 52-63, doi:10.1016/j.algal.2014.09.002.

KWIETNIEWSKA, E. Microalgae: cultivation and application of biomass as a source of energy: a review. **[S.I.] Instytut Agofizyki**, 2012, ISBN: 9788389969026

LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, 2012 v. 30, n. 3, p. 673–690. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.008>

LEE, S. J.; YOON, B, D.; OH, M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques**, 1998, v. 12, n. 7, p. 553-556, doi:10.1023/A:1008811716448.

LEE, A.K.; LEWIS E P.J; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, 2012, v.46 p.89-101, doi: 10.1016/j.biombioe.201206.034.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Bioresource Technology Force and energy requirement for microalgal cell disruption: An atomic force microscope evaluation. **Bioresource Technology**. [s. l.], 2012, v.128, p. 199–206, doi:10.1016/j.biortech.2012.10.032.

LIANG, M.-H.; WANG, L.; WANG, Q.; ZHU, J.; JIANG, J.-G. High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2018, v.8398, p. 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.145503>

LIU, J.; SONG, Y.; QIU, W. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, v. 72, n. December 2016, p. 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.120>

LOURENÇO, S. DE O. Cultivo de microalgas marinhas princípios e aplicações. São Carlos, 606. **SP: RIMA Editora**, 2006.

MATA, T. M., et a. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>

MATOS, M. J. C. P. P. **Novos métodos cromatográficos para análise e separação de produtos naturais antimicrobianos**, 2015. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Lusófica de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, p. 51.

MARQUES, R. **Produção de biodiesel pelas microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp.: otimização dos processos de pré-tratamento e conversão**, 2013. 59 f. Dissertação - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia da Energia e do Ambiente, Departamento de Engenharia geográfica, geofísica e energia, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa.

MARTINS, L. B.; SOARES. Dilute sulfuric acid hydrolysis of *Chlorella vulgaris* biomass improves the multistage liquid–liquid extraction of lipids. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021, v.11, n.6 p.2485-2497. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00661-w>

MEDINA-JARITZ, et al. Antimicrobial activity of aqueous and Methanolic extracts from *Arthrospira maxima*. **Formatex**, 2011, p. 1267-1271. Corpus ID: 31119812

METTING, F.B. Biodiversity and application of microalgae. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 1996, v.17, p.477-489, doi:10.1007/BF01574779.

MIRANDA, M. T. et al. Physical-energy characterization of microalgae *Scenedesmus* and experimental pellets. **Fuel**, [s. l.], 2018, v. 226, n. April, p. 121–126, 2018, doi.org/10.1016/j.fuel.2018.03.097.

NAJI, K. M.; DEVARAJ, V. R. Antioxidant and other biochemical defense responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. (Horse gram) induced by high temperature and salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology, On-line version, Campos dos Goitacases**, 2016, vol.23, n.3, p.2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S167704202011000300002&script=sci_arttext&tlng=pt.

NATRAH, F. M. I. et al. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. **Journal of Applied Phycology**, 2007, vol. 19, n. 6, p. 711-718. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9192-5>

NEOFOTIS, P. et al. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal Research**, 2016, v.15, P. 164-178. doi:10.1016/j.algal.2016.01.007.

ORDOG, V., et al. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. **J. Applied Phycol.**, 2004, vol. 16, p. 309-314. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047789.34883.aa>

OZDEMIR, G.; KARABAY, N.U.; DALAY, M.C.; PAZARBASI, B. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. **Phytother Res**, 2004, vol. 18, ed. 9, p. 754-7. doi: 10.1002/ptr.1541

PARK, J.B.K.; R.J. CRAGGS; A.N. SHILTON. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology** 2011, v.102 p.35-42, doi:10.1016/j.biortech.2010.06.158.

PEREIRA, N. S. et al. Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the in vitro cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). **Journal of Applied Phycology**, 2018, v.30, n.4 p.2347-2358. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1441-2>

PRATOOMYOT, J.; SRIVILAS, P.; NOIRAKSAR, T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 2005, v.27, n. May, p.1179-1187.

RASHID, N., et al. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2014, v. 40, p. 760–778. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.104>

RENUKA, N. et al. Evaluating the potential of cytokinins for biomass and lipid enhancement in microalga *Acutodesmus obliquus* under nitrogen stress. **Energy Conversion and Management**, 2017, v.140, p.14-23. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.02.065>

RODOLFI, L. et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 2009, v.102 p.100-112, doi: 10.1002/bit.22033.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; GUIL-GUERRERO, J. L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chem.**, 2008, vol. 108, p. 1023–1026.

SANDER, K.; MURTHY, G. S. Life cycle analysis of algae biodiesel. The International. **Journal of Life Cycle Assessment**, 2010, v. 15, n. 7, p. 704–714. <https://doi.org/10.1007/s11367-010-0194-1>

SANTOS, R. R. et al. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2015, v.22, p.95-99, DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.05.015

SANTOYO, S. et al. Screening of functional compounds in supercritical fluids extracts from *Spirulina plantensis*. **Food Chemistry**, 2007, ed. 102, p. 1357-1367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.068>.

SHANAB, et al. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2012, p. 608-615. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60106-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60106-3)

SHENK, P.M. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **BioEnergy Research**, 2008, v. 10, p. 20-43, doi:10.1007/s12155-008-9008-8.

SHU, CH; LUNG, MY. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. **J. Chin. Inst. Chem. Eng.**, 2008, vol. 39, p. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcice.2007.04.010>

SIERRA, J. J. B. Extração de lipídios da microalga *Scenedesmus* sp. com diferentes mistura de solventes orgânicos. **Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, 2018, v.16, n.2 p.88-98 (in portuguese, with abstract in English). <https://doi.org/10.18684/bsaa.v16n2.1169>.

SILVA, M. E. T., LEAL, M. A., DE OLIVEIRA RESENDE, M., MARTINS, M. A., DOS REIS COIMBRA, 7 J. S. *Scenedesmus obliquus* protein concentrate: A sustainable alternative emulsifier for the food industry. **Algal Research**, 2021, 59: 102468. 9 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102468>

SINGH, U.B. E A.S. AHLUWALIA. Microalgae: a promising tool for carbon sequestration. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, 2013, v.18 p.73-95, doi:10.1007/s11027-012-9393-3

SOARES, F. J. A. S. **Avaliação da Actividade Biológica de Extractos de Diferentes Espécies de Microalgas**, 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Lisboa, 2011. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/3258>. Acesso em: 05 jun. 2016.

TAVONI, T. M. Lipid transfer to HDL, CETP and HDL composition in coronary artery disease patients with or without type 2 diabetes mellitus. **European Journal of Preventive Cardiology**. 2020, v.27 n.19, p.2223-2225. <https://doi.org/10.1177/2047487319880364>

TOMÁS-ALMENAR, C. et al. *Scenedesmus almeriensis* from an integrated system waste nutrient, as sustainable protein source for feed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, [s. l.], 2018, v. 497, p. 422–430, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.011>

VARDANEGA, R.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. **Pharmacognosy Reviews**, 2014, v. 8, n. 16, p. 88-95.

VELASQUEZ-ORTA, S.B. AND HARVEY, A.P. Kinetics of Fast Alkali Reactive Extraction/in Situ Transesterification of *Chlorella vulgaris* That Identified Process Condition for a Significant Enhanced Rate and Water Tolerance. **Fuel Processing Technology**, 2016, v.144, p.212-219.

VELASQUEZ-ORTA, S.B. AND HARVEY, A.P. Surfactant Assisted Direct Biodiesel Production from Wet *Nannochloropsis oculata* by in Situ Transesterification/Reactive Extraction. **Biofuel Research Journal**, 2016, v.9, p.366-371. <http://dx.doi.org/10.18331/BRJ2016.3.1.6>

VIEGAS, C., V. Characterization of the lipid components in *Desmodesmus* and *Scenedesmus* strains: lipid content, lipid classes and fatty acid profile. **American Journal of Plant Sciences**. 2020, v.11 n.12 p.2103-2121. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.1112148>

VIEIRA, B. **Indicadores de rompimento mecânico de células visando a extração de biocompostos de *Tetrademus obliquus***. 2019. Dissertação (mestrado). Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

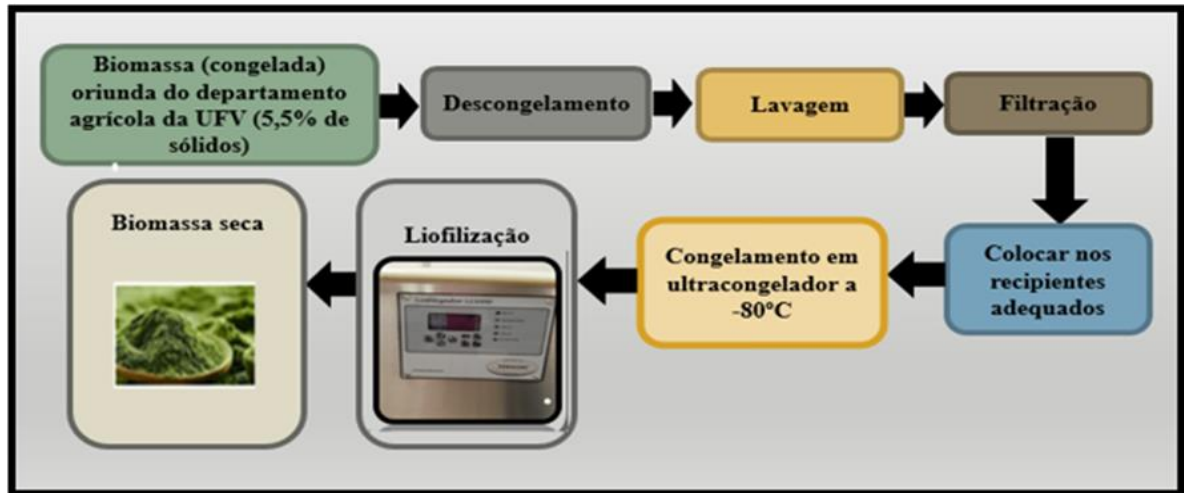
WONG, J. F. et al. A review on current and future advancements for commercialized microalgae species. **Food Science and Human Wellness**, 2022, v.11, n.5, p. 1156-1170. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.04.007>

ZORN, S. **Extração de óleo microalgal por solventes orgânicos: uma alternativa para a produção de biodiesel**, 2017. 124 p. Dissertação (Mestrado). Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Química na área de processos catalíticos e biocatalíticos – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2017.

ZORN S. et al. Avaliação dos fatores envolvidos na extração de lipídios da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* via solventes, **Holos On Line**, 2017, v. 2, p. 66 – 78. <https://doi.org/10.15628/holos.2017.5655>

APÊNDICE A - Figuras referentes à execução experimental

Figura 1. Fluxograma representativo do processamento da biomassa seguida de liofilização.



Fonte: próprio autor (2021)

Figura 2. Processo de destilação usado na caracterização de proteínas.



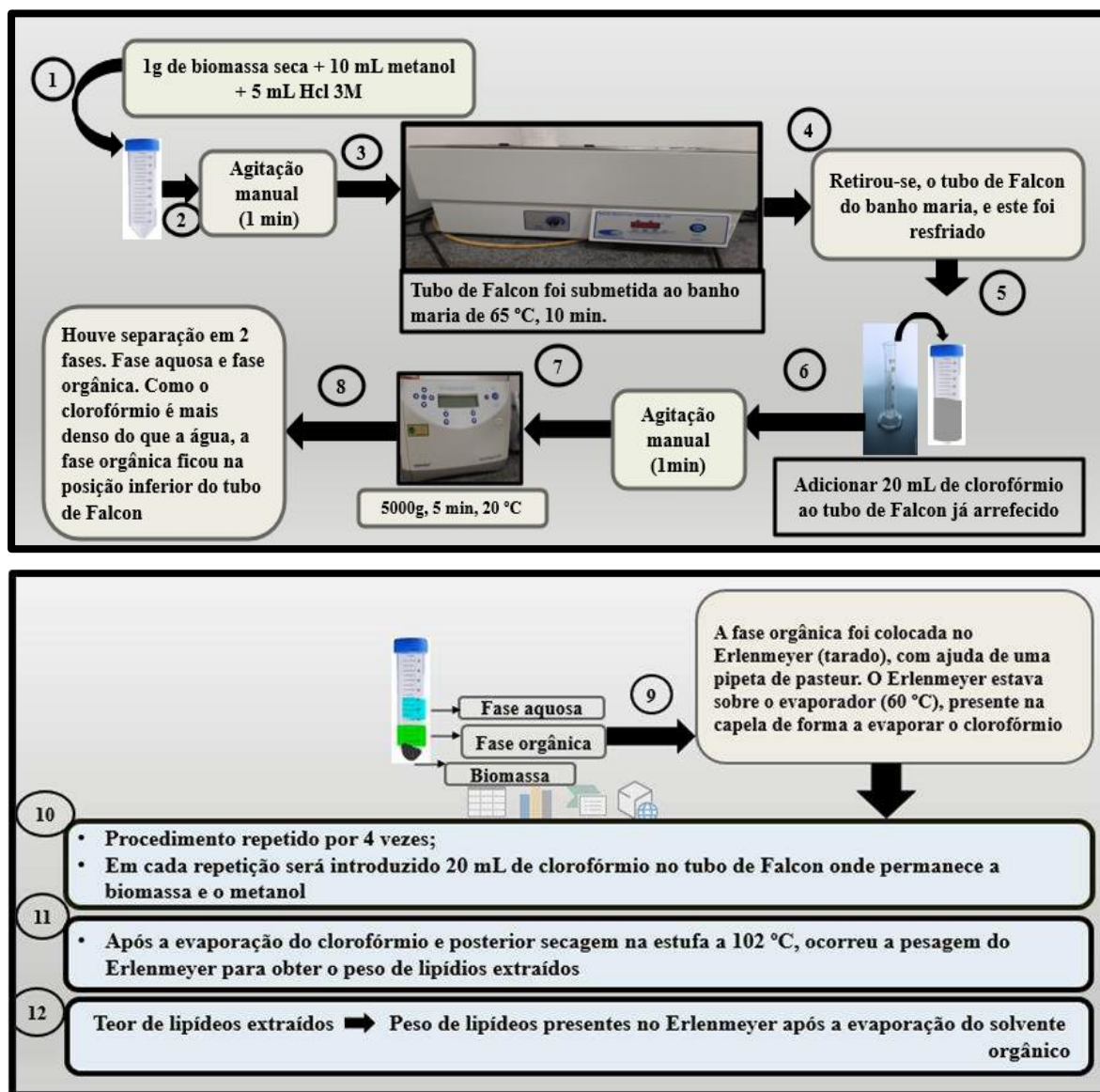
Fonte: foto própria

Figura 3. Cadinhos colocados na mufla na caracterização de cinzas.



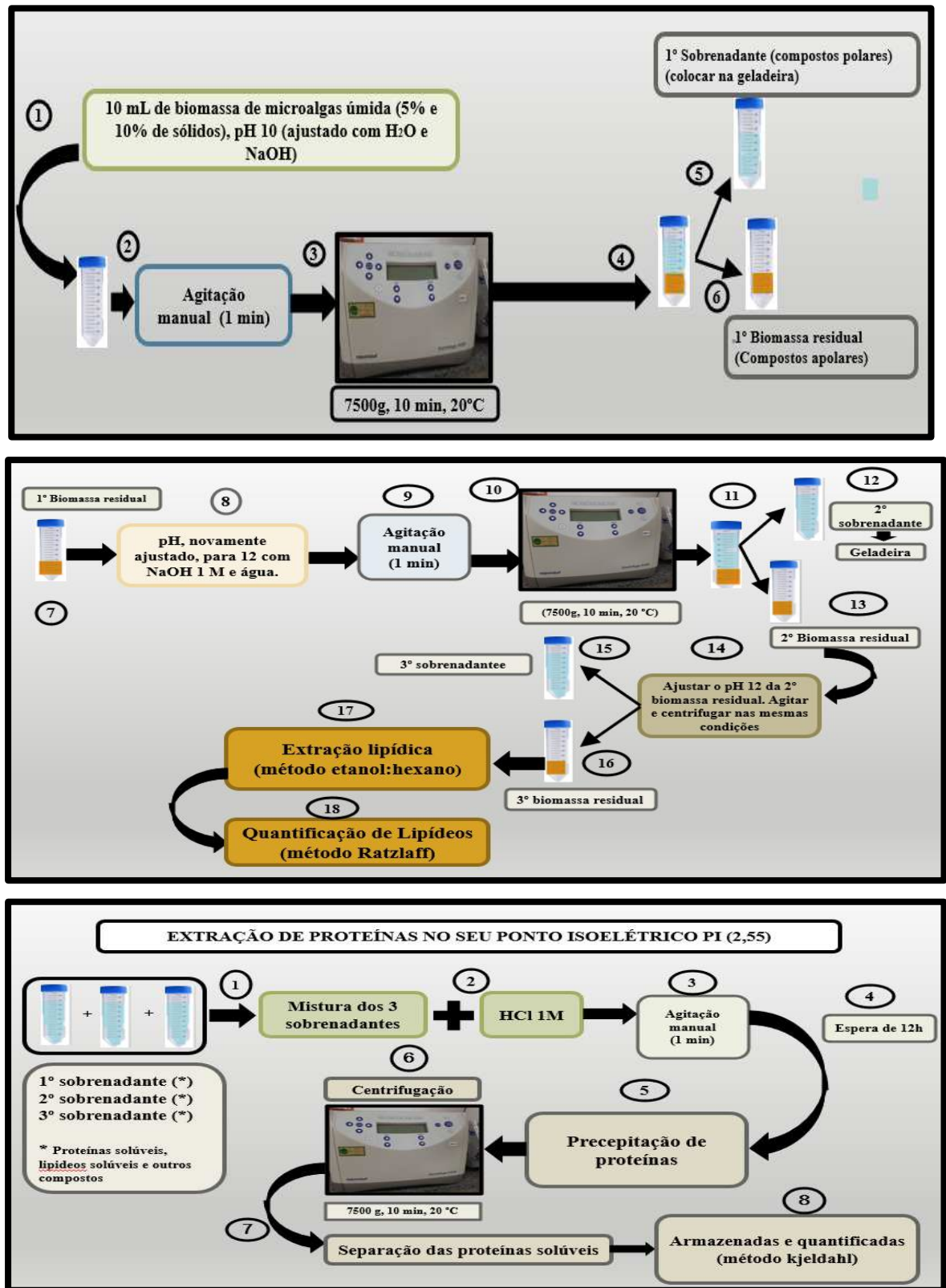
Fonte: foto própria

Figura 4. Fluxograma representativo do método de Folch associado à hidrólise ácida



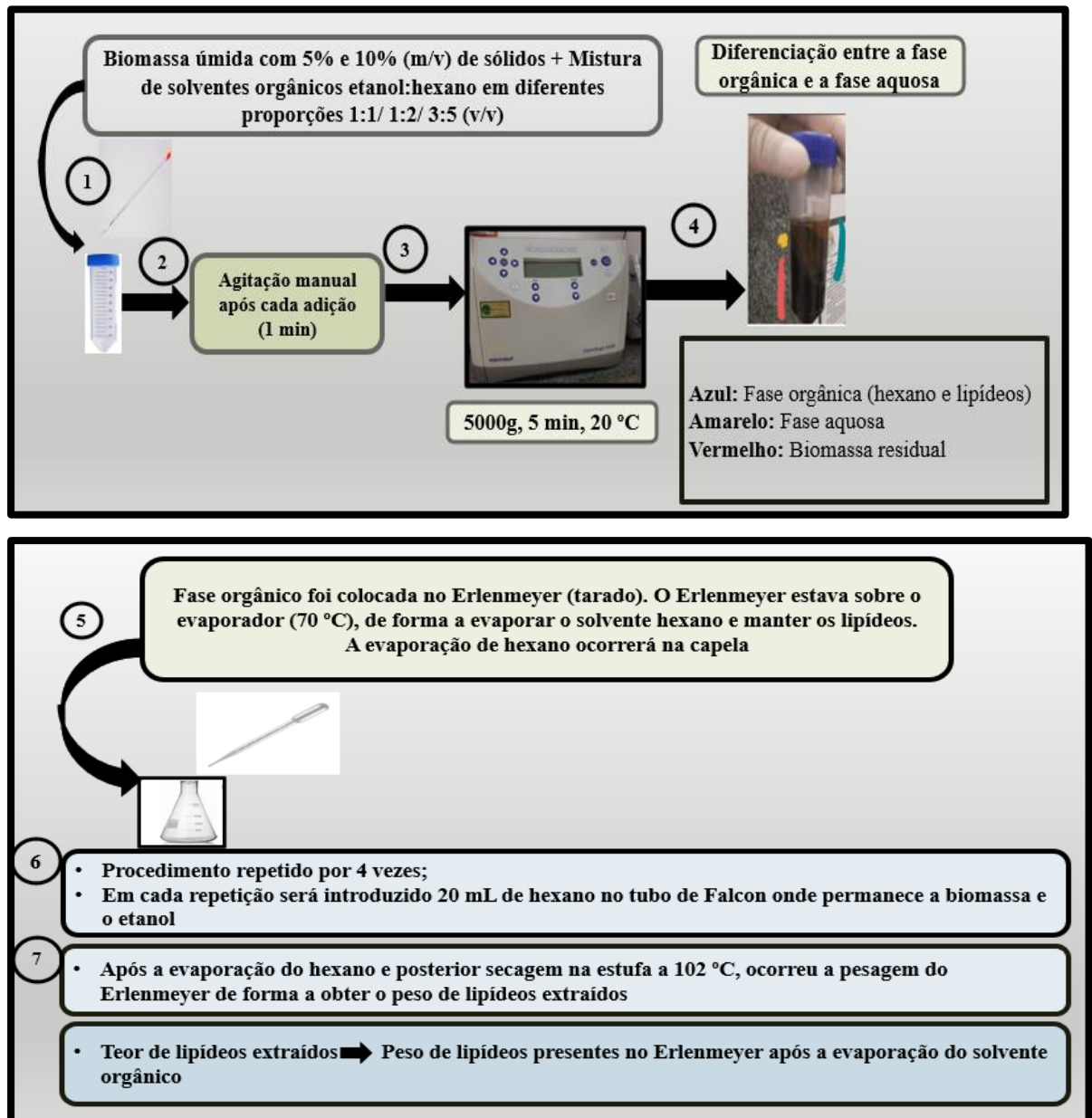
Fonte: próprio autor (2022)

Figura 5. Fluxograma representativo da extração de proteínas



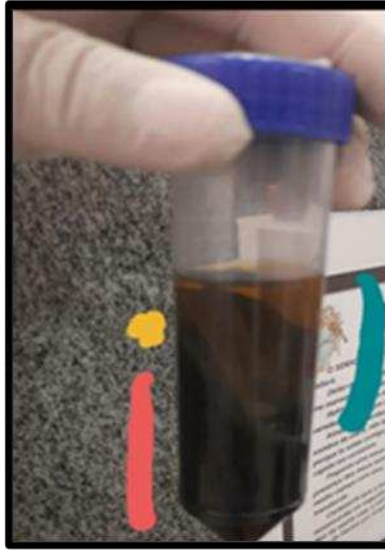
Fonte: próprio autor (2022)

Figura 6. Fluxograma representativo do processo extrativo de lipídios



Fonte: próprio autor (2022)

Figura 7. Tubo de Falcon após a centrifugação na extração lipídica (diferenciação de fases)



Fonte: foto própria

Legenda:

- Azul** ➔ Fase orgânica (hexano e lipídios)
- Amarelo** ➔ Fase aquosa
- Rosa** ➔ Biomassa residual

APÊNDICE B - Resultados experimentais

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão apresentados os resultados obtidos durante toda a execução experimental. A composição centesimal da microalga liofilizada e os resultados obtidos durante a extração de lipídios contendo diferentes concentrações de biomassa e utilizando diferentes proporções de solventes 1:1, 1:2 e 3:5 (etanol:hexano).

Tabela 1. Resultados experimentais obtidos na composição centesimal da microalga liofilizada *Tetrademus oblíquus*.

	% proteínas	% cinzas	% umidade	% lipídios	% carboidratos
% (g/100g)	40.64 ± 0.563	21.66 ± 0.11	6.01 ± 0.30	15.77 ± 1.09	15.85

Tabela 2. Resultados obtidos durante a extração de lipídios contendo diferentes concentrações de biomassa e utilizando a proporção de solventes 1:2 (etanol:hexano)

Concentração de microalgas Biomassa	Lipídios extraídos % (g/100 g)	% de lipídios extraídos em relação ao total de lipídios contidos na biomassa
5%	5.70 ± 0.63 ^a	36.14
10%	6.62 ± 0.28 ^a	41.98
36%	5.10 ± 0.37 ^a	32.34
100%	6.54 ± 0.68 ^a	41.47

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Teor de proteína na biomassa residual após extração de lipídios

	% Proteínas	
	SFE	CFE
Biomassa desproteinizada	6,73 ± 0,45 ^b	
Biomassa com proteínas	9,85 ± 0,19 ^a	8.02 ± 0.25 ^b (fase orgânica + Interfase emulsificada) 12.51 ± 0.5 ^a (fase aquosa + Interfase emulsificada)

SFE: sem formação de emulsificação; CFE: com formação de emulsificação no sistema interface; os dados são representados por média ± desvio padrão; Dados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Influência da desproteíntização da biomassa na extração de lipídios em diferentes proporções de sólidos e diferentes proporções de solventes

Etanol:hexano	Lipídios (%)			
	Biomassa desproteíntizada		Biomassa sem desproteíntização	
Proporção	5% Sd	10% Sd	5% Sd	10% Sd
1:1	3.48 ± 0.56 ^{bA}	3.37 ± 0.25 ^{bA}	3.25 ± 0.60 ^{bA}	3.49 ± 0.21 ^{bA}
1:2	5.01 ± 0.68 ^{aA}	4.55 ± 0.26 ^{aA}	4.97 ± 0.40 ^{aA}	4.91 ± 0.38 ^{aA}
3:5	5.15 ± 0.76 ^{aA}	4.82 ± 0.26 ^{bA}	4.87 ± 0.61 ^{aA}	4.91 ± 1.03 ^{aA}

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Espetroscopia de Infravermelho

Figura 8. Espectros de Infravermelho (FT-IR) da biomassa de microalgas *Tetradismus obliquus* rompida e não rompida, usada neste trabalho.

Figura 8.1. Amostra Rompida

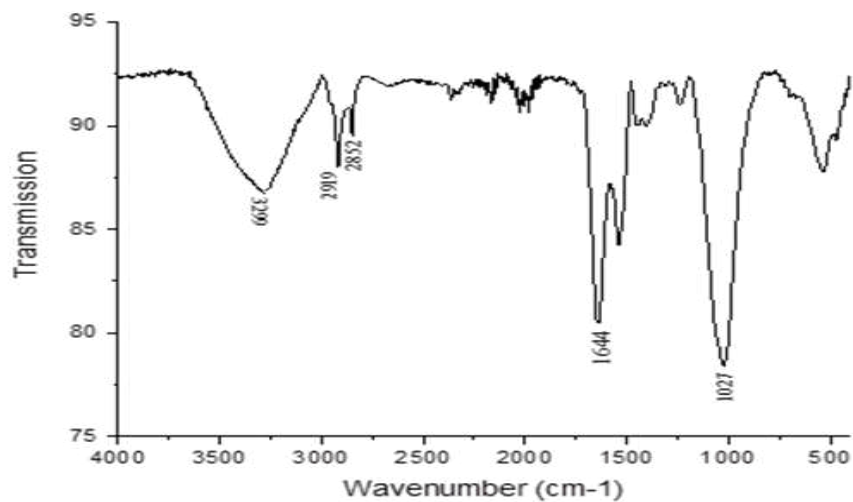


Figura 8.2. Amostra não rompida