

ANDRÉ LUIZ FIGUEIREDO NUNES

**ROMPIMENTO CELULAR, LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS
DA BIOMASSA DA MICROALGA *Tetrademus obliquus*: UMA ABORDAGEM
TEÓRICA**

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
Márcio Arêdes Martins
Eduardo Basílio de Oliveira

**VIÇOSA-MINAS GERAIS
2022**

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

T

N972r
2022

Nunes, André Luiz Figueiredo, 1992-
Rompimento celular, liofilização e extração de
biomoléculas das biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*:
uma abordagem teórica / André Luiz Figueiredo Nunes. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (80 f.): il.

Texto em português e inglês.

Inclui apêndice.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.516>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Microalgas. 2. Parede celular. 3. Biomassa. 4. Extração
(Química). 5. Secagem por congelação. 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. 579.8

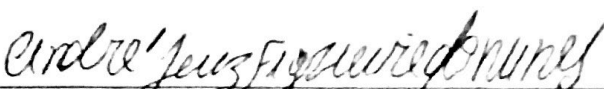
ANDRÉ LUIZ FIGUEIREDO NUNES

**ROMPIMENTO CELULAR, LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS
DA BIOMASSADA MICROALGA *Tetrademus obliquus*: UMA ABORDAGEM
TEÓRICA**


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: 29 de junho de 2022.

Assentimento:



André Luiz Figueiredo Nunes
Autor



Jane Sélia dos Reis Coimbra
Orientadora

*Dedico este trabalho a minha mãe e minha tia
e aos meus avós que sempre me auxiliam a todo
momento tornando a minha vida de grande felicidade*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder toda sabedoria, conhecimento, propósito para que fosse possível a execução deste trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa, pela admissão na pós-graduação, no qual durante o período de execução contribuiu fundamentalmente para o desenvolvimento acadêmico e profissional.

A minha orientadora, Prof.^a Jane Sélia dos Reis Coimbra, por todo auxílio e contribuição que tornaram plenamente possível a execução deste trabalho.

Aos meus coorientadores Prof. César Augusto Sodré da Silva e Prof. Márcio Aredes por todo auxílio e solicitude contribuindo para a execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão e fomento da bolsa referente ao projeto de pesquisa.

Ao LOP – (Laboratório de Operações e Processos) pela utilização e acesso.

Aos meus colegas de laboratório, por todo auxílio, contribuição e carinho que foram imprescindíveis em vários momentos difíceis.

A minha mãe Barbara de Fátima, que sempre me incentivou e colaborou de forma direta ou indireta para que eu me motivasse a fim de concluir todas as etapas durante o período de execução do mestrado.

A minha Tia Wilna, por todo apoio e auxílio.

Aos meus avós, por todo carinho, compreensão e auxílio que de forma indireta contribuíram para que a execução deste projeto fosse possível.

Aos meus amigos, alunos do LOP, e Danielle e José Roberto companheiros de várias horas sempre presentes nos momentos difíceis e alegres.

Aos meus amigos da minha cidade de Bom Jesus do Itabapoana-RJ, que contribuíram com conselhos e por todo carinho e compreensão de sempre.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que este projeto fosse possível.

*Nada na natureza se cria, nada se perde,
tudo se transforma*

(Lavoisier)

BIBLIOGRAFIA

ANDRÉ LUIZ FIGUEIREDO NUNES, filho de João Carlos Gatto Nunes e Bárbara de Fátima Figueiredo Nunes, nasceu em 10 de novembro de 1992, na cidade de Niterói, estado do Rio de Janeiro.

Graduou-se em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Instituto Federal Fluminense em Dezembro de 2019.

Em Março de 2020 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Bioprocessos.

RESUMO

NUNES, André Luiz Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Rompimento celular, liofilização e extração de biomoléculas da biomassa da microalga *Tetradismus obliquus*: uma abordagem teórica.** Orientadora: Jane Selia dos Reis Coimbra. Coorientadores: César Augusto Sodré da Silva, Márcio Arêdes Martins e Eduardo Basílio de Oliveira.

As microalgas são um grupo heterogêneo de organismos unicelulares fotossintetizantes encontrados nos mais diversos ecossistemas aquáticos, incluindo oceanos, lagoas, rios, poças de água e águas residuárias. As microalgas podem ser utilizadas como fonte de proteínas, pigmentos, carboidratos, lipídeos com inúmeras aplicações nutraceuticas, farmacológicas, alimentícias e na matriz energética para a produção de biocombustíveis, como biodiesel, etanol, metano, hidrogênio e bio-óleo. Entretanto, o acesso integral aos metabólitos microalgais pode ser dificultado pela localização no interior das células e pela presença da parede celular que é estruturalmente diversificada. Por essa razão se faz necessário o uso da operação unitária de rompimento celular, cujo objetivo é a ruptura da parede celular para permitir que o solvente e os metabólitos de interesse entrem em contato íntimo. O uso combinado das operações de rompimento celular e de secagem da biomassa tem por objetivo preparar a biomassa para a posterior extração dos metabólitos intracelulares. Estas duas operações unitárias compõem a primeira etapa do *downstream processing* da cadeia produtiva de derivados microalgais. Assim, no presente trabalho foi apresentada: (1) uma revisão de literatura acerca do rompimento celular de microalgas; e (2) uma abordagem teórica das operações de rompimento, secagem e extração de metabólitos da biomassa da microalga *Tetradismus obliquus*. A abordagem teórica abordou os balanços de massa referentes à extração de biocompostos da biomassa rompida e do rendimento das operações unitárias em quatro diferentes rotas metabólicas. A biomassa rompida foi avaliada em duas condições: úmida e seca.

Palavras-chave: Microalgas. Homogeneização. Liofilização. Rompimento celular. Extração.

ABSTRACT

NUNES, André Luiz Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Cell disruption, lyophilization, and biocompound extraction of the microalgae *Tetradismus obliquus* biomass: a theoretical approach.** Advisor: Jane Selia dos Reis Coimbra. Co-advisers: César Augusto Sodré da Silva, Marcio Arêdes Martins and Eduardo Basílio de Oliveira.

Microalgae are heterogeneous micro-groups of photosynthetic unicellular organisms found in the most diverse ecosystems, lagoons, and wastewater, including water, rivers, and wastewater oceans. Microalgae can be used as a source of proteins, pigments, carbohydrates, and lipids with numerous nutraceutical and food applications and in the energy matrix to produce biofuels, such as biodiesel, ethanol, methane, hydrogen, and bio-oil. However, full access to these biocompounds can be hampered by the structurally diverse and thick cell wall. For this reason, it is necessary to use cell disruption to allow intimate contact between the solvent and the target metabolite. The integrated use of cell disruption and biomass drying operations aims to prepare the biomass for the subsequent extraction of intracellular metabolites. These two unit operations compose the first stage of the downstream processing of the microalgal production chain. Thus, in the present work, it was studied: (1) a review of the literature on the cellular disruption of microalgae and (2) a theoretical approach to the operations of disruption, drying, and extraction of the biomass of the microalgae *Tetradismus obliquus*. The theoretical approach deals with the mass balances referring to wet and dry biomass and the efficiency of unit operations in four different metabolic pathways.

Keywords: Microalgae. Homogenization. Lyophilization. Cell rupture. Extraction.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1 – Cell disruption methods	23
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Obtenção/pré-tratamento da biomassa da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	51
Figura 2 – Tanque de produção da biomassa microalgal: a) vista frontal, b) vista lateral.	52
Figura 3 – Imagens de equipamentos utilizados na produção da biomassa: a) decantador, b) centrífuga utilizada para espessamento de lama microalgal.....	52
Figura 4 – Imagens de equipamentos utilizados no processamento da biomassa: a) homogeneizador à alta pressão, b) liofilizador.	53
Figura 5 – Fluxograma representativo dos processos extrativos para obtenção de biocompostos da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	54
Figura 6 – Esquematização das etapas relacionadas com os balanços de massa.	57

APÊNDICE A

Figura A 1 – Fluxograma do balanço de materiais da etapa de cultivo da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	78
Figura A 2 – Fluxograma do balanço de materiais das etapas relativas ao processo de upstream da biomassa da biomassa <i>Tetradismus obliquus</i>	79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 – Chemical Composition of different microalgal species.	20
Table 2 – Mechanical techniques of microalgae cell disruption.	24
Table 3 – Non-mechanical rupture techniques.	30

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Componentes utilizados no cultivo/obtenção da microalga <i>Tetradismus obliquus</i> *.	50
Tabela 2 – Balanço de materiais para os processos de homogeneização e secagem por liofilização da biomassa da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	61
Tabela 3 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de pigmentos utilizando a biomassa úmida.	62
Tabela 4 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de lipídeos da biomassa úmida.	63
Tabela 5 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de proteínas e carboidratos da biomassa úmida.	64
Tabela 6 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de pigmentos utilizando a biomassa seca.....	65
Tabela 7 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de lipídeos da biomassa seca.	66
Tabela 8 – Balanço de materiais correspondente as etapas de extração de proteínas e carboidratos da biomassa seca.	67
Tabela 9 – Quantidade de insumos utilizados nas extrações dos biomcompostos de interesse.	68
Tabela 10 – Extratos obtidos durante as etapas de processamento da biomassa.....	69

APÊNDICE A

Tabela A 1 – Quantidade de insumos utilizados para o crescimento da biomassa da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	77
Tabela A 2 – Balanço de materiais das etapas de coleta da biomassa de <i>Tetradismus obliquus</i>	80

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
REFERÊNCIAS	14
OBJETIVO GERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO 1 - CELL DISRUPTION OF MICROALGAE: ADVANCES AND PERSPECTIVES.....	17
1.1 Introduction.....	17
1.2 Microalgae	19
1.3 Microalgae cell disruption for the extraction of intracellular compounds	21
1.3.1 Mechanical methods	22
1.3.1.1 High-pressure homogenization (PAH)	24
1.3.1.2 Grinding.....	26
1.3.1.3 Ultrasonication.....	28
1.3.1.4 Microwave	29
1.3.2 Non-mechanical methods.....	30
1.3.2.1 Chemical methods.....	31
1.3.2.1.1 Surfactants	31
1.3.2.1.2 Acid treatment	32
1.3.2.2 Enzymatic methods.....	33
1.4 Conclusion	34
1.5 References.....	34
CAPÍTULO 2 - ROMPIMENTO CELULAR, LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DA BIOMASSA DA MICROALGA TETRADESMUS OBLIQUUS: UMA ABORDAGEM TEÓRICA.....	44
2.1 Introdução	45
2.2 Revisão de literatura	46
2.2.1 Homogenização	46
2.2.2 Liofilização	47
2.2.3 Centrifugação.....	47
2.2.4 Precipitação Isoelétrica.....	48
2.3 Material e métodos.....	49
2.3.1 Obtenção de dados para o cálculo dos balanços de massa.....	49

2.3.2 Dados para a etapa de cultivo	49
2.3.3 Rompimento celular e secagem por liofilização	52
2.3.4 Extração de pigmentos	55
2.3.5 Extração de Lipídeos	55
2.3.6 Precipitação de Proteínas	55
2.3.7 Extração de Carboidratos	56
2.3.8 Balanços materiais	56
2.4 Resultados e discussão	58
2.4.1 Obtenção de biomassa	58
2.4.2 Rompimento Celular e Liofilização	59
2.4.3 Extração de Biocompostos	61
2.4.3.1 Extração de Biocompostos por Via Úmida	61
2.4.3.2 Extração biomassa seca	64
2.4.4 Rendimentos da extração dos biocompostos da biomassa	68
2.5 Conclusões	70
2.6 Referências	70
APÊNDICE A	77

INTRODUÇÃO

Desde a década de 1990, existe uma crescente preocupação com o emprego de combustíveis que contribuam para a redução da emissão de CO₂, um dos gases responsáveis pelo efeito estufa, e conseqüentemente, com atuação no aumento das temperaturas em escala global. Nesse sentido, as microalgas se tornaram objeto de pesquisa devido à sua capacidade de sintetizar compostos bastante diversificados com inúmeras aplicações e principalmente capacidade de fixação de CO₂.

As microalgas requerem menores extensões de áreas cultiváveis do que matérias-primas de origem vegetal e animal, tais como oleaginosas, cereais, bovinocultura, dentre outras (HALIN et al., 2011). As microalgas formam um grupo heterogêneo e diversificado de organismos fotossintetizantes, com biomassa cultivável que pode ser modificada de acordo com as condições de cultivo, características ambientais, entre outros fatores; apresentam composição da biomassa variável, porém geralmente a maior parte das espécies acumula cerca de 10 % a 17 % de carboidratos, 12 % a 14 % de lipídeos e 50 % a 56 % de proteínas, embora esses valores se modifiquem de acordo com a espécie e condições de cultivo (JUAREZ et al., 2016; LUBIANA, 2014).

Taxonomicamente, esses organismos são classificados de acordo com a pigmentação pertencendo às classes: *Rhodophyta* (algas vermelhas), *Phaeophyta* (algas marrons), *Chlorophyta* (algas verdes); já em relação ao tamanho essas são distribuídas nos seguintes grupos: macroalgas que são espécies multicelulares visíveis a olho nu, enquanto que as microalgas são seres unicelulares eucariotas, no qual se encontra a classe das algas verdes (DAS et al., 2011).

Dentre as diferentes linhagens, a microalga *Tetradismus obliquus* pertence à classe das algas verdes (*Chlorophyta*), possui apreciáveis quantidades de lipídeos, proteínas, vitaminas, pigmentos tornando sua biomassa propícia para distintas aplicações. A microalga *Tetradismus obliquus* tem potencial biotecnológico voltado para produção de biocombustíveis, como o bioetanol, e é facilmente cultivada o que permite um maior aproveitamento de seus produtos metabólicos (TU et al., 2015).

Uma biorefinaria de microalgas é uma unidade onde ocorre um conjunto de operações, geralmente de separação, cuja objetivo é a obtenção de produtos de valor agregado e sua subsequente conversão em derivados químicos e energéticos. Tal conceito é semelhante a uma refinaria atual. O biorefinamento é classificado como primário ou secundário. O biorefinamento primário inclui as etapas de obtenção, pré-tratamento e extração de biomoléculas de interesse, já o biorefinamento secundário compreende a conversão dessas

biomoléculas em derivados comerciais de aplicação industrial não se limitando apenas ao segmento de biocombustíveis mais sim de fármacos, cosméticos, nutracêutico e alimentício. Por fim, a biorefinaria de microalgas envolve um encadeamento de conceitos de sustentabilidade, que quando aplicados de forma simultânea devem preferencialmente minimizar ou suprimir os impactos no meio ambiente (ZHU, 2015; ROMERO-GARCÍA, 2014; JUNG, 2013).

No presente trabalho é apresentada uma revisão de literatura acerca das técnicas de rompimento celular de microalgas e uma abordagem teórica das operações de rompimento e secagem da biomassa celular integral da microalga *Tetradismus obliquus*. Esta abordagem envolve os balanços de massa das operações unitárias para a obtenção da biomassa rompida seca, o rendimento, os equipamentos e o princípio de funcionamento de cada um deles visando dar subsídios para a construção de uma biorrefinaria. O capítulo 1 trata dos avanços e das perspectivas relativos ao rompimento celular de microalgas. O capítulo 2 trata da abordagem teórica do rompimento celular, liofilização e extração de biomoléculas da biomassa da microalga *Tetradismus obliquus*.

REFERÊNCIAS

DAS, P., AZIZ, S. S., OBBARD, J. P. Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. *Renew Energy*, v.36, n.9, p.2524-2528, 2011 <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.02.002>

HALIM, R. et al. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnology Advances*, v.30, n.3, p.709–32, Jan. 2012 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.001>

JUÁREZ, J. M. et al. Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, v.218, p.265-271, 2016 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.087>

JUNG, K. A. et al. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresource Technology*, v.135, p.182-190, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.025>

LUBIANA, K. M. F. Microalgas: ecologia, biodiversidade e importância. **IV Botânico Inverno**, July, 2014.

ROMERO-GARCÍA, J. M. et al. Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. **Bioresource Technology**, v.159, p.421–432, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.062>

SCHÜLER, L. M. et al. Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. **Algal Research**, v.25, n.1, p.263–273, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.025>

TU, R. et al. Effect of static magnetic field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater. **Water Research**, v.86, n.1, p.132-138, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.07.039>

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.41, p.1376– 1384, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.040>.

OBJETIVO GERAL

- Avaliar as operações unitárias de rompimento celular, liofilização e extração da biomassa da microalga *Tetradismus obliquus* visando o aumento da eficiência na extração de metabólitos intracelulares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar em termos de balanço de massa, as operações de rompimento celular, liofilização e extração para o processamento da biomassa microalgal úmida para obtenção de quatro diferentes metabólitos intracelulares;
- Avaliar em termos de balanço de massa, as operações de rompimento celular, liofilização e extração para o processamento da biomassa microalgal seca para obtenção de quatro diferentes metabólitos intracelulares.

CAPÍTULO 1 - CELL DISRUPTION OF MICROALGAE: ADVANCES AND PERSPECTIVES

ABSTRACT

Microalgae are organisms whose biomass contains different biomolecules, such as carbohydrates, lipids, proteins, pigments, vitamins, minerals, and antioxidant compounds, with numerous industrial applications, highlighting the biofuel, nutritional, cosmetic, and pharmacological segments. However, access to these biomolecules in an integrated manner is often hampered due to the structural rigidity of their cell wall, requiring the application of a pre-treatment that promotes cell lysis. Various cell rupture techniques applicable to microalgae biomass have been reported, which may be mechanical, especially ball milling techniques and high-pressure homogenization (PAH), or non-mechanical like chemical, thermal, and enzymatic procedures, each with advantages and disadvantages. Thus, this review aims to address the different methods of cell disruption, listing their advantages and disadvantages, applications in cell biomass, and challenges. **Key words:** Homogenization, grinding, enzymes, chemical methods, mechanical and non-mechanical methods.

1.1 INTRODUCTION

The search for new food sources is a challenge in food and nutrition segments when considering the United Nations global population projection of approximately 9.7 billion people in 2050; in this sense, a consequence of the population growth will be an increase in demand for food of approximately 70% in the next 30 years (UNITED NATIONS, 2019).

Associated with this challenge, the interest in sustainable and organic technologies for obtaining human foods supports scientific investigation on systems capable of producing large quantities of food materials. Thus, the growth of the world population will undoubtedly increase the demand for foods rich in macronutrients and micronutrients, whether of animal or plant origin; in this context, microalgae stand out among plant sources.

It is estimated that microalgae are responsible for producing 50% oxygen and the fixation of 50% carbon dioxide on the planet. The microalgae are classified according to the type of pigmentation, life cycle, morphology, and cell structure. They have a great

diversity of species, with more than 40,000 identified among the estimated 100,000 species (HU et al., 2008).

Microalgae are considered clean and sustainable sources of biocompounds with potential for various industrial applications because they: (1) can be grown in a wide range of pH values, nutrient contents, and temperatures; (2) exhibit high productivity, up to 10 times higher than that of traditional crops; (3) are not affected by seasonality; (4) can recycle carbon dioxide from the atmosphere and thus minimize the associated environmental impacts; (5) are efficient in carbon capture, revealing the possibility of cultivation in humid terrestrial, seawater, brackish or residual environments without the demand for the use of agricultural land (GROSSMANN et al., 2019).

The chemical composition of microalgae can be adjusted through different methods, conditions, and metabolic pathways permissible for cell growth because the metabolites synthesis is due to the primary and secondary metabolism of microalgae. This behavior makes microalgae an alternative source of food or supplements, given the presence of lipids (12 to 51) %, protein (35 to 60) %, pigments (8 to 12) %, carbohydrates (17 to 25) %, minerals (5 to 25) % and other constituents (SILVA et al., 2021). However, the biochemical and metabolic compositions of most species are unknown.

The recovery of the intracellular target metabolites from the microalgal biomass is due to the action of the extracting agents, which must penetrate the breakdown cell walls; however, the resistance of the cell wall to the disruption is a barrier that hinders the efficient extraction of intracellular components and can interfere with the accuracy of the compound quantification (SCHÜLER et al., 2020). Therefore, it is necessary to use appropriate techniques to disrupt the cells, extract the metabolites from the disrupted biomass, and quantify and conserve the extracted compounds. This exposes the need to develop efficient cell wall disruption techniques (mechanical, chemical, and/or enzymatic) for the appropriate release of microalgae components. Another relevant fact is the need to complement studies on methods of extraction and quantification of metabolites with preparative and analytical techniques that preserve their characteristics, such as the use of green solvents and less aggressive extractive procedures (GRIFFITHS et al., 2010).

The commercial production of microalgae in Brazil is incipient since only a few companies produce microalgal biomass, emphasizing *Chlorella* and the cyanobacterium *Spirulina*. These companies deal with specific niches within the segments of human and animal

nutrition, cosmetics, and wastewater treatment (FIGUEIREDO et al., 2015).

There is no information on large-scale production to obtain biomass to extract bioactive compounds for other applications. Microalgae cultivation, biomass concentration, and biomass processing are the three major steps necessary for implementing a microalgae biorefinery (BHATTACHARYA & GOSWAMI, 2020). Thus, there is a need for research to develop and/or improve stages of production systems on a commercial scale, such as cell disruption, to offer new microalgae products and increase the number of commercially viable microalgae species. In this context, the present review evaluates cell disruption techniques for the subsequent extraction of intracellular constituents of microalgae, such as pigments, proteins, lipids, and carbohydrates.

1.2 MICROALGAE

Algae are photosynthetic, microscopic organisms with simple biological structures that can be unicellular (microalgae) or pluricellular (macroalgae) and whose cells have sizes between 2 μm and 200 μm . In general, macroalgae (DE SOUZA LEITE et al., 2020; TANG et al., 2020; HARUN et al., 2011): (a) are found attached to rocks and other aquatic structures; (b) are in free life and dispersed in humid terrestrial environments, marine, and riverine ecosystems, and wastewater; (c) grown in open systems (extensive and circular lagoons, raceway, tanks, and cascade arrangements), closed systems (tubular photobioreactors, flat plates, big bag systems, and columns), fermenters or hybrids systems, in batch, semicontinuous or continuous regimes, and with different cultivation modes; (d) can be harvested by chemical, physical or biological processes.

Three cultivation modes can be used and differ according to the types of energy and carbon sources used in cell growth. Cells require macro- and micronutrients, light energy, and carbon from CO_2 to accumulate metabolites in cellular components or storage materials in the autotrophic mode. The metabolite content ranges from 20% to 50% of the total biomass (CHISTI, 2008). In the heterotrophic mode, organic compounds are used as a source of energy and carbon to produce metabolites in the absence of light. In mixotrophic culture, cells use both autotrophic and heterotrophic growth pathways for metabolite production; the energy sources can be light, organic and inorganic compounds, and the carbon sources can be CO_2 and organic compounds (FRANCO et al., 2013).

Strategies to optimize culture conditions should consider facilitating cell disruption, minimizing water evaporation, reducing the possibility of contamination, favoring light absorption, and intensifying the production of the compound of interest, among others.

The industrial use of microalgal compounds also demands the development of appropriate techniques for cell disruption of biomass, concentration, extraction, quantification, and conservation of metabolites. The discrepant metabolite contents for the same microalgae specie, as shown in Table 1, allow us to infer the necessity of standardization of the stages of microalgae production and the quantification techniques of metabolites.

Table 1 – Chemical Composition of different microalgal species.

Species	Composition (% dry matter)			References
	Proteins	Lipids	Carbohydrates	
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17	MARTINS et al. (2010)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26	GOUVEIA et al. (2008)
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32	GOUVEIA et al. (2008)
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	22-38	14-18	BRUTON (2009) GOUVEIA et al. (2008)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	15	27	BATISTA et al. (2007)
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	9-14	40-57	BRUTON (2009) GOUVEIA et al. (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17	SPOLAORE et al. (2006) CAI et al. (2013)
<i>Scenedesmusdimorphus</i>	8-18	16-40	21-52	BRUTON (2009) GOUVEIA et al. (2008)
<i>Scenedesmusquadricauda</i>	47	1-9	21-52	BRUTON (2009)

Regarding the composition of the microalgae, the lipid content is quite variable; some species, such as *Chlorella sp.*, *Botryococcus braunii*, *Nannochlorophysis sp.*, *Neochloris oleobundas*, and *Dunaliella salina sp.*, tend to accumulate a greater amount of lipids and polyunsaturated fatty acids (arachidonic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid, among others) (HOSSAIN & MAHLIA, 2019).

Distinct species contain proteins with a diversity of amino acids, such as aspartopane, lysine, leucine, and arginine (*Porphyridium aeruginum*), arginine (*Tetraselmis chuii*), and leucine (*Nannochlorophysis granulata*) (TIBBETTS et al., 2015). Microalgal carbohydrates are found intracellularly, mainly in the form of cellulose and starch, which can perform a variety of biological functions. They are classified into three groups: energy reserve polysaccharides, structural polysaccharides and those responsible

for cellular communication. *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis sp.*, *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium purpureum*, *Chlorella sp.*, and *Rodella rediculata* are the most used species to collect carbohydrates (HOSSAIN & MAHLIA, 2019; PIGNOLET et al., 2013).

Microalgae also have vitamins, minerals, antioxidants (phenolic compounds and tocopherols), chlorophyll, carotenoids (astaxanthin, beta-carotene, canthaxanthin, and lutein), xanthophyll and phycobilin (phycobiliprotein) classes (CANELI et al., 2022).

The viability of commercial use of microalgal biomass as a source of metabolites and bioactive compounds is also associated with efficient and low-cost cell disruption techniques. This condition explains the need to develop or adapt efficient cell wall disruption techniques (mechanical, chemical and/or enzymatic) for the appropriate release of microalgae components.

1.3 MICROALGAE CELL DISRUPTION FOR THE EXTRACTION OF INTRACELLULAR COMPOUNDS

The cell disruption of microalgae is considered a critical step in the processing of algal macromolecules (CARULLO et al., 2022; GÜNERKEN et al., 2015) because it allows the access of extraction agents to metabolic contents such as carbohydrates, proteins, lipids, vitamins, and other minor compounds. Cell wall thickness and chemical composition have been identified as the most significant factors determining the cell wall strength. The differences in the chemical composition, structure, and thickness of the cell walls confer unique features regarding the cell wall strength of the microalgae species. The cell wall characteristics are also crucial in defining the most effective disruption methods. The methods of cell disruption can be divided into two categories: mechanical (MCM) and non-mechanical (N-MCM) (Lee et al., 2021). The latter category is subdivided into chemical, thermal and enzymatic disruption techniques (Figure 1). The combinations of at least two MCM techniques, two N-MCM techniques, or one MCM and one N-MCM technique can promote a high level of cell rupture.

The cell disruption methods subject the cells to mechanical or non-mechanical stresses or a mixture of the two techniques. The combination of techniques has been used to increase the efficiency and preservation of intracellular microalgal compounds.

Mechanical rupture methods are the most used because they completely disintegrate the cell wall and do not depend on the specific chemical composition of the microalgae wall. However, they require high energy consumption, and the equipment is expensive. Conversely, non-mechanical methods, such as chemical and enzymatic techniques, do not depend on high investments in equipment but rather on the characteristics of cell walls.

1.3.1 Mechanical methods

The most used mechanical methods are the application of high-pressure homogenization, grinding, ultrasonication, and microwaves (GOH et al., 2019). Table 2 shows some techniques for the mechanical cell disruption of different microalgal species. High-pressure homogenization and ball mills are cell rupture methods broadly cited in literature due to their high suitability for use on an industrial scale. These methods and the ultrasound and microwave techniques will be detailed below.

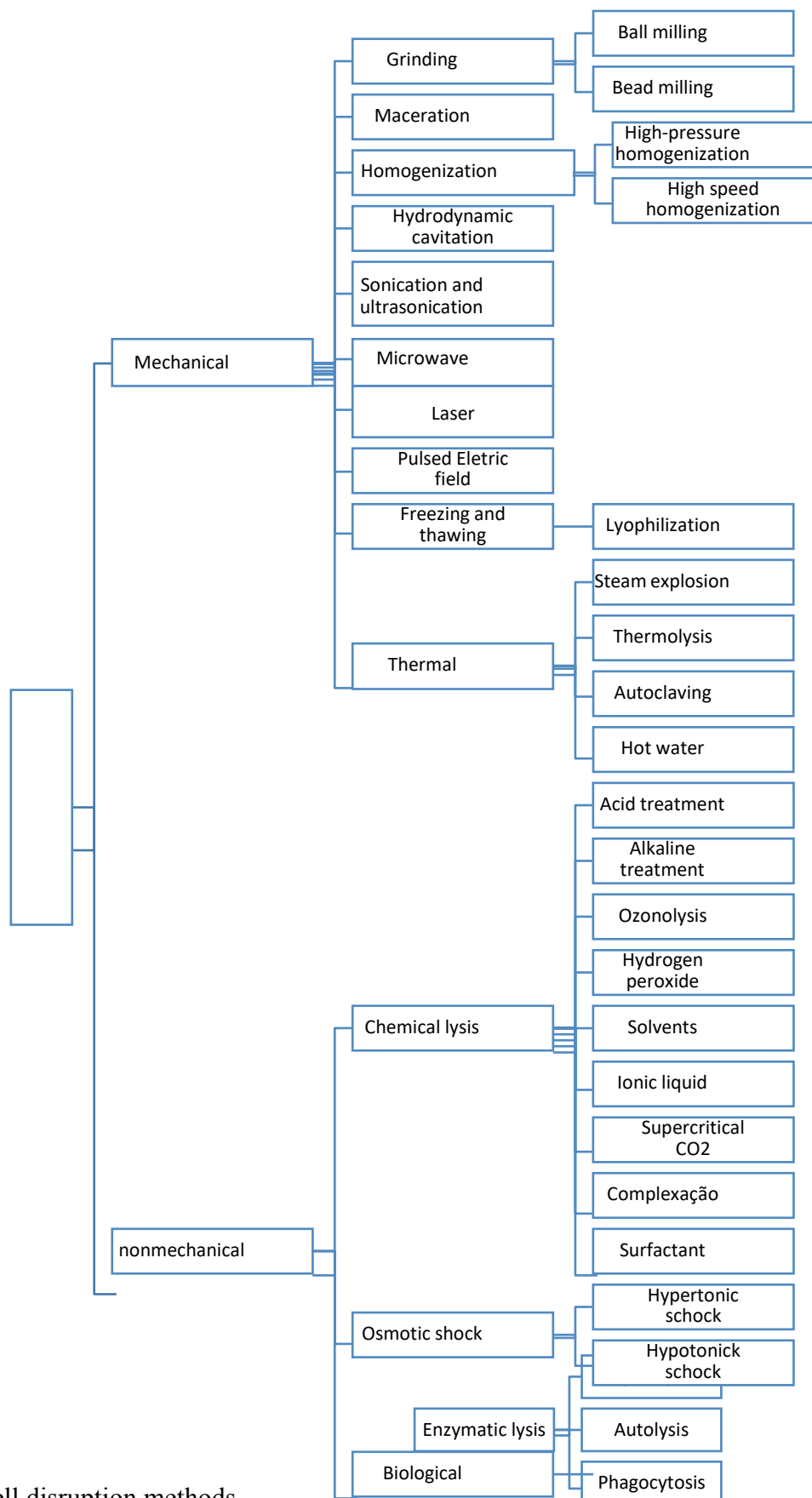


Figure 1 – Cell disruption methods

Table 2 – Mechanical techniques of microalgae cell disruption.

Rupture techniques	Species	Operating conditions	References
High-pressure homogenization	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nannochloropsis</i>	10% (m/v) biomass 180 MPa 22 °C	GROSSMANN et al., 2019
	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5% (m/m) oil/biomass 1000 bar 3 passes	EBERT et al., 2019
	<i>Chlorella vulgaris</i>	10% (m/v) biomass 150 MPa 9 passes	DAI et al., 2020
HPH* and alkaline treatment	<i>Chlorella vulgaris</i>	1.3% (m/v) biomass 1.5 Bar 25 °C	URSU et al., 2014
Grinding (ball mill)	<i>Tetraselmis sp.</i>	Flow rate: 1.5 L/min 30 min 20 °C	SCHWENZFEIER et al., 2011
	<i>Parachlorella kessleri</i>	Flow rate: 200 mL/min 20 °C	RIVERA et al., 2018
	<i>Nannochloropsis oculata</i> <i>Porphyridium cruentum</i>	Flow rate: 48 to 200 mL/min Rotation speed: 8 m/s Ball diameter: 0.375 - 2.15 mm 20 °C	MONTALESCOT et al., 2015
Sonication	<i>Chlorella vulgaris</i>	20% amplitude 200 W 5 pulses/s: on and off 15 min	SANKARAN et al., 2018
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	60% amplitude 20 KHz 2 min	SILVA et al., 2021
Microwave	<i>Scenedesmus obliquus</i>	400 W 10 min warm-up 0.25 h extraction	ZHOU et al., 2019
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	600 W 8 min warm-up 3.5 h extraction	ONUMAEGBU et al., 2019
Hydrodynamic cavitation	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1% (m/v) solids 80% amplitude 90 min cavitation	WAGHMARE et al., 2019
Pulsed electric field	<i>Haematococcus pluvialis</i>	10 to 80 pulses 5 min 1 Hz	MARTÍNEZ et al., 2019
Thermal (autoclave)	<i>Synechocystis PCC 6803</i>	Autoclave: 15 min 121 °C (miminal)	SHENG. et al., 2012

*HPH: High-pressure homogenization

1.3.1.1 High-pressure homogenization (PAH)

Is a technique in which microalgae cells are subjected to shear stresses that promote the rupture of the cell wall structure, enabling the separation of intracellular compounds (ANGLES et al., 2017). Thus, in PAH, flow occurs, at high pressure, of a suspension on a

cylindrical and narrow annular section present in the homogenizer valve. This flow generates shear stresses in the particles present in the suspension, leading them to fractionate into smaller and more homogeneous particles (GUL et al., 2017).

PAH is a technique with potential for industrial application for cell rupture of microalgae due to its scalability, applicability in highly concentrated biomass, and efficacy in disaggregating rigid cell wall microalgal species (LEE et al., 2017). The efficiency of PAH cell disruption is high despite the need to use a high energy demand for disruption (SPIDEN et al., 2013).

High-pressure homogenization causes a nonselective release of intracellular constituents. It generates a high concentration of cellular residues, which can hinder the downstream separation steps and is accompanied by an undesirable increase in temperature for heat-sensitive extracts (such as enzymes, lipids, pigments, and proteins). The optimization of the cell disruption method by high-pressure homogenization is a differential to improve the operational conditions and greater recovery of biocomposites. Most studies on high-pressure homogenization for microalgae rupture were performed with homogenization pressures up to 1500 bar, requiring many homogenization passes for more rigid cell wall microalgae (GÜNERKEN et al., 2015).

According to BERNAERTS et al. (2019), the application of higher homogenization pressure, called ultra-high-pressure homogenization, can result in a more efficient rupture process by decreasing the number of homogenization passages. The ability to accurately evaluate and quantify the degree of rupture is essential to understanding the phenomenon of rupture by high-pressure homogenization.

YAP et al. (2015) evaluated the cell disruption of the microalgae *Nannochloropsis sp.* in a homogenizer with a single passage aiming to separate lipids from the biomass. Suspensions with solids concentrations of 0.25%, 2.5% and 25% (m/m) were used at pressures between 30 MPa and 150 MPa. The authors obtained lipid concentrations of up to 30% w/w and concluded that the lipid concentration did not significantly influence homogenization and that cell disruption is dependent on the pressure applied by homogenization.

ANGLES et al. (2017) evaluated the cell disruption of *Nannochloropsis sp.* and the physiological and structural changes in microalgae cells subjected to growth conditions in the presence and absence of nitrogen. The microalgae suspensions were homogenized with pressures between 100 MPa and 270 MPa. Under both cultivation conditions, the rupture rate increased with increasing applied pressure levels. The authors concluded that there were changes in the structural rigidity of the cell wall of the microalgae, which promoted changes in cell disruption and energy consumption of the process as a whole.

GROSSMANN et al. (2018) evaluated the number of passes in a high-pressure homogenizer necessary to promote the disruption of 4 distinct species of microalgae, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricorneratum*, and *Nannochloropsis*. The differences in the structure and composition of the cell walls of each of these species generated the following order of difficulty of rupture: *P. tricorneratum* < *C. sorokiniana* < *C. vulgaris* < *N. oceanica*. According to the authors, the cell wall of the genus *Chlorella*, for example, consists of a very rigid polymer matrix, which generates a high resistance of cells to rupture induced by high pressure. The *Nannochloropsis* cells showed the highest resistance due to the highly thick cell wall compared to the other species studied. The resistance of cells to mechanical stress is also related to composition since the cell is formed by multiple layers containing an extremely resistant aliphatic polymer in the outermost layer, the algenane. The cell wall of *P. tricorneratum* is very fragile because it contains small amounts of silica and breaks easily by intermediate mechanical stress due to the fusiform shape of its cells (EBERT et al., 2019; GROSSMANN et al., 2018). SERIVE et al. (2012) also reported that using a ball mill easily disrupted *P. tricorneratum* cells.

1.3.1.2 Grinding

Grinding is a very complex mechanical cell rupture technique. The purpose of this method is to promote cell lysis through shear forces from rotational movements caused by friction between the cells and the mill spheres (GONG & BASSI, 2016).

The beads' diameter and charge are crucial parameters of this disruption operation, which directly affect the efficacy of cell lysis. The most commonly used material is zinc, which is indicated for high-density spheres, whereas glass spheres are recommended for low-density materials. Zirconium is the most useful when the material of interest has a high viscosity, while glass beads are more suitable for materials with a lower viscosity (WANG et al., 2020; GUNERKEN et al., 2015).

Unlike other physical methods, such as ultrasonication and microwave irradiation, ball milling can be used in ruptures involving large amounts of microalgal cell biomass, which makes this technique economically viable compared to the others (GONG & BASSI, 2016).

SCHULLER et al. (2020) evaluated different methods of carotenoid extraction from the biomass of the microalgae *Tetraselmis* sp. *PC4*. The authors compared the effectiveness of mechanical rupture by ball milling in two situations: wet biomass and a lyophilized one. These protocols were applied to various solvents, such as acetone, methanol, and tetrahydrofuran (THF). In the present study, the authors concluded that the extraction method with tetrahydrofuran, assisted by the rupture with glass beads in wet biomass, was the one that best responded to the extractive treatments with a productivity of lutein of $(622 \pm 40) \mu\text{g. g}^{-1} \text{ DW}$ (aqueous dispersion) and $(618 \pm 32) \mu\text{g. g}^{-1} \text{ DW}$ (aqueous dispersion) of β -carotene.

The mechanical shocks between the cells are influenced by several parameters: ball density, ball weight, ball speed, and feed rate. These parameters are influenced by the equipment model and the industrial design of the grinding chamber or agitator. Therefore, it is essential to optimize these parameters, which are adaptable to the cell stiffness and viscosity of the microalgae to be worked, in addition to the adequate concentration of solids highly indicated to optimize the yield of this entire process (NEMER et al., 2021; MONTALESCOT et al., 2015).

In an experiment conducted by RIVERA et al. (2018), samples of the biomass of the microalgae *Parachlorella kessleri* were pumped from a feed tank to a grinding chamber with a capacity of 600 ml and glass beads with a diameter of 1.30 mm, a feed flow of 200 mL/ min and a rotation of 8 m/s⁻¹. Two biomass fractions were interrupted with 85% and 100% cell disruption levels, and the fraction corresponding to the lowest disruption level was obtained after three passes through the grinding chamber. In contrast, the fraction corresponding to 100% was obtained after five passages, with the outlet temperature of the suspension maintained at 20 °C. The study was to evaluate the composition and organization of the lipids after cell interruption of the biomass of the microalgae *P. kessleri*. The authors also stated that despite the increase in the lipid content, the grinding favored the increased release of amphiphilic molecules, increasing the possibility of emulsification.

LIU et al. (2022) evaluated the recovery of lipids and water-soluble compounds from the microalgae *Parachlorella Kessler*. Cell rupture was performed by ball milling, and this technique was coupled with membrane centrifugation and microfiltration to separate microalgal compounds. The authors studied the influence of the biomass type, operational parameters of grinding and centrifugation, and physicochemical aspects of the granules on the recovery of metabolites. The best treatment produced 23% (w/v) of the total lipids, 9% of sugars, and 8% of proteins.

1.3.1.3 Ultrasonication

Among the mechanical methods, sonication uses sound waves to propagate pressure fluctuations, induce cavitation and promote cell disruption. Since it does not involve high temperatures, it is a promising technique for extracting thermolabile compounds, as is the case for proteins. It is a suitable method for disrupting microalgae with a rigid cell wall, as in the case of *Chlorella sp.*, but it is not indicated for species with flexible walls (DO CARMO CESÁRIO et al., 2021; GOH et al., 2019).

The main mechanisms that involve cell rupture by the ultrasound technique are the formation of bubbles with high pressure and consequent cavitation. This cavitation promotes the formation of mechanical shock waves with high shear stresses (GERDE et al., 2012; GUNERKEN et al., 2015; LEE et al., 2017).

The increase of the power of ultrasound is a procedure to optimize the cell rupture because it will impact the bubble formation and lead to a drop in their internal pressure. The use of the sonication frequency is a variable fully correlated with the characteristics of the studied species; in addition, the use of low cell biomass concentrations (1.5 to 14 gL⁻¹) does not affect the efficacy of the rupture as a whole (WANG & YUAN, 2016; KUROKAWA et al., 2016; GERDE et al., 2012).

SAFI et al. (2015) evaluated the extraction of carotenoids in aqueous biomass. According to the authors, the hydrophilic compounds dissolved rapidly in the aqueous medium, while the hydrophobic compounds (carotenoids and chlorophyll) did not. According to them, this may have occurred due to the high resistance of the cell wall of the microalgae *Chlorella vulgaris*.

IDO et al. (2018) evaluated several solvent mixtures in an ultrasound-assisted extraction process. The study evaluated the operational parameters of resonance amplitude, n-hexane/isopropanol ratio, and reaction time, and the procedures were performed continuously (pulse-free mode). According to the authors, ultrasonication promoted cell lysis concomitantly with the mixture of n-hexane/isopropanol solvents, facilitating the extraction of nonpolar and polar lipids. Additionally, according to the authors, the lipid yield was 26.66 % under 50 µm resonance amplitude, solvent ratio 4:1 (v/v), and reaction time of 1.5 h. Finally, the authors stated that the extracted lipids have adequate parameters for biofuel processing.

1.3.1.4 Microwave

In microwave-assisted mechanical disruption, rapid and uniform heating of the microalgal system is inherent. Since this heating favors the extraction of lipids from microalgae and may reduce extraction time and energy consumption, it is a technique that has been tested for lipid extraction. Although both ultrasound and microwaves have advantages, they have difficulty extracting biocompounds from denser media, affecting the process's scalability (GOH et al., 2019).

During microwave heating, there is heat transfer from the outer medium to the inside of the cells. The presence of polar molecules such as water contributes to the cell absorbing energy very quickly, contributing to the internal pressure being sufficiently large to cause lysis in the cell, facilitating the release of components in the extraction solvent, especially lipids (TIGRINE- KORDJANI et al., 2011; ZHAI et al., 2009).

ONUMAEGBU et al. (2018) evaluated the extraction of lipids from *Scenedesmus quadricauda* microalgae interrupted by a microwave. According to the authors, microwave pre-treatment was effective in cell disruption and was directly linked to increased energy. Additionally, according to the authors, the efficacy of cell rupture seems to decrease after a specific time of application of the pre-treatment. Finally, according to the authors, the best lipid yield was obtained under the power conditions of 600 W, the heating time of 8 min, and the extraction time of 3.5 h.

ZHOU et al. (2019) evaluated the lipid optimization of the microwave-assisted *Scenedesmus obliquus* microalgae. In this methodology, the authors compared two extraction methods: the first with heating in a water bath and the second assisted by microwaving. The operational parameters described as ideal were as follows: temperature at 130 °C, extraction time 0.25 h, solvent ratio n-hexane/isopropanol (3:2), cosolvent/biomass phase ratio (50:1) in mL/g. According to the authors, microwave-assisted extraction, when compared to extraction by a water bath, recovered 88.25 % and 95.88 % of lipids and fatty acid methyl esters, respectively. Nevertheless, according to the authors, scanning microscopic analysis (SEM) indicated that cell rupture facilitated the penetration of the solvent in a synchronized manner.

1.3.2 Non-mechanical methods

Non-mechanical methods are classified as those that cause cell disruption through chemical products, enzymatic agents, or heat due to the promotion of changes in membrane permeability and cellular appearance.

Table 3 shows several techniques for non-mechanical cell disruption of different microalgal species.

Table 3 – Non-mechanical rupture techniques.

TECHNIQUE OF RUPTURE	SPECIES	OPERATIONAL CONDITIONS	REFERENCE
CHEMICAL	Acid	<i>Scenedesmus sp.</i>	CASTRO et al., 2015
		<i>Chlorella sp.</i>	
		<i>Ankistrodesmus sp.</i>	
		<i>Micromonas sp.</i>	DUONGBIA et al., 2019
		<i>Chlamydomonas sp.</i>	
		<i>Spirulina plantesis</i>	0.5 to 5.5 M H ₂ SO ₄ 30 to 120 min hydrolysis 25 to 100 °C
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	0.5 to 4.5 M HCL 3.2 to 16.8 min hydrolysis 56 to 84 °C	VECHIO et al., 2021
	Alkaline	<i>Chlorococcum infusionum</i>	HARUN et al., 2011
	Surfactant	<i>Nannochloropsis sp.</i>	WU et al., 2017
		<i>Chlorella sorokiniana sp.</i>	Surfactant concentration: 288.37 to 647 g/mol Surface charge: -49,9 to 61,5 mV *CMC: 0.2 to 14.4 mM
BIOLOGICAL	Enzymatic	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	ZHANG et al., 2020
		<i>Schizochytrium sp.</i>	1:10, biomass:hemicellulase ratio Reaction time: 48 h; 55 °C
	Enzymatic	<i>Chlorella vulgaris</i>	1.5·10 ⁻⁴ to 2·10 ⁻¹ mg/mL enzyme poll Reaction time: 24 h; 37 °C
OSMOTIC SHOCK	<i>Chaetoceros muelleri</i>	1:5, biomass:water ratio	GONZÁLES-GONZÁLES et al., 2021

*Critical micelle concentration; **Amount to catalyze the transformation of 1 µmol of substrate per minute.

1.3.2.1 Chemical methods

Among the chemical cell disruption techniques, organic solvents and acid agents stands out (WANG et al., 2016; SIERRA et al., 2017).

1.3.2.1.1 Surfactants

Chemical compounds such as solvents, acids, alkalis, hypochlorites, and detergents may interact with components present in the microalgal cell wall, promoting cell disruption. The use of chemical compounds compared to mechanical cell disruption techniques has the advantage of greater accessibility and lower acquisition cost; however, using chemical compounds in a nonrationalized manner generates environmental problems and the possibility of contamination because usable compounds are seldom classified as food-grade (WANG et al., 2020).

Within a context that includes the use of these components, surfactants are an economically and environmentally more viable alternative. This component is quite suitable for cell disruptions when the harvesting conditions of the microalgal feedstock are unfavorable. In addition, surfactants can be used in large-scale production, unlike acids and some organic solvents. The mechanism of action of a surfactant is guided by the fact that it interacts with phospholipids located in the cell membrane, promoting rupture and synchronously facilitating the release of biomolecules with high added value (HUANG & KIM, 2013).

TAGHAVIJELOUDAR et al. (2021) evaluated the effect of different surfactants on the harvest and extraction of exo-polysaccharides from the microalgae *Chlorella sorokiniana* sp. with pH adjustment to optimize the flocculation operation. According to the authors, the non-ionic surfactant Triton X-100 optimized the extraction of EPS (exo-polysaccharides) from the microalgal biomass. Nevertheless, according to the authors, pH adjustment reduced the flocculant concentrations from 400 mg/L to 50 mg/L. In addition, all surfactants used were efficient in releasing EPS from microalgae. The order of release efficiency of these metabolites was as follows: triton X-100 > SDS > CTAB > DTAB, where triton X-100 and SDS represent non-ionic and anionic surfactants, respectively, whereas the CTAB and DTAB surfactants correspond to cationic surfactants.

In the study developed by LAI et al. (2018), the recovery of lipids and pigments from the microalgae *Synechocystis* sp PCC 6803, a cyanobacterium, was evaluated. According to the authors, the cationic surfactant hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) was more effective in breaking down microalgae cells in the present experiment and recovering the pigments, whereas dodecyl trimethylammonium bromide (DTAB) was more effective in

recovering lipids. Additionally, according to the authors, the number of carbons of the alkyl group CTAB > DTAB significantly influenced the extraction efficiency of the desired metabolites; therefore, the concentration and type of surfactant used should be specifically directed to the biomolecule of interest.

1.3.2.1.2 Acid treatment

Acid treatment can be performed with organic acids with less toxicity and greater biodegradability than inorganic acids and ionic liquids. The treatment causes a high release of cellular metabolites such as lipids, carbohydrates, and proteins (QURAIISHI et al., 2017; WANG et al., 2016), and compared to the enzymatic treatments, it has a lower cost and does not demand very specific costs and conditions in the process control.

Inorganic acids act as catalysts and, when used at lower temperatures and shorter reaction times, allow higher yields of carbohydrates, lipids, and proteins to be obtained. Temperatures between 110 and 150 °C and acid concentrations ranging from 1 to 1.5% (m/v) are operational conditions described as ideal in the literature (LEE et al., 2014; LEE & HAN, 2015). Moreover, the operational conditions must be adapted following the biomolecule of interest. Their concentrations can be adjusted as a function of the time and temperature of the process to avoid the degradation of some biomolecules, especially pigments, antioxidants, and proteins (NITSO et al., 2020). In general, treatment with dilute acid is an up-and-coming and effective alternative for the recovery of lipids and carbohydrates from microalgae.

WANG et al. (2016) evaluated hydrochloric acid and formic acid in the disruption of *Chlorella protothecoides* cells for lipid extraction. The microalgae were treated with acids in an acid:dry biomass ratio (w/w) of 1.5:1 for hydrochloric acid and 6.4:1 for formic acid. The formic acid supplemented with small amounts of hydrochloric acid was able to disrupt the cells; however, individual formic acid did not disrupt the microalgae cells in aqueous suspensions.

RIZZA et al. (2017) evaluated the acid hydrolysis of *Desmodesmus sp.* to maximize sugar extraction efficiency for bioethanol production. The authors found that the optimal operational conditions were biomass concentrations of 10% (m/m), 2% H₂SO₄ (v/v), and heating at 120 °C for 30 min. Under these operating conditions, 95% of the total sugar content was released.

VECHIO et al. (2021) evaluated multiple parameters of cell rupture in wet biomass of the microalgae *Haematococcus pluvialis* followed by solid–liquid extraction, whose objective was the more effective recovery of the astaxanthin molecule. According to the authors, the highest recovery rates of astaxanthin (99 ± 0.48) corresponded to the treatment with the

following operational conditions: temperature (71 °C), hydrolysis time(min), and HCl 3.7 N. Nevertheless, according to the authors, despite the good recovery of astaxanthin through these experimental variations, it did not cause total cell rupture, allowing the solvent to penetrate only by microperforations present in the cell wall.

1.3.2.2 Enzymatic methods

Enzymatic hydrolysis is a non-mechanical disruption technique in which one of the main advantages is the sustainability of the production of biological enzymes. However, the efficiency of hydrolysis with individual enzymes is low, requiring enzymatic blends. In addition, the mechanisms of cell disruption of microalgal biomass need to be studied in depth because studies on cell disruption from enzymes are centered on the effect of process conditions, enzyme amount, temperature, and pH on the efficiency of disruption. Using a pool of enzymes, xylanase, pectinase, snailase, lysozyme, and trypsin, promoted greater hydrolysis than the individual use of the enzymes (ZHANG et al., 2022; MALAKAR et al., 2020).

ZHANG et al. (2020) obtained biomass collected from the microalgae *Chlorella pyrenoidosa* subjected to interruption utilizing the cellulase enzyme. In this study, the authors also used hydrolyzed biomass as a carbon source for the mixotrophic cultivation of different microalgal species. According to the authors, the yields of lipids (16.89 % to 23.65 %) and proteins (32.30%-42.16%) in dry biomass improved considerably. The degree of unsaturation of the fatty acids was adequate for biodiesel production, and the protein profile in the biomass composition also increased. Finally, the authors point out that using hydrolysate as a carbon source is economically viable in waste use in microalgae.

SOUZA et al. (2020) evaluated different cell disruption methods in the dry biomass of the microalgae *Chlorella sorokiniana*, one of which was the enzymatic rupture. The use of the cellulase enzyme was not effective in cell disruption and did not contribute to the increase in the starch content. However, the authors found a higher release of biocompounds by combining vibratory grinding and enzyme procedures. Thus, enzymatic disruption needs a pre-treatment to optimize the rupture or an enzyme pool to enhance the efficiency.

ZHANG et al. (2022) studied the combination of different enzymes in the pre-treatment of the *Scenedesmus obliquus* for a more effective recovery of lipids. The best treatment corresponded to the combination (mg of enzyme/g of dry biomass) pectinase

(10 mg/g⁻¹), cellulase (20 mg/g⁻¹), and xylanase (14 mg/g⁻¹). The microscopic scanning tests the enzymes' action in trilaminar layers of the cell wall in the sequence: pectinase, cellulose, and hemicellulose. The authors concluded that enzymatic hydrolysis is an effective disruption technique to recover lipids from microalgae.

1.4 CONCLUSION

Microalgae have many biomolecules that perform numerous biological functions; however, integral access to these components is limited due to the rigid nature of their cell walls. Among the mechanical methods, the ball milling technique was promising mainly due to its better efficacy and possibility of use in larger production scales, which implies a lower energy demand when compared to other mechanical rupture techniques. In turn, non-mechanical non-mechanical methods, although less costly, toxicity and degradability in thermolabile compounds are some reasons for decreasing the use of these compounds in cell disruption. In general, economically and environmentally, the most viable alternative is to promote the extraction of microalgae biomolecules by mechanical rupture techniques, especially ball milling, which has shown promise compared to other mechanical rupture techniques.

1.5 REFERENCES

ANGLES, E. et al. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis sp.* disruption, physiological effects and solvent screening. **Algal Research**, v.21, p.27–34, 2017. doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.005.

BATISTA AP et al. Microalgae biomass - a potential ingredient for the food industry. IN: EFFOST/EHED **Joint Conference**. Lisbon, Portugal, 2007.

BERNAERTS, T. M. et al. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. **Biotechnology Advances**, v.37, n.8, e107419, 2019. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107419.

BHATTACHARYA, M.; GOSWAMI, S. Microalgae – A green multiproduct biorefinery for future industrial prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.25, 2020. doi.org/101580. 10.1016/j.bcab.2020.101580.

ANGLES, E. et al. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis sp.* disruption, physiological effects and solvent screening. **Algal Research**, v.21, p.27–34, 2017. doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.005.

BATISTA AP et al. Microalgae biomass - a potential ingredient for the food industry. IN: EFFOST/EHED **Joint Conference**. Lisbon, Portugal, 2007.

BERNAERTS, T. M. et al. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. **Biotechnology Advances**, v.37, n.8, e107419, 2019. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107419.

BHATTACHARYA, M.; GOSWAMI, S. Microalgae – A green multiproduct biorefinery for future industrial prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.25, 1015-1080, 2020. doi.org/101580. 10.1016/j.bcab.2020.101580.

BRUTON T. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. Ireland: **Sustainable Energy Ireland**. Dublin: 2009, Chapter.1, p.1-88.

CAI, T. et al. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.19, p.360–369, 2013. doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030.

CANELLI, G. et al. Tailored enzymatic treatment of *Chlorella vulgaris* cell wall leads to effective disruption while preserving oxidative stability. **LWT**, v.143, e111157, 2021. doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111157.

CASTRO, A. Y. et al. Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation. **Applied Energy**, v.140,n.15,p.14-19,2015. doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.045.

CARULLO, D. et al. Application of pulsed electric fields and high-pressure homogenization in biorefinery cascade of *C. vulgaris* microalgae. **Foods**, v.11, p.1-16, 2022. doi.org/10.3390/foods11030471.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v.26,n.3, p.126–131, 2008. doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002.

DAI, L. et al. Emulsifying properties of acid-hydrolyzed insoluble protein fraction from *Chlorella protothecoides*: Formation and storage stability of emulsions. **Food Hydrocolloid**, v.108, e105954, 2020. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105954.

DE SOUZA LEITE, L. et al. Microalgae harvesting from wastewater by pH modulation and flotation: assessing and optimizing operational parameters. **Journal of Environmental Management**, v.254, e109825, 2020. doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109825.

DO CARMO CESÁRIO, C. et al. Biochemical and morphological characterization of freshwater microalga *Tetrademus obliquus* (Chlorophyta: Chlorophyceae). **Protoplasma**, p.1-12, 2021. doi.org/10.1007/s00709-021-01712-3.

DUONGBIA, N. et al. Acidic hydrolysis performance and hydrolyzed lipid characterizations of wet *Spirulina platensis*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v.9, p.305-319, 2019. doi.org/10.1007/s13399-018-0350-6.

EBERT, S. et al. Emulsifying properties of water-soluble proteins extracted from the microalgae: *Chlorella sorokiniana* and *Phaeodactylum tricorutum*. **Food & Function**, v.10, p.754–64, 2019. doi.org/10.1039/c8fo02197j.

FIGUEIREDO, F. et al. Life-cycle assessment of microalgae biodiesel: a review. In: ENERGY FOR SUSTAINABILITY 2015. **Sustainable Cities: Designing for People and the Planet**, Coimbra, Portugal, p.1-8, 2015.

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

GERDE, J. A. et al. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v.125, p.175–181, 2012. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.110.

GOH, B. H. H. et al. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.107, p.59–74, 2019. doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.012.

GONG, M., BASSI, A. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v.34, p.1396–1412, 2016. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005

GONZÁLES-GONZÁLES, L.M. et al. Osmotic shock pretreatment of *Chaetoceros muelleri* wet biomass enhanced solvent-free lipid extraction and biogas production. **Algal Research**, v.54, e10217, 2021. doi.org/10.1016/j.algal.2020.102177.

GOUVEIA L. et al. Microalgae in novel food product. In: KONSTANTINOS, N., PAPADOPOULOS, PP **Food Chemistry Research Developments**. New York, NY: Nova Science Publishers, Inc, 2008, Chapter.2, p.1-37.

GRIFFITHS, M. J. et al. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. **Lipids**, v.45, p.1053-60, 2010. doi.org/10.1007/s11745-010-3468-2.

GROSSMANN, L. et al. Production of protein-rich extracts from disrupted microalgae cells: Impact of solvent treatment and lyophilization. **Algal Research**, v.36, p.67–76, 2018. doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.011.

GROSSMANN, L. et al. Solubility of extracted proteins from *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricorutum*, and *Nannochloropsis oceanica*: Impact of pH-value. **LWT**, v.105, p.408–416, 2019. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.040.

GUL, O. et al. Effect of high pressure homogenization (HPH) on microstructure and rheological properties of hazelnut milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.41, p.411-420, 2017. doi.org/10.1016/j.ifset.2017.05.002.

GÜNERKEN, E. et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v.33, p.243–260, 2015. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008.

HAC ISA, M. C. et al. Effect of different cell disruption methods on lipid yield of *Schizochytrium sp.* **Journal of the American Oil Chemists` Society**, v.99, p. 129-139, 2021. doi.org/10.1002/aocs.12551.

HARUN, R., JASON, W. S. Y., CHERRINGTON, T., DANQUAH, M. K. 2011. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Applied Energy**, v.88, p.3464-3467, 2011. doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.10.048.

HOSSAIN, N.; MAHLIA, T. M. I. Progress in physicochemical parameters of microalgae cultivation for biofuel production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.39, n.6, p.835-859, 2019. doi.org/10.1080/07388551.2019.1624945.

HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v.54, n.4, p.621-39, 2008. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.

HUANG, W.; KIM, J. Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v.149, p.579–581, 2013. doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.095.

IDO, A. L. et al. Application of central composite design in the optimization of lipid yield from *Scenedesmus obliquus* microalgae by ultrasound-assisted solvent extraction. **Energy**, v.157, n.15, p.949-956, 2018. doi.org/10.1016/j.energy.2018.04.171.

KUROKAWA, M. et al. Effect of sonication frequency on the disruption of algae. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.31, p.157–162, 2016. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.12.011.

LAI, Y. S. et al. Cell disruption by cationic surfactants affects bioproduct recovery from *Synechocystis sp. PCC 6803*. **Algal Research**, v.34, p.250-255, 2018. doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.010.

LEE, S. Y. et al. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review.

Bioresource Technology, v.244, n.2, p.1317–1328, 2017.
doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038.

LEE, SY et al. Techniques of lipid extraction from microalgae for biofuel production: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v.19, p.231-251, 2021. doi.org/10.1007/s10311-020-01088-5.

LEE, I.; HAN, J-I. Hydrothermal-acid treatment for effectual extraction of eicosapentaenoic acid (EPA)-abundant lipids from *Nannochloropsis salina*. **Bioresource Technology**, v.191, p.1–6, 2015. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.124.

LIU, S. et al. Coupling bead-milling and microfiltration for the recovery of lipids and proteins from *Parachlorella kessleri*: Impact of the cell disruption conditions on the separation performances. **Separation and Purification Technology**, v.287, n.15, e120570, 2022.
doi.org/10.1016/j.seppur.2022.120570.

MALAKAR, B. et al. Optimization of glucose yield from potato and sweet lime peel waste through different pre-treatment techniques along with enzyme assisted hydrolysis towards liquid biofuel. **Renewable Energy**, 145, p.2723-2732, 2020.
doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.037.

MARTÍNEZ, J. M. et al. Use of pulsed electric field permeabilization to extract astaxanthin from the nordic microalgae *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v.289, p. e121694, 2019. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121694.

MARTINS, A. et al. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.1, p.217–232, 2010.
doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020.

MONTALESCOT, V. et al. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: process modeling and application to *Porphyridium Cruentum* and *Nannochloropsis Oculata*. **Bioresource Technology**, v.196, p.339–346, 2015.
doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075.

NEMER, G. et al. Mechanical cell disruption technologies for the extraction of dyes and pigments from microorganisms: a review. **Fermentation**, v. 7, p.1-36, 2021. doi.org/10.3390/fermentation7010036.

ONUMAEGBU, C. et al. Modelling and optimization of wet microalgae *Scenedesmus quadricauda* lipid extraction using microwave pre-treatment method and response surface methodology. **Renewable Energy**, v.132, p.1323-1331, 2019.. doi.org/10.1016/j.renene.2018.09.008.

PIGNOLET, O. et al. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.400, p.781–796, 2013. doi.org/10.1007/s10295-013-1281-7.

QURAIISHI, K. S. et al. Ionic liquids toxicity on fresh water microalgae, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris* & *Botryococcus braunii*; selection criterion for use in atwo-phase partitioning bioreactor (TPPBR). **Chemosphere**, v.184, p. 642–651, 2017. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.037.

RIVERA, E. C. et al. Mechanical cell disruption of *Parachlorella kessleri* microalgae: impact on lipid fraction composition. **Bioresource Technology**, v.256, p.77–85, 2018. doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.148.

RIZZA, L. S. et al. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140–147, 2017. doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.021.

SAFI, C. et al. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. **Algal Research**, v.8, p.61–68, 2015. doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.002.

SANKARAN, R. et al. Extraction of proteins from microalgae using integrated method of sugaring-out assisted liquid biphasic flotation (LBF) and ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.48, p. 231–239, 2018. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.06.002.

SCHÜLER, L. M. et al. Improvement of carotenoid extraction from a recently isolated, robust microalga, *Tetraselmis Sp.* CTP4 (Chlorophyta). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.43,p.785–796,2020. doi.org/10.1007/s00449-019-02273-9.

SCHWENZFEIER, A. et al. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis sp.* **Bioresource Technology**, v.102, n.19, p. 9121–9127, 2011. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046.

SERIVE, B. et al. Selection and optimization of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v.124, p.311-320. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.105.

SHENG, J. et al. Disruption of *Synechocystis* PCC 6803 for lipid extraction. **Water Science and Technology**, v.65, p.567-73, 2012. doi.org/10.2166/wst.2012.879.

SILVA, M. E. T. et al. *Scenedesmus obliquus* protein concentrate: a sustainable alternative emulsifier for the food industry. **Algal Research**, v. 59, 2021. doi.org/10.1016/j.algal.2021.102468.

SIERRA, L. S. et al. Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. **Algal Research**, v. 25, p. 149–159, 2017. doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.004.

OUZA, M. F. et al. Effect of milling and enzymatic hydrolysis in the production of glucose from starch-rich *Chlorella sorokiniana* biomass. **Algal Research**, v.50, 2020. doi.org/10.1016/j.algal.2020.101961.

SPIDEN, E. M. et al. Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization. **Bioresource Technology**, v.140, p.165-71, 2013. doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.074.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.2, p.87–96, 2006. doi.org/10.1263/jbb.101.87.

TAGHAVIJELOUDAR, M. et al. Simultaneous harvesting and extracellular polymeric

substances extrusion of microalgae using surfactant: Promoting surfactant-assisted flocculation through pH adjustment. **Bioresource Technology**, v.319, 2021. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124224

TANG, Y. et al. Effects of live microalgae and algae powder on microbial community, survival, metamorphosis and digestive enzyme activity of *Penaeus monodon* larvae at different growth stages. **Aquaculture**, v. 526, n.15, 2020. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735344.

TIBBETTS, S. M. et al. Nutritional evaluation of whole and lipid-extracted biomass of the microalga *Scenedesmus sp.* AMDD isolated in Saskatchewan, Canada for animal feeds: proximate, amino acid, fatty acid, carotenoid and elemental composition. **Current Biotechnology**, v.4, p.530-546, 2015. doi.org/10.2174/2211550104666150827201854.

TIGRINE-KORDJANI, N. et al. Contribution of microwave accelerated distillation in the extraction of the essential oil of *Zygophyllum album* L. **Phytochemical Analysis**, v.22, n.1, p.1-9. 2022. doi.org/10.1002/pca.1236.

UNITED NATIONS. World population prospects: the 2019 revision, New York, United Nations Population Division. Available from: <https://population.un.org/wpp/>. Accessed: Mar. 29, 2022.

URSU, A. V. et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v.157, p.134–139, 2014. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071.

VECHIO, H. et al. A new approach on astaxanthin extraction via acid hydrolysis of wet *Haematococcus pluvialis* biomass. **Journal of Applied Phycology**, v.33, n.5, p. 2957-2966, 2021. doi.org/10.1007/s10811-021-02495.

WAGHMARE, A. et al. Hydrodynamic cavitation for energy efficient and scalable process of microalgae cell disruption. **Algal Research**., v.40, 2019. doi.org/10.1016/j.algal.2019.101496.

WANG, Y. et al. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 485–497, 2016. doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.106.

WANG, M.; YUAN, W. Modeling bubble dynamics and radical kinetics in ultrasound induced microalgal cell disruption. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.28, p.7-14, 2016. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.06.025.

WU, C. et al. Surfactants assist in lipid extraction from wet *Nannochloropsis sp.* **Bioresource Technology**, v.243, p.793-799, 2017. doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.010.

YAP, B. H. et al. Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenization. **Bioresource Technology**, v.184, p.280-285, 2015. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.049.

ZHAI, Y. et al. Microwave extraction of essential oils from dried fruits of *Illicium verum* Hook. F. and *Cuminum cyminum* L. using ionic liquid as the microwave absorption medium. **Journal of Separation Science**, v.32, n.20, p.3544-3549, 2009. doi.org/10.1002/jssc.200910204.

ZHANG, J. et al. Utilization of enzymatic cell disruption hydrolysate of *Chlorellapyrenoidosa* as potential carbon source in algae mixotrophic cultivation. **Algal Research**, v.45, e101730, 2020. doi.org/10.1016/j.algal.2019.101730.

ZHANG, Y. et al. Assessment of enzyme addition strategies on the enhancement of lipid yield from microalgae. **Biochemical Engineering Journal**, 177, 108-198, 2022. doi.org/10.1016/j.bej.2021.108198.

ZHOU, X. et al. Optimization of microwave assisted lipid extraction from microalga *Scenedesmus obliquus* grown on municipal wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v.221, n.1, p.502-508, 2019. doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.260.

CAPÍTULO 2 - ROMPIMENTO CELULAR, LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DA BIOMASSA DA MICROALGA TETRADESMUS OBLIQUUS: UMA ABORDAGEM TEÓRICA

RESUMO

As microalgas são organismos fotossintetizantes encontradas em abundância na natureza e compostas por biomoléculas de larga aplicação industrial. No presente estudo foram realizados os balanços materiais com dados obtidos da literatura para as etapas de ruptura celular (homogeneização a alta pressão), secagem por liofilização e extração das biomoléculas. Os balanços materiais foram conduzidos levando em consideração duas rotas distintas de processamento da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*: uma rota na qual a extração das biomoléculas foi realizada com a biomassa celular úmida, e outra rota em que a extração das biomoléculas foi realizada com biomassa celular liofilizada. Em uma escala piloto, a solução dos balanços materiais indicou que a água corresponde à principal perda (90% m/m) nas etapas de homogeneização a alta pressão e secagem por liofilização. Os protocolos de extração de pigmentos para a biomassa úmida demandaram um massa de etanol 10 vezes maior que a extração com biomassa seca. Nas extrações de lipídeos, proteínas e carboidratos não houve grande diferença na demanda de insumos para as duas rotas avaliadas. Os rendimentos de pigmentos e carboidratos foram maiores para a biomassa úmida. Observou-se que a secagem por liofilização da biomassa após a ruptura celular e antes da extração dos metabólitos afetou o teor dos metabólitos recuperados, possibilitando a extração de maiores massas de proteínas e lipídeos em relação a biomassa úmida.

Palavras chave: balanço de massa, rendimento, secagem

2.1 INTRODUÇÃO

As algas são organismos abundantes na natureza com capacidade para realizar a fotossíntese. São encontradas como macroalgas e microalgas nos mais diversos ecossistemas incluindo águas marítimas, fluviais e residuárias. As células das microalgas possuem um comprimento entre 2 μm e 200 μm (MENETREZ, 2012). A parede celular estratificada confere às microalgas uma complexa rigidez estrutural o que dificulta a extração de biocompostos. Assim, é necessário controlar diversos parâmetros envolvidos nas operações que abrangem o *dowstream processing* da microalga (SCHULLER et al., 2017).

A composição química das microalgas é variável entre as diversas espécies, sendo necessário ajustes nas rotas metabólicas para otimizar a produção de biomoléculas de interesse. De uma forma geral, as vias metabólicas são classificadas como: autotrófica, cuja o mecanismo é baseado na utilização de energia luminosa para conversão em carbono orgânico; heterotrófica, que ocorre em condições de ausência de energia luminosa; e mixotrófica, onde ocorre a participação de ambas vias metabólicas (SILVA, 2014).

A biomassa microalgal pode ser utilizada nos mais diversos segmentos industriais inclusive os setores alimentícios, nutricionais, farmacológicas e energético. Posto que as biomoléculas de interesse industrial (carboidratos, lipídeos, proteínas, pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados e algumas vitaminas) são encontradas intracelularmente é necessário o emprego da etapa de ruptura celular para a liberação delas, o que incorre em maior demanda energética, de custos e tempo.

As técnicas de ruptura celular são classificadas como de natureza mecânica ou não mecânica. Podem ser usadas tanto com a biomassa úmida quanto seca. O emprego da biomassa úmida reduz o impacto da demanda de energia e tempo (MENEZZO & FONSECA, 2019).

No presente capítulo é apresentado um fluxograma juntamente com os balanços de massa para quatro rotas extrativas de biocompostos microalgais. As extrações realizadas foram de proteínas, lipídeos, pigmentos e carboidratos. Os cálculos foram feitos tendo por base dados coletados da literatura para a espécie de microalga *Tetradismus obliquus*. A linha de processamento proposta foi composta pelas operações unitárias para ruptura celular (homogeneização a alta pressão), secagem (liofilização) e extração dos biocompostos com solventes da biomassa rompida. Foram usados dados da literatura para a extração de metabólitos da biomassa rompida em duas condições, a biomassa úmida e a seca. Assim, foram calculadas as demandas de insumos em cada linha de processamento e o rendimento dos metabólitos.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 Homogeneização

A homogeneização à alta pressão é uma operação unitária, onde uma dispersão de partículas é impulsionada com alta pressão por meio de uma cavidade estreita, e acelerada em uma curta distância, com alta velocidade ao encontro de uma barreira. A colisão com a barreira possibilita a formação de partículas de menor tamanho (BERK, 2018).

O homogenizador de alta pressão (HAP) é um equipamento projetado para funcionar em um ou dois estágios que possam restringir o fluxo do fluido de um determinado material de interesse. Os avanços recentes no design experimental do equipamento de homogeneização e o uso de materiais resistentes a alta pressão possibilitam a aplicação de pressões operacionais de até 400 MPa e elevadas temperaturas de até 140-150° C (BALASUBRAMANIAM et al., 2016; HATE, 2016; DUMAY et al., 2013; SEVENICH & MATHYS, 2018).

O mecanismo da homogeneização ocorre quando uma determinada suspensão é forçada a passar por um válvula que é regulada conforme a alta pressão para que posteriormente a suspensão seja direcionada a uma câmara de baixa pressão (NEMER et al., 2020). O design da válvula afeta diretamente o nível de pressão aplicada e as vazões em que o fluido escoar no interior do homogenizador, seja em escala laboratorial, piloto e industrial; o mesmo design e forma geométrica da válvulas é dimensionado para possibilitar inativação de microrganismos em estado vegetativo e formação de nanoemulsões alimentares (DUMAY et al., 2013; SEVENICH & MATHYS, 2018; DONSI et al., 2013; DONSI et al., 2012).

O mecanismo no qual a homogeneização rompe as células da biomassa microalgal em suspensão ocorre quando estas são submetidas a choques mecânicos induzidos por alta velocidade na superfície da válvula e tensão de cisalhamento provocada pela redução de pressão, entretanto o mecanismo relacionado a ocorrência da ruptura é atribuído a diversos fenômenos como cavitação, turbulência ou estresse HONDT et al. 2017; DONSI et al. 2009; KLEINIG et al., 1998; DIELS et al., 2006).

A técnica de homogeneização a alta pressão (HAP) em microalgas necessita de pressões de 20- 120 Mpa para ocorrência de turbulência, tensão de cisalhamento e atrito do fluido em escoamento. Embora esse método se mostre economicamente mais viável quanto a aplicabilidade em escala industrial existe a limitação na concentração de sólidos que podem ser utilizadas, podendo ocorrer a formação de detritos celulares (GUNERKEN et al., 2015; GOMES et al., 2020).

De acordo com Bernaets et al. (2019) mesmo uma redução efetiva no número de passes que o fluido circula pelo homogenizador não implica em redução do consumo energético.

2.2.2 Liofilização

Os parâmetros de secagem afetam consideravelmente as propriedades químicas da biomassa, entretanto possibilita maior prazo de tempo de estabilidade e rendimento de biocompostos em operações relacionadas com o downstream (SHOW et al., 2013; SAHOO et al., 2017). Assim, visando preservar as propriedades físico-químicas dos biocompostos a serem extraídos das microalgas, se faz necessário a aplicação de uma operação de secagem subsequente às operações relacionadas com a coleta da biomassa (KLEIN et al., 2018).

A liofilização é um método de secagem amplamente utilizado na indústria alimentícia bem como em diversas pesquisas relacionadas com microalgas, até por que a liofilização não promove lise na parede celular microalgal e devido as condições operacionais em que ocorre, os constituintes intracelulares são preservados (MILLEDGE et al., 2013; GULDHE et al., 20214). O uso desta técnica de secagem é realizada por meio de duas etapas: primeiramente a biomassa é congelada, e em uma segunda etapa esta é transportada para uma câmara de vácuo onde ocorre abaixamento da pressão e por conseguinte a água congelada é sublimada e removida na forma de vapor de água (LIAPIS & BRUTTINI , 2006).

Uma das vantagens do uso da liofilização comparada com outros métodos como secagem convectiva, secagem por pulverização e secagem por infravermelho é a capacidade de preservar o máximo de proteínas em biomassa seca limitando as perdas menores que 10%, além disso a ruptura celular é influenciada significativamente pela liofilização pois quando ocorre o congelamento de forma lenta se tem a formação de cristais de gelo de maior tamanho que podem aumentar a eficácia da ruptura celular (DESMORIEUX et al., 2004; CHEN et al., 2015).

Alguns biocompostos podem ser extraídos por meio de ciclos de congelamento-descongelamento por conta da expansão de água no meio intracelular microalgal. Como desvantagem a liofilização é economicamente inviável em produções de larga escala bem como perda de eficiência e tempo de espera para completa secagem (NEVES et al., 2019; LAWRENZ; LEE et al., 2017; OCHOA- MARTINEZ et al., 2012).

2.2.3 Centrifugação

A centrifugação é uma operação unitária cuja o mecanismo é baseado na geração de uma força centrífuga que se desloca de forma radial e por meio de uma aceleração que permite a separação de partículas devido a diferença de densidade de um determinado material e o meio

no qual se encontra (PAHL et al., 2013).

A centrifugação é aplicável para separação de soluções que já estejam bastante diluídas desde que sejam utilizadas rotações adequadas e nesse sentido a eficácia de separação está diretamente envolvida com o tamanho da partícula e variações na densidade entre os componentes (TAULBEE et al., 2020; MAJEKODUNMI et al., 2015).

De uma forma geral a eficácia de uma centrifugação depende das propriedades de sedimentação das células microalgais, tempo de retenção da pasta de microalga na centrífuga e profundidade que está inclusa no dimensionamento da centrífuga (BRENNAN & OWEDE, 2010; KLINTHONG et al., 2015; SHOW et al., 2017).

Entre as vantagens do uso da centrifugação estão a não adição de aditivos e a possibilidade de altas taxas de recuperação da biomassa (AHMAD et al., 2014). Em um contexto econômico, a aquisição da centrifugação pode representar até 30% do custo de implementação de uma biorefinaria de microalgas voltada para obtenção de biocombustíveis (QI, 2017).

2.2.4 Precipitação Isoelétrica

A precipitação é um mecanismo onde um determinado sólido é obtido de uma solução por meio da adição de um componente precipitador. A precipitação é um método de separação bastante utilizado para tratamentos e conservação de proteínas, que visam sua recuperação e preservação de suas atividades estruturais (BERSTCH et al., 2021; BÖCKER et al., 2021).

Em um contexto que envolva extração de proteínas presentes na biomassa das microalgas comumente são utilizados três diferentes abordagens: (1) Precipitação com solventes orgânicos geralmente feito com ácido clorídrico ou misturas compostas por etanol e acetona, (2) uso de altas concentrações salinas de NaCl or K_2HPO_4 e por fim a precipitação isoelétrica, que pode ser feita por meio de adição de compostos de caráter ácido ou básico (PEREIRA et al., 2018; PYLAEVA et al., 2018; BARBARINO et al., 2005).

A precipitação isoelétrica consiste em alterações no pH até que esta atinga o ponto isoelétrico (P.I) onde a solubilidade se torna muito baixa. A redução de pH torna possível a separação de diferentes proteínas presentes em uma mesma solução, sendo que o ponto isoelétrico presente na biomassa das microalgas ocorre em uma faixa de pH ácido e isso se deve a composição dos aminoácidos e por isso é possível favorecer a extração de diferentes frações proteicas (LIU et al., 2020; CHRONAKIS et al., 2000).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Obtenção de dados para o cálculo dos balanços de massa

Os fluxogramas relacionados aos balanços de matérias relacionados com as etapas de separação e purificação dos biocompostos da microalga foram construídos por meio do software EdrawMax 10.5.2. A coleta de dados na literatura teve como foco a microalga pertencente à espécie *Tetrademus obliquus*.

As informações da literatura para o cálculo dos balanços materiais foram retirados dos trabalhos realizados por Amorim et al. (2021), Vieira (2019), Dias (2019) e Rocha (2018). Nota-se que os dados da literatura relacionados à separação de biocompostos de microalga tiveram como foco, em maior quantidade, a extração de proteínas e lipídios, contudo, foram realizadas adaptações nos cálculos visando a determinação dos demais biocompostos de interesse.

2.3.2 Dados para a etapa de cultivo

O balanço de massa para a etapa de cultivo partiu do cultivo em tanque do tipo sistema aberto (*raceway*) com volume total de 4.000 L conforme Rocha (2018). O cultivo foi autotrófica e realizado com fotoperíodo natural, pH entre 6,5 e 6,7, temperatura a 27 °C e a agitação foi realizada por meio de injeção de ar comprimido.

O meio de cultura utilizado está descrito na Tabela 1. A Figura 1 apresenta o fluxograma para a obtenção e pré-tratamento da biomassa microalgal. As Figuras 2 e 3 apresentam imagens de equipamentos que foram utilizados para as etapas de cultivo e produção da biomassa.

Tabela 1 – Componentes utilizados no cultivo/obtenção da microalga *Tetradismus obliquus**.

Macronutrientes		Micronutrientes	
Quantidade (kg)		Quantidade (kg)	
Uréia	0,720	H ₃ BO ₃	0,011
Cloreto de Potássio	0,6956	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,007
per FosfatoSimples	0,4572	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00088
lfato de Magnésio Heptahidratado	0,284	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00032
Sulfato de Ferro Monohidratado	0,053	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,00008
Total	2,210	Total	0,02

*Adaptado de Rocha (2018)

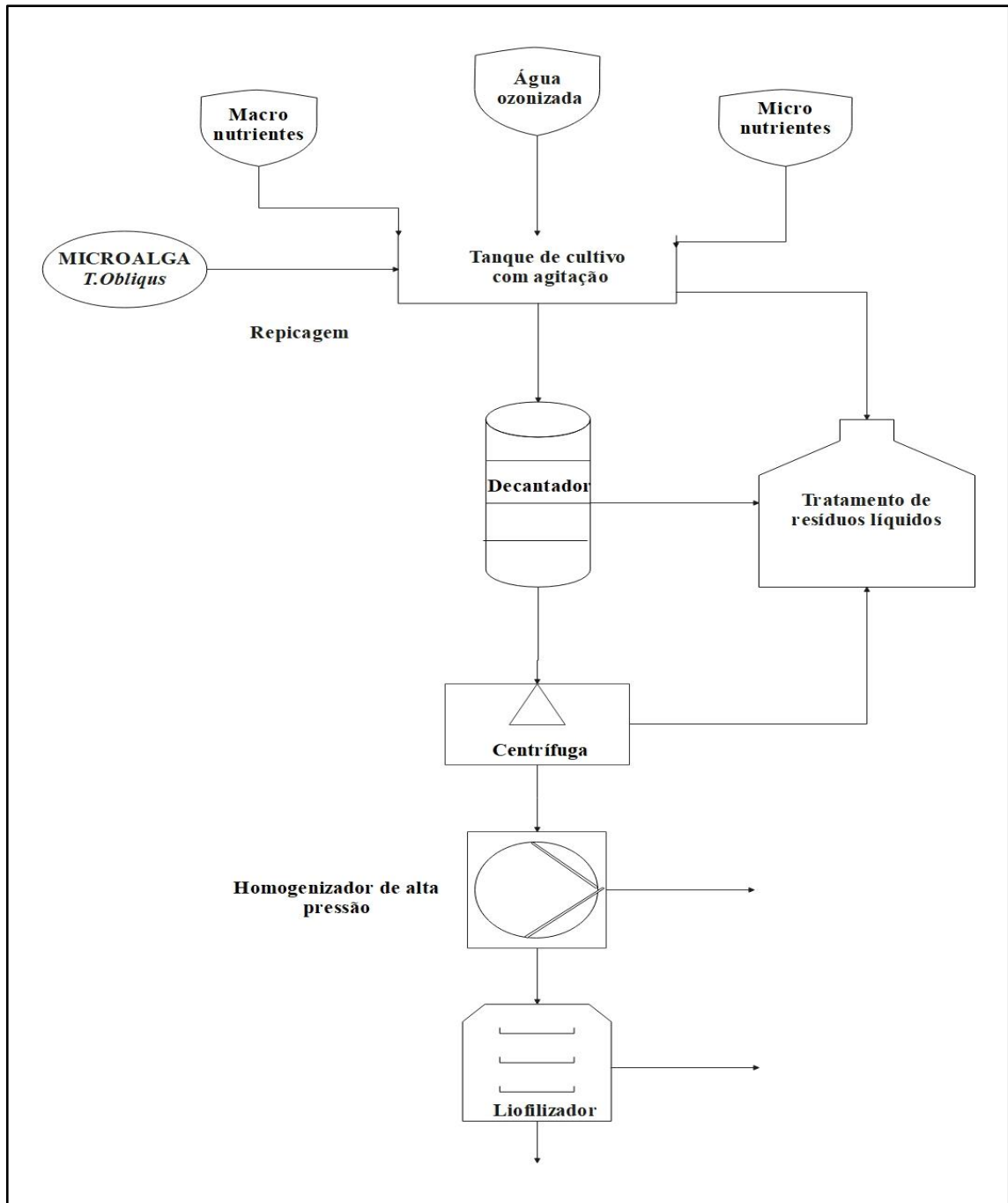


Figura 1 – Obtenção/pré-tratamento da biomassa da microalga *Tetradesmus obliquus*.
Fonte: Do autor



Figura 2 – Tanque de produção da biomassa microalgal: a) vista frontal, b) vista lateral.

Fonte: Do autor

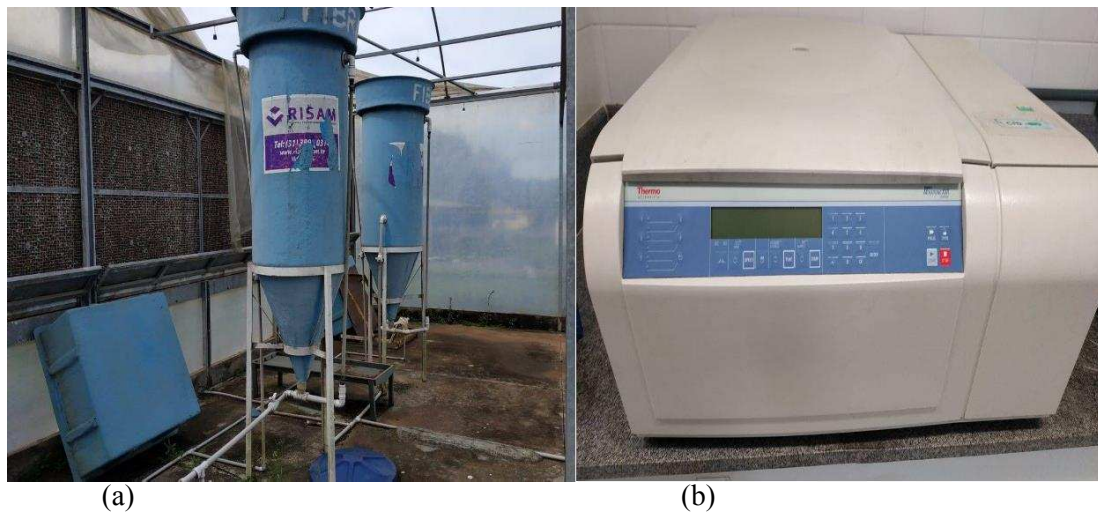


Figura 3 – Imagens de equipamentos utilizados na produção da biomassa: a) decantador, b) centrífuga.

Fonte: Do autor

2.3.3 Rompimento celular e secagem por liofilização

A análise do processo de rompimento celular foi feito por meio da técnica de homogeneização a alta pressão. A Figura 4 apresenta imagens do homogenizador à alta

pressão e do liofilizador que podem ser empregados nesse processo. Após o rompimento, a biomassa obtida com concentração de sólidos de 10 % (m/m) seguiu por 02 (duas) rotas:

- Rota 01: biomassa úmida submetida ao processo de extração de metabólitos por via úmida;
- Rota 02: após o rompimento, a biomassa foi acondicionada em recipientes estéreis e congelada em ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, liofilizadas, dando origem a biomassa homogeneizada liofilizada. A biomassa liofilizada passou por um processo de extração de metabólitos por via seca.

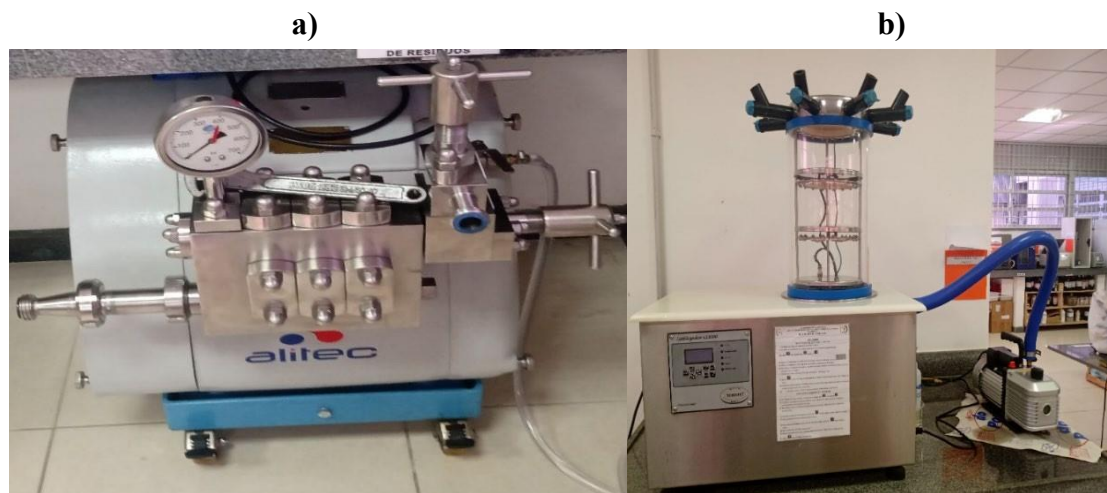


Figura 4 – Imagens de equipamentos utilizados no processamento da biomassa: a) homogeneizador à alta pressão, b) liofilizador.

Fonte: Do autor

A Figura 5 representa o fluxograma para a extração de proteínas, carboidratos e lipídeos. Na análise executada neste trabalho, as extrações foram realizadas de forma contínua, uma vez que cada material centrifugado oriundo de uma extração foi utilizado na etapa extrativa posterior. As extrações foram realizadas com as biomassas úmida e seca e ao final foi realizada uma análise comparativa entre seus rendimentos apontando qual processo é mais vantajoso em termos de demanda de insumos.

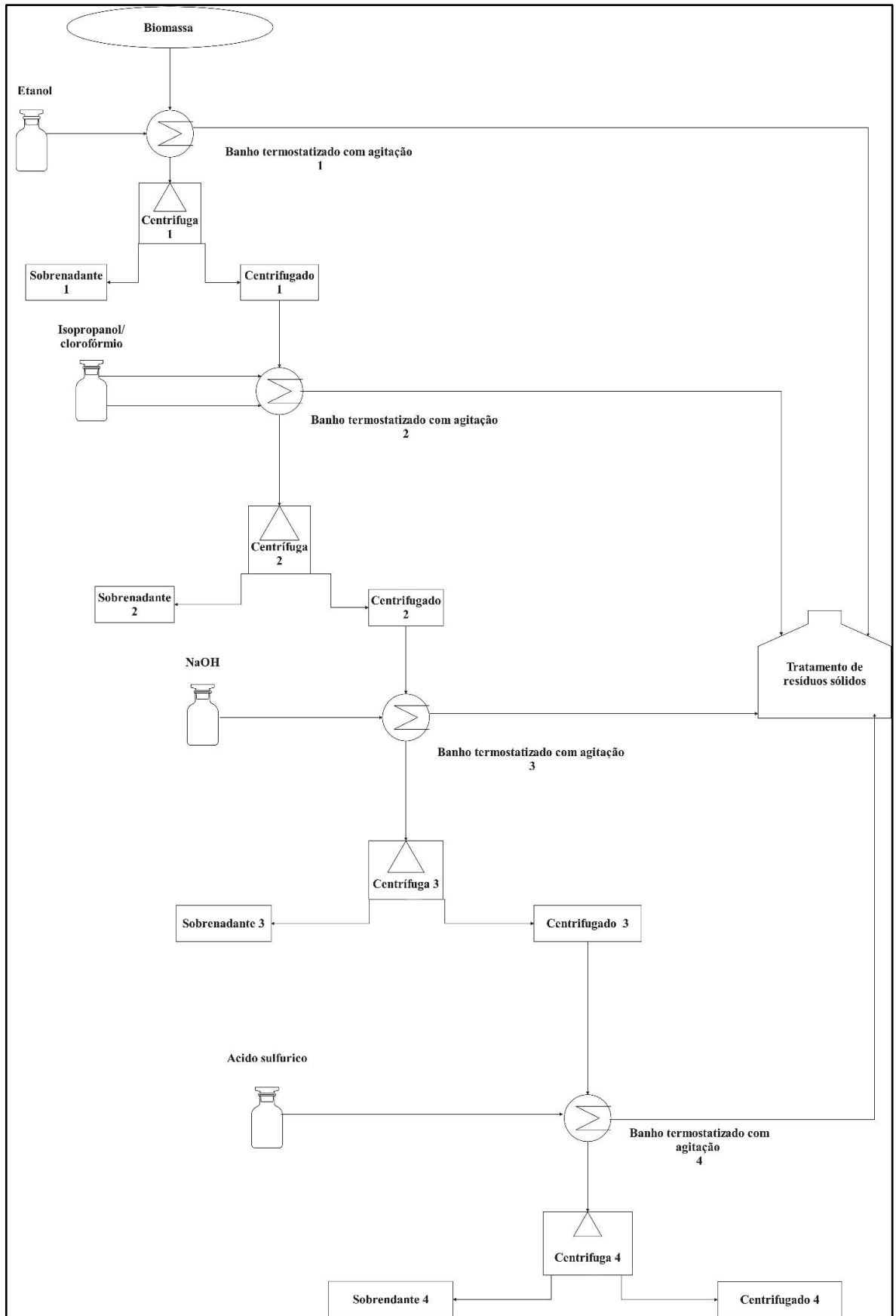


Figura 5 – Fluxograma representativo dos processos extrativos para obtenção de biocompostos da microalga *Tetrademus obliquus*.

2.3.4 Extração de pigmentos

A extração tem por objetivo permitir o acesso do solvente ao conteúdo do metabólito de interesse, seja ele extracelular ou intracelular. Os balanços de materiais realizados nas extrações propostas neste trabalho foram realizados com base nos resultados encontrados nos trabalhos de Amorim et al. (2021), Silva et al. (2021), Vieira (2019), Vieira (2021) e Dias (2019), para as biomassas úmida e seca.

A extração dos pigmentos proposta neste trabalho foi realizada com base nos resultados encontrados nos trabalhos de Amorim et al. (2021) e Vieira (2021), para as biomassas úmida e seca. Nessa metodologia, o etanol anidro P.A (Merck) foi adicionado às biomassas úmida e seca na proporção em base mássica de 4:1. A mistura seguiu para um processo de agitação, aquecimento, resfriamento e centrifugação. O sobrenadante seguiu para a etapa de evaporação dos solventes e quantificação de pigmentos, e o material de fundo foi utilizado como material para a extração seguinte correspondente a dos lipídeos.

2.3.5 Extração de Lipídeos

A extração dos lipídeos proposta neste trabalho foi realizada com base nos resultados encontrados no trabalho de Amorim et al. (2021), para as biomassas úmida e seca, sendo realizadas adaptações aos valores de massa utilizados. Ao centrifugado obtido na etapa de extração de pigmentos foi adicionada uma mistura de solventes clorofórmio- isopropanol na proporções 2:1, respectivamente. Esse sistema foi aquecido e agitado. O sistema foi então centrifugado, sendo que sobrenadante seguiu para a etapa de evaporação dos solventes e quantificação de lipídeos, e o material de fundo foi utilizado para a extração de proteínas.

2.3.6 Precipitação de Proteínas

A precipitação das proteínas proposta neste trabalho foi realizada com base nos resultados encontrados nos trabalhos de Vieira et al. (2021) e Silva et al. (2021), para as biomassas úmida e seca, sendo realizadas adaptações aos valores de massa utilizados. A biomassa centrifugada oriunda da extração dos lipídeos foi o material utilizado para extração das proteínas. A fim de obter maior rendimento no processo, a biomassa residual foi ressuspendida em água deionizada e o pH foi ajustado para 3,0, ponto isoelétrico (PI), para a precipitação das proteínas solúveis. Silva et al. (2021) relataram o PI de 3,0 para *T. obliquus*. Após o ajuste do pH com HCl (1 mol/L), os sistemas foram centrifugados a 5000 g por 10 min. O precipitado foi coletado, congelado a -20°C e seco por liofilização, produzindo o

concentrado proteico. O material de fundo foi utilizado para a extração de carboidrato.

2.3.7 Extração de Carboidratos

A extração dos carboidratos proposta neste trabalho foi realizada com base na remoção dos demais biocompostos de interesse realizada em etapas posteriores. Ao material residual obtido da etapa de extração de proteínas foi realizada a secagem do sobrenadante.

2.3.8 Balanços materiais

Os balanços de massa das correntes foram realizados desde a ruptura celular da biomassa até a extração dos biocompostos de interesse. Para o cálculo dos balanços de materias foi feito primeiramente o balanço global de cada etapa, representada pela equação 1.

$$F = R + P \quad (1)$$

Onde, F corresponde a alimentação do sistema (kg); R a qualquer componente residual [kg]; P é o produto resultante de cada operação na qual a biomassa foi submetida [kg].

Todos os balanços de materiais das etapas relacionadas foram calculados levando em consideração frações da biomassa úmida e seca, para que fosse comparado qual tipo de processamento é mais economicamente viável. A fim de padronizar, todos os resultados foram expressos em kg e os componentes representados por suas frações de sólidos e líquidos. A Figura 6, demonstra uma esquematização da ordem em que os balanços de massa foram realizados.

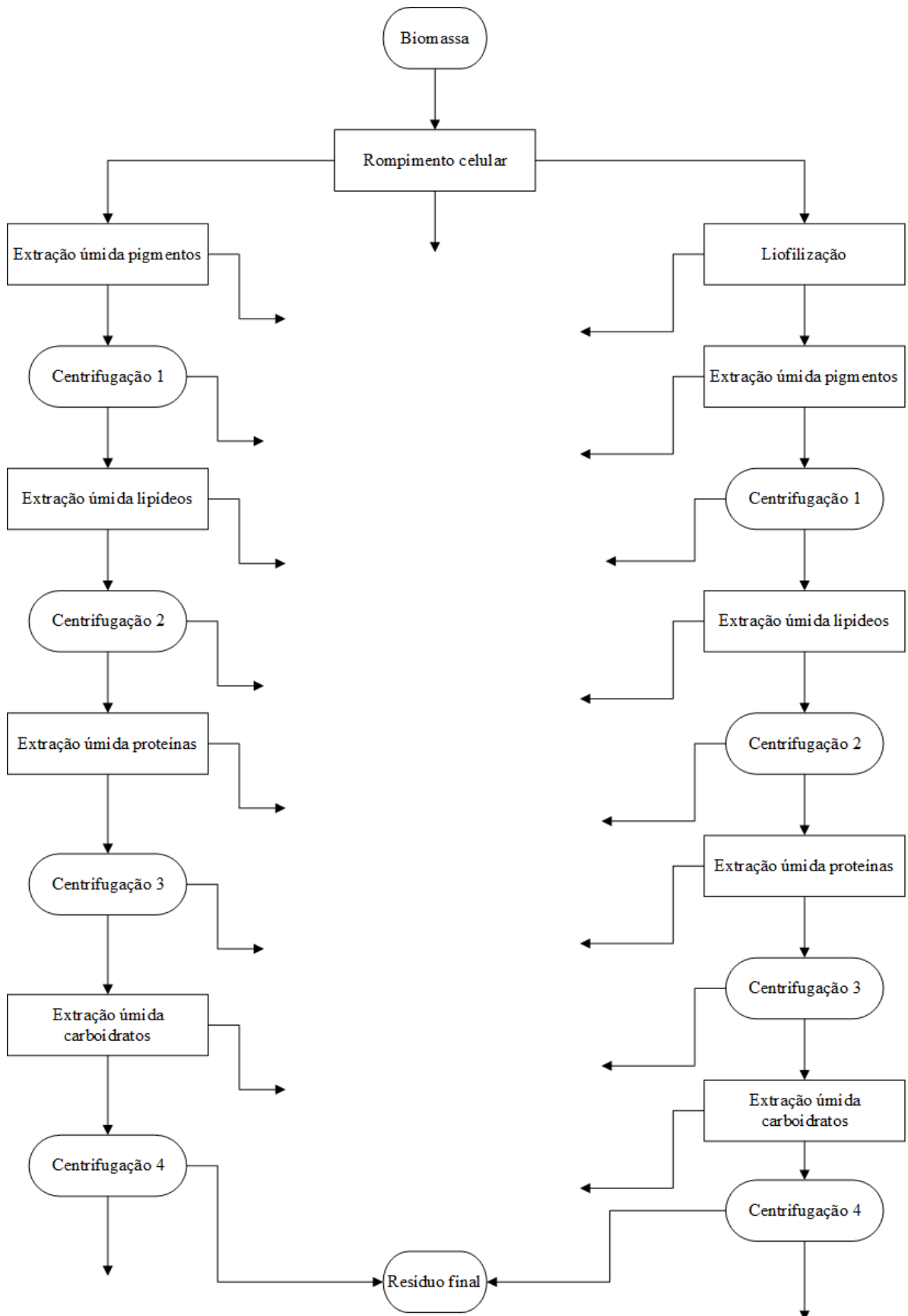


Figura 6 – Esquematização das etapas relacionadas com os balanços de massa.

Fonte: Do autor

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Obtenção de biomassa

A massa da biomassa da microalga produzida no tanque foi de 168 kg de células em suspensão, com concentração de sólidos de 0,8% (m/m), processo esse conduzido de forma mixotrófica com meio de cultura LM-4, otimizado para favorecer a rota metabólica de lipídeos conforme resultados encontrados em Rocha et al. (2019).

Durante as etapas relacionadas com o *upstream* o componente encontrado em maior abundância foi a água, cuja perda nas etapas que antecedem o *downstream* da biomassa foram na grandeza de 3.990 kg, o que corresponde a 99,75% da massa inicial de cultivo. Ainda que o volume de água seja muito grande, diferentemente das demais culturas de matérias-primas vegetais, as microalgas podem ser cultivadas em águas residuárias. Por fim, as microalgas necessitam de menores extensões territoriais e toda água oriunda dos processos de biorefinamento podem sofrer tratamento residual podendo ser aproveitada em bateladas subsequentes à desinfecção e completa ozonização (LOFTUS & JOHNSON, 2019).

Os 168 kg de células em suspensão foram transferidos para um decantador, adicionado de uma solução de NaOH com concentração de 0,15 g/L para ajuste do pH médio para 10,0 e de floculante (polímero catiônico P044) na concentração de 10 ppm.

O sobrenadante obtido do processo de decantação (fase superior e mais leve) com elevado teor de água foi direcionado ao tratamento de resíduos líquidos. A fase leve, contendo água e remanescentes de resíduos, apresentou uma massa de 141,12 kg.

O decantado (fase inferior e mais pesada), no total de 26,88 kg de biomassa úmida espessa, apresentou uma concentração de sólidos de 4,47 % (m/m), sendo recolhido após a saída do decantador e centrifugado a 4500 g por 10 min. A proporção entre as fases leve (sobrenadante) e pesada (centrifugada) do processo de centrifugação foi de 40/60.

Do material centrifugado, a massa final da fase pesada foi de 10,73 kg com concentração de sólidos de 11,7 % (m/m). Antes da operação de rompimento, essa biomassa foi adicionada juntamente com 1,15 kg de água a um misturador para padronização do teor de sólidos em 10% (m/m), obtendo uma biomassa úmida final com massa de 11,88 kg.

2.4.2 Rompimento Celular e Liofilização

O sistema de biorefinamento proposto contemplou as etapas de ruptura celular mediante a técnica de homogenização a alta pressão (HAP), secagem da biomassa celular úmida por liofilização (Rota 02) e extração das biomoléculas de acordo com as metodologias descritas neste trabalho.

A ruptura celular foi realizada com a biomassa integral úmida padronizada com 10% (m/m) de sólidos com uma massa de 11,88 kg, o que para algumas técnicas de rompimento mecânicas é um importante parâmetro operacional. De acordo com Glacio et al. (2013) a ruptura pode ser conduzida com a biomassa desidratada ou seca, porém a secagem é um ponto crítico em relação à demanda energética e de tempo, o que impacta diretamente nas extrações. Neste trabalho optou-se por efetuar a ruptura celular por homogenização a alta pressão antes da secagem por liofilização. Ambas operações foram realizadas de forma sequencial, visto que após a lise celular as possibilidades de degradação de alguns metabólitos e consequentemente perda de rendimento aumentam muito.

A homogenização a alta pressão é uma técnica de rompimento celular de natureza mecânica bastante aplicável a biomassa celular microalgal. A biomassa foi submetida a 400 bar de pressão, realizando 8 passes do fluido no homogeneizador, conforme metodologia adaptada de Shene et al. (2016). Para análise do processo, foi estimada uma perda de 10 % da massa inicial, assim, o conteúdo de biomassa rompida remanescente foi de 10,69 kg com uma concentração de sólidos de 10,56 % (m/m). A massa perdida durante a realização do processo foi de 1,19 kg e composta em quase sua totalidade por umidade (95 % m/m). Tais perdas devem-se a aderência do material nas tubulações e válvulas do homogeneizador. Conforme o item 2.2.3, após o rompimento, a biomassa obtida poderia seguir por duas rotas:

- Rota 01: biomassa úmida submetida ao processo de extração de metabólitos por via úmida. Nessa análise, foi utilizada o valor de 10,69 kg de biomassa com uma concentração de sólidos de 10,56 % (m/m);
- Rota 02: biomassa úmida submetida ao processo de extração de metabólitos por via seca, isto é, a biomassa rompida passa por um processo de secagem por liofilização antes da extração de metabólitos.

A secagem por liofilização é uma operação considerada como ponto crítico do ponto de vista energético e econômico. A presença de maiores teores de umidade pode

afetar negativamente as propriedades químicas, bem como o aumento significativo do aparecimento de reações enzimáticas e contaminação microbiana, prejudicando a sua utilização nas etapas subsequentes de extração de compostos de interesse (SHOW et al., 2013., SAHOO et al., 2017).

Para análise do processo de ultracongelamento, foi estimada uma perda de 5 % de massa total de entrada no processo, perda essa existente devido a aderência do material nos utensílios, equipamentos e devido ao manuseio das massas. A adição da operação de secagem pode resultar em até 75% do custo total de operações relacionadas com a coleta e ainda assim, uma biomassa com elevados teores de umidade pode ter a eficácia de processamento de produtos de interesse, drasticamente reduzida (SHOW et al., 2013).

Por outro lado, o congelamento realizado de forma lenta pode aumentar a porosidade da parede celular microalgal facilitando o crescimento de cristais de gelo da células no interior das células o que favorece a extração de metabólitos intracelulares (Lee et al., 2012), e de acordo com Unterlander et al. (2017) é mais viável armazenar a longo prazo células de microalgas liofilizadas em um dessecador do que uma pasta de biomassa ou em suspensão a temperatura de -80°C .

A Tabela 2 fornece as variáveis relacionadas com as etapas de homogeneização, ultracongelamento e liofilização da biomassa da microalga *Tetradismus obliquus*. De acordo com a Tabela, para análise da Rota 02, a biomassa utilizada possuía uma massa de 1,07 kg, com uma concentração de sólidos de 100 % (m/m).

Tabela 2 – Balanço de materiais para os processos de homogeneização e secagem por liofilização da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*.

Etapa	Variável	Massa (kg)	Teor de sólidos (%)	Massa de sólidos (kg)	Teor de líquidos (%)	Massa de líquidos (kg)
Entrada homogenizador	Biomassa misturada	11,88	10,0	1,19	90,0	10,69
Saída homogenizador	Biomassa rompida	10,69	10,56	1,13	89,44	9,56
Saída homogenizador	Perdas	1,19	5,00	0,06	95,0	1,13
Entrada ultracongelador	Biomassa rompida	10,69	10,56	1,13	89,44	9,56
Saída ultracongelador	Biomassa ultracongelada	10,16	10,56	1,07	89,44	9,09
Saída ultracongelador	Perdas	0,53	10,56	0,06	89,44	0,47
Entrada liofilizador	Biomassa ultracongelada	10,16	10,56	1,07	89,44	9,09
Saída liofilizador	Biomassa seca	1,07	100	1,07	0	0
Saída liofilizador	Água removida	9,09	0	0	100	9,09

2.4.3 Extração de Biocompostos

2.4.3.1 Extração de Biocompostos por Via Úmida

Pigmentos

Após a homogeneização por alta pressão, a extração de pigmentos da biomassa úmida foi conduzida utilizando o etanol Anidro como solvente. A extração foi conduzida em um banho de aquecimento termostático, onde foram inseridos a biomassa rompida (10,69 kg) e 42,77 kg de etanol na proporção de solvente/biomassa (4:1) (m/m).

A mistura foi agitada, aquecida, resfriada e centrifugada. A centrifugação teve por

objetivo separar fases para que o material que sofreu extração seja recolhido em uma das fases. A proporção entre as fases leve (sobrenadante) e pesada (centrifugada) do processo de centrifugação foi de 98/2. O sobrenadante da centrifugação (52,3 kg) seguiu para a etapa de evaporação dos solventes e quantificação de pigmentos e o produto de fundo (1,15 kg) foi utilizado como material para a extração seguinte, correspondente a dos lipídeos. As quantidades dos materiais usados na extração dos pigmentos estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de pigmentos utilizando a biomassa úmida.

Etapa	Variável	Massa (kg)	Teor de sólidos (%)	Massa de sólidos (kg)	Teor de líquidos (%)	Massa de Líquidos (kg)
Entrada banho	Biomassa homogenizada	10,69	10,56	1,13	89,44	9,56
Entrada banho	Solvente etanol	42,76	0	0	100	42,76
Entrada centrífuga	Mistura	53,45	2,11	1,13	97,89	52,32
Saída centrífuga	Sobrenadante	52,30	0,2	0,10*	99,8	52,2
Saída centrífuga	Produto de Fundo	1,15	89,56	1,03	10,44	0,12

Obs.: * Massa contendo fração concentrada de pigmentos a ser recuperada no processo.

Lipídeos

Ao produto de fundo, resultante da extração de pigmentos, foram adicionadas 11,5kg de uma mistura de solventes clorofórmio-isopropanol. Esse sistema foi aquecido e agitado. O sistema foi então centrifugado. A proporção entre as fases leve (sobrenadante) e pesada (centrifugada) do processo de centrifugação foi de 92/8. O sobrenadante da centrifugação (11,58 kg) seguiu para a etapa de evaporação de solventes e quantificação de lipídeos e o produto de fundo (1,07 kg) foi utilizado como material para a extração seguinte, correspondente a das proteínas. As quantidades dos materiais usados na extração dos lipídeos estão descritas na Tabela 4. A extração de lipídeos com a biomassa úmida pode ser uma vantagem em um contexto

econômico com redução de tempo e demanda energética, ainda que isso afete algumas propriedades químicas não tornando o óleo bruto extraído adequado para, por exemplo, a produção de biocombustíveis.

Tabela 4 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de lipídeos da biomassa úmida.

Etapa	Variável	Massa (kg)	Teor de sólidos (%)	Massa de sólidos (kg)	Teor de líquidos (%)	Massa de Líquidos(kg)
Entrada do banho	Produto de Fundo da Extração de Pigmentos	1,15	89,56	1,03	10,44	0,12
Entrada banho	Solvente Isopropanol	3,83	0	0	100	3,83
Entrada banho	Solvente Clorofórmio	7,67	0	0	100	7,67
Entrada centrífuga	Mistura	12,65	8,14	1,03	91,86	11,62
Saída centrífuga	Sobrenadante	11,58	1,21	0,14*	98,79	11,44
Saída centrífuga	Produto de Fundo	1,07	83,18	0,89	16,82	0,18

Obs.: * Massa contendo fração concentrada de lipídeos a ser recuperada no processo.

Proteínas e Carboidratos

O produto de fundo, resultante da extração de lipídeos, foi o material utilizado para precipitação das proteínas, com massa de 1,07 kg e concentração de sólidos de 83,17 (m/m). A essa massa foi realizada uma ressuspensão em água deionizada e o pH foi ajustado para 3,0 (ponto isoelétrico) para precipitação das proteínas. O sistema foi então centrifugado. A proporção entre as fases leve (sobrenadante) e pesada (centrifugada) do processo de centrifugação foi de 95/5. O sobrenadante foi removido para a etapa de extração de carboidratos, e o produto de fundo (1,14 kg) separado e liofilizado para determinação de teor de proteínas total.

A extração dos carboidratos proposta neste trabalho foi realizada com base na remoção dos demais biocompostos de interesse realizada em etapas posteriores. Ao material residual

obtido da etapa de extração de proteínas foi realizada a secagem do sobrenadante. Baixos rendimentos de carboidratos são uma desvantagem econômica em uma construção de projeto de biorefinaria de microalgas. Os carboidratos também podem ser utilizados como rota alternativa para a produção de biocombustíveis em relação a tradicional transesterificação do biodiesel o que pode valorar a cadeia produtiva a partir desta biomolécula.

Tabela 5 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de proteínas e carboidratos da biomassa úmida.

Etapa	Variável	Massa (kg)	Teor de sólidos (%)	Massa de sólidos (kg)	Teor de líquidos (%)	Massa de Líquidos(kg)
Entrada banho	Produto de Fundo da Extração de Lipídeos	1,07	83,18	0,89	16,82	0,18
Entrada banho	Água e HCL	21,40	0	0	100	21,40
Entrada	Mistura	22,47	3,96	0,89	96,03	21,58
Saída centrífuga	Sobrenadante	21,33	1,17	0,25	98,83	21,08
Saída centrífuga	Produto de Fundo	1,14	56,14	0,64*	43,86	0,50

Obs.: * Massa contendo fração concentrada de proteína a ser recuperada no processo.

2.4.3.2 Extração biomassa seca

Pigmentos

Após a homogeneização por alta pressão, a extração de pigmentos da biomassa seca foi conduzida utilizando o etanol anidro como solvente. A extração foi conduzida em um banho de aquecimento termostático, onde foram inseridos a biomassa rompida (1,07 kg) e 4,28 kg de etanol na proporção de solvente/biomassa (4:1) (m/m).

A mistura foi agitada, aquecida, resfriada e centrifugada. A centrifugação teve por objetivo separar fases para que o material que sofreu extração seja recolhido em uma das fases. A proporção entre as fases leve (sobrenadante) e pesada (centrifugada) do processo de centrifugação foi de 79/21. O sobrenadante da centrifugação (4,24 kg) seguiu para a etapa de evaporação dos solventes e quantificação de pigmentos e o produto de fundo (1,11 kg) foi

utilizado como material para a extração seguinte, correspondente a dos lipídeos. As quantidades dos materiais usados na extração dos pigmentos estão descritas na Tabela 6. Ainda que o rendimento de pigmentos tenha sido menor que o da biomassa úmida a vantagem desta etapa foi o menor uso de etanol (4,28 kg), tendo a biomassa totalmente eluída na presença do etanol.

Tabela 6 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de pigmentos utilizando a biomassa seca.

Etapa	Variável	Massa (kg)	Teor de sólidos (%)	Massa de sólidos (kg)	Teor de líquidos (%)	Massa de Líquidos (kg)
Entrada banho	Biomassa homogenizada	1,07	100	1,07	0	0
Entrada banho	Solvente etanol	4,28	0	0	100	4,28
Entrada centrífuga	Mistura	5,35	20,0	1,07	80,0	4,28
Saída centrífuga	Sobrenadante	4,24	0,25	0,01*	99,75	4,23
Saída centrífuga	Produto de Fundo	1,11	95,49	1,06	4,51	0,05

Obs.: * Massa contendo fração concentrada de pigmentos a ser recuperada no processo.

Lipídeos

Ao produto de fundo, resultante da extração de pigmentos, foram adicionadas 11,07kg de uma mistura de solventes clorofórmio-isopropanol. Esse sistema foi aquecido e agitado. O sistema foi então centrifugado. A proporção entre as fases leve (sobrenadante) e pesada (centrifugada) do processo de centrifugação foi de 91/9. O sobrenadante da centrifugação (11,11 kg) seguiu para a etapa de evaporação de solventes e quantificação de lipídeos e o produto de fundo (1,06 kg) foi utilizado como material para a extração seguinte, correspondente a das proteínas. As quantidades dos materiais usados na extração dos lipídeos estão descritas na Tabela 7.

A extração de lipídeos conduzida com a biomassa seca liofilizada não acarretou em diferenças nas quantidades do volume da mistura clorofórmio/isopropanol utilizada. Embora o rendimento lipídico tenha sido inferior a extração com a biomassa úmida, a liofilização visa a adequação e preservação de propriedades químicas dos ácidos graxos presente no óleo de

microalgas que não tenha finalidade para aplicação no segmento de biocombustíveis.

Tabela 7 – Balanço de materiais correspondente a etapa de extração de lipídeos da biomassa seca.

Etapa	Variável	Massa (kg)	Teor de sólidos (%)	Massa de sólidos (kg)	Teor de líquidos (%)	Massa de Líquidos(kg)
Entrada do banho	Produto de Fundo da Extração de Pigmentos	1,11	95,49	1,06	4,51	0,05
Entrada banho	Solvente Isopropanol	3,66	0	0	100	3,66
Entrada banho	Solvente Clorofórmio	7,40	0	0	100	7,40
Entrada centrífuga	Mistura	12,18	8,70	1,06	91,3	11,12
Saída centrífuga	Sobrenadante	11,11	1,91	0,21*	98,09	10,9
Saída centrífuga	Produto de Fundo	1,06	80,19	0,85	19,81	0,21

Obs.: * Massa contendo fração concentrada de lipídeos a ser recuperada no processo.

Proteínas e Carboidratos

O produto de fundo, resultante da extração de lipídeos, foi o material utilizado para extração das proteínas, com massa de 1,06 kg e concentração de sólidos de 80,19 (m/m). A essa massa foi realizada uma ressuspensão em água deionizada e o pH foi ajustado para 3,0 (ponto isoelétrico) para precipitação das proteínas. O sistema foi então centrifugado. A proporção entre as fases leve (sobrenadante) e pesada (centrifugada) do processo de centrifugação foi de 94/6. O sobrenadante foi removido para a etapa de extração de carboidratos, e o produto de fundo (1,34 kg) separado e liofilizado para determinação do teor de proteínas total.

A extração dos carboidratos proposta neste trabalho foi realizada com base na remoção dos demais biocompostos de interesse realizada em etapas posteriores. Ao material residual obtido da etapa de extração de proteínas foi realizada a secagem do sobrenadante.

Tabela 8 – Balanço de materiais correspondente as etapas de extração de proteínas e carboidratos da biomassa seca.

Etapa	Variável	Massa (kg)	Teor de sólidos (%)	Massa de sólidos (kg)	Teor de líquidos (%)	Massa de Líquidos(kg)
Entrada banho	Produto de Fundo da Extração de Lipídeos	1,06	80,19	0,85	19,81	0,21
Entrada banho	Água e HCL	21,20	0	0	100	21,20
Entrada	Mistura	22,26	3,82	0,85	96,18	21,41
Saída centrífuga	Sobrenadante	20,92	0,33	0,07	99,67	20,85
Saída centrífuga	Produto de Fundo	1,34	58,37	0,78*	41,63	0,56

Obs.: * Massa contendo fração concentrada de proteína a ser recuperada no processo.

Uma estratégia que vem sendo utilizada nas proteínas é desengordurar a biomassa por meio da remoção do material lipídico e concentração do material proteico sem a necessidade de promover etapas de extração alcalina, reduzindo gastos com materiais. Porém nesta abordagem referente a construção de uma biorefinaria, o material centrifugado oriundo da precipitação de proteínas não é tratado como descarte sendo necessário seu uso em etapas extrativas posteriores cuja objetivo é valorar a cadeia produtiva da microalga como um todo.

Outra possibilidade é promover a precipitação das proteínas de microalgas de forma subsequente à extração de pigmentos, lipídeos e carboidratos aproveitando integralmente o material concentrado. A pequena quantidade de massa presente no sobrenadante destinado a quantificação de carboidratos, após a centrifugação do material oriundo da precipitação de proteínas, pode ser devido a parte dos carboidratos ter sido precipitada juntamente com as proteínas o que corrobora com uma maior massa de proteínas presente no produto de fundo com a biomassa seca. Outra explicação pode ser o esgotamento de massa de carboidratos devido a quantidade de rotas extrativas antecedentes o que podem ter contribuído para a redução da quantidade de sólidos presentes no sobrenadante final obtido após a retirada integral das proteínas.

2.4.4 Rendimentos da extração dos biocompostos da biomassa

A Tabela 9 traz a demanda de materias utilizadas na extrações dos biocompostos de interesse. A Tabela 10 traz a produção de biocompostos em cada etapa do processo nas rotas úmida e seca. Os balanços de materiais foram calculados dentro da proposta de um biorefinamento, levando em consideração o uso em quase sua totalidade do resíduo da pasta de microalga, portanto os rendimentos não expressam necessariamente a composição química dos metabólitos abordados mas sim a produtividade de cada composto a partir de uma dada massa inicial de biomassa antecedente à etapa de extração.

Tabela 9 – Quantidade de insumos utilizados nas extrações dos biomcompostos de interesse.

Extração úmida		Extração seca	
Componente	Massa (kg)	Componente	Massa (kg)
Etanol anidro	42,76	Etanol anidro	4,28
Clorofórmio	3,83	Clorofórmio	3,66
Isopropanol	7,67	Isopropanol	7,40
Água e HCl	21,40	Solvente NaOH	21,20

Tabela 10 – Extratos obtidos durante as etapas de processamento da biomassa.

Componente	Extração úmida				Extração seca			
	Massa [kg]	Teor de Sólidos [%]	Massa de Sólidos no componente [kg]	Massa de sólidos no componente/ Massa de sólidos da biomassa [%]	Massa [kg]	Teor de Sólidos [%]	Massa de Sólidos no componente [kg]	Massa de sólidos no componente/ Massa de sólidos da biomassa [%]
Biomassa Inicial	10,69	10,56	1,13	---	1,07	100	1,07	---
Sobrenadante com massa de pigmento a ser obtido	52,30	0,2	0,10	8,84	4,24	0,25	0,01	0,93
Sobrenadante com Massa de Lipídeo a ser Obtido	11,58	1,21	0,14	12,38	11,11	1,91	0,21	19,62
Produto de Fundo com Massa de Proteína a ser Obtido	1,14	56,14	0,64	56,63	1,34	58,37	0,78	72,89
Sobrenadante com Massa de Carboidrato a ser Obtido	21,33	1,17	0,25	22,12	20,92	0,33	0,07	6,54

A massa de sólidos obtida durante a extração de pigmentos foi maior na biomassa rompida por via úmida (0,10 kg) quando comparada à seca (0,01 kg) por liofilização. Os pigmentos da biomassa das microalgas clorofíceas estão entre os metabólitos secundários de grande valor econômico, porém altamente susceptíveis a degradação, e o acesso íntegro ao seu conteúdo metabólico é dificultado por características fisiológicas da biomassa celular. De acordo com Vieira et al. (2021), o uso de grandes quantidades do solvente de caráter polar, como o etanol, pode suprimir a etapa de secagem o que seria vantajoso em um contexto técnico-econômico.

A massa de sólidos obtida durante a extração de lipídeos foi maior com a biomassa rompida por via seca (0,21 kg) quando comparada à biomassa úmida (0,14 kg). Porém, é economicamente mais viável produzir lipídeos a partir de uma biomassa úmida ainda que isso possa afetar o rendimento de processamento nas etapas subsequentes de transesterificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Além disso a biomassa celular de *Tetrademus obliquus* tende a acumular menores teores desse metabólito quando comparado com biomassas de outras espécies como *Chlorella sp.*, *Botryococcus Braunii*, *Nannochloropsis sp.*, *Neochloris oleobundus*, *Dunaliella sp* (HOSSAIN % MAHLIA, 2019).

A massa de sólidos obtida durante a extração de proteínas apresentaram um rendimento elevado (0,78 kg) com a biomassa seca. O menor rendimento proteico com a biomassa rompida

por via úmida pode ser explicado pelo fato dessas moléculas estarem dispersas na fase aquosa. Dentro de uma proposta de biorefinamento a retirada integral dos lipídeos da amostra favorece o aumento da concentração de proteína tornando esta estratégia economicamente mais viável do que realizar outros tipos de extração (AMORIM et al., 2021). A baixa massa de sólidos obtida durante a extração de carboidrato por via seca em relação à massa de carboidratos obtida por via úmida pode ser explicado pelo esgotamento dos outros biocompostos realizado nas extrações anteriores.

2.5 CONCLUSÕES

A biomassa da microalga *Tetradismus obliquus* possui uma vasta quantidade de biomoléculas voltadas para inúmeras aplicações industriais. O adequado encadeamento de diversas operações de separação utilizadas em uma biorefinaria facilita o acesso de forma íntegra a biomoléculas como proteínas, lipídeos, pigmentos e carboidratos. A ruptura celular e a secagem por liofilização são duas operações imprescindíveis dentro do biorefinamento primário.

A água corresponde a mais que 90% da fração de componentes envolvidos nos processos do biorefinamento da biomassa microalgal após o cultivo, podendo esta ser submetida à desinfecção e posterior ozonização em bateladas subsequentes o que representa uma vantagem em relação a diversas matérias primas de origem vegetal.

Os protocolos de extração das biomoléculas foram conduzidos seguindo duas rotas distintas. A extração de pigmentos com a biomassa úmida consumiu uma maior quantidade de solventes em comparação com a biomassa seca. Por fim é possível promover o encadeamento de operações de biorefinamento de forma simultânea com finalidade de obtenção de biomoléculas de microalgas, ainda assim serão necessários estudos que façam uma abordagem experimental e com simulações direcionadas para o encadeamento das operações em escala laboratorial e oportunamente em escala industrial.

2.6 REFERÊNCIAS

AHMAD, A.L. *et al.* Comparison of harvesting methods for microalgae *Chlorella* sp. and its potential use as a biodiesel feedstock. **Environ. Technol.**, v.35, p. 2244–2253. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.900117>

AMORIM, M. L. *et al.* Pilot-scale biorefining of the microalga *Scenedesmus obliquus* for the production of crude lipids and protein concentrate. **Separation and Purification Technology**, v.270, p. e 118775, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118775>

BALASUBRAMANIAM, VM. *et al.* High-pressure processing equipment for the food industry. In: Balasubramaniam VM, Barbosa-Cánovas GV, Lelieveld HLM (eds) High pressure processing of food principles, technology and applications, 1st edn. **Springer**, New York, pp 63–65, 2016.

BARBARINO, E. ; LOURENÇO, S.O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. **J. Appl. Phycol.**, v. 17, p.447–460, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>

BERK, Z. Mixing. In: Berk Z (ed) Food process engineering and technology, 3rd edn. **Academic Press**, London, pp 193–217, 2018.

BERTSCH, P. *et al.* Proteins from microalgae for the stabilization of fluid interfaces, emulsions, and foams. **Trends Food Sci. Technol.**, v.108, p.326–342, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.014>

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** v.37, n.8, p. 911–917, 1959. <https://doi.org/10.1139/o59-099>

BÖCKER, L. *et al.* Effect of *Arthrospira platensis* microalgae protein purification on emulsification mechanism and efficiency. **J. Colloid Interface Sci.**, v.584, p.344–353, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.09.067>

BERNAERTS, T.M.M. *et al.* Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization. **Algal Res.**, v.42, p. e 101616, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101616>

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRENNAN, L. ; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v.14, p.557–577, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

CHEN, B. *et al.* Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products A review. **Bioresource Technology**, v.244, p.1198–1206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.1704>

CHEN, C-L. *et al.* Dewatering and Drying Methods for Microalgae. **Drying Technology**. v.33, n.4, 2015. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.997881>

CHRONAKIS, I. S. *et al.* The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.173 p.181–192, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00548-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00548-3)

DESMORIEUX, H.; HERNANDEZ, F. Biochemical and physical criteria of *Spirulina* after different drying processes. **In Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS)**, Sao Paulo City, Brazil, August 22–25, 2004, B, 900–907.

D'HONDT, E. *et al.* Cell Disruption Technologies. **Microalgae-Based Biofuels and Bioprod.**, p.133–154, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>

DIAS, V. M. **Racionalização de energia na secagem da microalga *scenedesmus obliquus* cultivada em tanques abertos** Monografia (Graduação em Engenharia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2019.

DIELS, A.M.J. ; MICHIELS, C.W. High-Pressure Homogenization as a Non-Thermal Technique for the Inactivation of Microorganisms. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 32, p.201–216, 2006. <https://doi.org/10.1002/jib.99>

DONSÌ, F. *et al.* Main Factors Regulating Microbial Inactivation by High-Pressure Homogenization: Operating Parameters and Scale of Operation. **Chem. Eng. Sci.**, v. 64, p.520–532, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.10.002>

DONSÌ, F. *et al.* Microbial inactivation by high pressure homogenization: effect of the disruption valve geometry. **J Food Eng.**, v.115, p.362–370, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.046>

DONSÌ, F. *et al.* Effect of emulsifier type and disruption chamber geometry on the fabrication of food nanoemulsions by high pressure homogenization. **Ind Eng Chem Res.**, v.51, p.7606–7618, 2018. <https://doi.org/10.1021/ie2017898>

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

DUMAY, E. *et al.* Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. **Trends Food Sci Technol.**, v.31. p. 13–26, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.005>.

GLACIO S.A. *et al.* Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20 1, p. 95–98, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.027>

GULDHE, A. *et al.* Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. **Fuel**, v.128, p.46–52. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.02.059>

GOMES, T.A. *et al.* An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. **Prep. Biochem. Biotech.**, v.50, p.635–654, 2020. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1728696>

GÜNERKEN, E. *et al.* Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotech. Adv.**, v.33, p.243–260, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>

HARTE, F. *et al.* Food processing by high-pressure homogenization. In: Balasubramaniam VM, Barbosa-Cánovas GV, Lelieveld HLM (eds) High pressure processing of food principles, technology and applications, 1st edn. **Springer**, New York, pp 123–141.

HOSSAIN, N.; MAHLIA, T. M. I. Progress in physicochemical parameters of microalgae cultivation for biofuel production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.39, p.835-859,2019. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1624945>

HU, Y.; BASSI, A. **Extraction of Biomolecules from Microalgae**; Elsevier Inc.:Amsterdam, The Netherlands, 2020. ISBN 9780128185360.

KLEIN, B.C. *et al.* Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: a critical review. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v.82, p. 1376–1392, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.063>

KLEINIG, A.R.; MIDDELBERG, A.P.J. On the Mechanism of Microbial Cell Disruption in High-Pressure Homogenisation. **Chem. Eng. Sci.**, v.53, p.891–898, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)00414-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00414-4)

HYNSTOVA, V. V. *et al.* Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 148, p. 108–118, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.018>

KLINTHONG, W. *et al.* A review: microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. **Aerosol Air Qual. Res.**, v.15, p.712–742,2015. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>.

JAVED, F. *et al.* Microalgae based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: a pathway towards sustainable biorefinery. **Fuel**, v.255 p.e 115826, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fuel>.

LAWRENZ, E. *et al.* Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. **J. Appl. Phycol.**, v.23, p.865-871, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9600-0>

LEE, A.K. *et al.* Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements, **Biomass Bioenergy**, v.46, p.89–101,2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>.

LEE, S.Y. *et al.* Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. **Bioresour. Technol.**, v.244, p.1317-1328,2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>

LIAPIS, A.I & BRUTTINI, R. Freeze Drying. In: Mujumdar AS, editor. Handbook of Industrial Drying. Boca Raton, FL: **CRC Press**, 2006.

LIU, S. *et al.* Recent advances on protein separation and purification methods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.284, p. e 102254, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254>

LOFTUS, S. E.; JOHNSON, Z. I. Reused cultivation water accumulates dissolved organic carbon and uniquely influences different marine microalgae. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v.p.1–13,2019 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00101>

MAJEKODUNMI, S.O. *et al.* A review on centrifugation in the pharmaceutical industry. **American Journal of Biomedical Engineering.**, v.5 p.67–78, 2015. <https://doi.org/10.5923/j.ajbe.20150502.03>

MAKUSO, T. *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplateformat **Analytical Biochemistry**, v. 339, n.1, p.69–72. 2005.<https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>

MARTINS, L. B. **Extração integrada de carboidratos e lipídeos para a produção de bioetanol e biodiesel a partir da microalga *Chlorella* sp.** Dissertação (Mestrado em Engenharia química)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2018.

MENEGAZZO, M. L; FONSECA, G. G. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.107 , p. 87–107, 2019. <https://doi.org/10.1016/j>.

MENEZTREZ M. Y. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. **Environmental Science & Technology**, v.46, n.13, p.7073– 7085, 2012. <https://doi.org/10.1021/es300917r>

MILLEDDGE, J.J.; HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v.12, p.165–178, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9301-z>

NEMER, G. *et al.* Mechanical cell disruption technologies for the extraction of dyes and pigments from microorganisms: a review. **Fermentation**, v. 7, p.1-36, 2021.<https://doi.org/10.3390/fermentation7010036>.

NEVES, F, F. *et al.* Drying and quality of microalgal powders for human alimentation. In: *Microalgae From Physiology to Application*. **IntechOpen Ltd.**, London, UK (2019). <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89324>

OCHOA-MARTÍNEZ,C. *et al.* Drying characteristics of mango slices using the Refractance Windowtm technique. **J. Food Eng.**, v.109, p.69-75, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.032>

PAHL, S.L. *et al.* Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass. in: M.A. Borowitzka,N.R. Moheimani (Eds.), *Algae for Biofuels and Energy*, **Springer**, pp. 165-185, 2013. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_10

PEREIRA, A.M. *et al.* High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* p.47,v. 187–194, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.015>

PYLAEVA, S. *et al.* Salt bridge in aqueous solution: Strong structural motifs but weak enthalpic effect. **Sci. Rep.**, v.8, p.e 13626, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31935-z>

QI, W. Generation and harvesting of microalgae biomass for biofuel production, Prospects and Challenges in Algal Biotechnology, 1st ed., **Springer Nature**, pp. 100–101, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1950-0>

ROCHA, D. N. Associação de fatores de estresse e modos de cultivo para aumento da produtividade de lipídeos em *Scenedesmus Spp.* 2018. 92 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.

SAHOO, N. K. *et al.* Sustainable dewatering and drying of self-flocculating microalgae and study of cake properties. **Journal of Cleaner Production**, v.159, p. 248–256, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.015>

SCHÜLER, L.M. *et al.* Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. **Algal Research**, v. 25, n. 1, p. 263–273, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.025>

SEVENICH, R.; MATHYS, A. Continuous versus discontinuous ultra-high-pressure systems for food sterilization with focus on ultra-high-pressure homogenization and high-pressure thermal sterilization: a review. **Compr Rev Food Sci Food Saf.**, v.17, p.646–662, 2018. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12348>

SHENE, C. *et al.* High pressure homogenization of *Nannochloropsis oculata* for the extraction of intracellular components: Effect of process conditions and culture age. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**, v.118, p.63-639, 2016. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500011>

SHOW, P.L. *et al.* A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications, **Int. J. Mol. Sci.**, v.18, p.215, 2017, <https://doi.org/10.3390/ijms18010215>

SILVA, D. A. Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biodiesel. 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais: setor de Tecnologia), Programa de Pós graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná.

SHOW, K.-Y. *et al.* Algal biomass dehydration. **Bioresource Technology, Biorefineries**, v 135, p.720–729, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.021>

TAULBEE, D.N.; MAROTO-VALER, M.M. Centrifugation, **Encyclopedia of Separation Science**, pp. 17–40, 2000. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/00011-9>

UNTERLANDER, N. *et al.* Lyophilization pretreatment facilitates extraction of soluble proteins and active enzymes from the oil-accumulating microalga *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v.25, p.439-444, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.010>

VIEIRA, B. B. **Indicadores de rompimento mecânico de células visando a extração de biocompostos de *Scenedesmus obliquus*.** Dissertação (mestrado em Engenharia Química)-

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa , MG. 2019.

VIEIRA, B. B. *et al.* Optimized extraction of neutral carbohydrates, crude lipids and photosynthetic pigments from the wet biomass of the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. **Separation and Purification Technology**, v.269, p.118711, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118711>

ZHOU, X. *et al.* Optimization of microwave assisted lipid extraction from microalga *Scenedesmus obliquus* grown on municipal wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v.221, n.1, p. 502-508, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.260>.

APÊNDICE A

Tabela A 1 – Quantidade de insumos utilizados para o crescimento da biomassa da microalga *Tetradismus obliquus*.

Componente	Massa (kg)	de sólidos(%)	le líquidos(%)
Micronutrientes	0,02	-	-
Inóculo	1	-	-
Macro nutrientes	2,21	-	-
Água ozonizada	3996,7	-	-
Volume da mistura	4.000	0,8	99,2

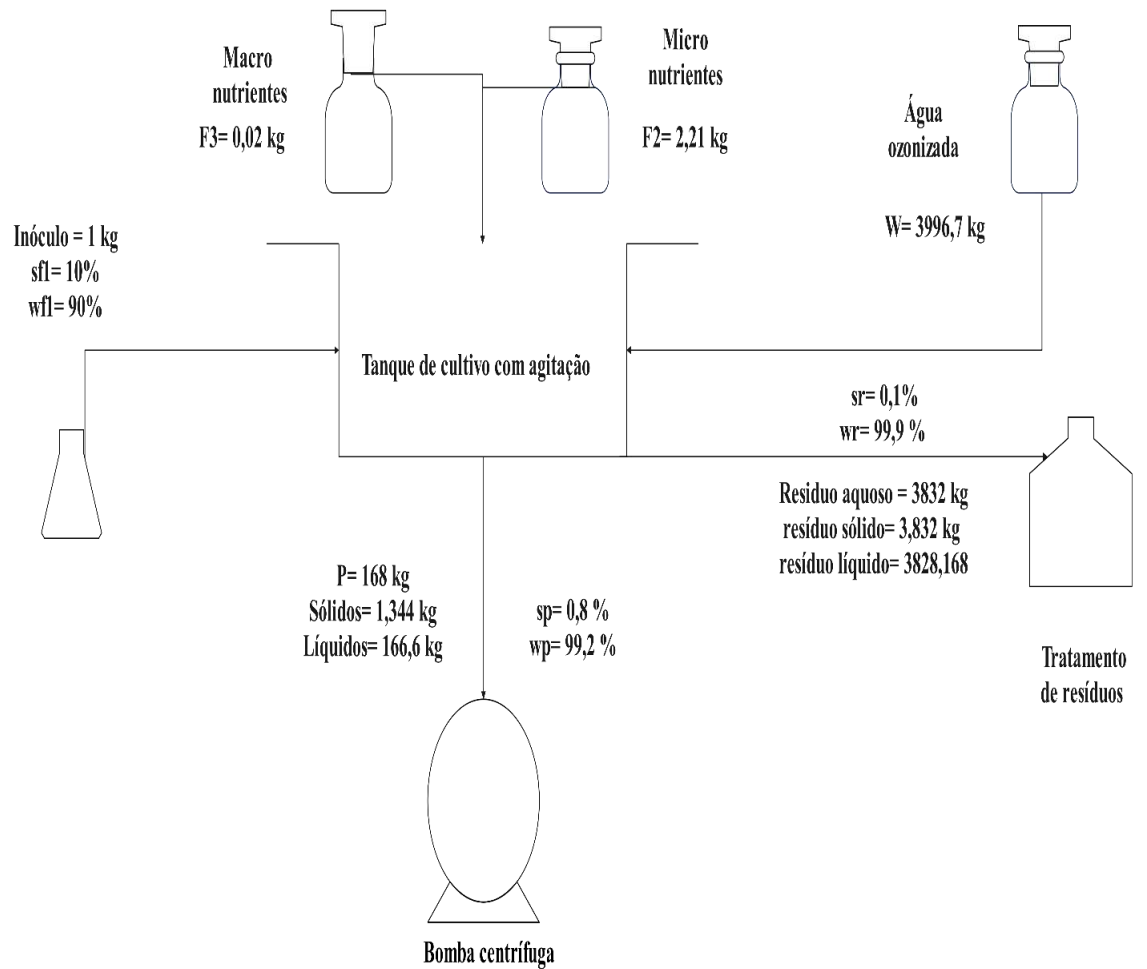


Figura A 1 – Fluxograma do balanço de materiais da etapa de cultivo da microalga *Tetradesmus obliquus*.

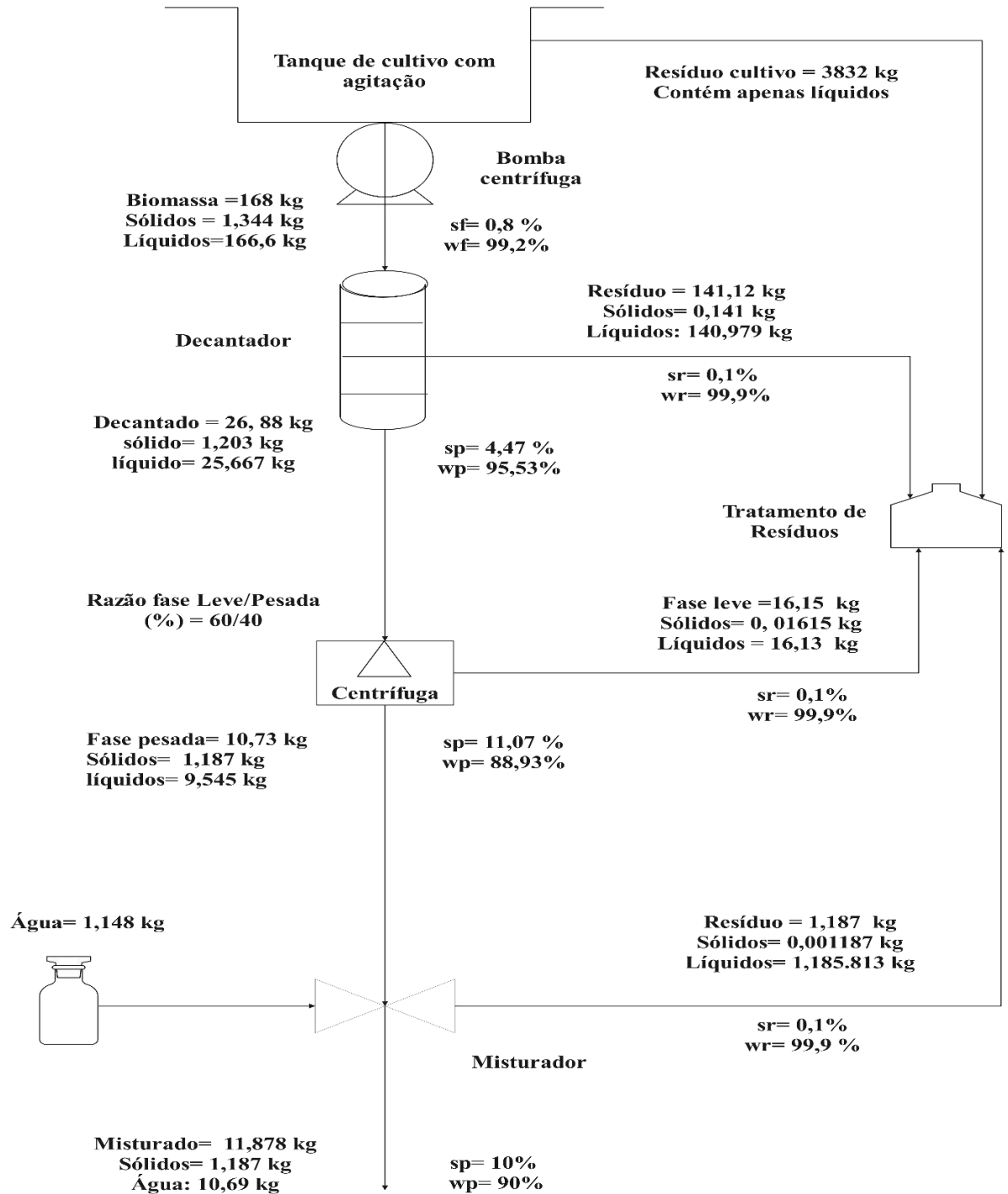


Figura A 2 – Fluxograma do balanço de materiais das etapas relativas ao processo de upstream da biomassa da biomassa *Tetrademus obliquus*.

Tabela A 2 – Balanço de materiais das etapas de coleta da biomassa de *Tetrademus obliquus*.

Etapa	Componente	Massa (kg)	Teor de sólidos (%)	Massa de sólidos (kg)	Teor de Líquidos (%)	Massa de líquidos (kg)
Entrada tanque	do Biomassa	4000	0,03	3,772	99,97	3996,2
Saída tanque	do Resíduo cultivo	3832	0,06	2,428	99,94	3829,58
Saída tanque	do Biomassa	168	0,8	1,344	99,2	166,6
Saída decantador	Biomassa decantada	26,88	4,47	1,20	95,53	25,68
Saída decantador	Resíduo decantador	141,12	0,1	0,141	99,9	140,98
Entrada centrífuga	Biomassa decantada	26,88	4,47	1,20	95,53	25,68
Saída centrífuga	Biomassa centrifugada	10,73	11,09	1,19	88,91	9,54
Saída centrífuga	Resíduo centrifuga	16,15	0,06	0,01	99,9	16,14
Entrada misturador	Biomassa	10,73	11,09	1,19	88,91	9,54
Entrada misturador	Água	1,15	0	0	100	1,15
Saída misturador	Biomassa suspendida	11,88	10	1,19	90	10,69