



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
EM ENGENHARIA QUÍMICA



Extração de lipídios da *Chlorella sorokiniana* comercial assistida por ultrassom utilizando DMSO como solvente

Autor: Higor Gomes Quevedo

Orientadoras: Professora Débora Jung Luvizetto Faccin

e Professora Lígia Damasceno Ferreira Marczak

Porto Alegre, setembro de 2023

Autor: Higor Gomes Quevedo

Extração de lipídios da *Chlorella sorokiniana* comercial assistida por ultrassom utilizando DMSO como solvente

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à COMGRAD/ENQ da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química

Orientadoras: Professora Débora Jung Luvizetto Faccin e Professora Lígia Damasceno Ferreira Marczak

:

Banca Examinadora:

Doutora, Daniele Misturini Rossi, Professora na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Mestra, Laura Jensen Ourique, Doutoranda na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento a todos que contribuíram para a realização deste trabalho de conclusão de curso. Esta conquista não teria sido possível sem o apoio incondicional daqueles que estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada. À minha amada família, em especial à minha mãe Ana Jussara, quero expressar minha eterna gratidão. Seu amor, apoio e incentivo foram a força motriz que me impulsionou a superar desafios e buscar excelência em meus estudos. A lembrança de meu pai, José Valdir, permanece viva em meu coração e sei que ele estaria orgulhoso desta realização. Às minhas amigas de faculdade, em especial Eduarda, Estela, Eugênia e Helena, agradeço por compartilharmos risos, estudos e momentos memoráveis ao longo desses anos. Nossa união foi um pilar fundamental para minha jornada acadêmica e pessoal. Não posso deixar de mencionar minhas orientadoras, Ligia e Débora. Seu conhecimento, orientação e apoio foram fundamentais para a concretização deste trabalho. O acesso ao laboratório e os recursos fornecidos por vocês foram essenciais para a realização dos experimentos e para o sucesso deste estudo. Por último, mas não menos importante, minha gratidão se estende à Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A instituição não apenas me proporcionou um ambiente propício para o aprendizado, mas também me ofereceu recursos valiosos, conhecimento e uma estrutura que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Na busca crescente por combustíveis e fontes de energia renovável, a produção de biodiesel tem conquistado um espaço significativo no mercado global. Diante dos desafios enfrentados na produção deste biocombustível, especialmente quando associada ao uso de culturas agrícolas voltadas para alimentação humana, as microalgas surgem como uma alternativa promissora. Isso se deve à sua alta capacidade de proliferação celular, ao seu teor elevado de lipídios e à não exigência de terras férteis para seu cultivo. No entanto, apesar das vantagens das microalgas como matéria-prima, a produção em larga escala de biodiesel a partir delas ainda enfrenta obstáculos consideráveis, principalmente relacionado ao processo de extração lipídica devido à resistência apresentada pelas paredes celulares da maioria das microalgas. Para contornar essa complexidade, têm sido desenvolvidos métodos que utilizam diferentes solventes e pré-tratamentos. O uso de solventes mostra-se promissor, uma vez que eles têm a capacidade de romper as membranas celulares e solubilizar os lipídios presentes nas microalgas. Além disso, a aplicação de pré-tratamentos surge como um passo estratégico para facilitar o processo de extração. O ultrassom, por exemplo, tem se destacado como um pré-tratamento eficaz. Esse método envolve a utilização de ondas ultrassônicas para criar microbolhas dentro da cultura de microalgas resultando na quebra das paredes celulares, permitindo a liberação dos lipídios encapsulados. Nesse trabalho foi avaliada a extração de lipídios da biomassa proveniente da microalga *C. sorokiniana* comercial utilizando diferentes concentrações de dimetil sulfoxido (DMSO) como solvente e a sua eficiência foi comparada com o etanol; também foi testado o uso do pré-tratamento da biomassa assistido por ultrassom e sua influência na extração. Para o DMSO, a maior porcentagem lipídica foi obtida na concentração de 83%, resultando em 7,35% de lipídios por g de biomassa e pré-tratamento não apresentou diferença significativa na efetividade da extração. Ademais, foi possível inferir que o etanol apresenta melhor desempenho para o processo de extração, pois resultou em 35,10% de óleo por g de biomassa.

Palavras-chave: *Microalga, biodiesel, lipídios, extração.*

ABSTRACT

Due to the growing quest for fuels and renewable energy sources, biodiesel production has gained significant attraction in the global market. Faced with challenges in the production of this biofuel, especially when tied to the use of agricultural crops meant for human consumption, microalgae emerge as a promising alternative. This is due to their high cellular proliferation capacity, elevated lipid content, and the lack of a need for fertile lands for cultivation. However, despite the advantages of microalgae as raw material, large-scale biodiesel production from them still encounters substantial obstacles, primarily related to the lipid extraction process due to the resistance presented by microalgae cell walls. To address this issue, methods involving different solvents and pre-treatments have been developed. The use of solvents appears promising as they have the ability to break down cell membranes and solubilize the lipids present in microalgae. Furthermore, the application of pre-treatments emerges as a strategic step to facilitate the extraction process. Ultrasonic treatment, for instance, has stood out as an effective pre-treatment. This method involves the use of ultrasonic waves to create microbubbles within the microalgae culture, resulting in the disruption of cell walls and enabling the release of encapsulated lipids. In this study, the extraction of lipids from biomass derived from the commercial microalgae *C. sorokiniana* was evaluated. Different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) were used as solvents, and their efficiency was compared with ethanol. Additionally, the use of ultrasound-assisted biomass pre-treatment and its impact on extraction were tested. For the DMSO, the highest lipid percentage was obtained at an 83% concentration, resulting in 7.35% lipids per gram of biomass, and pre-treatment did not significantly affect extraction effectiveness. Moreover, it was possible to infer that ethanol performs better for the extraction process, yielding 35.10% oil per gram of biomass.

Keywords: *Microalgae, biodiesel, lipids, extraction.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação geral de transesterificação do biodiesel.	5
Figura 2: Etapas da reação geral de transesterificação de triglicerídeos.....	6
Figura 3: Mecanismo de reação de transesterificação por via catalítica básica.	7
Figura 4: Mecanismo de reação de transesterificação por via catalítica ácida.....	8
Figura 5: <i>Chlorella sorokiniana</i>	11
Figura 6: Modelos de sistemas de cultivo de microalgas.....	12
Figura 7: Mecanismo de extração direta com solvente orgânico - difusão.....	14
Figura 8: Mecanismo de extração com solvente orgânico auxiliado.....	15
Figura 9: Abordagens clássicas de extração.	16
Figura 10: Novas abordagens de extração de lipídios.....	18
Figura 11: Modelos distintos da ação de diferentes concentrações de DMSO em membranas fosfolipídicas.....	20
Figura 12: Curva de calibração para análise de quantificação de lipídios pelo método SPV...25	
Figura 13: Aparato experimental para extração assistida por ultrassom.	25
Figura 14: Fluxograma de etapas da extração de lipídios assistida por ultrassom.....	26
Figura 15: Fluxograma de processos da quantificação de lipídios.....	28
Figura 16: Reação de extração exaustiva com SPV.	31
Figura 17: Rendimento da extração de lipídios obtido por regressão linear.....	31
Figura 18: Extratos de biomassa com pré-tratamento de ultrassom.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedade do biodiesel produzido através da <i>C. vulgaris</i>	21
Tabela 2: Composição de ácidos graxos da <i>C. sorokiniana</i>	22
Tabela 3: Rendimento extração exaustiva da biomassa de <i>C. sorokiniana</i> por regressão linear.....	29
Tabela 4: Teste de Tukey para diferenças entre os grupos amostrais.....	32
Tabela 5: Teste de Tukey, desconsiderando amostra de DMSO 55%.	32
Tabela 6: Porcentagem de óleo recuperado nos extratos.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

CNPE – Conselho Nacional de Política Energética

DMSO – Dimetil sulfóxido

ILs – Líquidos iônicos IL

PBR – Fotobiorreator

PEF – Campo Elétrico Pulsado

PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

SPV – Método sulfo-fosfo-vanilina

UAE – Extração assistida por ultrassom

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	4
2.1	Biodiesel	4
2.1.1	Transesterificação alcalina homogênea	6
2.1.2	Transesterificação homogênea catalisada por ácido	8
2.1.3	Transesterificação enzimática	9
2.2	Microalgas	9
2.2.1	Cultivo de microalgas	11
2.2.2	Extração de lipídeos	13
2.2.3	Dimetil Sulfóxido	19
2.3	Biodiesel de microalgas	20
2.3.1	Perfil de ácidos graxos	21
3	Materiais e Métodos	23
3.1	Microalga	23
3.2	Extração de lipídios	23
3.2.1	Extração exaustiva de lipídios	23
3.2.2	Extração de lipídios assistida por ultrassom	25
3.3	Quantificação de lipídios nos extratos	27
4	Discussão e Resultados	29
4.1	Lipídios totais	29
4.2	Quantificação de lipídios nos extratos	31
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	36
	REFERÊNCIAS	37

1 Introdução

Nos últimos anos, a crescente preocupação com a escassez de recursos energéticos não renováveis e a busca por alternativas mais sustentáveis têm impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de fontes de energia limpa e renovável. Nesse contexto, os biocombustíveis emergem como uma das soluções promissoras para atender às demandas energéticas globais, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa e minimizando os impactos ambientais associados à utilização de combustíveis fósseis. Entre os biocombustíveis, o biodiesel se destaca como uma alternativa viável devido à sua compatibilidade com os motores convencionais, menor emissão de poluentes e potencial para substituir parcialmente o diesel de origem fóssil (NEUPANE,2022).

Atualmente o Brasil conta com 59 unidades produtoras de biodiesel (ANP, 2023) e a política de adição de biodiesel ao diesel encontra-se regulamentada, estabelecendo metas progressivas de mistura de biodiesel ao diesel mineral, visando à redução de emissões de gases poluentes e à promoção da sustentabilidade ambiental. O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) junto com o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) definem a porcentagem de biodiesel a ser adicionada ao diesel convencional, aumentando-a gradualmente ao longo dos anos (CNPE, 2023; PNPB, 2023).

No entanto, a produção convencional de biodiesel a partir de culturas agrícolas tradicionais, como a soja e o óleo de palma, enfrenta desafios sociais e econômicos significativos, incluindo a competição por terras agriculturáveis com culturas alimentares e o uso intensivo de recursos hídricos. Nesse contexto, as microalgas surgem como uma promissora fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel. Microalgas são organismos fotossintéticos que possuem alta taxa de crescimento, capacidade de fixar dióxido de carbono atmosférico e elevado teor de lipídios em suas células, além da possibilidade de cultivo em terras estéreis. Essas características as tornam candidatas ideais para a produção sustentável de biodiesel.

A extração de lipídios de microalgas é um dos principais passos no processo de produção de biodiesel a partir desses organismos. Os lipídios, principalmente na forma de triglicerídeos, são os compostos que serão convertidos em ésteres metílicos ou etílicos - os componentes-chave do biodiesel -por meio de reações de transesterificação. No entanto,

aumentar a eficiência da extração de lipídios das células de microalgas é um desafio técnico e econômico, uma vez que as paredes celulares rígidas e complexas da maioria desses organismos dificultam a eficiência da operação unitária.

Diversos métodos de extração de lipídios de microalgas têm sido desenvolvidos e aprimorados, variando desde métodos mecânicos até abordagens químicas e enzimáticas. Métodos mecânicos, como prensagem e centrifugação, são amplamente utilizados, porém apresentam limitações em termos de eficiência de extração e consumo energético. Já os métodos químicos, como a extração com solventes orgânicos, têm eficácia, mas podem gerar resíduos e ser prejudiciais ao meio ambiente. Abordagens enzimáticas têm ganhado destaque devido à sua seletividade e menor impacto ambiental, mas ainda requerem otimização para alcançar eficiência industrial.

O pré-tratamento das microalgas antes da extração lipídica é uma estratégia que pode aumentar a eficiência do processo. Nesse contexto, a aplicação de ultrassom tem sido apontada como uma técnica eficaz. O ultrassom de alta frequência cria cavitação e turbulência nas células de microalgas, causando ruptura das paredes celulares e facilitando a liberação dos lipídios. Essa abordagem não apenas melhora a eficiência da extração, mas também reduz o tempo necessário para alcançar altos rendimentos lipídicos. No entanto, é importante otimizar os parâmetros da operação de ultrassom, como intensidade e tempo de aplicação, para evitar danos excessivos às células e garantir a qualidade dos lipídios extraídos.

A *Chlorella sorokiniana*, uma microalga da classe *Chlorophyceae*, é uma candidata promissora para a produção de biodiesel devido ao seu alto teor de lipídios e rápido crescimento. Seu conteúdo lipídico varia dependendo das condições ambientais e do estágio de crescimento, mas pode atingir teores significativos, tornando-a uma escolha atraente para a produção de biocombustível.

Este trabalho tem como objetivos:

- Propor e avaliar a eficiência da extração lipídica utilizando dimetil sulfóxido (DMSO).
- Identificar a influência da concentração de solvente na extração.
- Verificar o impacto do pré-tratamento de ultrassom na extração.

- Selecionar etanol ou DMSO como melhor opção de solvente para a operação unitária proposta. Com foco em manter a extração com menor impacto ambiental e economicamente viável.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Biodiesel

O aumento da população mundial e suas crescentes necessidades energéticas representam um desafio significativo para as fontes de energia renováveis. Maheshwari et al. (2022) discutem que o consumo acelerado de combustíveis fósseis compromete os objetivos de desenvolvimento sustentável e controle do aquecimento global, estabelecidos no Acordo de Paris. O crescimento econômico implica no aumento de maior transporte e, dessa forma, combustíveis alternativos devem ser viáveis tecnicamente, competitivos economicamente, aceitáveis ambientalmente e disponíveis facilmente (MEHER et al., 2006).

Biodiesel é um combustível renovável derivado de óleos vegetais ou gorduras animais por meio de um processo chamado transesterificação; ele consiste em um alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa. A ideia de usar biocombustíveis em motores a diesel teve origem com Rudolf Diesel, que apresentou o primeiro motor a diesel funcionando com óleo de amendoim em 1900. Porém, o diesel de petróleo era abundante na época e isso limitou as pesquisas sobre combustíveis de óleo vegetal. Atualmente, com a crise de recursos petrolíferos e a necessidade de alternativas ambientalmente sustentáveis, o biodiesel ganhou atenção como um combustível renovável que oferece vantagens, como: redução da dependência de petróleo, biodegradabilidade e não toxicidade (YUSUF et al., 2011; AL-ZUHAIR, 2007).

Como um combustível alternativo para motores a diesel, o biodiesel é produzido através da reação de um óleo ou gordura com um álcool. Em seu trabalho, Yusuf et al. (2011) avaliaram os álcoois mais usados, metanol e etanol, descrevendo o primeiro como mais barato e mais reativo, gerando uma reação com ésteres etílicos de ácidos graxos mais voláteis. Entretanto, pontuaram o etanol como uma alternativa por ser menos tóxico e sustentável, visto que o metanol advém principalmente de fontes fósseis.

O biodiesel pode ser produzido através de diversas matérias-primas, como óleo de soja, de palma, de fritura usado, e outros óleos vegetais; além disso também pode ser produzido utilizando gordura animal, óleo microbiano, biomassa vegetal, entre outros. Essas matérias-primas reagem com catalisadores que podem ser ácidos, alcalinos, enzimáticos, homogêneos, heterogêneos ou com solventes eutéticos profundos híbridos, e a reação

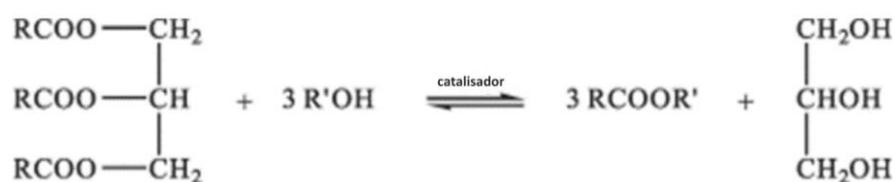
acontece juntamente com um álcool monoídrico, por meio de uma reação de transesterificação (MAHESHWARI et al., 2022).

Em 2023 foi oficializado o aumento da porcentagem de biodiesel obrigatória no óleo diesel, passando de 10 para 12% conforme Resolução nº 16 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). A estimativa é alcançar 15% em 2026, uma vez que essa medida prevê maior segurança e previsibilidade, estimulando o consumo interno no país e gerando mais empregos e investimentos (SERVIÇOS DE INFORMAÇÃO DO BRASIL, 2023; CNPE, 2023).

Esse aumento é justificado uma vez que as emissões de gases como hidrocarbonetos e monóxido de carbono tendem a diminuir significativamente com o uso de biodiesel. Isso ocorre devido à combustão completa, resultado do aumento do conteúdo de oxigênio nas chamas geradas pelas moléculas de biodiesel. O biodiesel é um combustível líquido de coloração amarelo-âmbar transparente e diferentemente do derivado de petróleo, não é explosivo nem inflamável, com ponto de fulgor de 423 K; também é biodegradável e não tóxico, o que faz reduzir a emissão de compostos aromáticos, bem como seus efeitos tóxicos e mutagênicos (SHAHIR et al., 2015; YUSUF et al., 2011).

Na Figura 1 é demonstrada a reação geral de transesterificação do biodiesel.

Figura 1: Reação geral de transesterificação do biodiesel.

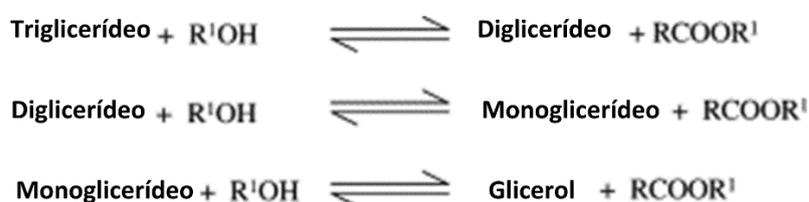


Fonte: Adaptado de PINTO et al., 2005.

Em seu trabalho, Thangaraj et al. (2018) descreveram que no processo, o óleo vegetal (triglicerídeos) reage com um álcool primário em presença de um catalisador, resultando na produção de biodiesel (ésteres alquílicos de ácidos graxos). Durante essa reação, a glicerina é formada como subproduto. A transesterificação ocorre em etapas reversíveis sequenciais, iniciando com a conversão de triglicerídeos em diglicerídeos, seguida pela transformação dos diglicerídeos em monoglicerídeos e glicerol gerando uma molécula de éster metílico em cada

etapa, conforme mostrado na Figura 2. Destaca-se que o processo de transesterificação é principalmente facilitado por um sistema catalítico externo.

Figura 2: Etapas da reação geral de transesterificação de triglicerídeos



Fonte: Adaptado de MEHER et al., 2006.

A produção de biodiesel pode ser catalisada de maneira homogênea ou heterogênea, por diferentes vias de reação. A seguir são apresentados os principais pontos sobre a reação e catalisadores abordados nos trabalhos de Maheshwari et al. (2022), Vyas et al. (2010) e Demirbas (2005).

2.1.1 Transesterificação alcalina homogênea

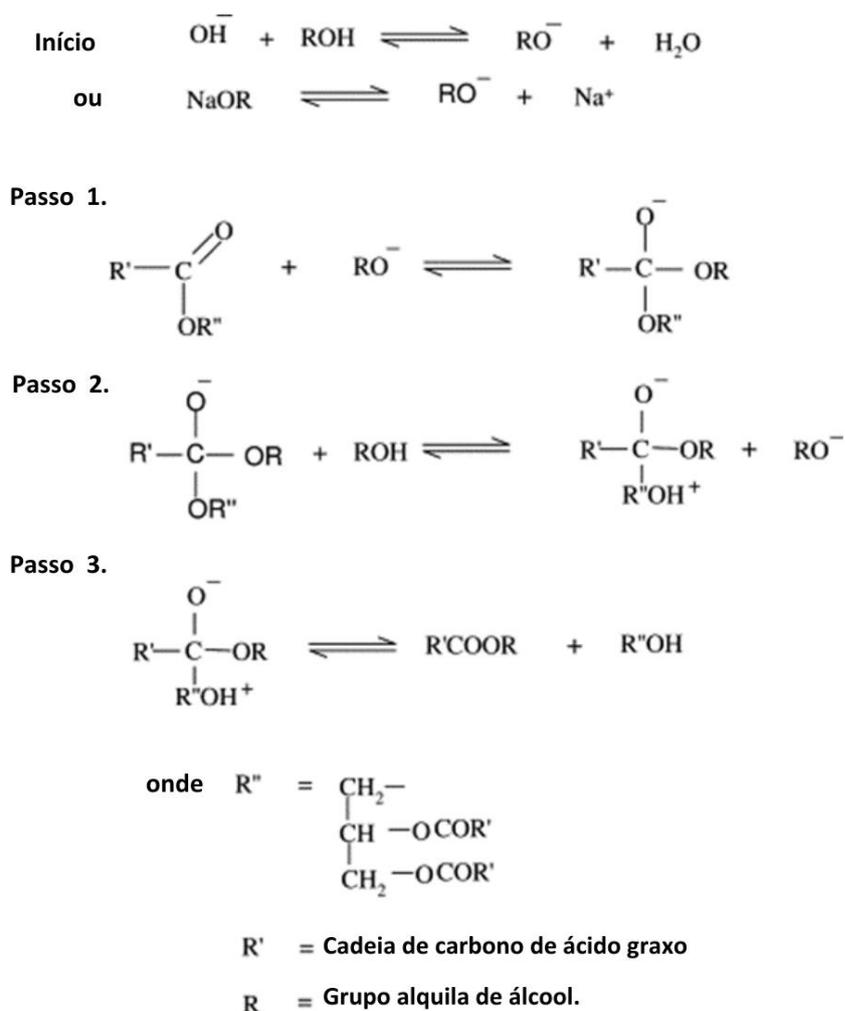
A reação de transesterificação catalisada por via alcalina, normalmente com NaOH, CH₃ONa e KOH, ocorre mais rapidamente que a catalisada por ácidos. O mecanismo de transesterificação é ilustrado na Figura 3. Primeiramente, ocorre a reação da base com o álcool, produzindo um alcóxido e o catalisador protonado. O alcóxido ataca o grupo carbonila do triglicerídeo e gera um intermediário tetraédrico, que posteriormente forma o éster alquílico e o ânion do diglicerídeo, que desprotona o catalisador e pode reagir com uma próxima molécula, reiniciando o ciclo.

Na transesterificação alcalina, mesmo que utilizada matérias-primas desidratadas, a interação da base com o solvente forma água que, na presença de ácidos graxos livres, leva à formação de sabão pela hidrólise dos triglicerídeos, reduzindo consideravelmente a qualidade e o rendimento de produção de biodiesel. A recuperação do produto se torna complicada caso a porcentagem de ácidos livres na reação seja maior que 1% pois, assim, parte do processo pode seguir para a rota de saponificação, inibindo a separação do biodiesel e glicerina.

Em uma reação de transesterificação alcalina do óleo de girassol, CH₃ONa e CH₃OK apresentaram altos rendimentos, 99,99% e 98,46% em peso, respectivamente, pois contêm apenas um grupo hidroxila, impureza necessária para a saponificação. No entanto, quando

utilizados NaOH e KOH, os rendimentos caíram para 86,71% e 91,67% em peso, respectivamente, devido à maior presença de grupos hidroxila. Os sabões são dissolvidos no glicerol e também aumentam a solubilidade do éster metílico no glicerol, levando a perda de rendimento (VICENTE et al., 2004).

Figura 3: Mecanismo de reação de transesterificação por via catalítica básica.



Fonte: Adaptado de MEHER et al., 2006.

Por causa do problema de saponificação, é recomendado a transesterificação em dois passos: primeiro por catálise ácida e posteriormente por catálise básica; a primeira reduz o teor de ácidos graxos livres na reação e a segunda eleva o rendimento total de biodiesel. Além disso, o tipo de álcool utilizado no processo tem um efeito significativo, sendo o metanol o mais adequado, com maior velocidade de reação e maior recuperação do éster, quando comparado com o etanol (SANLI e CANAKCI, 2008).

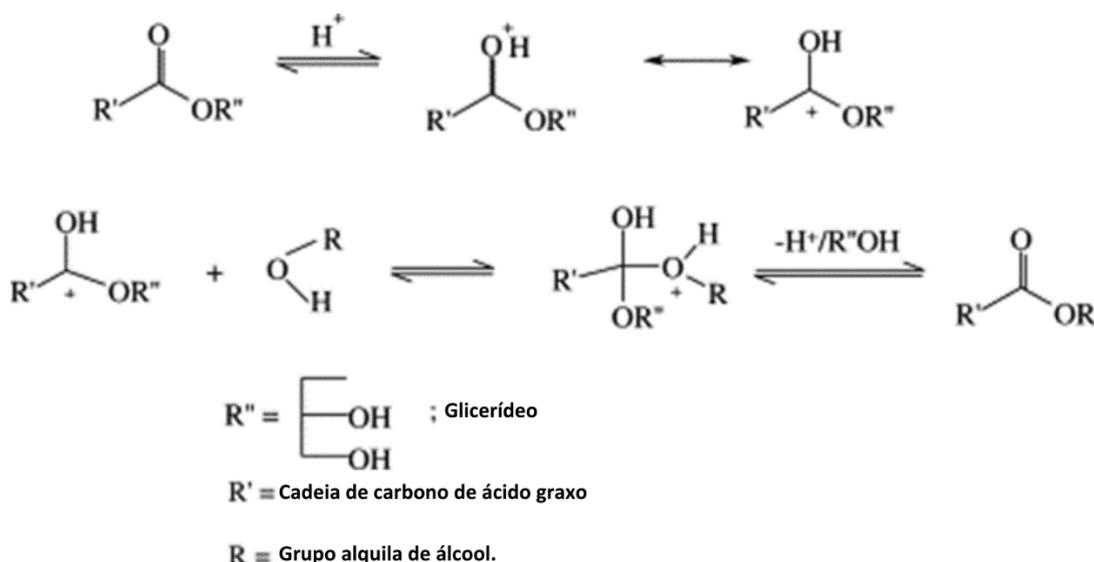
2.1.2 Transesterificação homogênea catalisada por ácido

O ácido sulfônico é o principal catalisador ácido para produção de biodiesel, que também pode ser realizada com ácidos sulfúrico, fosfórico ou clorídrico (FUKUDA et al., 2001). O catalisador ácido pode fornecer um ótimo rendimento para a reação; entre suas desvantagens estão a baixa produtividade do biodiesel, e também o fato da razão molar óleo/álcool ser mais elevado quando comparada a catálise básica (ZHENG et al., 2006; MARCHETTI et al., 2007). A reação catalisada por ácido chega a ser 4000 vezes mais lenta que a reação homogênea catalisada por base, e a vantagem da via ácida é que o processo não é fortemente afetado pela presença de ácidos graxos livres na matéria prima.

Outro diferencial do catalisador ácido é a capacidade de catalisar simultaneamente a esterificação e a transesterificação, permitindo produzir biodiesel a partir de matérias-primas de baixo custo, que são geralmente associadas à alta concentração de ácidos graxos livres, como por exemplo óleo de cozinha usado, que apresenta cerca de 6% de ácidos graxos em sua composição (LOTERO et al., 2005).

A Figura 4 ilustra o mecanismo de reação de produção do biodiesel por vias de catalise ácida.

Figura 4: Mecanismo de reação de transesterificação por via catalítica ácida.



Fonte: Adaptado de MEHER et al., 2006.

A protonação do grupo carbonila do éster leva ao carbocátion, que produz o intermediário tetraédrico após um ataque nucleofílico do álcool, eliminando o glicerol,

formando o novo éster e regenerando o catalisador H^+ . Nesse mecanismo, ácidos carboxílicos podem ser formados através da interação do carbocátion com H_2O , portanto essa reação deve preferencialmente ser feita na ausência de água.

2.1.3 Transesterificação enzimática

Devido à separação dos produtos ser mais fácil do que os outros métodos catalíticos, a transesterificação enzimática utilizando lipase é promissora e atrativa, pois apresenta a mínima necessidade de tratamento de água residual, fácil recuperação do glicerol e ausência de reações secundárias (JEGANNATHAN, 2008). No entanto, na prática, a utilização da enzima traz dificuldades como a contaminação do produto com atividade enzimática residual, além do alto custo econômico.

A catálise por via enzimática oferece para a produção biodiesel mais vantagens quando comparada às vias químicas, entretanto o custo da lipase é o principal problema para a industrialização da produção catalisada por lipase. A viabilização da produção por esse método está associada à redução do custo de produção da enzima, seja por meio de novas lipases e melhoria do processamento. Além disto, destaca-se o estudo de maneiras de estender a vida útil de operação da lipase, através da imobilização da enzima e otimização das reações (DU et al., 2008).

2.2 Microalgas

Conhecidas como uma das formas mais antigas de vida, as algas são plantas primitivas que não possuem caules, raízes e folhas. Com a principal função de conversão de energia, o desenvolvimento simples das estruturas das algas permite sua adaptação e prosperidade em diversas condições ambientais (BRENNAN e OWENDE, 2010).

As microalgas são organismos fotossintéticos capazes de converter o dióxido de carbono em potenciais biocombustíveis, alimentos, rações e bioativos de alto valor. Elas consistem em um grupo diverso de microrganismos unicelulares e multicelulares simples, que trazem a vantagem de alta eficiência fotossintética, taxa de crescimento rápida, métodos de cultivo simplificados e a capacidade de produção em terras estéreis (WANG et al., 2014; CHISTI, 2007).

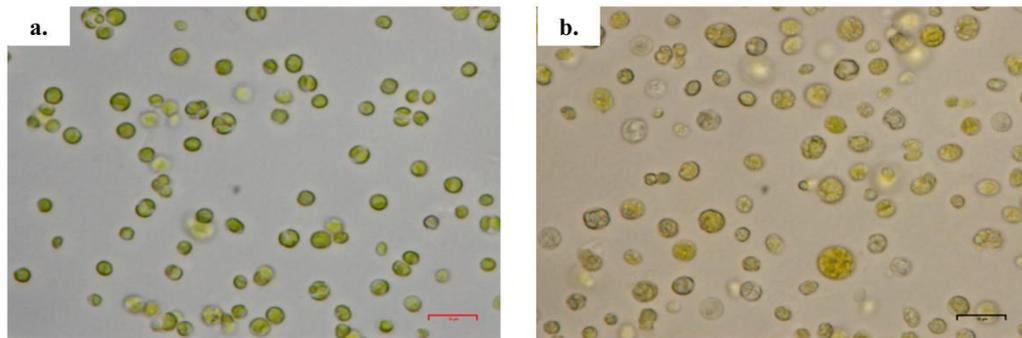
As microalgas podem ser eucariontes ou procariontes e estão presentes em todos os ecossistemas na Terra; estima-se que existam mais de 50.000 espécies e cerca de 30.000 estudadas e conhecidas, pois os ficologistas consideram qualquer organismo que contenha clorofila e um talo não diferenciado em raízes, caule e folhas como uma alga. Já ao termo que se refere a microalgas, aborda as algas microscópicas *sensu stricto* e as cianobactérias, que são bactérias fotossintéticas oxigênicas (MATA et al., 2010; ABELIOVICH et al. 2003).

As algas podem ser divididas em quatro grupos, o primeiro incluindo as algas procariontes, sendo os outros classificados conforme a evolução do cloroplasto; entretanto, ao longo dos anos a posição dos grupos mudaram diversas vezes. O grupo de microalgas desperta grande interesse devido à potencial utilização como biomassa, ração e diversos outros produtos químicos. As origens da ficologia aplicada a esses microrganismos remetem à cultura de *Chlorella*, em 1890, sendo até hoje a principal microalga para uso comercial (ABELIOVICH et al., 2003). Zuccaro et al. (2020) apontaram diversos produtos com valor agregado que podem ser extraídos a partir de microalgas, como bioprodutos incluindo polissacarídeos, lipídios, pigmentos, proteínas, vitaminas e outros compostos.

O gênero *Chlorella* das algas verdes (*Chlorophyceae*) é considerado promissor devido ao seu crescimento acelerado, produção de lipídios e eficiência fotossintética. Além da adaptação em climas que podem variar do desértico ao polar, a *Chlorella* tem se mostrado com alto potencial para engenharia biológica. A *Chlorella sorokiniana*, representada na Figura 5 e matéria-prima neste estudo, apresenta ácidos graxos C16:0 e C18:1 como seus principais constituintes, que em uma lagoa fechada ao ar livre tolerou uma faixa de temperatura e salinidades, acumulando 25% de lipídios, sendo considerada uma das matérias-primas promissoras para a produção de biodiesel de microalgas (NEOFOTIS et al., 2016; ZOU et al., 2022).

Chew et al. (2017) destacaram as microalgas como uma fonte versátil e promissora, que oferecem produtos de alto valor, como proteínas, carboidratos e os já comentados lipídios. A sua versatilidade advém de poder ser cultivada em lagoas abertas ou sistemas fechados, utilizando água e CO₂ atmosférico, tornando-a não concorrente de culturas agrícolas de alimentos.

Figura 5: *Chlorella sorokiniana*. A barra representa 10µm. A) *C. sorokiniana* em condições fotoautotróficas. B) *C. sorokiniana* em condições mixotróficas.



Fonte: Adaptado de AZAMAN et al., 2017.

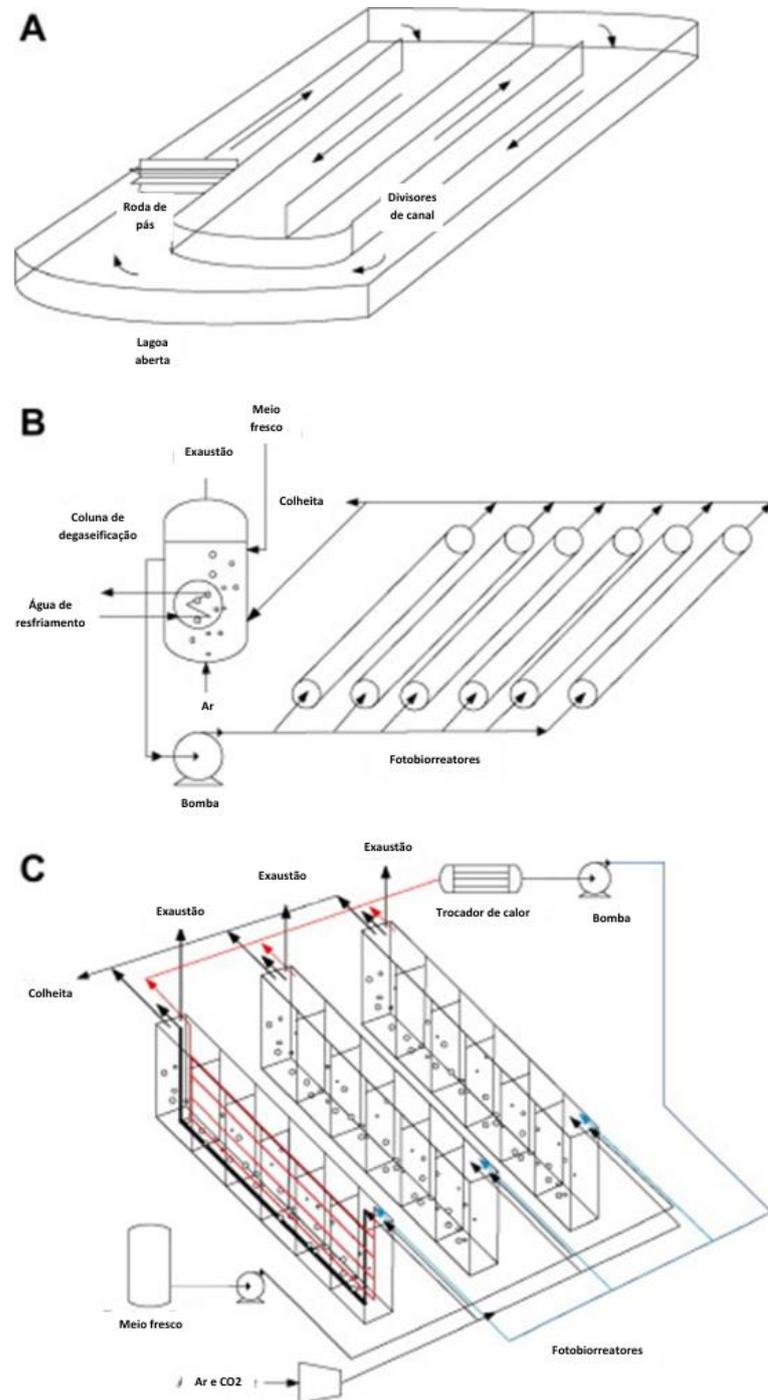
Diante da produção industrial do etanol de cana-de-açúcar e seu clima favorável, o Brasil tem grande possibilidade de se tornar um grande produtor de biodiesel a partir de algas. Quantidades de CO₂ liberadas na queima do bagaço da cana somado à água e nutrientes que podem ser fornecidos pelo vinhoto, que é um efluente líquido do processamento de etanol, são um sistema propício para produção de algas, entretanto a forma apropriada de cultivo ainda é um desafio, pois não é estabelecido ao certo como os fatores influenciam a produção de óleo (SOUZA, 2018).

Zhuang et al. (2018) descreveram em seu trabalho como as variáveis de processo e propriedades físico-químicas podem influenciar na produção de microalgas e seu acúmulo de biomassa. A taxa de fluxo, composição de nutrientes disponíveis, intensidade da luz e troca gasosa disponível são fatores que podem afetar a produtividade, além do modo de cultivo, padrões de reator, características do substrato, pH e faixas de temperatura. As algas podem ser cultivadas por três vias metabólicas distintas: fotoautotróficas, heterotróficas e mixotróficas, e em sistemas de cultivos classificados em abertos e fechados (ZUCCARO et al., 2020).

2.2.1 Cultivo de microalgas

Nos estudos de Zuccaro et al. (2020), sistemas de cultivos foram classificados em duas maneiras distintas: lagoas abertas e sistemas fechados, que também são chamados de fotobiorreatores (PBR, do inglês *Photobioreactor*), que podem ser tubulares, colunas membranas ou placa planas. A Figura 6 mostra exemplos de alguns desses sistemas.

Figura 6: Modelos de sistemas de cultivo de microalgas. A) Lagoas tipo raceway. B) Fotobiorreator tubular. C) Fotobiorreator de placa plana.



Fonte: Adaptado de JORQUERA et al., 2010.

Lagoas tipo *raceway* fazem parte dos sistemas abertos, geralmente são rasas com até 50 cm de profundidade e incorporam pás para a mistura e circulação dos componentes líquidos e gasosos. Usualmente requerem investimentos iniciais baixos e são construídos em

concreto ou terra compactada. São expostas diretamente à atmosfera, permitindo a troca gasosa e a regulação da temperatura. Apesar de não requerer terra arável, por ocorrer uma grande taxa de evaporação, necessitam de uma grande quantidade de água, ponto que representa uma desvantagem (ZUCCARO et al., 2020; JORQUERA et al., 2010).

Os PBR representam os sistemas fechados e a sua escolha depende de diversos fatores como a produtividade de biomassa e os produtos finais de interesse. Apesar do seu modo de cultivo ser mais oneroso, uma vez que as variáveis como iluminação, alimentação de dióxido de carbono e nutrientes são controlados, traz como vantagem uma maior produção por área e a minimização de problemas relacionados a contaminação (ZUCCARO et al., 2020).

Nos estudos de Narala et al. (2016) ainda é sugerido uma forma de produção de microalgas diferente, chamado de sistema de cultivo híbrido de duas etapas. Esse sistema consiste na etapa de crescimento as células em um reator PBR e posteriormente transferidas para uma lagoa tipo *raceway*. Esse método é atrativo para a extração de lipídios de microalgas, pois o crescimento é mais rápido no PBR e no sistema aberto os nutrientes são menores, o que estimula o acúmulo de lipídios.

Para um cultivo destinado à produção de biocombustível, os principais desafios são separar a biomassa do meio de crescimento e, posteriormente, extrair os lipídios da biomassa colhida. Os principais métodos de colheita envolvem centrifugação, sedimentação e/ou floculação, ademais, pode-se haver a necessidade de secar a biomassa. A colheita pode representar de 20% a 35% do custo total da produção e a secagem pode representar até 89% da energia necessária no processo (TAHER et al., 2014).

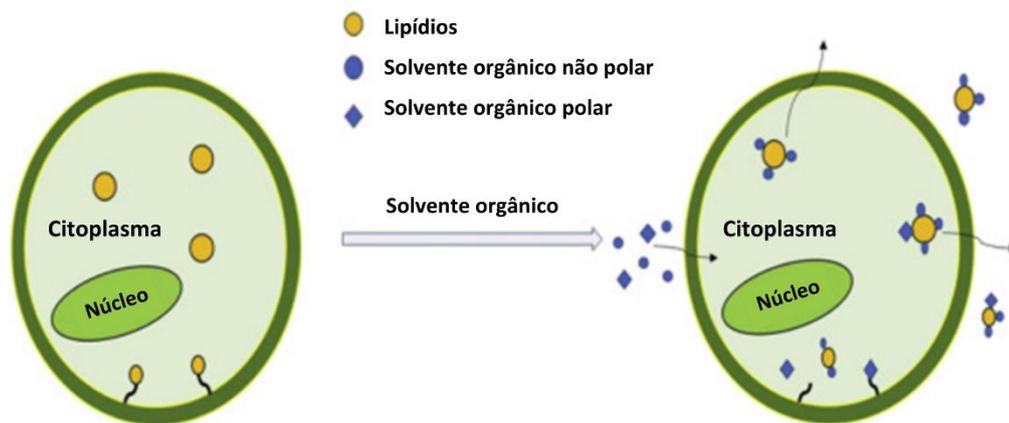
2.2.2 Extração de lipídeos

A biomassa de microalgas tem capacidade de armazenar lipídios dentro de células, com a capacidade de produzir até 100 vezes mais óleos vegetais por área do que muitas outras plantas. Para produção de biocombustíveis, surge a necessidade de extrair esses lipídios de maneira eficiente e com alta produtividade, Mubarak et al. (2015) citam diversos métodos para realizar essa extração, tanto mecânicos como químicos. Métodos químicos incluem a extração Soxhlet, Bligh and Dyer's, extração com fluídos supercríticos e acelerada por

solventes. Já as vias de extração mecânica incluem uso de expeller de óleo, assistida por micro-ondas e assistida por ultrassom.

Na Figura 7 está representada simplificada a extração por solvente orgânico. De acordo com o conceito básico de solubilidade, as longas cadeias de ácidos graxos hidrofóbicos dos lipídios neutros interagem entre si através de fracas atrações de Van der Waals e formam grânulo no citoplasma. O mecanismo de extração segue as seguintes etapas: primeiro o solvente orgânico penetra a membrana celular, em seguida ele interage com os lipídios usando forças de van der Waals semelhantes que, posteriormente, formam um complexo solvente-lipídio. Impulsionado por um gradiente de concentração, esse complexo difunde-se através da membrana que, finalmente, passa do filme de solvente estático que envolve a célula para o solvente em massa (HALIM et al., 2012).

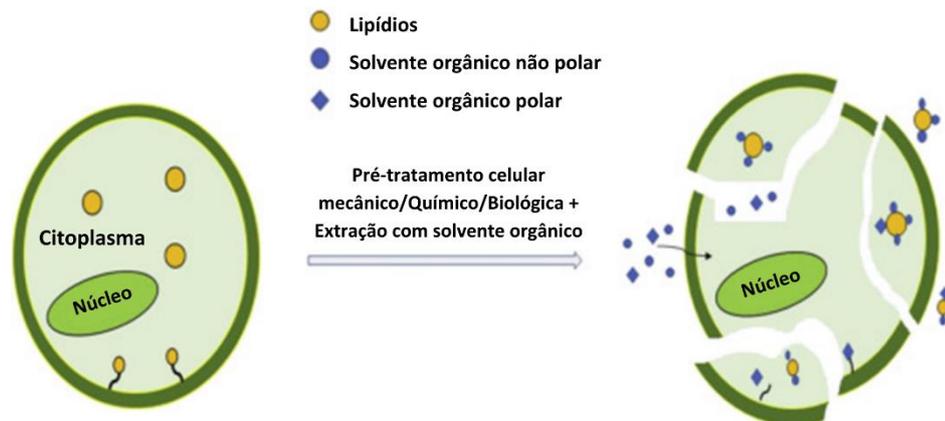
Figura 7: Mecanismo de extração direta com solvente orgânico - difusão



Fonte: Adaptado de SATI et al., 2019.

A extração de lipídeos é uma das principais etapas entre as várias operações empregadas na produção de biodiesel por microalgas. Nesse processo os solventes desempenham a função principal, podendo ser usados diretamente (Figura 7) ou auxiliados por métodos que levam à ruptura celular, como mecanismo exemplificado na Figura 8. As maiorias das microalgas possuem uma parede celular espessa e a liberação dos compostos de interesse é limitada pela rigidez matricial das microalgas. As abordagens clássicas como Soxhlet, Folch e Bligh-Dyer têm sido usadas e apesar do baixo custo, devido ao grande consumo de reagentes e poluição ambiental, novas técnicas estão sendo estudadas (ZHOU et al., 2022; SATI et al, 2019).

Figura 8: Mecanismo de extração com solvente orgânico auxiliado



Fonte: Adaptado de SATI et al., 2019.

A otimização da extração lipídica de microalgas vindo sendo assunto de diversos estudos, citando-se os trabalhos de Zhou et al. (2022), Sati et al. (2019) e Lee et al. (2020) que demonstraram os principais métodos de extração e os pré-tratamentos de biomassa mais utilizados. A seguir são discutidos, separadamente, os métodos clássicos e os inovadores para a extração de lipídeos de microalgas.

a) Abordagens clássicas: Soxhlet e Folch/Bligh-Dyer extraction

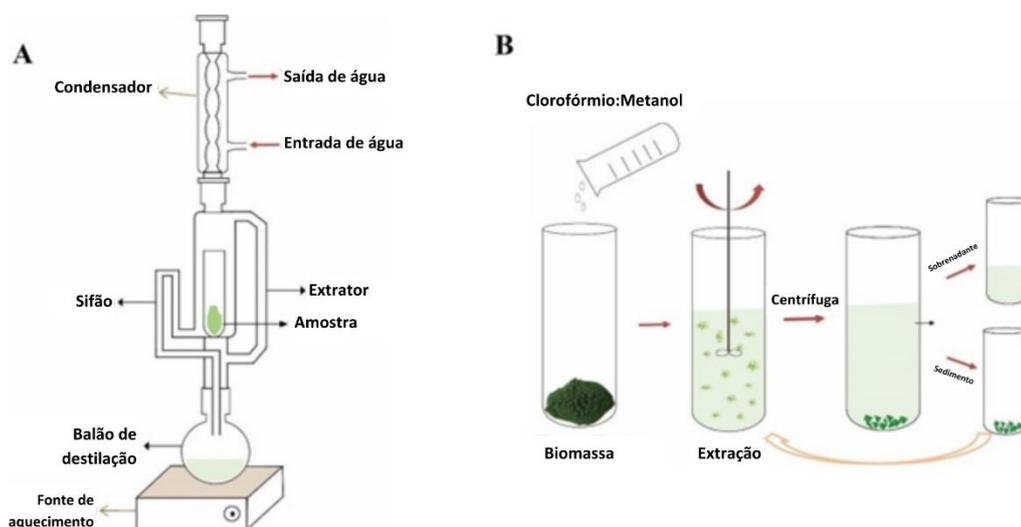
O método Soxhlet envolve a extração contínua usando solventes orgânicos, como hexano. A técnica emprega ciclos de evaporação e condensação dos solventes, repondo continuamente a biomassa com solventes frescos para evitar a saturação. O processo ocorre em um aparelho Soxhlet e é vantajoso por sua relativa simplicidade e baixo custo. No entanto, apresenta desvantagens, como o consumo significativo de solventes orgânicos, que geralmente são tóxicos. Além disso, o método requer tempos de extração prolongados.

Folch, Lees e Stanley (1957) introduziram a lavagem com metanol, clorofórmio e água para promover a formação de duas fases, e no ano seguinte, Bligh e Dyer (Bligh and Dyer, 1959) desenvolveram outra uma abordagem clássica para a extração de lipídios de microalgas. Essa técnica utiliza uma mistura de solventes orgânicos, como clorofórmio e metanol, para interagir com os lipídios presentes nas células microalgais. A mistura de solventes resulta em uma bipartição em duas fases, onde os lipídios se separam na fase orgânica. O método Bligh-Dyer tem a vantagem de ser relativamente simples e econômico, mas enfrenta desvantagens semelhantes às do método Soxhlet, incluindo o consumo de solventes orgânicos e a

possibilidade de poluição ambiental. Além disso, também pode envolver tempos de extração prolongados.

Na Figura 9 são representados esses dois métodos de extração.

Figura 9: Abordagens clássicas de extração. A) Soxhlet. B) Folch/Bligh-Dyer



Fonte: Adaptado de ZHOU et al., 2022.

b) Novas abordagens: Extração com fluido supercrítico ou com líquido pressurizado, campo elétrico pulsado, assistido por micro-ondas ou por ultrassom, assistido por enzimas e líquidos iônicos.

Fluidos supercríticos são compostos que se encontram em pontos de pressão e temperatura acima do ponto crítico, o que faz com que esses compostos tenham transportabilidade semelhantes a de gases e solubilidade semelhante a de líquidos. Dióxido de carbono, amônia e metanol são alguns exemplos de fluidos que em estado supercrítico podem ser utilizados como agentes extratores. Quando a biomassa microalgal é exposta ao fluido, o conteúdo lipídico é desorvido na corrente e posteriormente é recuperado por condensação. O CO_2 é amplamente usado com essa técnica pois suas características são favoráveis, como baixa temperatura e pressão crítica, baixa inflamabilidade e toxicidade, pouca reatividade e características que facilitam a separação dos extratos no final.

A extração líquida pressurizada também é uma técnica diretamente ligada a pontos de pressão e temperatura. Entretanto, o fluido extrator é trabalhado no ponto subcrítico, isto é, aquecido acima do ponto de ebulição e abaixo do ponto crítico, onde a pressão é

controladora para manter o líquido nesse estado. Foram feitos estudos utilizando água com líquido extrator de lipídios e também solventes a base de biomassa como limoneno e etanol.

O PEF campo elétrico pulsado (PEF, do inglês *Pulsed Electric Field*) utiliza a teoria da eletroporação, ou seja, um campo elétrico de alta voltagem, entre 0,5 e 1,0 V, é aplicado na amostra para romper as células. O campo altera a estrutura da membrana com a formação de poros temporários ou permanentes, aumentando sua permeabilidade e interação entre o solvente e os lipídios.

O método de extração assistido por micro-ondas envolve a exposição da amostra a radiações eletromagnéticas em uma frequência entre 0,3 a 300 GHz. Nesse processo o calor é transferido do meio para as extremidades, aquecendo a amostra inteiramente. Com o aumento da energia, a pressão celular aumenta e a parede celular é destruída, deixando o lipídio exposto para a ação do solvente. As micro-ondas interagem seletivamente com as moléculas polares, como água, e induzem o aquecimento, sendo um método desvantajoso para compostos sensíveis ao calor. A eficiência desse modo é diretamente afetada pela temperatura e pelo tempo de exposição.

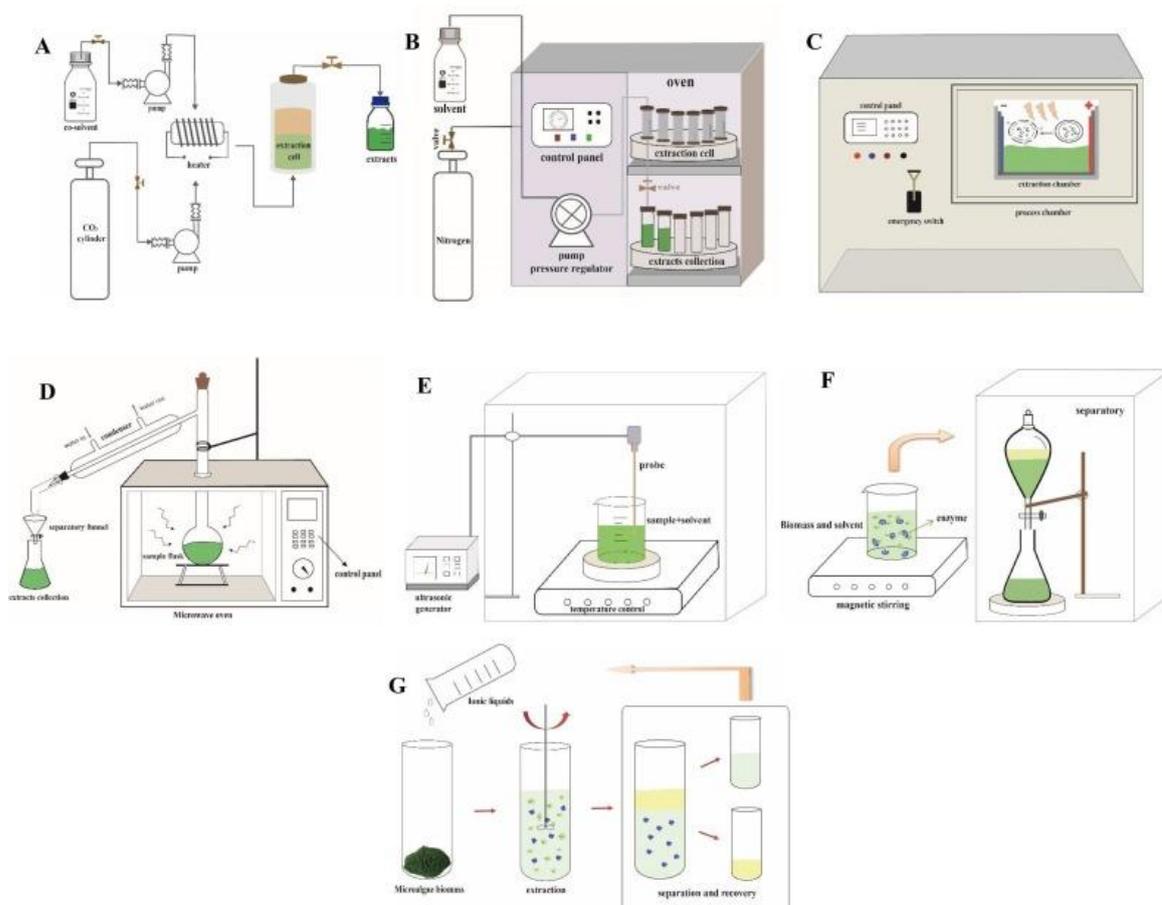
A extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *ultrasound-assisted extraction*) utiliza ondas sonoras de alta frequência, geralmente acima de 20 kHz, para romper as células das microalgas. A operação envolve dois mecanismos principais: a cavitação e os efeitos mecânicos-acústicos induzidos. O solvente gera microbolhas sobre a ação das ondas, que formam ondas de choque locais e rompem a célula, resultando no aumento na taxa de extração de lipídios. A UAE é uma técnica fácil de operar, requer menor energia e é rápida e eficaz. Um aumento de 50-500% de óleo e redução de 10 vezes no tempo podem ser alcançados utilizando essa técnica, cuja eficiência varia para diferentes microalgas e tempo de exposição.

Para fugir do uso de equipamentos caros, alguns métodos bioquímicos são estudados. A extração assistida por enzimas tem uma alta seletividade de substrato e pode ser realizado a condições de baixas pressões e temperatura. As enzimas se ligam a moléculas específicas na parede celular e hidrolisam as ligações, o que resulta na quebra da parede celular. O rendimento do método está diretamente ligado a compatibilidade entre a biomassa algal e a enzima escolhida.

Os líquidos iônicos (ILs, do inglês *ionic liquids*) são soluções de sal não aquosas que compreendem um cátion orgânico e um ânion inorgânico. O ponto de fusão geralmente é abaixo de 100 °C e são adequados para a extração de lipídios devido a sua estabilidade térmica, não volatilidade e baixa inflamabilidade. Os ILs geralmente têm a capacidade de solvatar biopolímeros como a lignina ou celulose, rompendo as paredes celulares das microalgas. As propriedades físico-químicas e térmicas podem ser ajustadas pela seleção dos constituintes catiônicos e aniônicos, por isso são considerados solventes personalizados.

Na Figura 10 está a representação de diversas técnicas com abordagens inovadoras na extração de lipídios.

Figura 10: Novas abordagens de extração de lipídios. A) Extração com fluido super crítico. B) Extração líquida pressurizada. C) Campos elétricos pulsados. D) Extração assistida por micro-ondas. E) Extração assistida por ultrassom. F) Extração assistida por enzimas. G) Líquidos iônicos.



Fonte: Adaptado de ZHOU et al., 2022.

Os variados métodos têm sua eficiência mensurada através da quantificação do percentual de lipídio extraído da microalga, isto é, a quantidade de óleo extraído frente ao total que poderia ser extraído; em seus estudos, Jaeschke (2019) quantificou o total de lipídios que poderia ser extraído da biomassa através do método sulfo-fosfo-vanilina (SPV). O grupo carbonila, presente no reagente fosfo-vanilina, reage com os íons de carbono provenientes da quebra de moléculas de lipídios, causada pelo ácido sulfúrico, e resulta em um composto de coloração rosada, permitindo identificar a quantidade total de lipídios em uma análise de espectrofotometria.

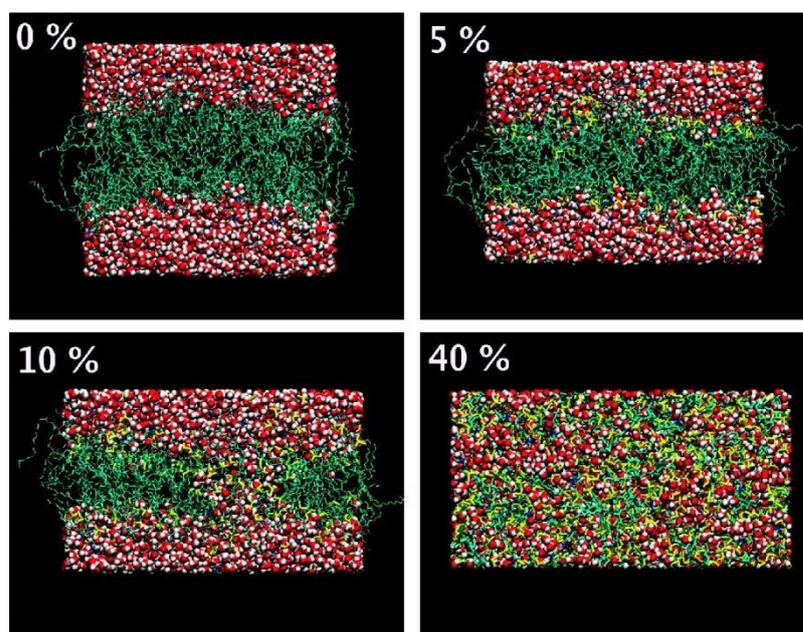
2.2.3 Dimetil Sulfóxido

Com um domínio altamente polar e dois grupos metil apolares, a molécula de dimetil sulfóxido (DMSO) tem caráter anfipático, sendo solúvel tanto em meios aquosos quanto orgânicos. O DMSO pode ser usado em configurações clínicas ligados a terapias medicamentosas, mas suas características o tornam um propício solvente em estudos biológicos. O DMSO pode romper ligações de hidrogênio, captar radicais de hidroxila e agir como diferenciador celular (SANTOS et al., 2003).

A otimização dos protocolos como a identificação ótima de DMSO é em grande parte empírica, devido à compreensão da ação do DMSO em membranas celulares ainda ser deficiente. Alguns estudos indicam que o DMSO induz a formação de poros na membrana celular. Em seus estudos, Gurtovenko et al. (2007) investigaram a ação da variação de concentração de DMSO em uma membrana fosfolipídica na fase cristal líquido usando simulações de dinâmica molecular. Os pesquisadores identificaram que, dependendo da concentração, o DMSO é capaz de diminuir a espessura da membrana, induzir a formação de poros ou destruir a estrutura da bicamada de membranas, conforme está apresentado resumidamente na Figura 11.

Comparado com outros solventes de extração tradicional quando referido a microalgas, o DMSO apresenta como vantagem a extração fácil e rápida, sem necessidade de processos intermediários como centrifugação e, também, apresenta alta estabilidade dos componentes bioativos de interesse. A baixa toxicidade, alta fluidez e seletividade em pontos de pressão e temperatura baixos indicam que o DMSO como solvente potencial para extração de lipídios (WANG et al., 2023).

Figura 11: Modelos distintos da ação de diferentes concentrações de DMSO em membranas fosfolipídicas.



Fonte: Adaptado de GURTOVENKO et al., 2007.

2.3 Biodiesel de microalgas

Diversas espécies de microalgas podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção de biodiesel, principalmente as algas verdes e cianobactérias, que podem produzir 40% de óleo em base seca e 90 toneladas por hectare. Pelas características químicas do biodiesel produzido por microalgas serem semelhantes ao diesel de petróleo, como viscosidade, ponto de fulgor e densidade, elas são uma alternativa aos combustíveis fósseis. Além do mais, seu alto teor de óleo e boa produtividade as tornam uma matéria prima atrativa (SOUZA, 2018).

Conforme os estudos de Jacob et al. (2021), o biodiesel produzido através da *C. vulgaris* atende os padrões de qualidade impostos pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM), conforme Tabela 1. Em testes de motores, a maioria dos estudos apontou que a eficiência de saída do motor a diesel foi alcançada, apenas com um leve consumo superior de combustível. Entretanto, em viabilidade técnica econômica ainda são necessárias muitas melhorias devido aos custos dos fotobiorreatores.

Tabela 1: Propriedade do biodiesel produzido através da *C. vulgaris*.

Espécie	Viscosidade (cP) 40°C	Peso específico	Ponto de nuvem (°C)	Ponto de fulgor (°C)	Número de cetano	Calor específico (MJ/Kg)
<i>C. vulgaris</i>	4.8	0.870	0	-12	110	33.6
ATSM	1.9-6.0	0.860-0.900	-	-	min 40	-

Fonte: Adaptado de JACOB et al., 2021.

2.3.1 Perfil de ácidos graxos

O biodiesel é uma mistura de ésteres de ácidos graxos, principalmente de 16 e 18 átomos de carbono. O perfil de ácidos graxos é o principal fator para controlar as propriedades do biodiesel, como o número de cetano, ponto de fusão e ebulição, valor calorífico e viscosidade. Estas propriedades têm tendência crescente conforme maior o comprimento de cadeia, e conseqüentemente, as insaturações diminuem e cadeia e tender a diminuir essas propriedades (DESHMUKH et al., 2019).

Nos seus estudos, Deshmukh et al. (2019) apontaram que os ácidos graxos de cadeia longa irão desempenhar uma combustão melhor, pois seu número de cetano será maior; entretanto, a alta viscosidade pode representar um problema na atomização do combustível. A presença de ácidos graxos saturados ou poli-insaturados irão levar aos extremos das propriedades, logo, idealmente, o biodiesel pode ser uma mistura entre os diversos ácidos graxos.

Os triglicerídeos contêm ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Para definir a qualidade do biodiesel, alguns fatores são considerados; o número de cetano, por exemplo, é diretamente proporcional ao a um menor número de insaturações do éster, o que causa uma combustão incompleta e geração de fumaça. Em outra direção, um número alto de insaturações favorece a oxidação, mesmo que atrelado ao uma melhor lubrificação. No Brasil o número mínimo de cetano do biodiesel é 51 (SOUZA, 2018).

Outra característica importante de ser controlada na produção de biodiesel é a viscosidade, pois essa indica a resistência do fluido ao escoamento. Além disso, essa propriedade também influencia a combustão, pois quanto maior a viscosidade, menor a eficiência de ingestão de combustível, pois a área de contato gases pressurizados-combustível

diminui na câmara de combustão, favorecendo a queima incompleta. Por outro lado, valores baixos causam problemas de vedação e vazamento (SOUZA, 2018; ZUNIGA, 2011).

Na Tabela 2 é apresentada a distribuição dos ácidos graxos em uma cultura de *C. sorokiniana* estudada nos trabalhos de Yun et al. (2020). É notável que os principais componentes são C16:0, C18:2 e C18:3.

Tabela 2: Composição de ácidos graxos da *C. sorokiniana*

Cepa	Temperatura (°C)	Total de lipídios (%)	Composição dos ácidos graxos (%)												Produtividade (g/L)	
			C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SFA ₁	UFA ₂	MUFA ₃	PUFA ₄	Biomassa	Lipídios
KNUA104	25	19,31	24,63	0,10	6,16	8,90	1,56	9,97	21,48	27,10	26,29	73,71	10,07	63,64	0,71	0,14
KNUA114	25	23,21	26,54	2,30	9,97	13,88	0,65	2,30	21,45	22,17	27,93	72,07	4,60	67,47	0,78	0,18

¹ Porcentagem de ácidos graxos saturados

² Porcentagem de ácidos graxos insaturados

³ Porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados

⁴ Porcentagem de ácidos graxos polisaturados

Fonte: Adaptado de YUN et al., 2020.

3 Materiais e Métodos

O presente capítulo apresenta uma descrição detalhada das ferramentas, técnicas e abordagens empregadas na condução deste estudo com uma visão completa do processo metodológico utilizado para avaliar a extração de lipídios a partir de microalgas. A metodologia seguida foi baseada nos estudos de Jaeschke (2019).

3.1 Microalga

As amostras de biomassa da *Chlorella sorokiniana* comercial foram obtidas da marca Green Gem®. A biomassa pode sofrer variações de composição entre os lotes devido ao processo produtivo, pois as microalgas utilizadas tem como finalidade a venda comercial para utilização como suplementação alimentar humana. A disposição da biomassa na embalagem é em cápsulas de pequenos discos, que foram trituradas utilizando gral e pistilo. Foi feita análise granulométrica da amostra através de peneiras (BERTEL Indústria Metalúrgica Ltda., Brasil). A amostra apresentou grãos entre 65 e 200 mesh.

3.2 Extração de lipídios

3.2.1 Extração exaustiva de lipídios

A determinação da concentração total de lipídios na biomassa foi executada utilizando o método sulfo-fosfo-vanilina (SPV). O procedimento de extração e quantificação dos lipídios compreendeu as etapas descritas a seguir. A biomassa, previamente hidratada, foi empregada em quantidades de 0,05 g por amostra. A fim de preparar a reação, adicionou-se 0,1 mL de água deionizada a cada amostra. Posteriormente, para dar início à reação química, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (*Química Moderna, Brasil*) foram adicionados a cada amostra. As amostras, contendo ácido sulfúrico, foram então aquecidas a uma temperatura de 100 °C por um período de 10 minutos, utilizando banho maria sob aquecimento em uma chapa quente e temperatura controlada manualmente com auxílio de termômetro digital. Para interromper a reação, as amostras foram imediatamente resfriadas em um banho de gelo por 5 minutos.

As amostras foram então submetidas a diferentes níveis de diluição, sendo diluídas em proporções de 2, 10 e 20 vezes. De cada uma das amostras diluídas, uma alíquota foi transferida para um novo tubo falcon/vidro. Nessas amostras, o volume total foi restaurado para 2,1 mL ao adicionar água deionizada, utilizando pipeta volumétrica. Adicionalmente, uma

amostra não diluída também foi avaliada. Em seguida, o reagente fosfo-vanilina foi introduzido nas amostras. A reação ocorreu no escuro e foi mantida por 15 minutos. Finalmente, as amostras submetidas a extração descrita foram analisadas utilizando um espectrofotômetro (*PG Instruments Ltd., Model T80+ UV-Vis, United Kingdom*), com a leitura das amostras utilizando comprimento de onda de 530 nm. Todas as amostras foram realizadas em duplicata.

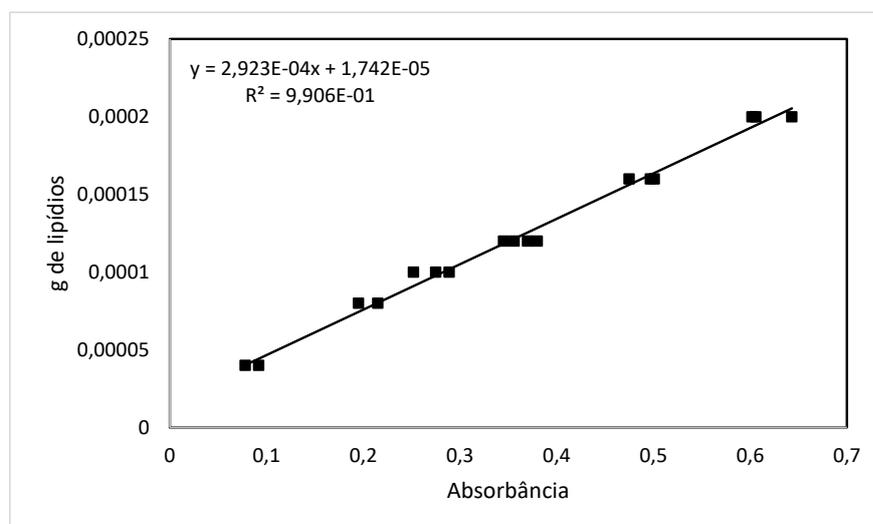
O reagente fosfo-vanilina foi preparado previamente; trata-se de uma solução de ácido fosfórico (*Êxodo científica, Brasil*), etanol (*Êxodo científica, Brasil*) e vanilina (*Sigma Aldrich, USA*). Foi adicionado 0,3 g de vanilina a 50 mL de uma solução 10% etanol (v/v), e a solubilização da vanilina foi feita sob agitação com barra e agitador magnético. Após a total solubilização da vanilina, foi adicionado 200 mL de ácido fosfórico concentrado e a mistura foi armazenada no escuro. O reagente foi produzido pouco antes da reação com o extrato de modo a garantir a sua eficiência de quantificação.

A concentração de lipídeos na amostra foi determinada por uma curva de calibração prepara com óleo de oliva (*Sigma Aldrich, USA*) em clorofórmio (*Neon, Brasil*). Primeiramente foi preparada uma solução mãe utilizando 0,02 g de óleo de oliva em 10 mL de clorofórmio (CHCl_3), foram extraídas amostras de 20, 40, 50, 60, 80 e 100 μL da solução mãe em tubos falcon/vidro, todas as amostras tiveram volume final ajustados para 100 μL através da adição de diferentes quantidades de clorofórmio. Então, as amostras foram levadas para estufa a 60 °C por 20 minutos para evaporação total do CHCl_3 . Para trabalhar em mesmo volume, 100 μL de água deionizada foram adicionadas as amostras que posteriormente foram tratadas com ácido sulfúrico e SPV como já descrito anteriormente. A curva de calibração foi determinada em concentrações variando de 0,4 a 2 mg L^{-1} e está representada na Figura 12.

Todos os pontos da curva de calibração foram feitos em duplicata, como também as extrações exaustivas. A curva de calibração foi aproximada linearmente a uma equação da reta (3.1), em que y representa a quantidade de lipídios presente na amostra em g e em x os valores lidos de absorbância da amostra. Através da equação 3.1 é possível calcular a quantidade de lipídios extraída da biomassa e dos extratos, em que x é o valor de absorbância lido e y é o valor em grama de lipídios na amostra.

$$y = 0,0002923x + 0,00001742 \quad (3.1)$$

Figura 12: Curva de calibração para análise de quantificação de lipídios pelo método SPV.

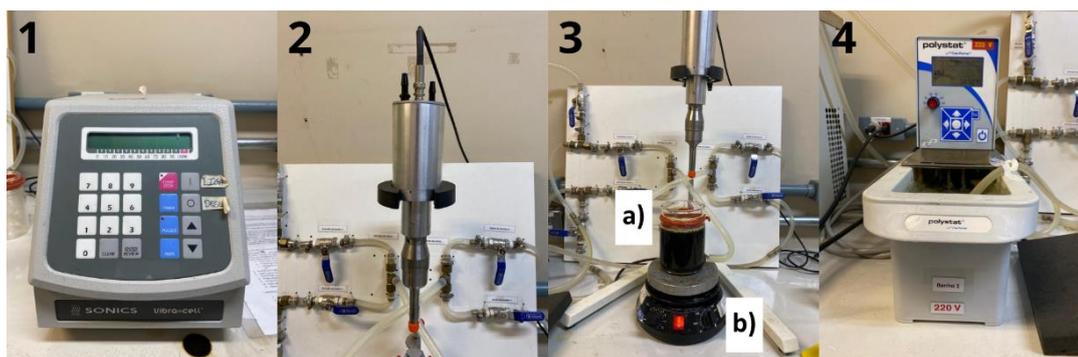


Fonte: Autor.

3.2.2 Extração de lipídios assistida por ultrassom

A extração de lipídios assistida por ultrassom foi separada em dois momentos: primeiro um pré-tratamento da biomassa e posteriormente uma etapa difusiva. O aparato experimental está representado na Figura 13.

Figura 13: Aparato experimental para extração assistida por ultrassom. 1) Gerador de potência. 2) Sonda de ultrassom. 3) Sistema: a) célula de extração. b) agitador magnético. 4) Banho termostático.



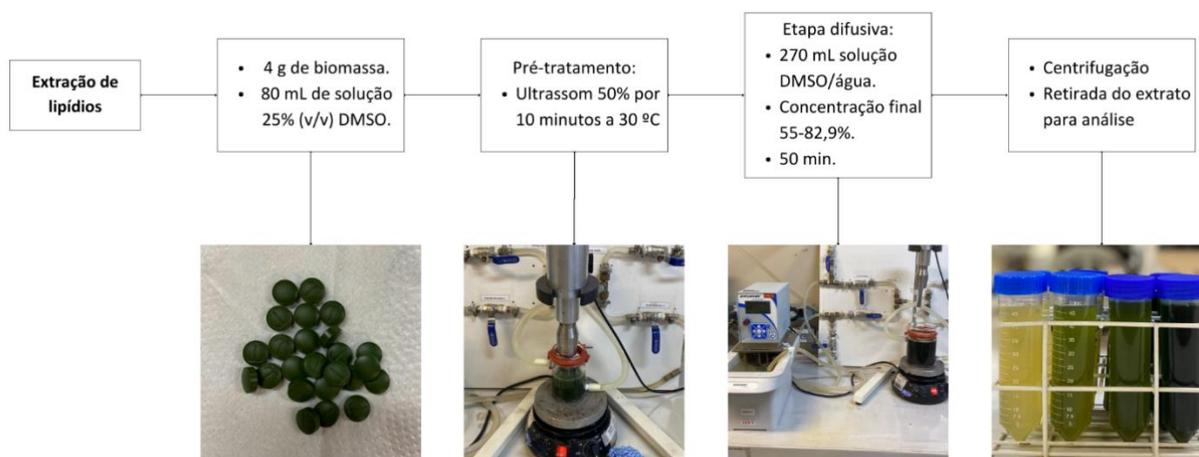
Fonte: Autor.

O pré-tratamento foi realizado por 10 minutos utilizando 4 g de biomassa em 80 mL de solução 25% DMSO (*Neon, Brasil*) (v/v) e intensidade do ultrassom (*SONICS, Vibra-Cell, USA*) em 50%. Essa intensidade foi escolhida baseada no melhor ponto experimental de extração nos estudos de Jaeschke (2019). A amostra foi colocada em uma célula Pyrex encamisada de 100 mL acoplada a um banho termostático (*Polystat® Cole-Parmer, USA*),

assegurando a temperatura do sistema em 30 °C, temperatura setada baseada no trabalho de Jaeschke (2019). Além do ultrassom, foi garantida a homogeneidade da mistura utilizando barra e agitador magnético.

Após o pré-tratamento, a amostra foi transferida para uma célula Pyrex encamisada de 400 mL para a realização da etapa difusiva. Com duração de 50 minutos, foram adicionadas soluções de DMSO/água, em diferentes concentrações, de modo a completar 350 mL total de amostra final. Para verificar a influência do solvente na etapa difusiva, as concentrações finais de DMSO foram variadas entre de 55-83,9% nas amostras. A etapa também foi realizada acoplada a um banho termostático para garantir a manutenção da temperatura do sistema em 30 °C e foi utilizada barra e agitador magnético para garantir a homogeneidade da mistura. Na Figura 14 está representada em fluxograma as etapas do experimento de extração realizado.

Figura 14: Fluxograma de etapas da extração de lipídios assistida por ultrassom.



Fonte: Autor.

Para entender a eficiência do solvente na extração assistida por ultrassom, baseado nos trabalhos de Jaeschke (2019), foram realizados em duplicata os mesmos experimentos descritos utilizando como solvente o etanol ao invés do DMSO, em concentração de 75% (v/v) e intensidade de ultrassom de 50%. Esse ponto operacional foi identificado por Jaeschke (2019) em seu trabalho como o melhor ponto de extração de óleo das microalgas utilizando o etanol como solvente.

Para garantir o fim da extração, a solução foi imediatamente centrifugada, e o extrato foi recuperado da fração precipitada. A centrifugação foi feita em 10000 g, durante 10 minutos a uma temperatura de 20 °C. Após, o extrato foi transferido para um tubo falcon de 50 mL e armazenado para futura quantificação de lipídios.

Para verificar o efeito do pré-tratamento com ultrassom, foi realizado uma extração sem ultrassom que se procedeu adicionando 4g de biomassa em uma solução 25% DMSO (v/v) por 10 minutos sob agitação magnética, também em temperatura setada de 30 °C. Posteriormente foi adicionada solução de DMSO/água para resultar no volume final de 350 mL, a concentração escolhida foi a que apresentou maior eficiência na extração de lipídios utilizando o ultrassom.

3.3 Quantificação de lipídios nos extratos

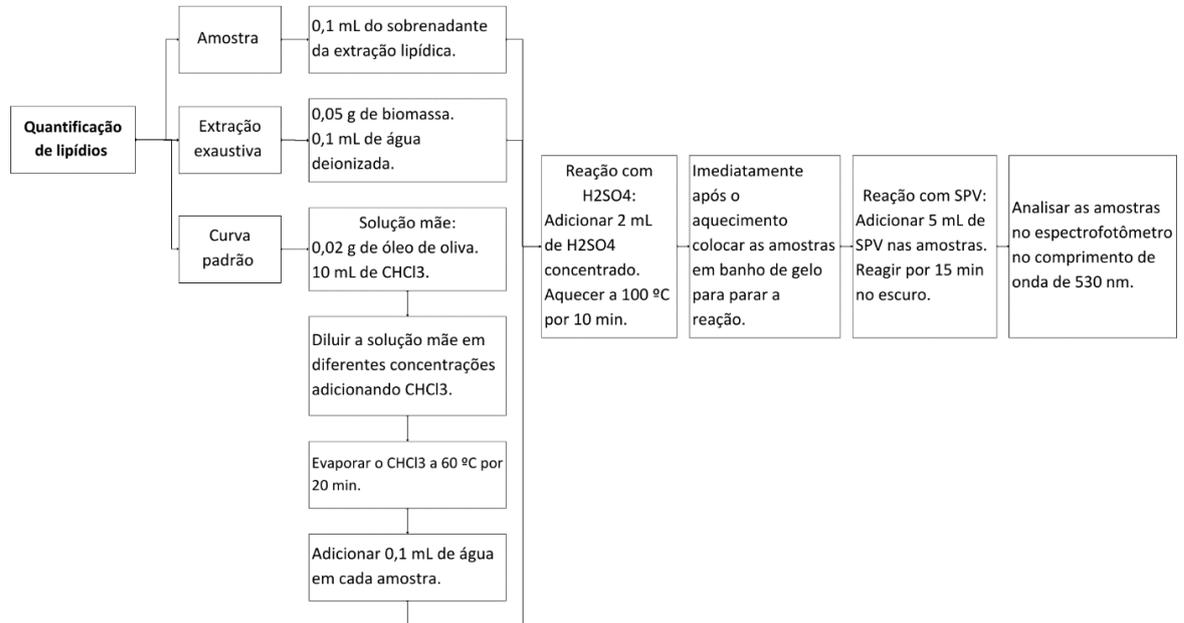
As extrações foram feitas previamente e então a quantificação de lipídios das amostras e a leitura da curva de calibração (método SPV) foram feitas em um mesmo dia. Para garantir a homogeneidade da mistura, antes de retirar a alíquota analisada do extrato, a solução foi agitada em vórtex por 30 segundos e posteriormente uma alíquota de 0,1 mL foi imediatamente retirada para reação com ácido sulfúrico.

A quantificação de lipídios no extrato foi feita de maneira semelhante ao descrito para a extração exaustiva, utilizando método SPV. Para a análise do extrato foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e adicionada em um tubo falcon/vidro, posteriormente foi adicionado 2 mL de ácido sulfúrico e as demais etapas se procederam seguindo as mesmas etapas descritas na extração exaustiva.

A reação foi feita para a curva de calibração com quantidade de óleo conhecida, extratos e extração exaustiva da biomassa. Na Figura 15 está representado o fluxograma de todos os processos para a quantificação de lipídios.

A fim de garantir o estudo do efeito de cada concentração de solvente na extração lipídica, os procedimentos foram feitos em duplicata e os resultados expressos de porcentagem de óleo em biomassa (m/m). A análise estatística foi realizada utilizando o software *Past*[®].

Figura 15: Fluxograma de processos da quantificação de lipídios.



Fonte: Autor.

4 Discussão e Resultados

Os resultados obtidos no presente trabalho estão apresentados e discutidos nesse capítulo.

4.1 Lipídios totais

O método de extração exaustiva que visa obter o teor de lipídios totais na biomassa foi realizado através do método sulfo-fosfo-vanilina. Os valores de teor de lipídeos obtidos estão apresentados na Tabela 3, sendo o teor expresso em porcentagem de g de óleo por g de biomassa. Os resultados apresentados na Tabela 3 sofreram uma diluição do volume em 20 vezes e foram realizadas duas duplicatas amostrais.

Tabela 3: Rendimento extração exaustiva da biomassa de *C. sorokiniana* por regressão linear.

Duplicata	Amostra	%g óleo/g biomassa
1	1	7,80
1	2	6,23
2	3	5,96
2	4	5,21

Os resultados obtidos pela análises das amostras que foram diluídas em dez ou duas vezes e das amostras que não sofreram diluição foram descartadas pois o valor de absorbância lido estava fora da faixa de absorbância da curva de calibração feita com o óleo de oliva, sendo assim, não houve resultados conclusivos. Isso pode ter ocorrido devido a maior quantidade de biomassa no material de análise, que pode ter interferido na leitura do espectrofotômetro. A possibilidade de centrifugação para separação a biomassa foi descartada, pois poderia interferir na homogeneidade do material lipídico, induzindo resultados incorretos.

A análise da alíquota com diluição em vinte vezes foi a que permitiu a obtenção do melhor resultado de leitura, caindo no intervalo da curva de calibração e permitindo identificar a extração de lipídios totais na biomassa de *C. sorokiniana*. Para medida de comparação, foi feito em duplicata a diluição da alíquota em ácido sulfúrico ao invés de água. No entanto, com esse procedimento não se obteve resultados conclusivos pois a leitura de

absorbância foi maior que a curva de calibração. Esse fato demonstra que havia mais material lipídico na solução. Uma possível explicação seria que a diluição da alíquota em ácido reiniciaria a reação extrativa, indicando que há mais presença de lipídios na biomassa além do resultado obtido com a diluição em água.

Outra via experimental que não obteve resultados conclusivos foi utilizar uma massa de biomassa 20 vezes menor e seguir as etapas de todo experimento. O teste foi feito em duplicata, e a leitura de absorbância foi maior que a abrangência da curva de calibração. O aumento da área de contato entre a biomassa e o ácido pode ser uma justificativa para esse resultado, o que também corrobora mais porcentagem de óleo na biomassa microalgal.

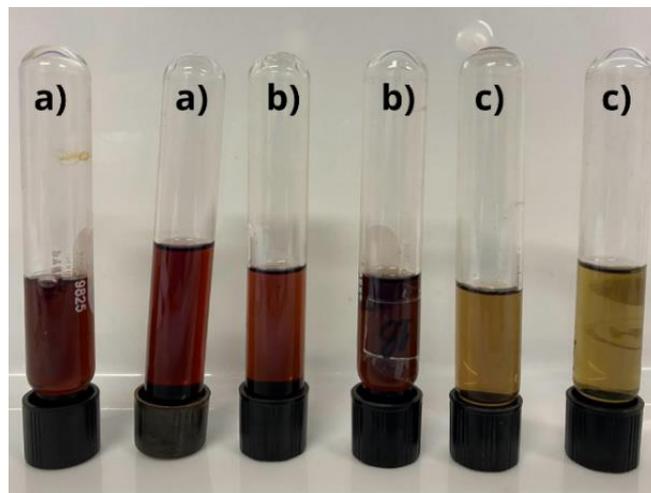
Conforme Neofotis et al. (2016), valores próximos de 25% de óleo eram esperados na biomassa de *C. sorokiniana*, entretanto os resultados apresentaram valores abaixo, em torno de 6,30% (g de lipídios/g de biomassa), com desvio padrão de 1,09%. Uma hipótese para os resultados menores pode ser pelo método de cultivo e pelos processos que a amostra sofreu até a etapa de extração, já que o propósito da biomassa era para venda comercial para suplementação alimentar com foco em vitaminas e proteínas, e não com foco específico para extração de óleo.

O método sulfo-fosfo-vanilina, apesar de não ser o mais difundido na literatura, é um método eficiente para quantificação de lipídios, contando com uma análise fácil e rápida, sem uso necessário de solventes tóxicos e com a possibilidade de quantificação por via úmida, podendo ser evitados processos intermediários como secagem ou centrifugação da biomassa.

Na Figura 16 está apresentada uma fotografia das amostras de extração exaustiva após a reação com o SPV.

A reação do sulfo-fosfo-vanilina com os íons de carbono provenientes da quebra de moléculas de lipídios resulta na mudança de coloração, que quanto mais rosada indica maior presença de lipídios. A hipótese de haver mais óleo na biomassa seca é reforçada com os resultados obtidos nas análises dos extratos utilizando DMSO e etanol, que estão expressos na sequência. Foram realizados experimentos tanto em tubos falcon quanto em tubos de vidro e os resultados foram semelhantes.

Figura 16: Reação de extração exaustiva com SPV. a) Massa 20 vezes menor de biomassa. b) Diluição 20 vezes em ácido sulfúrico. c) Diluição 20 vezes em água.

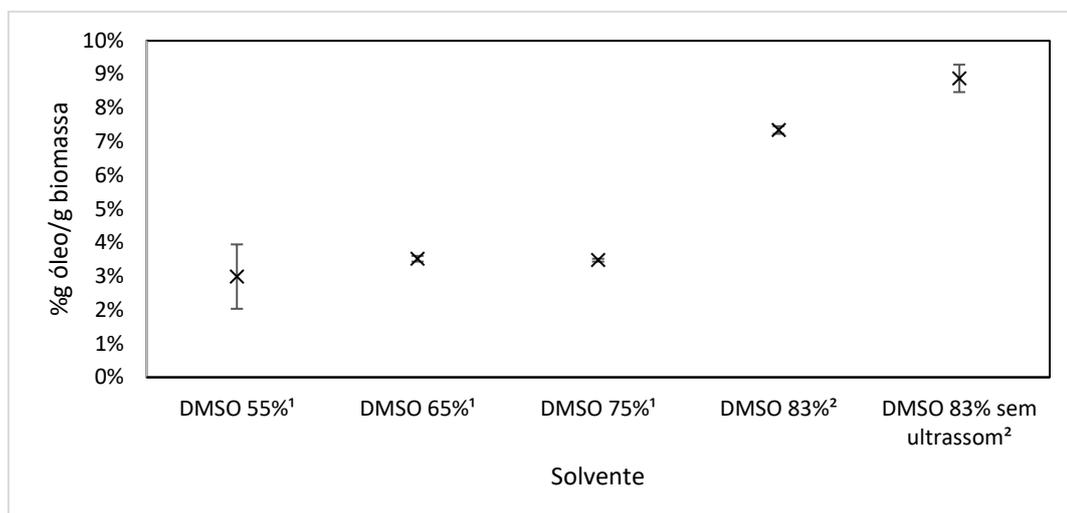


Fonte: Autor

4.2 Quantificação de lipídios nos extratos

Os resultados obtidos nos estudos sobre o uso do DMSO como solvente extrator de lipídios da biomassa estão apresentados na Figura 17.

Figura 17: Rendimento da extração de lipídios obtido por regressão linear. Sobre índices iguais nos percentuais indicam que não há diferença significativa entre valores.



Fonte: Autor.

É possível verificar que o DMSO pode ser usado como solvente extrator de lipídios da biomassa composta por microalgas. Verificou-se através de análise de variância, com 95% de confiança e aplicação de teste de Tukey, que para as menores concentrações de DMSO utilizadas, isto é, até 75% DMSO (v/v), não há diferença significativa na porcentagem de óleo

extraído, indicados pelo número 2 na Figura 17. Na concentração de 83% há um aumento representativo, sendo esse o melhor ponto de concentração entre os investigados, com cerca de 7,35% (g de óleo/g de biomassa).

Além disso, observa-se que a extração de lipídios sob efeito do ultrassom não apresentou diferença significativa no rendimento ao melhor ponto de extração estudado assistido por ultrassom. O extrato da via sem o pré-tratamento apresenta 8,88% de lipídios por grama de biomassa, e levando em consideração a análise de variância, são representados pelo número 1.

Na Tabela 4 estão representados os resultados da análise de variância das amostras e teste de Tukey. Em formato matricial, a comparação entre os grupos amostrais foi feita utilizando o intervalo de 95% de confiança e em laranja está representada a diferença entre os grupos amostrais relacionados nas linhas e colunas, a sigla SU significa a amostra sem o pré-tratamento de ultrassom. Os resultados dessa tabela serviram de base para se atribuir os sobre índices 1 e 2 da Figura 17.

Tabela 4: Teste de Tukey para diferenças entre os grupos amostrais.

	DMSO 55%	DMSO 65%	DMSO 75%	DMSO 83%	DMSO 83% SU
DMSO 55%		0,9182	0,937	0,006468	0,001629
DMSO 65%	1,14		1	0,01148	0,002537
DMSO 75%	1,05	0,08997		0,01095	0,002447
DMSO 83%	9,297	8,157	8,247		0,2779
DMSO 83% SU	12,56	11,42	11,51	3,264	

Considerando que a amostra de DMSO 55% teve um desvio padrão alto (Figura 17), foi realizada uma outra análise estatística, desconsiderando esse ponto. O resultado dessa análise está mostrado na Tabela 5 e indica que, agora, para a concentração de 83% de DMSO, é significativa a diferença entre a extração assistida por ultrassom e a extração sem essa tecnologia.

Tabela 5: Teste de Tukey, desconsiderando amostra de DMSO 55%.

	DMSO 65%	DMSO 75%	DMSO 83%	DMSO 83% SU
DMSO 65%		0,9989	0,0008025	0,0002217
DMSO 75%	0,1962		0,0007685	0,0002158
DMSO 83%	17,79	17,99		0,02463
DMSO 83% SU	24,91	25,11	7,119	

Nesse cenário, o pré-tratamento apresentou uma redução na eficiência da extração quando comparado com a amostra sem ultrassom, ou seja, somente com a etapa difusiva. Um possível motivo para o aumento da extração sem o pré-tratamento pode estar associado à degradação lipídica, conforme relatado por Phan et al. (2023); o tempo de reação a que se refere a duração do processo de extração é um fator crítico, pois um período muito longo sob efeitos do tratamento mecânico pode causar degradação lipídica e outros efeitos indesejados que prejudicam a obtenção dos compostos de interesse.

Nas análises do extrato, o etanol apresentou uma extração de 35,10% (g de óleo/g de biomassa), resultado expressivamente acima da extração com DMSO e exaustiva, inclusive acima dos valores da literatura, de 25%. Os parâmetros experimentais da extração utilizando etanol foram propostos nos estudos de Jaeschke (2019) e indicados como o melhor ponto experimental, isto é, aquele no qual a autora obteve maior eficiência na extração.

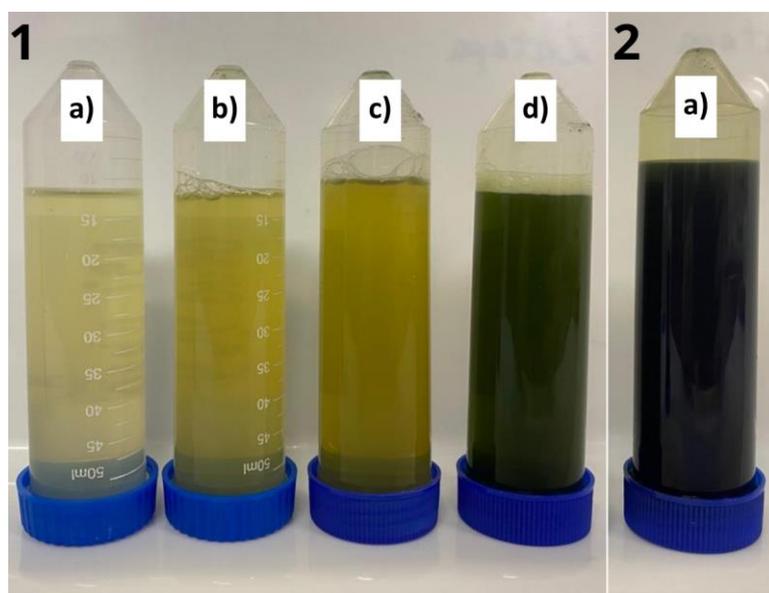
Diante do cenário da extração lipídica com etanol ter sido 5 vezes mais eficiente quando comparada com a extração exaustiva, somando as incertezas inferidas no processo experimental dessa extração, já citadas anteriormente, optou-se por adotar a extração com etanol como referência de valor máximo. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos nos pontos de DMSO com e sem o pré-tratamento de ultrassom e na extração com etanol 75% (v/v). A porcentagem de óleo recuperado é a razão entre a quantidade de óleo que foi extraído e a quantidade máxima de óleo que poderia ter sido extraída considerando a extração do etanol como valor de máxima eficiência.

Tabela 6: Porcentagem de óleo recuperado nos extratos.

Amostra	%óleo recuperado
Etanol 75%	100
DMSO 55%	8,51
DMSO 65%	10,04
DMSO 75%	9,92
DMSO 83%	20,94
DMSO 83% sem ultrassom	26,21

A maior extração observada nas condições de DMSO 83% e de etanol também pode ser vista por meio da fotografia dos extratos obtidos nas diferentes condições de extração, Figura 18. Observa-se uma coloração muito mais intensa para essas duas condições, indicando que houve uma maior extração de clorofilas. A extração desse pigmento, contudo, não indica necessariamente uma maior extração de lipídeos. A comparação entre os resultados com a mesma concentração dos diferentes solventes, isto é, 75% DMSO e 75% etanol, mostra que a porcentagem de extração de óleo foi bem inferior, pois o etanol foi capaz de extrair 5 vezes mais óleo que o DMSO, nas condições testadas.

Figura 18: Extratos de biomassa com pré-tratamento de ultrassom. 1) Extratos de DMSO: a) DMSO 55%. b) DMSO 65%. c) DMSO 75%. d) DMSO 83%. 2) Comparação: a) Etanol 75%.



Fonte: Autor

O fato de o etanol ser um solvente que possui alta afinidade com o complexo lipídico, indica que esses compostos podem ser extraídos de maneira eficiente. Yang et al. (2015) em seus estudos relatam a capacidade do etanol dissolver a estrutura celular, corroborando a capacidade do etanol permear e desfazer a parede celular, resultando na liberação lipídica, e os estudos abordando o gênero *Chlorella*, a eficiência de desintegração foi cerca de 25%.

O maior resultado esperado era da extração exaustiva, entretanto experimentalmente não foi o observado. O cultivo e o processamento industrial que a matéria prima passou é uma hipótese que pode ocasionar algumas causas de erro, uma vez que, por ser uma amostra comercial para uso alimentício, não é possível identificar todos os

procedimentos que a amostra sofreu. Além disso, as extrações ficaram em repouso até ocorrer as análises de quantificação lipídica, o que gerou uma pequena separação de fase. Os extratos foram agitados em vórtex, mas não é possível garantir a homogeneidade da solução. Foi observado nos extratos de DMSO a geração de espuma na solução, fator que pode aumentar o erro experimental na quantificação de lipídios desse solvente.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho mostrou que o dimetil sulfóxido (DMSO) pode ser utilizado como solvente no processo de extração lipídica de microalgas e os resultados apresentaram uma melhor eficiência na maior concentração, que foi de 83% (v/v). Também foi possível inferir que o pré-tratamento utilizando ultrassom não demonstrou melhora na extração dos lipídios da biomassa de *C. sorokiniana* comercial no ponto de maior concentração de DMSO.

Ademais, os resultados obtidos na extração utilizando o etanol como solvente apresentaram as maiores porcentagens lipídicas extraídas por g de biomassa. Esse resultado aponta que a biomassa algal é uma matéria-prima conveniente para a produção de biodiesel e o etanol é um solvente eficaz; sua utilização também traz benefícios considerando que esse solvente é ambientalmente amigável.

Para trabalhos futuros, sugere-se o estudo utilizando como matéria-prima microalga de cultivo acompanhado, identificando todos os processos que a amostra foi submetida anteriormente à extração lipídica. Também estimula-se ampliar o estudo da metodologia analítica, a fim de inferir os pontos ótimos de concentração e de tempo de reação para a extração lipídica.

Para garantir os resultados, também sugere-se testar outros métodos de extração exaustiva, para garantir a eficiência do método utilizando o reagente fosfo-vanilina. Finalmente, sabendo dos inúmeros bioativos com valor agregado existentes nas microalgas, estimula-se testar os diferentes solventes para extrações de outros compostos de interesse, como de pigmentos e proteínas.

REFERÊNCIAS

- ABELIOVICH, Aharon; ARAD, Shoshana; BECKER, Wolfgang; *et al.* **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2003.
- AGÊNCIA DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIODIESEL - ANP. **Mapa Dinâmico de Produtores de Biocombustíveis**. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/mapa-dinamico-de-produtores-de-biocombustiveis-1>>. Acesso em: 26 jul. 2023.
- AL-ZUHAIR, Sulaiman. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 1, p. 57–66, 2007.
- AZAMAN, Siti Nor Anj; NAGAO, Norio; YUSOFF, Fatimah M.; *et al.* A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. **PeerJ**, v. 5, p. e3473, 2017.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- CHEW, Kit Wayne; YAP, Jing Ying; SHOW, Pau Loke; *et al.* Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.
- CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.
- CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA - CNPE. Resolução nº 16 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/despacho-do-presidente-da-republica-473383252>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

DESHMUKH, Suchit; KUMAR, Ritunesh; BALA, Kiran. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. **Fuel Processing Technology**, v. 191, p. 232–247, 2019.

DU, Wei; LI, Wei; SUN, Ting; *et al.* Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 331–337, 2008.

FOLCH, Jordi; LEES, M.; STANLEY, G.H. Sloane. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FUKUDA, Hideki; KONDO, Akihiko; NODA, Hideo. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405–416, 2001.

GURTOVENKO, Andrey A.; ANWAR, Jamshed. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 35, p. 10453–10460, 2007.

HALIM, Ronald; DANQUAH, Michael K.; WEBLEY, Paul A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.

JACOB, Ashwin; ASHOK, B.; ALAGUMALAI, Avinash; *et al.* Critical review on third generation micro algae biodiesel production and its feasibility as future bioenergy for IC engine applications. **Energy Conversion and Management**, v. 228, p. 113655, 2021.

JAESCHKE, Débora. **Aplicação de tecnologias emergentes na extração de compostos de interesse a partir de microalgas**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019.

JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; ABANG, Sariah; PONCELET, Denis; *et al.* Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253–264, 2008.

JORQUERA, Orlando; KIPERSTOK, Asher; SALES, Emerson A.; *et al.* Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors.

Bioresource Technology, v. 101, n. 4, p. 1406–1413, 2010.

LEE, Jane Weng Yee; CHIA, Wen Yi; ONG, Wee-Jun; *et al.* Advances in catalytic transesterification routes for biodiesel production using microalgae. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 52, p. 102336, 2022.

LEE, Sze Ying; KHOIROH, Ianatul; VO, Dai-Viet N.; *et al.* Techniques of lipid extraction from microalgae for biofuel production: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 231–251, 2020.

LOTERO, Edgar; LIU, Yijun; LOPEZ, Dora E.; *et al.* Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 14, p. 5353–5363, 2005.

MAHESHWARI, Pranjali; HAIDER, Mohd Belal; YUSUF, Mohammad; *et al.* A review on latest trends in cleaner biodiesel production: Role of feedstock, production methods, and catalysts. **Journal of Cleaner Production**, v. 355, p. 131588, 2022.

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, n. 6, p. 1300–1311, 2007.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MEHER, L; VIDYASAGAR, D; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.

MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T.V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, v. 7, p. 117–123, 2015.

NARALA, Rakesh R.; GARG, Sourabh; SHARMA, Kalpesh K.; *et al.* Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. **Frontiers in Energy Research**, v. 4, 2016.

NEOFOTIS, Peter; HUANG, Andy; SURY, Kiran; *et al.* Characterization and classification of

highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal Research**, v. 15, p. 164–178, 2016.

NEUPANE, Dhurba. Biofuels from Renewable Sources, a Potential Option for Biodiesel Production. **Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 29, 2022.

PHAN, Tam Minh; HUYNH, Biet V; NUR, Susilo; *et al.* Ultrasound-Assisted Lipid Extraction from *Chlorella* sp.: Taguchi Design and Life Cycle Assessment. **Molecular Biotechnology**, 2023.

PINTO, Angelo C.; GUARIEIRO, Lilian L. N.; REZENDE, Michelle J. C.; *et al.* Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313–1330, 2005.

SANLI, H. ; CANAKCI, M. Effects of Different Alcohol and Catalyst Usage on Biodiesel Production from Different Vegetable Oils. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 4, p. 2713–2719, 2008.

SANTOS, Nuno C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; *et al.* Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035–1041, 2003.

SATI, Himanshu; MITRA, Madhusree; MISHRA, Sandhya; *et al.* Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. **Algal Research**, v. 38, p. 101413, 2019.

SHAHIR, V.K.; JAWAHAR, C.P.; SURESH, P.R. Comparative study of diesel and biodiesel on CI engine with emphasis to emissions—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 686–697, 2015.

SOUZA, Simone; SEABRA, Joaquim; NOGUEIRA, Luiz. Feedstocks for biodiesel production: Brazilian and global perspectives. **Biofuels**, v. 9, n. 4, p. 455–478, 2018.

TAHER, Hanifa; AL-ZUHAIR, Sulaiman; AL-MARZOUQI, Ali H.; *et al.* Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 159–167, 2014.

THANGARAJ, Baskar; SOLOMON, Pravin Raj; MUNIYANDI, Bagavathi; *et al.* Catalysis in biodiesel production—a review. **Clean Energy**, v. 3, n. 1, p. 2–23, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ce/article/3/1/2/5250541>>.

VICENTE, Gemma; MARTÍNEZ, Mercedes; ARACIL, José. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 297–305, 2004.

VYAS, Amish P.; VERMA, Jaswant L.; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. **Fuel**, v. 89, n. 1, p. 1–9, 2010.

WANG, Min; ÁNGELES MORÓN-ORTIZ; ZHOU, Jianjun; *et al.* Effects of pressurized liquid extraction with dimethyl sulfoxide on the recovery of carotenoids and other dietary valuable compounds from the microalgae *Spirulina*, *Chlorella* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Food Chemistry**, v. 405, p. 134885–134885, 2023.

WANG, Shi-Kai; STILES, Amanda R.; GUO, Chen; *et al.* Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 6, p. 550–559, 2014.

YANG, Fangfang; CHENG, Chang-Hong; LONG, Lijuan; *et al.* Extracting Lipids from Several Species of Wet Microalgae Using Ethanol at Room Temperature. **Energy & Fuels**, v. 29, n. 4, p. 2380–2386, 2015.

YUN, Hyun-Sik; KIM, Young-Saeng; YOON, Ho-Sung. Characterization of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella vulgaris* fatty acid components under a wide range of light intensity and growth temperature for their use as biological resources. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04447, 2020.

YUSUF, N.N.A.N.; KAMARUDIN, S.K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 7, p. 2741–2751, 2011.

ZHENG, S.; KATES, M.; DUBÉ, M.A.; *et al.* Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 3, p. 267–272, 2006.

ZHOU, Jianjun; WANG, Min; SARAIVA, Jorge A.; *et al.* Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132236, 2022.

ZHUANG, Lin-Lan; YU, Dawei; ZHANG, Jian; *et al.* The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 1110–1119, 2018.

ZOU, Shanmei; HUANG, Zheng; WU, Xuemin; *et al.* Physiological and Genetic Regulation for High Lipid Accumulation by *Chlorella sorokiniana* Strains from Different Environments of an Arctic Glacier, Desert, and Temperate Lake under Nitrogen Deprivation Conditions. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 5, 2022.

ZUCCARO, Gaetano; YOUSUF, Abu; POLLIO, Antonino; *et al.* Microalgae Cultivation Systems. **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**, v. 29, p. 11–29, 2020.

ZUNIGA, ABRAHAM DAMIAN GIRALDO. REVISÃO: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIODIESEL. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 21, 2011.

Governo oficializa ampliação da mistura de biodiesel no diesel vendido no país. Serviços e Informações do Brasil. Disponível em: <

Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <