



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

JOSÉ GABRIEL BARRETO PESSOA

Extração assistida por ultrassom do óleo de microalga (*Scenedesmus* sp. LF01) e avaliação de rotas enzimáticas para produção de lipídios funcionais

Ultrasound-assisted extraction of microalgae oil (*Scenedesmus* sp. LF01) and evaluation of enzymatic routes for the production of functional lipids

CAMPINAS

2021

JOSÉ GABRIEL BARRETO PESSOA

Extração assistida por ultrassom do óleo de microalga (*Scenedesmus* sp. LF01) e avaliação de rotas enzimáticas para produção de lipídios funcionais

Ultrasound-assisted extraction of microalgae oil (*Scenedesmus* sp. LF01) and evaluation of enzymatic routes for the production of functional lipids

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Vasconcelos Fregolente

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO JOSÉ GABRIEL
BARRETO PESSOA, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. RUBENS MACIEL FILHO.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

P439e Pessoa, José Gabriel Barreto, 1993-
Extração assistida por ultrassom do óleo de microalga (*Scenedesmus* sp. LF01) e avaliação de rotas enzimáticas para produção de lipídios funcionais / José Gabriel Barreto Pessoa. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Rubens Maciel Filho.

Coorientador: Leonardo Vasconcelos Fregolente.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microalgas. 2. Extração de lipídeos. 3. Extração assistida por ultrassom. 4. Enzimas. 5. Catálise enzimática. 6. Lipídeos na nutrição humana. I. Maciel Filho, Rubens, 1958-. II. Fregolente, Leonardo Vasconcelos, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Ultrasound-assisted extraction of microalgae oil (*Scenedesmus* sp. LF01) and evaluation of enzymatic routes for the production of functional lipids

Palavras-chave em inglês:

Microalgae

Lipid extraction

Ultrasound-assisted extraction

Enzymes

Enzymatic catalysis

Lipids in human nutrition

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Rubens Maciel Filho [Orientador]

Luisa Fernanda Rios Pinto

Marija Tasic

Data de defesa: 20-08-2021

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3453-7354>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5419755016105193>

Folha de Aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado defendida por **JOSÉ GABRIEL BARRETO PESSOA**, e aprovada em 20 de agosto de 2021 pela Comissão Examinadora constituída pelos Doutores:

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (Presidente / Orientador)

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Dra. Luisa Fernanda Rios Pinto

UNICAMP

Videoconferência

Dra. Marija Tasic

University of Nis

Videoconferência

Ata de defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Unicamp e todos os colaboradores do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pelo crescimento profissional e pessoal que este mestrado me proporcionou.

Aos meus pais, Sandra e Rui, e minha namorada, Rebecca, pelo amor e apoio incondicional durante todo esse processo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Maciel Filho e meu coorientador Prof. Dr. Leonardo Fregolente, pelos ensinamentos, incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório LOPCA-REF-BIORREF, pelo companheirismo e auxílio durante os experimentos.

À empresa Algae Biotecnologia (Holambra, SP), pela doação da biomassa de microalga que foi estudada neste projeto.

À Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho, pelo fornecimento das quatro enzimas que foram avaliadas neste trabalho.

Ao meu psicólogo, Daniel, por sempre me ajudar a achar uma solução quando tudo parecia estar perdido.

Aos meus colegas de mestrado, pois sem vocês esta experiência não seria a mesma. Obrigado por todas as risadas em situações de desespero. Vocês deixaram tudo mais leve.

Aos moradores da República Mary Jane. Vocês foram minha família por mais de dois anos e eu sou eternamente grato por ter conhecido vocês. MJ pra sempre!

A todos os amigos que fiz em Barão Geraldo. Os momentos que vivi com vocês ficarão gravados na minha memória e no meu coração. Vou sentir muita saudade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo 15/20630-4 pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta dissertação.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

O desenvolvimento de produtos de maior valor agregado a partir do óleo de microalga é uma alternativa promissora para a expansão desse setor da bioeconomia. Estudos sobre a extração do óleo focam majoritariamente na aplicação de solventes tóxicos através do método Bligh & Dyer, dificultando sua aplicação nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a aplicação de ultrassom para otimizar um método de extração mais ecológico e menos tóxico para a microalga *Scenedesmus* sp. LF01 e avaliar a aplicação do óleo bruto na produção de lipídios funcionais por rotas enzimáticas. Diferentes pré-tratamentos da biomassa foram testados utilizando a extração pelo método Bligh & Dyer. A secagem ao sol obteve a menor eficiência, enquanto que a autoclavagem seguida de secagem em estufa e a liofilização obtiveram resultados semelhantes. Posteriormente, métodos de extração assistidos por ultrassom (25 kHz, 60 °C, 1 h, razão solvente:biomassa 10:1) utilizando os solventes n-hexano, clorofórmio/metanol (1:1) e etanol foram avaliados. A extração com etanol foi otimizada através de um planejamento de experimentos 2² e os fatores temperatura e razão solvente:biomassa foram considerados significativos a 95% de confiança. A extração com os fatores otimizados (80 °C e razão 25:1) obteve um resultado (15,80 ± 0,55%) semelhante ao método Bligh & Dyer, com a vantagem de ser um processo ambientalmente mais amigável. Quatro lipases foram avaliadas e a de maior atividade enzimática (*Rhizopus javanicus* - 4533,33 ± 243,43 U.mg⁻¹) foi selecionada para ser aplicada nas reações enzimáticas. O óleo bruto apresentou o mesmo perfil de ácidos graxos independente do pré-tratamento ou método de extração, com altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (60%). Também se observou um alto teor de ácidos graxos livres e ésteres (77,42%) e baixo teor de triacilgliceróis (17,21%), favorecendo a esterificação em detrimento da glicerólise, que não foi observada nos experimentos. A esterificação (50-55 °C, 24-48 h) proporcionou uma produção de diacilgliceróis (20-25%) compatível com a literatura, porém nenhuma formação de monoacilglicerol foi obtida. Uma hipótese para esta observação está na possível interferência dos componentes do óleo bruto na reação, visto que outro estudo com óleo não purificado reportou resultados similares. A etanólise foi a reação mais promissora apresentando o melhor rendimento (92,74%) a menor temperatura (25 °C) e duração (6 h). Isto sugere que o óleo bruto da cepa LF01 é uma matéria-prima em potencial para produção de etil ésteres ricos em ácidos graxos poli-insaturados que futuramente possam ser aplicados em formulações farmacêuticas e alimentares.

Palavras-chave: Microalga; Extração; Ultrassom; Lipídios Funcionais; Enzimas.

ABSTRACT

The development of higher value-added products from microalgae oil is a promising alternative for the expansion of this sector of the bioeconomy. Studies on oil extraction mainly focus on toxic solvents application through the Bligh & Dyer method, bringing some restrictions to apply it in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. In this context, the present work aimed to apply ultrasound to optimize a greener less toxic oil extraction method for *Scenedesmus* sp. LF01 microalgae and evaluate the application of its crude oil in the production of functional lipids through enzymatic routes. Different biomass pretreatments were tested using the Bligh & Dyer extraction method. Sun drying presented the lowest yield, while autoclaving followed by oven drying and lyophilization obtained similar results. Subsequently, ultrasound-assisted extraction methods (25 kHz, 60 °C, 1 h, solvent:biomass ratio 10:1) using the solvents n-hexane, chloroform/methanol (1:1) and ethanol were evaluated. Ethanol extraction was optimized through a 2² design of experiments and the factors temperature and solvent:biomass ratio were considered significant at a 95% confidence level. The extraction with optimized factors (80 °C and 25:1 ratio) presented a result (15.80 ± 0.55%) similar to the Bligh & Dyer method, with the advantage of being a more environmentally friendly process. Four lipases were evaluated and the one with the highest enzymatic activity (*Rhizopus javanicus* - 4533.33 ± 243.43 U.mg⁻¹) was selected to be applied in the enzymatic reactions. The crude oil presented the same fatty acid profile regardless of pretreatment or extraction method, with high levels of polyunsaturated fatty acids (60%). A high content of free fatty acids and esters (77.42%) and a low content of triacylglycerols (17.21%) was also observed, favoring esterification over glycerolysis, which was not observed in the experiments. Esterification (50-55 °C, 24-48 h) led to a production of diacylglycerols (20-25%) compatible with the literature, but no formation of monoacylglycerol was reported. One hypothesis for this observation is the possible interference of crude oil components in the reaction, as another study with unpurified oil reported similar results. Ethanolysis was the most promising reaction with the highest yield (92.74%) at the lowest temperature (25°C) and duration (6 h). This suggests that the LF01 strain crude oil is a potential feedstock for the production of ethyl esters rich in polyunsaturated fatty acids that can be applied in pharmaceutical and food formulations in the future.

Keywords: Microalgae; Extraction; Ultrasound; Functional Lipids; Enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura de alguns ácidos graxos.	23
Figura 2 – Transesterificação de um TAG com metanol catalisada por NaOH.....	24
Figura 3 – Representação da molécula do TAG Trilinoleína e das posições presentes na estrutura do Glicerol (sn-1, sn-2 e sn-3).....	25
Figura 4 – Representação dos isômeros sn-1,2 e sn-1,3 apresentados pelos diacilgliceróis...	26
Figura 5 – Representação dos isômeros sn-1 e sn-2 apresentados pelos monoacilgliceróis...	27
Figura 6 – Representação das estruturas do metil éster e etil éster.	28
Figura 7 – Células de uma espécie do grupo <i>Scenedesmus</i> sp.....	32
Figura 8 – Microfotografias de células de microalgas antes e depois do tratamento com ultrassom.	39
Figura 9 – Produtos alimentícios contendo <i>Spirulina</i> : suplemento alimentar (A); wraps (B); suspensão para uso em bebidas (C); smoothie de frutas (D); iogurte (E); chips (F).....	41
Figura 10 – Produtos cosméticos à base de algas e/ou microalgas.	42
Figura 11 – Produtos contendo microalgas <i>Scenedesmus</i> : máscara fácil (A); creme antirrugas (B); biomassa em formato de pérolas (C).	42
Figura 12 – Produtos da <i>Euglena co.</i> : nutracêuticos e cosméticos (A); biodiesel utilizado em um ônibus (B).....	43
Figura 13 – Principais reações enzimáticas para a modificação de lipídios.	45
Figura 14 – Representação geral da reação de glicerólise com os isômeros de MAGs e DAGs produzidos.	49
Figura 15 – Representação da esterificação entre ácidos graxos e glicerol com os respectivos produtos.....	53
Figura 16 – Medicamento Lovaza a base de etil ésteres de ácidos graxos ω -3.	56
Figura 17 – Representação das reações para produção de ésteres etílicos.....	57
Figura 18 – Esquema das etapas presentes na metodologia experimental seguida por este trabalho.....	59
Figura 19 – Sistema utilizado para produção de lipídios funcionais por via enzimática.	63
Figura 20 – Eficiência de extração pelo método B&D com diversos pré-tratamentos da biomassa.....	67
Figura 21 – Perfil de ácidos graxos das amostras com diferentes pré-tratamentos pelo método B&D.	69

Figura 22 – Perfil de ácidos graxos dividido entre ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), mono insaturados (AGMI) e saturados (AGS) do método B&D.	70
Figura 23 – Perfil de ácidos graxos obtido neste trabalho em comparação com outros estudos da literatura.....	71
Figura 24 – Eficiência das extrações assistidas por ultrassom em comparação com o método B&D.	73
Figura 25 – Perfil de ácidos graxos dos métodos avaliados com as amostras de biomassa liofilizada.....	76
Figura 26 – Gráfico de Pareto dos fatores avaliados na extração assistida por ultrassom utilizando etanol.	79
Figura 27 – Eficiência com diferentes razões solvente:biomassa a 80 °C.	80
Figura 28 – Coloração do óleo bruto em etanol pré-titulação.....	82
Figura 29 – Resultado da atividade enzimática das quatro enzimas avaliadas.	84
Figura 30 – Resultados da metodologia de glicerólise para o óleo bruto da cepa LF01.....	85
Figura 31 – Resultados da metodologia de esterificação para o óleo bruto da cepa LF01.	87
Figura 32 – Resultados da metodologia de etanólise para o óleo bruto da cepa LF01.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos de extração da fração lipídica de diversas cepas <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando modificações do método Bligh & Dyer com diferentes pré-tratamentos.....	38
Tabela 2 – Comparação entre estudos de extração de lipídios com microalgas <i>Scenedesmus</i> sp. com e sem o auxílio da tecnologia de ultrassom.....	40
Tabela 3 – Frações percentuais de MAGs, DAGs e TAGs presentes naturalmente nos óleos comestíveis.....	48
Tabela 4 – Valores dos níveis para cada fator analisado no planejamento experimental da extração.....	62
Tabela 5 – Parâmetros reacionais propostos para a glicerólise enzimática do óleo bruto de microalga.....	64
Tabela 6 – Parâmetros reacionais propostos para a esterificação enzimática do óleo bruto de microalga.....	64
Tabela 7 – Parâmetros reacionais propostos para a etanólise enzimática do óleo bruto de microalga.....	64
Tabela 8 – Instruções do método Ca 5a-40 para determinação dos ácidos graxos livres por titulação.....	66
Tabela 9 – Eficiência da extração com etanol para as amostras analisadas no planejamento experimental.....	79
Tabela 10 – Comparação dos perfis de ácidos graxos pelo método Bligh & Dyer e pelo método com etanol.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – Ácido araquidônico
- AE – Atividade Enzimática
- AGMI – Ácido graxo monoinsaturado
- AGPI – Ácido graxo poli-insaturado
- AGS – Ácido graxo saturado
- ALA – Ácido Alfa-linolênico
- DAG – Diacilglicerol
- DHA – Ácido Docosahexaenóico
- EHL – Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico
- ELSD – Detector Evaporativo com Espalhamento de Luz
- EPA – Ácido Eicosapentaenóico
- FAME – *Fatty Acid Methyl Esther* (Metil Éster de Ácido Graxo)
- FID – Detector por Ionização de Chama
- GC – Cromatografia Gasosa
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- LA – Ácido Linoleico
- LC – Cromatografia Líquida
- LF01 – Identificação da cepa *Scenedesmus* sp.
- MAG – Monoacilglicerol
- MS – Espectrometria de Massas
- OA – Ácido Oleico
- RE:O – Razão Etanol:Óleo
- RG:O – Razão Glicerol:Óleo
- RID – Detector de Índice de Refração
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- RP – Fase Reversa
- RS:O – Razão Solvente:Óleo
- TAG – Triacilglicerol
- TLC – Cromatografia em Camada Delgada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO GERAL	16
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
1.3	PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES DESTE TRABALHO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	LIPÍDIOS	18
2.1.1	Ácidos Graxos	19
2.1.1.1	Famílias ω -9, ω -6 e ω -3	21
2.1.2	Acilgliceróis	23
2.1.2.1	Triacilgliceróis	24
2.1.2.2	Diacilgliceróis	26
2.1.2.3	Monoacilgliceróis	26
2.1.3	Metil e Etil Ésteres de Ácidos Graxos	28
2.1.4	Outras Classes	29
2.2	MICROALGAS	30
2.2.1	<i>Scenedesmus</i> sp.	32
2.2.2	Composição Lipídica	33
2.2.3	Pré-tratamento da Biomassa	34
2.2.4	Métodos de Extração de Lipídios	36
2.2.4.1	Método Bligh & Dyer	37
2.2.4.2	Método Assistido por Ultrassom	39
2.2.5	Mercado e Produtos	41
2.2.5.1	Óleo de Microalga	42
2.3	LIPÍDIOS FUNCIONAIS E ROTAS DE PRODUÇÃO	44
2.3.1	MAGs e DAGs	46
2.3.1.1	Glicerólise	48
2.3.1.2	Esterificação	53
2.3.2	Etil Ésteres	56
2.4	CONCLUSÃO	57
3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	59
3.1	BIOMASSA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	60
3.2	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA	60
3.3	EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGA	60
3.3.1	Bligh & Dyer	61
3.3.2	Extrações Assistidas por Ultrassom	61

3.3.3	Otimização da Extração	61
3.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	62
3.5	PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS FUNCIONAIS	63
3.6	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDIOS	64
3.6.1	Perfil de Ácidos Graxos	64
3.6.2	Composição de Acilgliceróis	65
3.6.3	Determinação de Ácidos Graxos Livres	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
4.1	EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGA	67
4.1.1	Pré-tratamento da Biomassa	67
4.1.2	Extração assistida por Ultrassom	72
4.1.3	Aplicações do óleo	77
4.2	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.....	82
4.3	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	83
4.4	PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS FUNCIONAIS	84
4.4.1	Glicerólise	85
4.4.2	Esterificação	86
4.4.3	Etanólise	88
5	CONCLUSÕES	90
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICES	107
	ANEXOS	114

1 INTRODUÇÃO

As microalgas se destacam como uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel devido às suas vantagens em comparação a cultivares agrícolas. Entre os principais benefícios apresentados pelas microalgas, tem-se a alta taxa de crescimento, elevado acúmulo de lipídios, alta biofixação de CO₂ e o cultivo em menores áreas sem interferir na produção de alimentos (DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019). Apesar de suas vantagens, análises técnico-econômicas recentes apontam que o biodiesel de microalgas ainda não é competitivo e alguns desafios, como o alto custo de cultivo e processamento da biomassa, dificultam uma produção economicamente viável (HEO; HEO; LEE, 2019; PATEL et al., 2021; SUN et al., 2019). Nesse ponto, vale ressaltar que, em casos especiais como a produção de biodiesel a partir de microalgas integrada em usinas de etanol de primeira geração no Brasil, existem perspectivas positivas em termos econômicos (KLEIN et al., 2019).

Embora esforços para superar esses desafios e promover avanços tecnológicos sejam importantes, uma mudança no foco de pesquisa visando o desenvolvimento de produtos de maior valor agregado se apresenta como uma alternativa para promover o desenvolvimento da aplicação sustentável do óleo de microalga. Esta transição pode aumentar os lucros do processo para compensar os custos de produção e incentivar investimentos neste campo da bioeconomia (BHATTACHARYA; GOSWAMI, 2020; PATEL et al., 2021; RAJESH BANU et al., 2020). Uma grande variedade de compostos bioativos pode ser obtida a partir da biomassa de microalgas, tais como lipídios, proteínas, polissacarídeos, pigmentos, antioxidantes, vitaminas e minerais. Essas frações podem ser utilizadas como matéria-prima para produtos de maior valor comercial com diversas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (TANG et al., 2020).

O processo de extração do óleo (lipídios) de microalga depende majoritariamente da aplicação de solventes orgânicos, pelo menos até o momento atual do avanço tecnológico dessa área de estudo (SATI et al., 2019). O clorofórmio e o metanol representam os solventes mais estudados para extração de óleo de biomassas e a metodologia padrão para este processo foi proposta por Bligh & Dyer (BLIGH; DYER, 1959). Apesar da sua eficiência, a toxicidade do método Bligh & Dyer (B&D) não é adequada para extração de óleo de microalgas em estudos que visam aplicações mais refinadas além do biodiesel (SATI et al., 2019). Esses solventes estão sendo estritamente regulamentados na indústria bioquímica à medida que se avança em direção a protocolos de extração mais verdes (CHEMAT et al., 2019), ou seja, de fontes

renováveis e mais amigáveis com relação ao meio ambiente, saúde ocupacional, humana e animal. Portanto, a otimização da extração de óleo usando solventes menos tóxicos é necessária para garantir produtos seguros que possam impulsionar o desenvolvimento de biorrefinarias (DE JESUS et al., 2019).

Outro desafio para produção industrial do óleo de microalgas é a otimização dos pré-tratamentos da biomassa (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015). Dessa forma, os métodos de secagem e rompimento celular são estudados para entender sua influência no processo de extração, visando um aumento na eficiência e redução nos custos (MENEGAZZO; FONSECA, 2019). A secagem é necessária para tornar as células de microalgas mais disponíveis para extração por solvente, enquanto a ruptura celular é realizada para aumentar a extração de lipídios intracelulares (FLORENTINO DE SOUZA SILVA et al., 2014).

Diferentes métodos têm sido aplicados para quebrar a estrutura da parede celular, incluindo a aplicação de ultrassom, micro-ondas, enzimas e fluidos supercríticos (MORAIS et al., 2020). Dentre eles, a técnica de ultrassom vem mostrando resultados positivos, aumentando a eficiência quando incorporada aos métodos tradicionais de extração (ARAUJO et al., 2013; FLORENTINO DE SOUZA SILVA et al., 2014). Além disso, a extração assistida por ultrassom possibilita a obtenção de melhores resultados utilizando solventes de baixa toxicidade que não seriam capazes de obter a mesma eficiência sem este auxílio (BASILY et al., 2018). Portanto, essa tecnologia é uma grande aliada para desenvolver métodos de extração mais ecológicos, proporcionando uma ruptura da parede celular relativamente rápida e eficaz com custo mínimo de manutenção e sem a necessidade de substâncias perigosas (KAPOORE et al., 2018).

A fração lipídica das microalgas vem conquistando o interesse do mercado pelo acúmulo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) demonstrado por algumas espécies (FERREIRA et al., 2019a). Os AGPIs das famílias ômega 3, 6 e 9 são considerados precursores essenciais para a síntese de lipídios funcionais com alto valor nutricional que promovem diversos benefícios à saúde humana, como a proteção do sistema cardiovascular e do sistema nervoso (MINIHANE; LOVEGROVE, 2006). Portanto, a avaliação do óleo de microalga como matéria-prima para produção de lipídios funcionais surge como uma alternativa para valorizar o cultivo desta biomassa e contribuir com a literatura escassa sobre este tópico em comparação com as pesquisas focadas em biodiesel.

Neste contexto, o presente trabalho teve a proposta de aplicar a técnica de ultrassom na otimização de um método mais ecológico e menos tóxico para a extração do óleo bruto de microalga e assim avaliar a aplicabilidade do mesmo em rotas enzimáticas para produção de

lipídios funcionais ricos em AGPIs. Estudos focados na otimização de métodos de extração assistidos por ultrassom para microalgas já foram publicados, porém nenhum otimizou esse processo para a cepa LF01, até o momento. A utilização do óleo de uma cepa do gênero *Scenedesmus* sp. para produção de lipídios funcionais ainda não foi reportada na literatura.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo propor uma metodologia de extração assistida por ultrassom para o óleo de microalga (*Scenedesmus* sp. LF01) e avaliar a aplicabilidade do óleo bruto na produção de lipídios funcionais através de rotas enzimáticas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar diferentes pré-tratamentos (secagem ao sol, autoclavagem com posterior secagem em estufa e liofilização) na biomassa da microalga *Scenedesmus* sp. LF01 e extrair seu óleo pelo método Bligh & Dyer para analisar a eficiência e o perfil de ácidos graxos;
- Avaliar a extração assistida por ultrassom aplicando diferentes solventes, definir o método mais adequado e otimizá-lo através de um planejamento de experimentos avaliando os fatores razão solvente:biomassa e temperatura;
- Determinar a atividade enzimática das quatro enzimas estudadas (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium solitum*, *Rhizopus javanicus*) no intuito de selecionar a mais eficiente para aplicação nas rotas enzimáticas de produção de lipídios funcionais;
- Analisar a aplicabilidade do óleo bruto de microalga como substrato das reações de glicerólise, esterificação e etanolise para produção de mono/diacilgliceróis e etil ésteres ricos em AGPIs.

1.3 PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES DESTE TRABALHO

Este trabalho visou contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia verde de baixa toxicidade para a extração do óleo bruto de microalga, substituindo o uso de solventes como metanol e clorofórmio. Também busca avaliar a aplicabilidade dessa matéria-prima em rotas alternativas de maior valor agregado, como a produção de lipídios funcionais ricos em ácidos graxos poli-insaturados. Os resultados dessa pesquisa incentivam o desenvolvimento desse setor da bioeconomia, explorando as possíveis aplicações nutracêuticas/farmacêuticas do gênero *Scenedesmus* sp., amplamente estudado para produção de biodiesel.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica deste trabalho consiste na apresentação da fundamentação teórica e trabalhos publicados na literatura direcionados tanto para a otimização da extração do óleo de microalgas quanto para a produção de lipídios funcionais através de rotas enzimáticas. Ela foi dividida em três temas principais e irá abordar: lipídios (teoria e importância das diversas classes), microalgas (benefícios do cultivo, composição lipídica, processamento e mercado) e lipídios funcionais (teoria, aplicações e rotas de produção).

2.1 LIPÍDIOS

De acordo com a definição de Christie (1987), os lipídios constituem um grupo de compostos orgânicos formados por ácidos graxos e seus derivados, englobando também as substâncias relacionadas biossinteticamente ou funcionalmente a este grupo. Carbono, hidrogênio e oxigênio formam a maior parte das estruturas lipídicas, porém determinados lipídios podem conter outros elementos como nitrogênio, fósforo e enxofre (VALENZUELA; VALENZUELA, 2013). Gorduras, óleos, ceras, fosfolipídios e esteroides são os principais exemplos deste grupo de moléculas.

Estas macromoléculas são caracterizadas pela baixa solubilidade em solventes polares e podem ser encontradas em todos os tipos de células, desde microrganismos até plantas superiores e animais. Elas contribuem na formação da estrutura celular, fornecem armazenamento de energia e participam em diversos processos biológicos que incluem desde a transcrição do código genético até a regulação de vias metabólicas vitais e respostas fisiológicas (GURR; HARWOOD; FRAYN, 2002).

Os lipídios são agrupados em diferentes classes de acordo com a sua composição estrutural. Geralmente, eles são classificados como lipídios simples, lipídios compostos ou complexos e lipídios derivados ou precursores (ARNESON; BRICKELL, 2007). Os lipídios simples compreendem todas as estruturas formadas apenas por ésteres de ácidos graxos e álcoois. Exemplos de lipídios simples incluem triacilgliceróis (gorduras e óleos), metil e etil ésteres (componentes do biodiesel) e ceras (ARNESON; BRICKELL, 2007; FAHY et al., 2011). Os lipídios complexos englobam todas as estruturas que possuem grupos adicionais além dos ácidos graxos e álcoois, como fosfatos e carboidratos. Como exemplo, podem-se citar os fosfolipídios e glicolipídios. Os lipídios derivados incluem as estruturas obtidas quando lipídios

simples ou complexos são hidrolisados. Ácidos graxos, esteroides, terpenos, e mono e diacilgliceróis estão nesta categoria (FAHY et al., 2011).

Uma classificação de acordo com a polaridade também é encontrada na literatura. Os lipídios neutros (ou apolares) são representados pelas estruturas hidrofóbicas, como ácidos graxos, mono, di e triacilgliceróis, ceras, esteróis, carotenoides e tocoferóis (LIBONG et al., 2017). Os lipídios polares são frequentemente anfifílicos (contendo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas) e normalmente constituídos por uma ou duas cadeias de ácidos graxos ligadas a um grupo mais hidrofílico. Eles englobam principalmente os fosfolipídios (glicerofosfolipídios e esfingolipídios) e glicolipídios (glicero-glicolipídios e esfingoglicolipídios) (TRAVERSIER et al., 2018). Alguns autores classificam os monoacilgliceróis como lipídios polares por estes apresentarem características anfifílicas significativas (LARSSON et al., 2006).

Outra classificação divide os lipídios em saponificáveis e não saponificáveis. Alguns lipídios contêm ésteres que são hidrolisáveis por calor, álcalis e/ou outras soluções. Esses são chamados de lipídios saponificáveis e os produtos finais da hidrólise são geralmente ácidos graxos e glicerol. Triacilgliceróis e fosfolipídios são exemplos desta classe. Por outro lado, alguns lipídios possuem outras estruturas que não são hidrolisáveis e são classificados como não saponificáveis. Como exemplo, podem-se citar os terpenos e esteroides (GYAMFI; OFORI AWUAH; OWUSU, 2019).

Os lipídios desempenham um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do ser humano, onde as necessidades dessas moléculas (principalmente ácidos graxos) irão mudar dependendo da idade e do estado fisiológico dos indivíduos. Além disso, os lipídios têm participação crucial tanto no desenvolvimento como na prevenção de muitas doenças, especialmente doenças crônicas (SIMOPOULOS, 2003). Como componentes dos alimentos, os lipídios também são importantes porque fornecem características organolépticas (palatabilidade, sabor, aroma e textura), são veículos para vitaminas lipossolúveis, pigmentos ou corantes e antioxidantes, e podem atuar como agentes emulsificantes e/ou promover a estabilidade de suspensões e emulsões (VALENZUELA; DELPLANQUE; TAVELLA, 2011).

2.1.1 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos representam a classe de ácidos monocarboxílicos ligados covalentemente a uma cadeia alifática saturada (apenas ligações C-C) ou mono/poli-insaturada (presença de uma ou mais ligações C=C) (GUNSTONE, 1996). As propriedades químicas e físicas dos diferentes ácidos graxos, como sua solubilidade em solventes apolares e o ponto de

fusão, dependem do número de átomos de carbono na molécula. Quanto maior o número de átomos de carbono na cadeia, maior será o ponto de fusão e a hidrofobicidade da molécula (FAHY et al., 2005).

De acordo com o comprimento da cadeia, estes lipídios são classificados como ácidos graxos de cadeia curta: possuem quatro (C4) a dez (C10) carbonos; de cadeia média: doze (C12) a quatorze (C14) carbonos; de cadeia longa: dezesseis (C16) a dezoito carbonos (C18); e de cadeia muito longa: (C20) ou mais átomos de carbono. Moléculas com menos de quatro átomos de carbono (C2: ácido acético e C3: ácido propiônico) não são consideradas ácidos graxos devido à alta hidrofiliabilidade (VALENZUELA; VALENZUELA, 2013). Ácidos graxos com elevado número de átomos de carbono não são frequentes, porém estão presentes em quantidade significativa no cérebro de vertebrados, incluindo mamíferos e humanos. No cérebro humano já foram identificados ácidos graxos de até 36 átomos de carbono (KUIPERS et al., 2012).

De acordo com a nomenclatura química oficial estabelecida pela IUPAC (International Union of Practical and Applied Chemistry), os carbonos dos ácidos graxos devem ser numerados sequencialmente iniciando pelo carbono carboxílico (C1) até o carbono metileno mais extremo (Cn). Após esta numeração, acrescentam-se dois pontos e indicam-se quantas ligações duplas estão presentes na molécula. Se presente(s), a(s) posição(ões) da(s) ligação(ões) dupla(s) deve(m) ser indicada(s) pelo símbolo delta (Δ), junto com o número do carbono onde a(s) ligação(ões) começa(m). O ácido linoleico, por exemplo, é representado nesta nomenclatura por C18:2, Δ 9, Δ 12 – indicando que ele possui 18 carbonos e duas ligações duplas presentes entre o carbono 9 e 10 e o carbono 12 e 13 (VALENZUELA; VALENZUELA, 2013).

Apesar de ser oficial, a nomenclatura da IUPAC não é a mais adequada para identificar os produtos da oxidação metabólica dos ácidos graxos. Este problema ocorre porque as células oxidam os ácidos graxos para produção de energia majoritariamente nas posições alfa e beta, que correspondem as posições C2 e C3 (WANDERS; KOMEN; KEMP, 2011). Isso significa que à medida que o ácido graxo é metabolizado, o número de cada átomo de carbono vai mudando, criando um problema para a identificação dos produtos metabólicos formados à medida que a oxidação avança. Por esta razão, R. Holman, em 1958, propôs um novo tipo de notação que agora é amplamente utilizada para a identificação bioquímica e nutricional de ácidos graxos insaturados (ARNAULD et al., 2009). Esta nomenclatura numera os carbonos no sentido oposto da nomenclatura da IUPAC, logo o C1 é o carbono mais distante do grupo carboxila (chamado de carbono de metileno terminal ou final), que é designado como " ω " ou

"ômega" e em seguida adiciona-se o número correspondente a posição da primeira ligação dupla (GUNSTONE, 2006).

Na nomenclatura ômega, o ácido linoleico passa a ser representado por C18:2 ω -6, indicando que a primeira ligação dupla está localizada no C6 contando a partir do carbono metileno final. A posição da segunda ligação dupla (C9) não é indicada, porém pode ser inferida já que a maioria dos ácidos graxos apresenta ligações duplas separadas por um grupo metileno formando uma estrutura -C=C-C-C=C-, conhecida como "estrutura não conjugada" (OSÓRIO et al., 2008). No entanto, embora com muito menos frequência, também estão presentes "estruturas conjugadas" onde as ligações duplas não são separadas por um grupo metileno, formando uma estrutura -C=C-C=C-. Esta disposição estrutural vem ganhando destaque porque alguns ácidos graxos que as possuem apresentam propriedades nutricionais especiais, sendo chamados de "ácidos graxos conjugados". A maioria deles é derivada da estrutura não conjugada do ácido linoleico (C18:2 ω -6) (VALENZUELA; VALENZUELA, 2013).

2.1.1.1 Famílias ω -9, ω -6 e ω -3

Os ácidos graxos das famílias ômega 9, 6, e 3 desempenham funções importantes no corpo humano e, embora elas sejam diferentes, a evidência é clara de que a incorporação de proporções equilibradas desses lipídios é importante para manter a saúde do coração e o bem-estar geral (LE THI et al., 2018). Além disso, a promoção de efeitos benéficos nos níveis de colesterol pela substituição de ácidos graxos saturados (AGS) por ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) ou poli-insaturados (AGPIs) é uma evidência bem difundida na medicina (HODSON; SKEAFF; CHISHOLM, 2001).

O ácido oleico (OA; C18:1 ω -9), que tem uma única ligação dupla em C9 contada a partir da extremidade metil, é o principal representante da família ômega 9 e é altamente abundante em tecidos vegetais e animais. A substituição das gorduras saturadas na dieta por ácido oleico contribui para a manutenção dos níveis normais de colesterol no sangue, além de uma série de outros efeitos que vêm sendo estudados como a modulação de marcadores inflamatórios, controle da pressão arterial e sensibilidade à insulina (PRAVST, 2014).

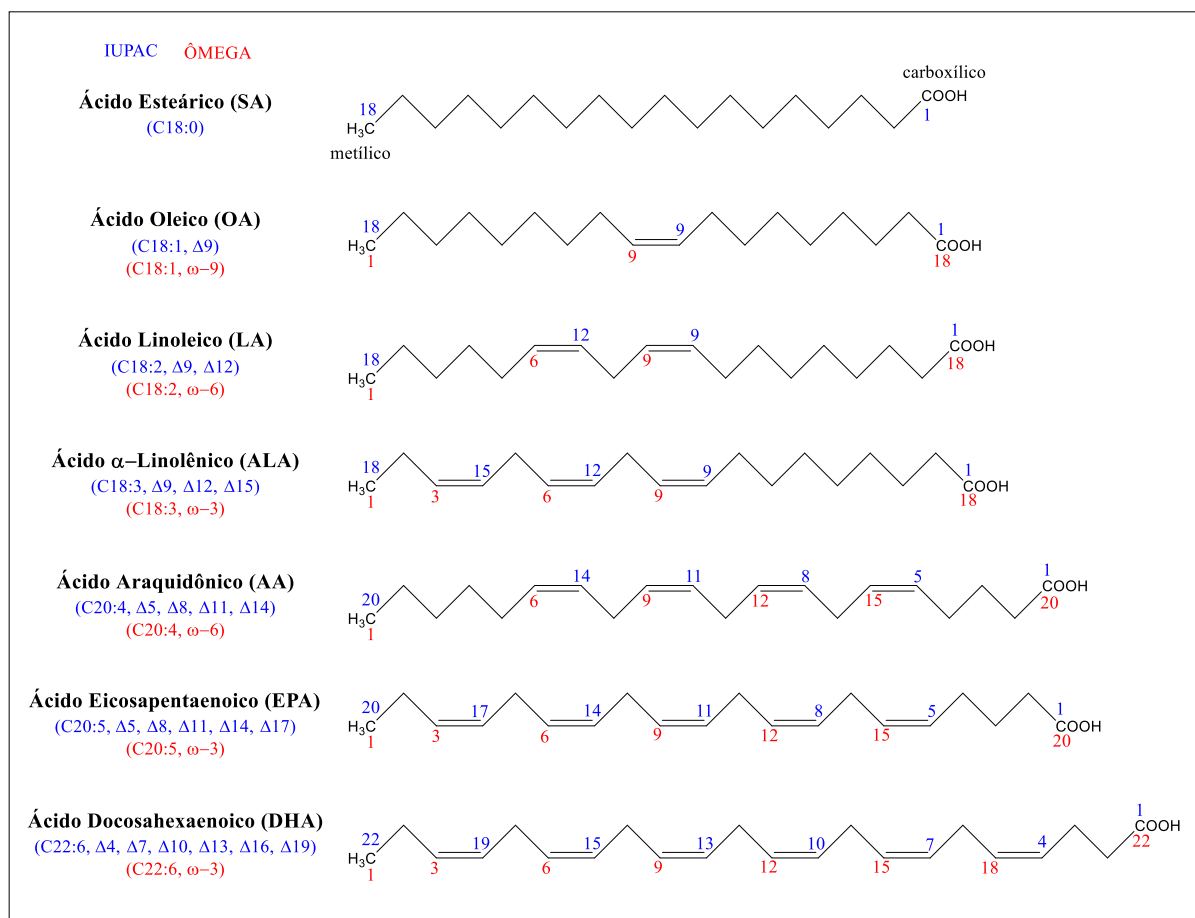
O ácido linoleico (LA; C18:2 ω -6) é o principal representante da família ômega 6 e é muito abundante em óleos vegetais e presente em menor quantidade em gorduras animais. Pesquisas indicam que a ingestão adequada desse ácido graxo está relacionada com a prevenção de doenças cardiovasculares, aterosclerose, alguns tipos de câncer e diabetes tipo 2 (ROS, 2020). O ácido linoleico conjugado também proporciona benefícios para a saúde humana e suas

propriedades anticarcinogênicas, antidiabéticas, anti-hipertensivas e anti-obesidade vem sendo confirmadas (KOBA; YANAGITA, 2014).

O ácido alfa-linolênico (ALA; C18:3, ω -3) corresponde ao ácido graxo com ligações duplas em C3, C6 e C9, e representa o principal componente da família ômega 3. O ALA é menos abundante que o OA e o LA, e está presente quase que exclusivamente no reino vegetal, principalmente em plantas terrestres (KRIS-ETHERTON et al., 2000). Seus benefícios para a saúde humana incluem efeitos cardioprotetores, modulação da resposta inflamatória, prevenção da diabetes tipo 2 e do risco de fratura nos ossos, além de um impacto positivo na função e no comportamento do sistema nervoso central (RAJARAM, 2014; STARK; CRAWFORD; REIFEN, 2008). Uma dieta com alimentos contendo os ácidos linoleico e alfa-linolênico é importante para a manutenção da saúde humana pois estes ácidos graxos estão na categoria dos ácidos graxos essenciais.

A capacidade de um organismo de introduzir metabolicamente ligações duplas em certas posições de um ácido graxo, determina a existência dos chamados ácidos graxos não essenciais ou essenciais. Mamíferos, incluindo os primatas e seres humanos, só conseguem introduzir uma ligação dupla até a posição C9 de um ácido graxo saturado (de acordo com a nomenclatura " ω "), mas não em outros carbonos mais próximos ao carbono metileno (C1) (BLASBALG et al., 2011). Esta é a razão pela qual o ácido oleico é um ácido graxo não essencial, pois pode ser sintetizado metabolicamente a partir de outros. Em contrapartida, os ácidos linoleico e alfa-linolênico são essenciais pois não são sintetizáveis metabolicamente, já que os mamíferos não conseguem introduzir ligações duplas nas posições C6 e C3 (VALENZUELA; VALENZUELA, 2013).

Os ácidos linoleico (LA) e alfa-linolênico (ALA) são precursores de uma categoria de ácidos graxos importante para o regulamento das funções metabólicas: os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPICL). Estes lipídios desempenham um papel importante na regulação do sistema imunológico, coagulação do sangue, atividade dos neurotransmissores, metabolismo do colesterol e estrutura dos fosfolipídios da membrana do cérebro e da retina (ABEDI; SAHARI, 2014). Como exemplos desta classe, pode-se citar o ácido araquidônico (AA; C20:4, ω -6), sintetizado a partir do LA, e os ácidos eicosapentaenóico (EPA; C20:5, ω -3) e docosahexaenóico (DHA; C22:6, ω -3), sintetizados a partir do ALA. Os AGPICLs podem ser encontrados em tecidos de animais terrestres (AA), aquáticos (AA, EPA e DHA) e em plantas de origem marinha, como as microalgas (EPA e DHA) (KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2002). A Figura 1 ilustra a estrutura de alguns ácidos graxos e suas representações de acordo com a nomenclatura da IUPAC e a nomenclatura ômega.

Figura 1 – Representação da estrutura de alguns ácidos graxos.

Fonte: Autor.

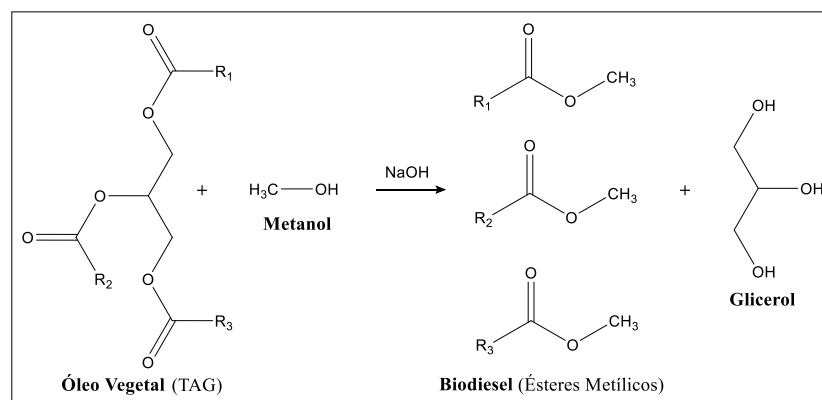
2.1.2 Acilgliceróis

Os ácidos graxos são encontrados na natureza em sua forma livre, porém majoritariamente se apresentam na forma de acilgliceróis. Estes compostos, também conhecidos como glicerídeos, são lipídios formados por uma molécula de glicerol (1,2,3-propanotriol) ligada através de uma ligação éster a um (monoacilglicerol – MAG), dois (diacilglicerol – DAG) ou três ácidos graxos (triacilglicerol – TAG) (GUNSTONE, 1996). O glicerol é um álcool trihidroxilado que participa como intermediário no metabolismo de carboidratos e lipídios. Este composto é considerado o transportador natural mais comum para grupos acilo e atua como base de muitas classes lipídicas além dos TAGs, como os glicerofosfolipídios e gliceroglicolipídios (GUNSTONE; HERSLÖF, 2000).

Este poliálcool é produzido comercialmente durante a fabricação de sabões através do processo de saponificação de óleos com hidróxido de sódio ou potássio e, a partir de 1949, também passou a ser produzido a partir da síntese do propeno. Recentemente, o glicerol vem sendo gerado em grandes quantidades como subproduto da produção do biodiesel (ésteres de

ácidos graxos), através da reação de transesterificação de um óleo vegetal com um álcool utilizando catálise básica, como representado na Figura 2. O termo glicerol refere-se ao componente químico puro, enquanto o termo glicerina é aplicado aos produtos comerciais purificados, contendo pelo menos 95% de glicerol (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Figura 2 – Transesterificação de um TAG com metanol catalisada por NaOH.



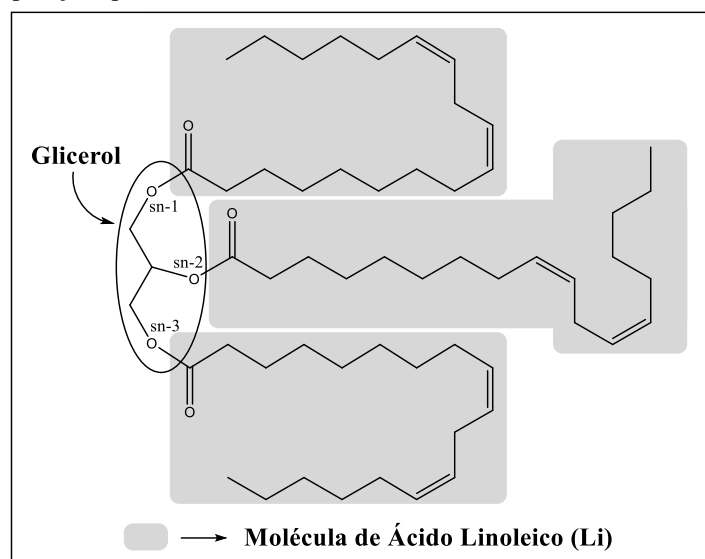
Fonte: Baseado em Mota, Silva e Gonçalves, 2009.

Os acilgliceróis naturais contêm uma extensa variedade de ácidos graxos. Os compostos mais encontrados nestes lipídios são os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1) e linoleico (18:2). Os acilgliceróis vegetais geralmente têm uma proporção relativamente maior de ácidos graxos insaturados. Entretanto, os óleos de coco e palma se destacam por apresentar a predominância de ácidos saturados de cadeia média. Com relação aos lipídios de origem animal, as gorduras do leite se sobressaem por conter uma proporção muito maior, dependendo da espécie, de ácidos de cadeia curta e média do que a maioria das gorduras desta origem (GURR; HARWOOD; FRAYN, 2002).

2.1.2.1 Triacilgliceróis

Os triacilgliceróis (TAGs), ou triglicerídeos, são os componentes essenciais das gorduras (sólidas a temperatura ambiente) e óleos (líquidos a temperatura ambiente), embora seja importante frisar que existem outras classes em proporções menores nestes lipídios, como esteróides e carotenóides (GURR; HARWOOD; FRAYN, 2002). Uma molécula de TAG é constituída por três ácidos graxos (grupos acilo), iguais ou diferentes, ligados através de ligações éster a uma estrutura de glicerol, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 – Representação da molécula do TAG Trilinoleína e das posições presentes na estrutura do Glicerol (sn-1, sn-2 e sn-3).



Fonte: Autor.

Tanto os tipos quanto as posições dos ácidos graxos (sn-1, sn-2 e sn-3) podem variar amplamente, criando uma enorme possibilidade de combinações moleculares que dão origem a inúmeros tipos de TAGs (LARSOON et al., 2006). As características dos TAGs presentes na composição de óleos e gorduras, tais como peso molecular, grau de insaturação e distribuição dos ácidos graxos na estrutura do glicerol, são fatores que determinam as propriedades físicas e químicas destes lipídios (KUKSIS, 1978).

Por muitos anos, a gordura foi considerada um componente indesejável na dieta humana, contribuindo para a obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer. No entanto, esta consideração vem sendo questionada por resultados de estudos a longo prazo que avaliaram a ingestão individual e a ingestão com relação a outros fatores de risco conhecidos como tabagismo, alcoolismo, idade e sexo (SANDERS, 2016).

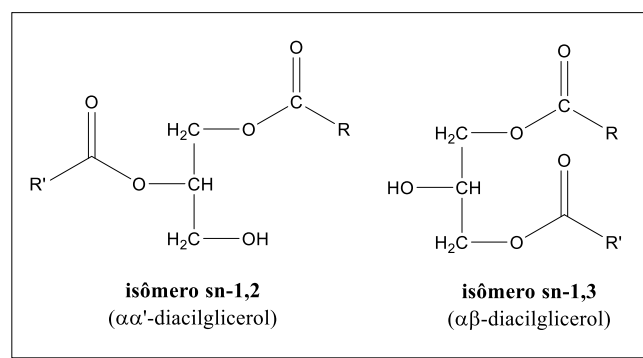
Além disso, há uma evidência crescente que sugere que a substituição da gordura por carboidratos refinados pode ter efeitos adversos à saúde e que alguns lipídios e constituintes de óleos vegetais, como vitamina E, fitoesteróis e polifenóis, têm efeitos positivos para a saúde. Sabe-se que o papel principal da gordura na dieta é proporcionar energia, porém ela também fornece ácidos graxos essenciais e facilita a absorção das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K). Portanto, sua ingestão de forma balanceada é necessária para o funcionamento saudável do metabolismo humano (SANDERS, 2016).

2.1.2.2 Diacilgliceróis

Os diacilgliceróis (DAGs), também conhecidos como diglicerídeos, são moléculas que apresentam a substituição de apenas dois grupos hidroxila do glicerol por dois ácidos graxos, iguais ou diferentes. Estes acilgliceróis são componentes naturais de vários óleos comestíveis, como óleos de oliva e algodão, nos quais estão presentes em quantidades não superiores a 10% (TAKASE, 2007).

Devido às três possíveis posições presentes no glicerol para substituição, os DAGs se manifestam na forma dos isômeros: sn-1,2 ($\alpha\alpha'$ -diacilgliceróis) e sn-1,3 ($\alpha\beta$ -diacilgliceróis), como apresenta a Figura 4 (GUNSTONE; HERSLÖF, 2000). De acordo com Laszlo, Compton e Vermillion (2008), a razão de produção entre o isômero sn-1,3 e sn-1,2 é em torno de 2:1, devido a migração dos grupos acilo que tendem a formar o isômero de maior estabilidade.

Figura 4 – Representação dos isômeros sn-1,2 e sn-1,3 apresentados pelos diacilgliceróis.



Fonte: Baseado em Gunstone e Herslöf, 2000.

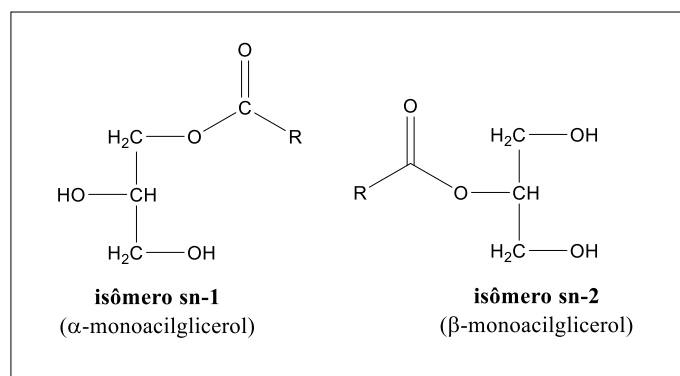
O isômero sn-1,2 dos diacilgliceróis se apresenta como componente minoritário na maioria dos tecidos e membranas, porém é indispensável nas células animais, pois atua como intermediário-chave na formação de diversos glicerolipídios. Além disso, os $\alpha\alpha'$ -diacilgliceróis exercem a função de mensageiros secundários em muitos processos celulares, respondendo a estímulos externos para regular mecanismos bioquímicos vitais. Este é o único tipo de isômero que consegue desempenhar estas funções, já que a maioria das enzimas celulares não identifica os $\alpha\beta$ -diacilgliceróis (NICOLAOU; KOKOTOS, 2004).

2.1.2.3 Monoacilgliceróis

Os monoacilgliceróis (MAGs), também denominados de monoglicerídeos, são ésteres de glicerol onde apenas um grupo hidroxila foi esterificado com uma molécula de ácido graxo. Estes compostos apresentam os isômeros sn-1 (ou sn-3), conhecidos como α -monoacilgliceróis que apresentam a esterificação no carbono final (ou inicial), e o sn-2, conhecidos como β -

monoacilgliceróis onde o carbono intermediário é esterificado (GUNSTONE; HERSLÖF, 2000). Dentre estes dois isômeros, o sn-1 é predominante nas misturas após o equilíbrio (razão de 9:1 em relação ao sn-2) devido à migração dos grupos acilo que é induzida por este isômero ser termodinamicamente mais estável (LASZLO; COMPTON; VERMILLION, 2008). O isômero sn-2 existe apenas em uma única forma cristalina, enquanto o sn-1 pode se apresentar em diversas formas, sendo um isômero polimórfico (LARSOON et al., 2006). As estruturas dos α -monoacilgliceróis e β -monoacilgliceróis estão representadas na Figura 5.

Figura 5 – Representação dos isômeros sn-1 e sn-2 apresentados pelos monoacilgliceróis.



Fonte: Baseado em Gunstone e Herslöf, 2000.

Os β -monoacilgliceróis são um dos principais produtos finais da digestão intestinal de gorduras em animais pela enzima lipase pancreática. Eles são absorvidos diretamente pelas células intestinais e convertidos em triacilgliceróis antes de serem transportados por lipoproteínas para o fígado. Dentro dos tecidos, os MAGs são produzidos pela lipólise dos TAGs presentes no tecido adiposo. Esta classe de acilgliceróis também é produzida em bactérias, fungos, plantas e animais a partir de diacilgliceróis, pela ação das lipases diacilglicerolíticas (NICOLAOU; KOKOTOS, 2004).

As hidroxilas presentes no glicerol proporcionam aos MAGs características hidrofílicas enquanto a cadeia acil presente na molécula de ácido graxo é responsável por conceder características lipofílicas/hidrofóbicas. Portanto, estes compostos são considerados anfifílicos e possuem propriedades emulsificantes/surfactantes, ajudando na formação de produtos onde a mistura de substâncias lipofílicas e hidrofílicas se faz necessária, pois reduzem a tensão superficial entre as fases água e óleo promovendo estabilidade na emulsão (FERRETTI et al., 2010).

Os emulsificantes são frequentemente avaliados de acordo com suas propriedades físico-químicas. Diversos métodos foram desenvolvidos para classificá-los, porém, o conceito de equilíbrio hidrofílico/lipofílico (EHL) desenvolvido por Griffin é o mais utilizado dentre

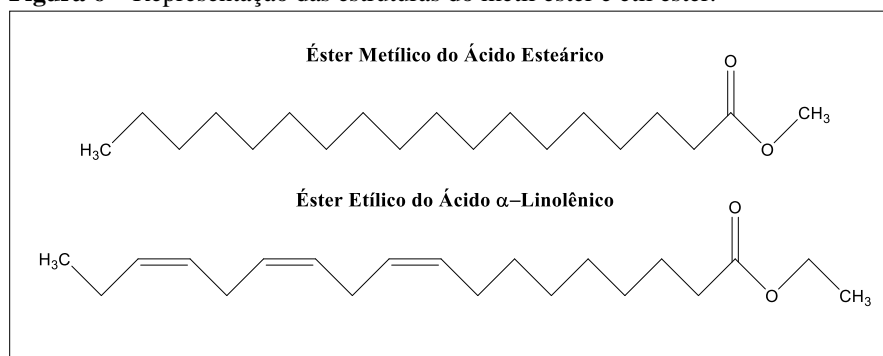
eles. Os monoglicerídeos possuem um caráter lipofílico e, portanto, recebem um número baixo de EHL (entre 3 e 6). Este tipo de emulsificante se dissolve facilmente em óleo e estabiliza emulsões de água/óleo (a/o), formando micelas invertidas (WHITEHURST, 2004).

Os DAGs também possuem propriedades semelhantes às dos MAGs, todavia, suas moléculas apresentam apenas um grupo hidroxila. Conseqüentemente, os DAGs são emulsificantes mais lipofílicos em comparação aos MAGs (valor de EHL mais baixo). Devido a essas diferenças, os MAGs possuem uma maior atividade tensoativa na interface a/o e são mais procurados para fins de emulsificação em virtude da sua maior eficiência. Todavia, DAGs também são adicionados em emulsões para auxiliar os MAGs na estabilidade e reduzir custos graças ao seu menor valor de mercado (MELTON; SHAHIDI; VARELIS, 2019).

2.1.3 Metil e Etil Ésteres de Ácidos Graxos

Os metil e etil ésteres são estruturas formadas a partir da ligação entre uma molécula de ácido graxo e uma molécula de metanol ou etanol (Figura 6). Estes compostos representam a maior parte da composição do biodiesel porém também podem ser utilizados como intermediários na fabricação de emulsificantes, agentes umectantes, estabilizantes, tratamentos têxteis, ceras, entre outros usos (GUNSTONE, 1996; LARSSON et al., 2006). Outra aplicação que vem ganhando destaque é a utilização de etil ésteres de ácidos graxos da família ômega três como suplemento nutracêutico para promover a redução dos níveis de triglicerídeos no sangue e a prevenção de doenças cardiovasculares (CASTEJÓN et al., 2019; KUO et al., 2020).

Figura 6 – Representação das estruturas do metil éster e etil éster.



Fonte: Autor.

2.1.4 Outras Classes

Os lipídios representam uma grande variedade de moléculas e suas estruturas vão além dos ésteres de ácidos graxos com álcoois de cadeia curta. Dentre as principais categorias de lipídios que contribuem para essa diversidade, podem-se citar as ceras, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e terpenos (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTRA, 2007).

As ceras biológicas são ésteres constituídos de ácidos graxos saturados ou insaturados de cadeia longa (C14 a C36) ligados a um álcool de cadeia longa (C16 a C30). As ceras têm uma diversidade de funções relacionadas às suas propriedades repelentes à água e à sua consistência firme (NELSON; COX, 2004).

Os fosfolipídios se caracterizam pela presença de um grupo fosfato e apresentam duas categorias principais: os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios. Os glicerofosfolipídios apresentam uma estrutura semelhante à dos triacilgliceróis, porém um dos ácidos graxos é substituído por uma molécula do grupo fosfato. Os esfingolipídios não contém glicerol em sua composição e são compostos de uma molécula do amino álcool de cadeia longa esfingosina ou um de seus derivados, uma molécula de um ácido graxo de cadeia longa e um grupo polar que é unido por uma ligação fosfodiéster. Estes lipídios desempenham um papel duplo nas células como componentes estruturais essenciais da membrana celular e como moléculas reguladoras e importantes intermediários metabólicos (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTRA, 2007; NELSON; COX, 2004).

Os glicolipídios se destacam pela presença de carboidratos agrupados a molécula do lipídio e se dividem em glicerglicolipídios e esfingoglicolipídios. Os glicerglicolipídios representam uma subclasse que é caracterizada pela presença de um ou mais carboidratos ligados ao glicerol por meio de uma ligação glicosídica. Os esfingoglicolipídios são semelhantes ao esfingolipídios, porém o grupo polar fosfato é substituído por um carboidrato unido por uma ligação glicosídica. Os glicolipídios têm como principal função manter a estabilidade da membrana celular e facilitar o reconhecimento celular, que é crucial para a resposta imune e as conexões celulares para formação de tecidos (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTRA, 2007; NELSON; COX, 2004).

Os esteróis são lipídios compostos por vários anéis de carbono e ocorrem na forma livre ou como ésteres de ácidos graxos. O membro mais importante deste grupo é o colesterol - um lipídio de grande importância como bloco de construção de outros esteróis e como constituinte das membranas celulares do corpo humano. Outros esteróis importantes incluem os ácidos biliares, hormônios e a vitamina D (LARSSON et al., 2006).

Os terpenos são uma classe grande e diversa de produtos naturais derivados do esqueleto de carbono C5 ramificado do isopreno. Eles são encontrados principalmente em plantas onde são responsáveis pelo perfume característico das mesmas, porém são produzidos por outros organismos como os fungos. Os terpenos apresentam diversas atividades biológicas, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, anti-inflamatória, antialérgica, antitumoral e imunomoduladora (SOLTANI, 2016).

2.2 MICROALGAS

As microalgas representam uma ampla categoria de microrganismos fotossintéticos unicelulares que são taxonomicamente/filogeneticamente diversos e compreendem tanto células eucarióticas (microalgas) e quanto procarióticas (cianobactérias), também conhecidas como algas azuis (BUX, 2013). Esses microrganismos são normalmente encontrados em ambientes marinhos ou de água doce, mas também podem habitar o solo. Algumas espécies têm a capacidade de crescer em condições extremas de temperatura (campos de neve nas montanhas e solo desértico), pH (meios extremamente ácidos ou alcalinos) e salinidade (regiões hipersalinas) (JACOB-LOPES et al., 2020). Acredita-se que a vida vegetal avançada de hoje tenha evoluído a partir dessas entidades microscópicas simples semelhantes às plantas. Em geral, as algas são um grupo heterogêneo de organismos fotossintéticos polifiléticos com cerca de 350.000 espécies conhecidas (BRODIE; ZUCCARELLO, 2007).

A enorme diversidade taxonômica e ampla distribuição ambiental permitem que as microalgas apresentem uma biomassa com composição variada e enorme potencial para aplicações em áreas diversificadas (JACOB-LOPES et al., 2020). Esta biomassa é constituída por variados biocompostos e pode ser utilizada como matéria-prima para:

- Alimentação animal e humana, pois é uma importante fonte de vitaminas naturais, proteínas, minerais e ácidos graxos (SINGH; KATE; BANERJEE, 2005);
- Produção de cosméticos, medicamentos e alimentos funcionais, porque é rica em compostos de interesse, como pigmentos, antioxidantes, β -carotenos, proteínas, polissacarídeos, triacilgliceróis, ácidos graxos poli-insaturados e vitaminas (ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017);
- Energia renovável, uma vez que os ácidos graxos presentes na biomassa da microalga podem ser usados para a produção de biodiesel e a biomassa residual

pode ser fermentada para produzir bioetanol ou digerida anaerobicamente para produzir metano e eletricidade (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Além das possíveis aplicações provenientes de sua biomassa, as microalgas vêm ganhando destaque devido aos benefícios ambientais proporcionados pelo seu cultivo, como a desaceleração do efeito estufa.

Os gases do efeito estufa de origem antropogênica representam uma problemática ambiental crítica, em virtude de serem responsáveis pela mudança climática global. Dentre estes gases, o dióxido de carbono (CO₂) é responsável por até 68% do total de emissões e uma série de esforços em pesquisa e desenvolvimento vêm sendo direcionados para mitigar estas emissões. Como são microrganismos fotossintéticos, as microalgas podem usar o CO₂ como fonte de carbono, podendo ser utilizadas como tecnologia de captura e armazenamento de carbono, reduzindo sua concentração na atmosfera. Nos últimos anos, a biofixação de CO₂ utilizando o cultivo de microalgas tornou-se uma abordagem com crescente viabilidade, principalmente porque estes microrganismos possuem uma eficiência de fixação cerca de 10 a 50 vezes maior do que as plantas terrestres (HO et al., 2011).

Outras vantagens em relação às plantas terrestres também merecem ser citadas como: taxas de crescimento e produtividades de biomassa mais altas; cultivo em menor área e sem a necessidade de terras aráveis, não competindo com a produção de cultivares alimentícios; águas de baixa qualidade podem ser utilizadas para produção de biomassa, reduzindo os custos associados ao fornecimento de nutrientes e o impacto ambiental associado ao uso de água doce (JACOB-LOPES et al., 2020).

A utilização de águas de baixa qualidade e efluentes para o cultivo de microalgas não só reduz custos como também pode proporcionar o tratamento dos mesmos. A capacidade desses microrganismos de absorver nutrientes como nitrogênio e fósforo, comumente encontrados em efluentes de diferentes fontes, pode desempenhar um papel importante na remediação de águas residuais (FERREIRA et al., 2019b). Alguns estudos também já avaliaram a remoção de metais pesados e outros poluentes orgânicos e inorgânicos (GENTILI; FICK, 2017; PAVITHRA et al., 2020).

Apesar do grande potencial de sua biomassa e os benefícios ambientais de seu cultivo, a produção e o processamento de microalgas ainda apresentam alguns desafios, especialmente em termos técnico-econômicos. As principais etapas do processo produtivo incluem a seleção de cepas, o cultivo, a colheita e pré-tratamento da biomassa, a extração dos compostos de interesse e a produção dos produtos desejados. Cada uma dessas etapas vem sendo estudada como forma de otimizar a produção para viabilizar a integração das microalgas em processos

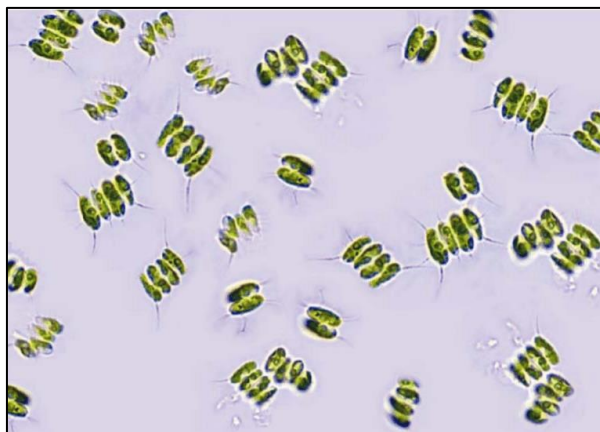
já existentes e o desenvolvimento de futuras biorrefinarias baseadas neste tipo de biomassa (BUX, 2013; JACOB-LOPES et al., 2020).

2.2.1 *Scenedesmus* sp.

Diversas espécies de microalgas são testadas aplicando-se diferentes metodologias e processos para as mais variadas aplicações. Dentre elas, as do gênero *Scenedesmus* estão entre as mais estudadas e reportadas na literatura (RUMIN et al., 2020). A principal razão para este maior número de trabalhos se dá pelas espécies *Scenedesmus* sp. possuírem algumas vantagens em comparação com outras microalgas, como a menor probabilidade de ser contaminada por outros microrganismos e um potencial de propagação em águas contendo alta concentração de materiais orgânicos e metais pesados, possibilitando o seu cultivo em efluentes industriais que reduzem os custos de produção (KIM et al., 2017).

A denominação *Scenedesmus* sp. compreende todas as microalgas que foram classificadas como pertencentes à este gênero porém não tiveram suas espécies catalogadas. Elas geralmente apresentam uma forma elipsoidal (Figura 7) em colônias de série linear com um agrupamento de células variando normalmente entre 4 e 8, mas podendo apresentar até 16 ou 32 células em casos mais raros (STANKIEWICZ; ANDRADE; DOMINGUES, 1981).

Figura 7 – Células de uma espécie do grupo *Scenedesmus* sp.



Fonte: Dogdu Okcu, Tucanan e Dikmen (2019).

Dentre os trabalhos publicados com este grupo de microalgas, se destacam os estudos para remediação de efluentes (NAYAK; KAREMORE; SEN, 2016; PANDEY; SRIVASTAVA; KUMAR, 2019; ZHANG et al., 2019), otimização de seus parâmetros de cultivo para acúmulo de lipídios (DOGDU OKCU; TUNACAN; DIKMEN, 2019; LIU et al., 2012; SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017), comparação de métodos de extração da fração lipídica (BASILY et al., 2018; LEE et al., 2010; RANJAN; PATIL;

MOHOLKAR, 2010) e produção de biodiesel (GULDHE et al., 2014b; TRIPATHI; GUPTA; THAKUR, 2019; TSAVATOPOULOU; ARAVANTINOU; MANARIOTIS, 2019).

2.2.2 Composição Lipídica

As microalgas têm chamado grande atenção como uma fonte promissora e sustentável de lipídios, apresentando um fração lipídica intracelular geralmente na faixa entre 15 a 50% do seu peso seco (SUN et al., 2018). Assim como nas plantas superiores, os dois principais grupos de lipídios presentes nas microalgas consistem em lipídios polares e apolares (lipídios neutros) junto com alguns lipídios incomuns que podem ser característicos de um gênero ou espécie em particular (MIMOUNI et al., 2018). Na maioria das espécies, os glicerolipídios polares (fosfolipídios e glicolipídios) constituem 41%-92% do lipídio total, enquanto os glicerolipídios apolares representam 5% –51% dos lipídios totais. O acúmulo de lipídios varia muito tanto entre diferentes espécies quanto entre cepas da mesma espécie, já que parâmetros do cultivo como estágio de crescimento, composição do meio de cultura, luminosidade, dentro outros, interferem no teor intracelular de lipídios (ALONSO et al., 2000).

Os lipídios polares são constituintes estruturais das membranas e intermediários para a síntese de lipídios. Os glicolipídios estão localizados principalmente nas membranas dos cloroplastos, enquanto os fosfolipídios estão localizados nas membranas extracloroplásticas. Os fosfolipídios contribuem para a integridade estrutural e permeabilidade seletiva de membranas extracloroplásticas enquanto os glicolipídios são responsáveis por manter a estabilidade do aparato fotossintético (MIMOUNI et al., 2018).

Os lipídios neutros em microalgas incluem glicerolipídios não polares, incluindo TAGs, DAGs e MAGs, junto com esteróis e ácidos graxos livres em quantidades menores (VÉRON; DAUGUET; BILLARD, 1996). Os TAGs não estão envolvidos na função estrutural, mas são armazenados no citosol como gotículas lipídicas para armazenamento de energia, especificamente sob condições de estresse. Eles são produtos de armazenamento abundantes que podem ser facilmente catabolizados para fornecer energia metabólica (GURR; HARWOOD; FRAYN, 2002). Na maioria das microalgas, os TAGs são principalmente sintetizados durante o contato com a luz, armazenados em corpos lipídicos no citosol e reutilizados para a síntese de lipídios polares na fase escura (THOMPSON, 1996).

Os esteróis são componentes essenciais das membranas e suas funções incluem o controle da fluidez e da permeabilidade das mesmas. Os esteróis encontrados em microalgas

exibem uma grande diversidade de estruturas devido ao grande número de classes, gêneros e espécies de microalgas (MIMOUNI et al., 2018).

Os ácidos graxos mais encontrados nas microalgas são o C16 e o C18, tanto na forma saturada quanto na forma mono ou poli-insaturada, mas as proporções dos mesmos são variáveis entre os diferentes grupos de microrganismos (HU et al., 2008). Os ácidos graxos poli-insaturados podem representar de 10% a 70% do total encontrado de ácidos graxos produzidos pelas microalgas. Nestes microrganismos, a composição de ácidos graxos dos lipídios totais está frequentemente associada à distribuição das várias classes de lipídios, sendo as porcentagens de C14:0, C16:0 e C16:1, $\Delta 7$ frequentemente correlacionadas com as proporções de TAG, enquanto as porcentagens de EPA e/ou DHA associadas a lipídios polares (BROWN et al., 1996).

A obtenção da fração lipídica de microalgas é um processo que envolve várias etapas, desde a colheita e secagem da biomassa (pré-tratamento) até a escolha do melhor método para extração do óleo visando sua futura aplicação industrial. A otimização técnico-econômica da obtenção do óleo é crucial para aumentar a competitividade dos produtos oriundos dessa matéria-prima.

2.2.3 Pré-tratamento da Biomassa

O cultivo de microalgas se inicia com a inoculação da cepa desejada no meio de cultura, que contém os nutrientes necessários para o seu crescimento. O meio de cultura com o inóculo é mantido em condições ambientais favoráveis para o seu crescimento, e a biomassa é recolhida após um pré-determinado período de cultivo (FON SING et al., 2014). Levando em consideração o pequeno tamanho das células de microalga (entre 2 e 20 μ m) e que elas crescem em culturas muito diluídas (menos de 0,5gL⁻¹), a separação da biomassa do meio de cultura representa uma parte considerável dos custos de produção (KUCMANOVÁ; GERULOVÁ, 2019).

A presença de água na cultura pode afetar as características e concentração dos extratos, bem como a eficácia da técnica de extração. Dessa forma, a separação e a secagem de culturas para produção de biomassa é importante. Os processos de separação concentram a biomassa separando-a do meio de cultura e a secagem é usada para remover completamente a água, gerando uma biomassa seca. Centrifugação, floculação, filtração, sedimentação por gravidade, flotação e técnicas de eletroforese são os métodos convencionais de separação amplamente utilizados. Da mesma forma, a secagem solar, convectiva, liofilização e spray-drying são os

métodos convencionais usados para secar as culturas de microalgas (JACOB-LOPES et al., 2020).

A secagem de culturas de algas sob luz solar direta em uma área aberta é chamada de secagem solar e é considerada o método de secagem mais simples e barato. No entanto, este método requer uma grande superfície de secagem e maior duração para a conclusão da mesma, além de depender das condições ambientais. A secagem solar é adequada para casos com disponibilidade de área em regiões tropicais, onde a energia solar é abundante (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A secagem convectiva é considerada um método de custo e complexidade moderada em relação às outras formas de secagem. Este método utiliza a convecção de ar quente para secar a biomassa e é geralmente realizado em fornos. É importante otimizar e controlar as condições de secagem em pequena escala antes de aplicá-la em larga escala, pois determinadas temperaturas podem degradar os compostos de interesse (DESMORIEUX; DECAEN, 2005).

A liofilização é um método que utiliza equipamentos de alto custo e maior complexidade, porém consegue preservar de maneira eficiente o conteúdo biomolecular da biomassa de microalgas. Geralmente, as microalgas ou seus produtos são congelados por 24h a -70°C e posteriormente submetidos à liofilização por um tempo especificado. A liofilização ajuda a reter a qualidade nutricional das microalgas em comparação com a secagem em forno, e é adequada para aplicações relacionadas com alimentos funcionais (BENNAMOUN; AFZAL; LÉONARD, 2015).

Outro método de alto custo e complexidade é o spray-drying, ou secagem por pulverização, altamente recomendado para a secagem de produtos de alto valor derivados de microalgas. A secagem por pulverização é um método de produção de um pó seco a partir de um líquido ou pasta, secando-o rapidamente com uma corrente de gás quente. Uma solução líquida é pulverizada em uma câmara de ar quente para evaporar a fração volátil. O processo de secagem é concluído em poucos segundos, as microalgas secas são coletadas no fundo e o fluxo de gás residual é exaurido por meio de um separador ciclônico (SHOW; LEE; MUJUMDAR, 2015).

Cada método tem vantagens e desvantagens específicas. Assim, é altamente recomendado selecionar a melhor forma de secagem para uma aplicação específica de microalgas, levando em conta o clima, disponibilidade de área, compostos de interesse e custos. A utilização de um método otimizado para a produção desejada é importante para aumentar a viabilidade econômica do projeto.

Além dos métodos de secagem para remover a influência do excesso de água na extração, outros pré-tratamentos visam aumentar a eficiência do processo através do rompimento celular. Estas técnicas aplicadas na biomassa de microalgas podem ser feitas de forma mecânica, química ou biológica, auxiliando na liberação eficiente de lipídios intracelulares para a posterior etapa de extração (SATI et al., 2019). Como exemplos destes pré-tratamentos pode-se citar a aplicação de autoclave (FLORENTINO DE SOUZA SILVA et al., 2014), micro-ondas e ultrassom (GULDHE et al., 2014a) – mecânicos; hidrólise ácida (YU et al., 2015) e oxidação (HUA et al., 2016) – químicos; hidrólise enzimática (ZHANG et al., 2018a) – biológico. Algumas destas tecnologias podem ser aplicadas durante o processo de extração, criando-se assim metodologias híbridas conhecidas como extrações assistidas.

2.2.4 Métodos de Extração de Lipídios

Após a separação do meio de cultura e o processo de secagem, a extração lipídica é realizada a partir do pó da biomassa seca. Algumas linhas de pesquisa também investigam a possibilidade de extração dos lipídios com a biomassa úmida, para reduzir os custos com a secagem. Em ambos os casos, os solventes orgânicos desempenham um papel fundamental e a extração de lipídios de microalgas é majoritariamente baseada na aplicação de solventes, pelo menos até o momento atual no progresso tecnológico (LEE et al., 2021). A extração de lipídios por solventes orgânicos é fundamentada no conceito de "semelhante dissolve semelhante", ou seja, solventes polares dissolvem lipídios polares e solventes não polares dissolvem lipídios não polares (SATI et al., 2019).

Uma série de solventes, como acetona, benzeno, clorofórmio, n-hexano, metanol, etanol, butanol e ciclohexano podem dissolver lipídios, mas a mistura de metanol e clorofórmio é considerada como a de maior eficiência para extração de lipídios de microalga na literatura (DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015). Apesar de mais eficientes, o clorofórmio e o metanol apresentam alta toxicidade e pesquisas vêm buscando substituí-los por solventes menos nocivos, como o hexano e o etanol, aliados a outras tecnologias (ESCORSIM et al., 2018; SHIN et al., 2014). Os pré-requisitos de um solvente ideal são: alto nível de especificidade para lipídios intracelulares, baixo ponto de ebulição, insolubilidade em água, baixo custo e não tóxico por natureza (COONEY; YOUNG; NAGLE, 2009). Os fatores que podem interferir na eficiência da extração são: a escolha do solvente, a razão entre a quantidade de solvente e biomassa (v/m), o tempo de extração e a temperatura do processo (LEE et al., 2021).

Os solventes são usados diretamente ou auxiliados por técnicas de rompimento celular (extrações assistidas) para aumentar a eficiência da extração de lipídios (SATI et al., 2019). Embora as metodologias de extração assistida não tenham sido capazes de eliminar totalmente o uso de solventes orgânicos até o momento, elas reduziram seu uso e também aumentaram a eficiência geral do processo. Outros métodos vem sendo testados com o objetivo de extrair os lipídios das microalgas sem a utilização de solventes orgânicos, tais como: a extração com CO₂ supercrítico (TAHER et al., 2014) e extração utilizando líquidos iônicos (TO et al., 2018). Outra linha de pesquisa, visa desenvolver metodologias não destrutivas (sem rompimento celular) para realizar a extração contínua de lipídios de células vivas de microalgas (MIRIZADEH et al., 2021).

Após a extração dos lipídios, a identificação e caracterização dos mesmos com precisão se faz necessária para estabelecer suas possíveis aplicações industriais. As técnicas analíticas amplamente utilizadas para a análise de lipídios são: cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-voe (MALDI-TOF) e cromatografia em camada delgada (TLC) (BUX, 2013).

2.2.4.1 *Método Bligh & Dyer*

O método B&D é um dos procedimentos padrão para isolar frações lipídicas totais de matrizes biológicas e se baseia em um sistema de solventes que consiste em clorofórmio/metanol/água (2:2:1,8:v/v/v) (SÜNDERMANN; EGGERS; SCHWUDKE, 2016). Este método de extração de lipídios foi proposto em 1959 por Graham Bligh e William Dyer que buscavam um procedimento eficiente para estudar a decomposição de lipídios em peixes congelados (BLIGH; DYER, 1959).

Esta metodologia é amplamente utilizada para caracterização da fração lipídica de microalgas e diversos artigos utilizam seus resultados como parâmetro de comparação para avaliar a eficiência de novas tecnologias neste campo de pesquisa. Apesar de ser um dos protocolos de extração mais eficiente, ele apresenta algumas desvantagens relacionadas a extração de outros compostos além da fração lipídica. Pesquisas já relataram que este método apresenta a interferências pois também consegue extrair clorofilas (ARCHANAA; MOISE; SURAIISKUMAR, 2012), e carboidratos e proteínas em pequenas quantidades (BREIL et al., 2017).

A literatura sobre esse método aplicado para microalgas indica que, para diferentes tipos de amostra, as relações solvente/amostra e/ou o número de etapas de extração podem ser otimizados. Dessa forma, diversos autores realizam modificações do método B&D para melhor adequá-lo as amostras estudadas. A Tabela 1 apresenta uma revisão da literatura sobre diversos estudos que aplicaram modificações do método B&D em cepas *Scenedesmus* sp. com diferentes pré-tratamentos.

Tabela 1 – Estudos de extração da fração lipídica de diversas cepas *Scenedesmus* sp. utilizando modificações do método Bligh & Dyer com diferentes pré-tratamentos.

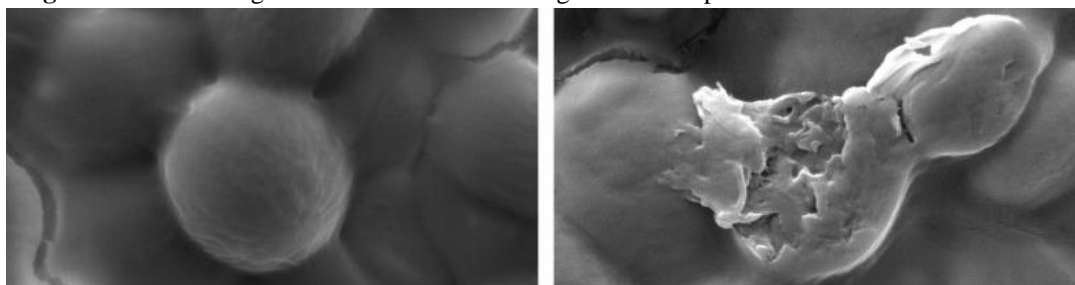
Cepa	Cultivo	Pré-tratamento	Método de Extração	Eficiência (% de biomassa seca)	Referência
-	Meio BG-11 modificado	Secagem em forno	Cl:Met:Sol Sal (3:1:1.2 v/v) Solvente:Biomassa (13:1 v/m)	≈ 2	(RANJAN; PATIL; MOHOLKAR, 2010)
-	Meio BG-11	Autoclave + Liofilização	Cl:Met (1:1 v/v) Solvente:Biomassa (1:1 v/m)	≈ 5	(LEE et al., 2010)
-	Meio BG-11	Liofilização		19.85 ± 0.35	
-	Meio BG-11	Secagem em forno	Cl:Et (1:1 v/v) Solvente:Biomassa (20:1 v/m)	18.8 ± 0.1	(GULDHE et al., 2014a)
-	Meio BG-11	Secagem ao sol		18.9 ± 0.5	
UTEX B72	Meio à base de uréia	Secagem em forno	Cl:Met:Água (1:1:0.9 v/v) Solvente:Biomassa (29:1 v/m)	12.8 ± 0.7	(SHIN et al., 2014)
HXY2	Meio simulando um efluente	Secagem ao forno	Cl:Met (1:2 v/v) Solvente:Biomassa (120:1 v/m)	15.56	(YE et al., 2020)
ISTGA1	Meio BG-11 suplementado com NaHCO ₃	Secagem em forno	Chl:Met (2:1 v/v)	≈ 20	(TRIPATHI; SINGH; THAKUR, 2015)
LX1	Meio BG-11 modificado	Biomassa úmida	Cl:Met (1:1 v/v)	≈ 15	(ZHANG et al., 2013)
CCNM 1028	Meio BG-11	Secagem em forno	Cl:Met:Água (2:2:1.8 v/v)	31.24	(RAM; PALIWAL; MISHRA, 2019)
	Meio BBM			14.39	

Cl – Clorofórmio; Met – Metanol; Sol Sal – Solução Salina; Et – Etanol.

2.2.4.2 Método Assistido por Ultrassom

A tecnologia de ultrassom é um método mecânico que pode ser utilizado antes da extração de lipídios, como pré-tratamento da biomassa de microalgas, ou durante a mesma, auxiliando numa maior eficiência do processo. Neste método, a biomassa de microalga é exposta a ondas ultrassônicas de alta frequência (acima de 20 kHz) que criam pequenas bolhas de cavitação ao redor das células. As bolhas entram em colapso e emitem ondas de choque que rompem as paredes celulares (Figura 8), aumentando o contato entre o solvente e os lipídios intracelulares. Existem dois tipos de equipamentos ultrassônicos que podem ser utilizados para auxiliar a extração da fração lipídica de microalgas: as sondas e os banhos (ABDEL GHALY, 2015; DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019).

Figura 8 – Microfotografias de células de microalgas antes e depois do tratamento com ultrassom.



Fonte: Keris-Sem et al. (2014).

A tecnologia ultrassônica do tipo sonda usa um gerador piezoelétrico que é composto por cristais de titanato zirconato de chumbo que vibram com amplitude variando de 10 a 15 μm . As vibrações formadas viajam pela sonda de titânio, aumentando em amplitude de 100 μm a 150 μm na ponta. O uso de sonicadores deste tipo é limitado a escala de laboratório com volumes variando de 10 a 100 mL (MINOLETTI; HERMOSO; GRESSIER, 2009).

Os banhos ultrassônicos utilizam transdutores para gerar as ondas ultrassônicas que são colocados na parte inferior de uma cuba metálica. O número e a disposição dos transdutores variam com a capacidade do banho e a sua forma. Os banhos ultrassônicos têm uma capacidade maior de trabalho (até 3 L) do que as sondas, mas seu tamanho é limitado pela rápida taxa de dissipação da energia sônica com a distância (ABDEL GHALY, 2015).

Os principais fatores que influenciam a eficiência da extração de lipídios de microalgas assistida por ultrassom são: o tempo de pré-tratamento, a temperatura da extração, a razão entre a quantidade de solvente/biomassa e a cepa de microalga estudada. A Tabela 2 apresenta estudos de extração de lipídios realizados com cepas *Scenedesmus* sp. com e sem o auxílio da tecnologia de ultrassom.

A utilização do ultrassom para auxiliar a extração da fração lipídica da biomassa de microalgas tem diversas vantagens, que incluem: tempo de extração reduzido, menor quantidade necessária de solvente e maiores eficiências, como resultado da penetração celular e liberação mais fácil dos componentes intracelulares para o meio contendo solvente. No entanto, as técnicas assistidas por ultrassom possuem desvantagens como alto consumo energético e dificuldades de aumento de escala (ABDEL GHALY, 2015; SATI et al., 2019).

Tabela 2 – Comparação entre estudos de extração de lipídios com microalgas *Scenedesmus* sp. com e sem o auxílio da tecnologia de ultrassom.

Método de Extração	Solvente(s)	Eficiência (% de biomassa seca)	Referências
Bligh and Dyer Solvente:Biomassa 29:1 (v/m)	Cl:Met:Água (1:1:0.9 v/v)	12.8 ± 0.7	(SHIN et al., 2014)
Extração por 1 h à temp. amb. Solvente:Biomassa 20:1 (v/m)	n-hexano	2.4 ± 0.7	
Pré-tratamento com ultrassom (24 kHz) por 5 min / Extração por 6h à temp. amb. com agitação / Solvente:Biomassa 100:1 (v/m)	n-hexano	20 – 40	(SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017)
Bligh and Dyer modificado	Cl:Met:Sol Sal (3:1:1.2 v/v)	≈ 2	(RANJAN; PATIL; MOHOLKAR, 2010)
Extração assistida por ultrassom (20 kHz) por 30 min à temp. amb. / / Solvente:Biomassa 10:1 (v/m)	Cl:Met:Sol Sal (3:1:1.2 v/v)	≈ 6	
	n-hexano	≈ 1	
Bligh and Dyer modificado Solvente:Biomassa 1:1 (v/m)	Cl:Met (1:1 v/v)	≈ 2.4	(LEE et al., 2010)
Pré-tratamento com ultrassom (10 kHz) por 5 min / Extração por 5 min à temp. amb. / Solvente:Biomassa 1:1 (v/m)	Cl:Met (1:1 v/v)	≈ 7.25	
Bligh and Dyer Solvente:Biomassa 50 ml:25 mg	Cl:Met:Água (1:1:0.5 v/v)	52.8	(KERIS-SEN et al., 2014)
Extração assistida por ultrassom (30 kHz) por 1h à temp. amb. / Solvente:Biomassa 50 ml:25 mg	Cl:Met (1:1 v/v)	26.8	
	n-hexano	17.6	
Extração por 24h em um reator de batelada à temp. amb. com agitação a 400 rpm / Solvente:Biomassa 50:1 (v/m)	Cl:Met (2:1 v/v) n-hexano (95%) Etanol (70%)	15 2.1 11.1	(CHO et al., 2012)
Duas bateladas de extração assistida por ultrassom (15 kHz) por 2 min à temp. amb. / Solvente:Biomassa 10:1 (v/m)	Cl:Et (1:1 v/v)	19.85 ± 0.35	(GULDHE et al., 2014a)
Extração assistida por ultrassom (20 kHz) por 15 min à temp. amb./ Solvente:Biomassa 6:1 (v/m)	Cl:Met (1:1 v/v) n-hexano Etanol	6.8 5 7.6	(BASILY et al., 2018)

Cl – Clorofórmio; Met – Metanol; Sol Sal – Solução Salina; Et – Etanol.

2.2.5 Mercado e Produtos

O mercado global de produtos a partir de microalgas foi avaliado em 32,6 bilhões de dólares em 2017 e estima-se que ele possa crescer até 53,43 bilhões em 2026. Os principais produtos atualmente sendo comercializados ou em consideração para extração comercial incluem nutrição humana, ração animal e aquática, ficobilinas, β -caroteno, polissacarídeos, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, esteróis e moléculas biologicamente ativas para drogas antimicrobianas, antivirais, antibacterianas e anticâncer. No entanto, é provável que itens novos sejam produzidos na próxima década devido a quantidade de pesquisas na área. Esses biocompostos são usados principalmente nos setores farmacêutico, nutracêutico e de cosméticos (ALAM; XU; WANG, 2020).

Macroalgas, comumente conhecidas apenas como algas, têm sido usadas para alimentação humana há milhares de anos. As algas marinhas são cultivadas comercialmente em águas costeiras em mais de 30 países, tanto para alimentação quanto para produção de polissacarídeos usados como espessantes (ágares, carragena, alginatos) (CHISTI, 2018). Além das algas marinhas, a microalga *Arthrospira* (*Spirulina*) tem uma história de sucesso como matéria-prima para produtos alimentícios (Figura 9).

Figura 9 – Produtos alimentícios contendo *Spirulina*: suplemento alimentar (A); wraps (B); suspensão para uso em bebidas (C); smoothie de frutas (D); iogurte (E); chips (F).



Fonte: Jacob-Lopes et al. (2020).

A produção comercial de *Spirulina* e seus aspectos nutricionais estão bem documentados na literatura. Sua produção de biomassa seca é estimada em cerca de 2.000 toneladas secas (CHISTI, 2018). Além dos produtos alimentícios, muitos produtos cosméticos baseados em extratos de algas marinhas e microalgas também são comercializados (Figura 10).

Figura 10 – Produtos cosméticos à base de algas e/ou microalgas.

Fonte: Jacob-Lopes et al. (2020).

As microalgas *Scenedesmus* sp. não são tão comercialmente exploradas como a *Spirulina*, porém alguns produtos podem ser encontrados em sites de e-commerce (Amazon). Dentre eles pode-se citar uma máscara de beleza facial com óleo de uma microalga *Scenedesmus* encontrada no Saara (Figura 11 A), um creme antirrugas com extrato de *Scenedesmus* (Figura 11 B) e um conjunto de biomassa de *Scenedesmus* sp. em formato de pérolas utilizado para fins educativos (Figura 11 C).

Figura 11 – Produtos contendo microalgas *Scenedesmus*: máscara fácil (A); creme antirrugas (B); biomassa em formato de pérolas (C).

Fonte: Site de e-commerce da Amazon. Acesso em 9 mar. 2021.

Disponível em: https://www.amazon.com/s?k=scenedesmus&ref=nb_sb_noss

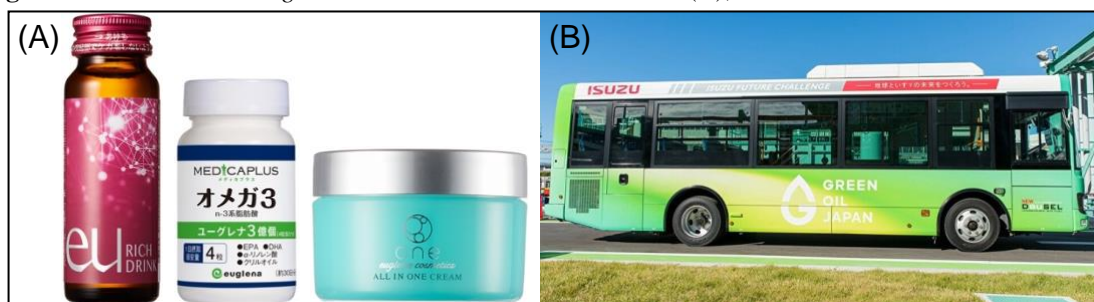
2.2.5.1 Óleo de Microalga

O óleo de microalgas tem um potencial imenso como fonte alternativa de bioenergia, por ser produzido pela conversão da energia solar em lipídio pela fixação de CO₂ e, em seguida, convertido em biodiesel por meio da transesterificação. No entanto, a comercialização em larga escala de biodiesel de microalgas ainda está longe da realidade, devido a vários fatores, principalmente o alto custo total de produção (KLEIN et al., 2019; RAJESH BANU et al., 2020). Um estudo estima que o custo do biodiesel a partir desta biomassa custa entre 2 e 7 dólares por litro (KANG et al., 2015) enquanto análises econômicas sugerem que esta tecnologia só será possível e economicamente viável em larga escala se o custo diminuir para

1 dólar por litro (KHAN; SHIN; KIM, 2018). Muitos esforços para reduzir o custo do biodiesel de microalgas vem sendo feitos, incluindo a melhoria genética de cepas (KORKHOVOY; TSARENKO; BLUME, 2016), utilização de efluentes como meio de cultivo (FERREIRA et al., 2019b), desenvolvimento de processos mais eficientes (ABOMOHRRA et al., 2021), entre outros.

As restrições e desafios de desenvolver óleos de microalga apenas para biodiesel fizeram com que muitas empresas, especialmente *star-ups*, ampliassem seu foco para a produção de produtos de alto valor. Um exemplo de sucesso que merece ser citado é o da empresa *Euglena co.* no Japão. Incentivos do governo (Projeto Green Oil Japan) juntamente com a produção de uma ampla variedade de produtos (nutracêuticos e cosméticos) viabilizaram a produção de biodiesel a partir de microalgas (Figura 12). Ônibus já circulam no país utilizando este biocombustível. A empresa está em constante expansão e atualmente trabalha no desenvolvimento de fertilizantes e bioplásticos (EUGLENA, 2020).

Figura 12 – Produtos da *Euglena co.*: nutracêuticos e cosméticos (A); biodiesel utilizado em um ônibus (B).



Fonte: Site da empresa *Euglena co.*. Acesso em 9 mar. 2021.

Disponível em: <https://www.euglena.jp/whatiseuglena/>

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) das famílias ômega 3 e 6 se destacam dentre os produtos de interesse provenientes do óleo de microalga. Principalmente porque a maior fonte desses ácidos graxos atualmente, o óleo de peixe, vem apresentando disponibilidade limitada, alto custo e potencial de bioacumulação de poluentes tóxicos, além de não serem adequados para dietas vegetarianas/vegas (CARVALHO et al., 2020). Atualmente, existem mais de 100 produtores comerciais de AGPIs de óleo de microalga globalmente, dos quais a maioria está localizada nos Estados Unidos, China (incluindo Taiwan) e Índia (Sathasivam et al., 2019). Outros lipídios funcionais vêm sendo produzidos a partir de AGPIs de microalgas. A empresa *Solutex* desenvolveu um método para produção de monoacilgliceróis ricos em DHA de microalgas, desenvolvendo assim um emulsificante/estabilizante que consegue promover benefícios para a saúde (SOLUTEX, 2021).

2.3 LIPÍDIOS FUNCIONAIS E ROTAS DE PRODUÇÃO

Os lipídios funcionais podem ser amplamente descritos como lipídios que fornecem benefícios específicos à saúde quando consumidos e/ou que alteram uma funcionalidade física ou química específica de um produto alimentício. Outros termos que podem ser usados para descrever lipídios funcionais são lipídios nutricionais e lipídios médicos/farmacêuticos (AKOH, 2005). Exemplos de lipídios funcionais que proporcionam benefícios a saúde incluem lipídios contendo os ácidos graxos ômega 3, ômega 6 e ácidos linoleicos conjugados, fitoesteróis, carotenoides e alguns fosfo e glicolipídios (ALABDULKARIM; BAKEET; ARZOO, 2012; KATIYAR; ARORA, 2020). Com relação aos lipídios funcionais utilizados na indústria alimentícia, a categoria de emulsificantes se destaca pela sua aplicação em uma variedade de produtos. Dentre eles, os mais utilizados são: mono e diacilgliceróis, lecitina (fosfolipídio), monoésteres de propilenoglicol, polissorbatos, ésteres com ácidos acético, cítrico, e láctico, ésteres de poliglicerol e ésteres de sacarose (RAJAH, 2014).

Existem diversas rotas para modificação de lipídios e produção de lipídios funcionais. A utilização de catalisadores se faz necessária pois esta aplicação proporciona um caminho de reação energeticamente favorável e isso implica numa redução no tamanho do reator e uma maior taxa de reação. Além disso, um catalisador aumenta a seletividade para os produtos desejados e reduz a produção de subprodutos (MAMTANI; SHAHBAZ; FARID, 2020). Existem dois grupos de catalisadores que podem ser aplicados na modificação de lipídios: os catalisadores químicos, que são classificados em homogêneos (em solução) ou heterogêneos (sólidos), e os catalisadores biológicos, que compreendem as enzimas (lipases).

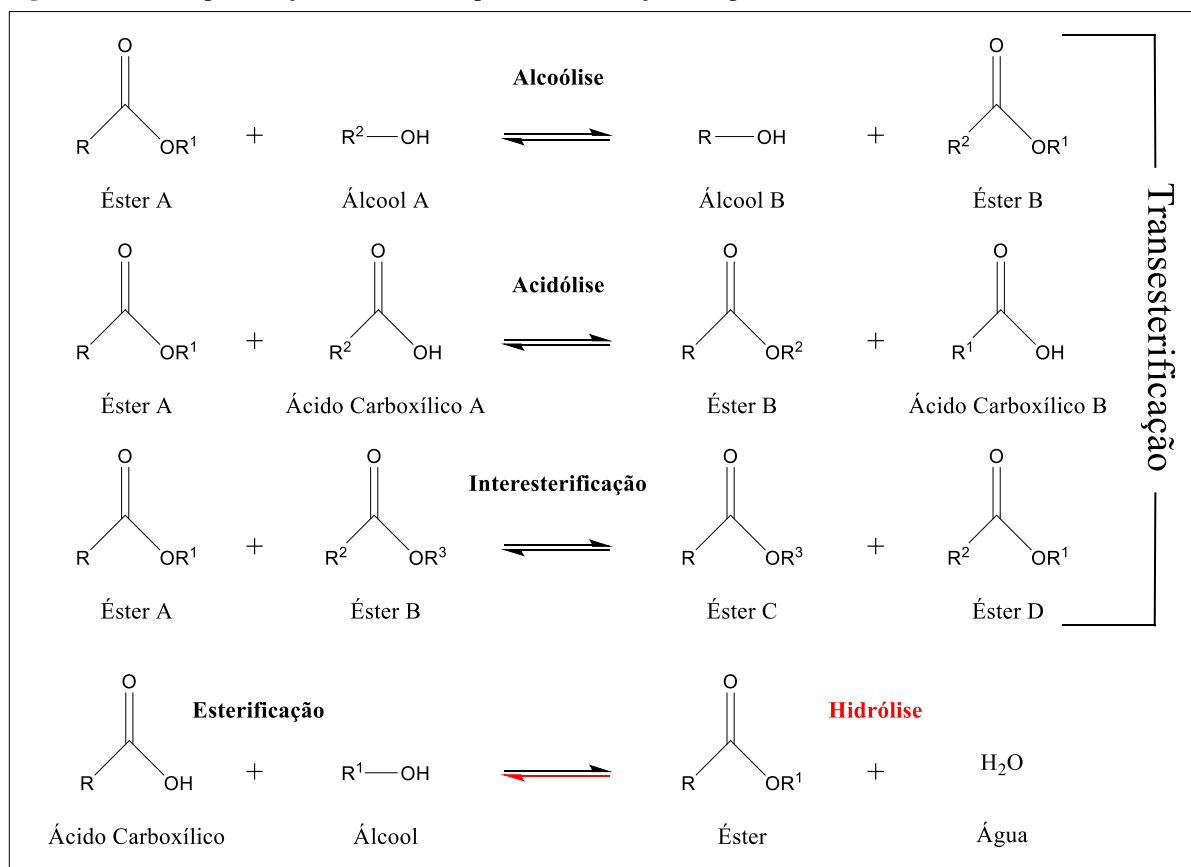
A modificação de lipídios por catálise enzimática é um processo consideravelmente novo em comparação com a alteração química de gorduras e óleos. A crescente quantidade de pesquisas sobre biotransformação de lipídios permitiu um aumento no conhecimento sobre a ação das lipases, embora a aplicação dessa tecnologia ainda seja industrialmente limitada. Em comparação com os métodos químicos, a modificação enzimática de lipídios apresenta algumas vantagens. A seletividade das enzimas torna a modificação simples e direta enquanto as condições da reação são mais amenas, não só com relação a temperatura mas também a pressão e pH (BAEZA-JIMÉNEZ; LÓPEZ-MARTÍNEZ; GARCÍA, 2014).

As lipases são classificadas como hidrolases, sendo denominadas como hidrolases de ésteres de glicerol (E.C. 3.1.1.3), e os microrganismos produtores mais estudados incluem as bactérias e fungos (BORNSCHEUER, 2000). Estes biocatalisadores consistem em cadeias polipeptídicas contendo 199 a 641 resíduos de aminoácidos e, em geral, sua funcionalidade

depende de uma mudança conformacional que permite o acesso do substrato até o sítio ativo. As lipases são classificadas em diferentes grupos de acordo com a sua especificidade de substrato: lipases aleatórias ou não específicas; lipases regioespecíficas; lipases estereoespecíficas; lipases específicas de ácidos graxos (FELTES et al., 2013).

As principais reações enzimáticas para a modificação de lipídios incluem a transesterificação, a esterificação e a hidrólise (BAEZA-JIMÉNEZ et al., 2013). O termo transesterificação se refere a um importante grupo de reações orgânicas que promovem a transformação de um éster em outro através da troca do radical alcoila (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998). De acordo com o tipo do composto que realiza esta troca com o éster, tem-se os seguintes tipos de transesterificação: alcoólise (reação com um álcool), acidólise (reação com um ácido carboxílico) e interesterificação (reação com outro éster). A esterificação consiste na produção de um éster (e água) a partir da reação entre um ácido carboxílico e um álcool. Já a hidrólise, representa a reação oposta da esterificação (BAEZA-JIMÉNEZ; LÓPEZ-MARTÍNEZ; GARCÍA, 2014; BORNSCHEUER, 2000). A Figura 13 apresenta um esquema dessas reações.

Figura 13 – Principais reações enzimáticas para a modificação de lipídios.



Fonte: Autor.

2.3.1 MAGs e DAGs

Os mono e diacilgliceróis pertencem a classe dos surfactantes não iônicos devido às suas estruturas e são extensivamente utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Esta ampla aplicação é decorrente da ausência de efeitos adversos à saúde humana quando MAGs e DAGs são consumidos na dieta ou entram em contato com a pele, ao contrário do que ocorre com a aplicação de agentes tensoativos iônicos (FELTES et al., 2013). Eles representam cerca de 70% de toda produção global de emulsificantes para fins alimentícios e podem ser usados em diversos produtos para consumo humano pois possuem o certificado de segurança GRAS (*Generally Recognized as Safe*) fornecido pela agência FDA (*Food and Drug Administration*) (RAJAH, 2014).

Os MAGs são amplamente adicionados em margarinas, produtos lácteos, de panificação e de confeitaria, pois suas propriedades emulsificantes, estabilizantes e condicionantes melhoram as propriedades organolépticas destes alimentos. Por exemplo, ao incorporar MAGs em produtos de panificação obtém-se um aumento no volume e melhora da estrutura do miolo, evitando o endurecimento e prolongando o prazo de validade (MELTON; SHAHIDI; VARELIS, 2019).

Estes emulsionantes também podem ser aplicados em molhos pois atuam para impedir a separação das fases da água e do óleo, melhorando assim a aparência e o prazo de validade do produto. Além disso, podem ser utilizados como clarificantes de bebidas para ajudar na dispersão, estabilizantes em sorvetes para melhora da textura e condicionantes para obtenção de massas de macarrão mais firmes e soltas (FELTES et al., 2013).

Na indústria de fármacos, os monoacilgliceróis são empregados no desenvolvimento de novas formas de dosagem farmacêutica através da criação de emulsões, micro emulsões e géis com diferentes propriedades relacionadas a liberação do componente ativo (PRAJAPATI; DALRYMPLE; SERAJUDDIN, 2012). Também são utilizados como emolientes na produção de emplastos (preparações terapêuticas adesivas) para promover uma liberação lenta e prolongada do medicamento (RAROKAR et al., 2017). Na produção de cosméticos, os MAGs são adicionados em cremes e loções para melhorar a consistência e textura (KAEWTHONG et al., 2005).

Em relação aos benefícios para saúde humana, os MAGs de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), como o ácido eicosapentaenóico (EPA – 20:5) e o ácido docosa-hexanóico (DHA–22:6), são considerados de alto valor nutricional, apresentam propriedades cardioprotetoras e reduzem inflamações, pois interferem na produção de mediadores

inflamatórios (CRUZ-HERNANDEZ et al., 2016). Outras propriedades foram identificadas em monoacilgliceróis específicos como a atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral presente na monolaurina e a atividade antioxidante da monooleína (NITBANI et al., 2015).

Os diacilgliceróis também são extensamente utilizados como emulsificantes na indústria alimentícia e este setor representa sua principal aplicação. Eles são aplicados principalmente em conjunto com os MAGs para auxiliar na estabilidade da emulsão e reduzir custos, já que possuem um menor valor de mercado (MELTON; SHAHIDI; VARELIS, 2019).

Embora existam pesquisas conflitantes sobre o consumo destes acilgliceróis e os benefícios relacionados à saúde, principalmente devido às diferenças nos níveis de DAGs consumidos e à condição dos indivíduos testados, considera-se de um modo geral que a incorporação/consumo de DAGs no lugar de TAGs é benéfico (PHUAH et al., 2015).

Ao contrário dos TAGs, os DAGs atuam no combate dos altos níveis de colesterol e triglicerídeos, prevenindo a obesidade através da redução do acúmulo de gordura no corpo. Dessa forma, estes acilgliceróis são favoráveis na prevenção de doenças relacionadas a esses fatores de risco, como doenças coronarianas, hipertensão arterial, diabetes mellitus e alguns tipos de câncer (FELTES et al., 2013).

O valor energético e a digestibilidade do óleo constituído por DAGs demonstraram ser similares aos do óleo tradicional contendo TAGs. Entretanto, acredita-se que as diferentes vias metabólicas dos DAGs proporcionam os efeitos positivos à saúde e que os isômeros sn-1,3, mais comercializados devido a maior estabilidade, são os responsáveis pelos benefícios apresentados (MELTON; SHAHIDI; VARELIS, 2019).

Alimentos como muffins, bolachas, sopas, biscoitos e barras de cereais foram produzidos a partir de óleos com maior teor de DAGs e administrados a pacientes com sobrepeso e obesidade. Os resultados indicaram que esta mudança na dieta foi capaz de promover redução no peso e na gordura corporal (MAKI et al., 2002). Os diacilgliceróis também podem ser aplicado em emulsões óleo/água (maioneses e molhos de salada), emulsões água/óleo (margarinas, pastas, recheios cremosos de confeitaria), produtos fritos, coberturas e sorvetes (FELTES et al., 2013).

Os monoacilgliceróis e diacilgliceróis estão presentes naturalmente nos óleos e gorduras em frações extremamente baixas, geralmente menores que 1% e 10%, respectivamente. Estas frações são muito inferiores em comparação com os triacilgliceróis, como apresentado na Tabela 3 que mostra a composição de alguns óleos comestíveis. Dessa forma, os MAGs e DAGs precisam ser sintetizados para utilização nos diversos processos onde são aplicados.

Tabela 3 – Frações percentuais de MAGs, DAGs e TAGs presentes naturalmente nos óleos comestíveis.

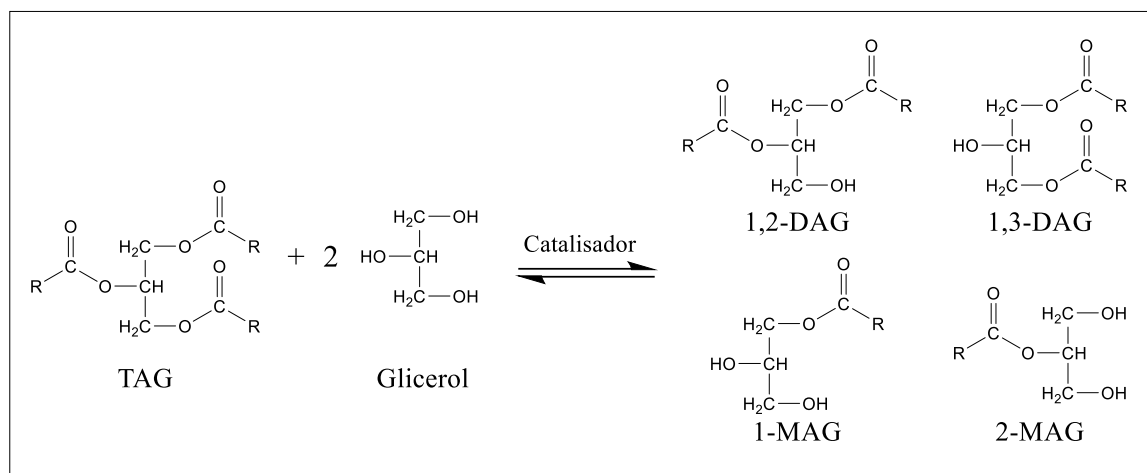
Óleos	Monoacilgliceróis	Diacilgliceróis	Triacilgliceróis	Outros
Soja	-	1,0	97,9	1,1
Algodão	0,2	9,5	87,0	3,0
Palma	-	5,8	93,1	1,1
Milho	-	2,8	95,8	1,4
Cártamo	-	2,1	96,0	1,9
Azeite	0,2	5,5	93,3	1,0
Canola	0,1	0,8	96,8	2,3

Adaptado de Takase (2007).

A primeira síntese destes acilgliceróis ocorreu em 1853 pelo cientista francês Marcellin Berthelot, mas apenas na década de 1930 houve um grande avanço na produção comercial quando a indústria de margarina iniciou a aplicação destes compostos em larga escala (WHITEHURST, 2004). Os principais métodos de produção de MAGs e DAGs são pela hidrólise parcial de TAGs, esterificação direta dos ácidos graxos no glicerol ou alcoólise de TAGs com glicerol (glicerólise). Em todos estes casos, catalisadores químicos homogêneos são geralmente utilizados em processos comerciais (GUNSTONE, 1999; SUBROTO, 2020).

2.3.1.1 *Glicerólise*

Dentre os possíveis métodos de se obter MAGs, a glicerólise é a reação que possui o maior rendimento teórico, uma vez que cada mol de TAG usado como substrato pode produzir 3 mols de MAG na presença de excesso de glicerol. Contudo, o rendimento real da reação não proporciona apenas a formação de MAGs e o resultado consiste em uma mistura de acilgliceróis (MAGs, DAGs, TAGs que não reagiram) juntamente com o excesso de glicerol. Quando não há excesso de glicerol no meio, a reação é direcionada para a maior obtenção de DAGs na mistura (BORNSCHEUER, 1995). A Figura 14 representa a reação de glicerólise e os possíveis isômeros de MAGs e DAGs que são formados.

Figura 14 – Representação geral da reação de glicerólise com os isômeros de MAGs e DAGs produzidos.

Fonte: Elaborado pelo autor. Baseado em Bornscheuer, 1995.

O método mais convencional utilizado pelas indústrias para produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis consiste na glicerólise dos triacilgliceróis em altas temperaturas (200 – 250 °C) sob catálise alcalina (KOH, NaOH ou Ca(OH)₂), preferencialmente em uma atmosfera inerte. A glicerólise comercial pode se desenvolver em processo descontínuo, com bateladas durando entre 1 e 4 horas, ou em processo contínuo, onde o tempo de reação pode ser inferior à meia hora. Geralmente, ela fornece uma distribuição de MAGs, DAGs e TAGs de 45 a 55%, 38 a 45% e 8 a 12%, respectivamente, apresentando também traços de glicerol livre em torno de 1 a 7% (DAMSTRUP et al., 2005; PALACIOS et al., 2019).

As principais vantagens da síntese química convencional estão relacionadas com o curto tempo de reação e o custo atrelado a obtenção dos catalisadores. É mais rentável realizar a glicerólise aplicando uma catálise básica homogênea, pois o custo de catalisadores alternativos é mais elevado (MELTON; SHAHIDI; VARELIS, 2019). Todavia, este tipo de produção também apresenta desvantagens decorrentes da aplicação de temperaturas relativamente altas, como o alto consumo energético e o favorecimento de reações indesejáveis. Os subprodutos destas reações geralmente possuem cor escura e sabor amargo, resultando em um produto final com menor teor de monoglicerídeos e uma baixa qualidade (FREGOLENTE et al., 2008; WEE et al., 2013).

Dessa forma, os MAGs produzidos pela glicerólise usual que são destinados para aplicações de alta eficiência precisam ser separados da mistura e purificados, aumentando a complexidade e os custos da produção. A destilação molecular é um dos processos que se destaca na purificação de MAGs, pois permite alcançar uma elevada qualidade do produto (WHITEHURST, 2004).

Pesquisas vêm sendo realizadas para desenvolver e testar catalisadores alternativos que forneçam um produto de alta qualidade sem necessitar a aplicação de processos de alto custo para purificação. Os catalisadores heterogêneos como os heteropoliácidos do tipo Keggin e óxidos metálicos (MgO e ZnO) impregnados em materiais de suporte (peneiras moleculares, carvão ativado e zeólitas) são objetos de pesquisa para viabilizar uma produção de MAGs mais eficiente. As vantagens destes catalisadores estão na maior área de superfície, alta seletividade de monoglicerídeos e maior facilidade na separação/purificação. No entanto, estes catalisadores necessitam de um maior tempo de reação em relação aos catalisadores básicos (MELTON; SHAHIDI; VARELIS, 2019).

A aplicação de biocatalisadores também é estudada para otimizar a catálise da glicerólise devido às vantagens apresentadas pelas enzimas lipases, porém o alto custo destes biocatalisadores e as menores taxas de reação podem dificultar a viabilidade de projetos em grande escala. No entanto, o menor custo energético e a melhora na qualidade do produto, em virtude da mínima degradação e formação de subprodutos, podem compensar as desvantagens, dependendo do tipo de aplicação. Portanto, o uso de enzimas representa uma alternativa cada vez mais viável para produção de MAGs e DAGs, especialmente devido à pressão global nos últimos anos por rotas alternativas ambientalmente mais corretas, tornando-as uma opção atraente para substituir os catalisadores químicos (BORNSCHEUER, 2000; WANG et al., 2018).

Nas últimas décadas, a síntese enzimática de DAGs e MAGs tem recebido crescente atenção. Nestes processos, é recorrente o teste de algumas razões de solvente:óleo utilizadas para melhorar a miscibilidade da mistura glicerol/óleo/lipases. No entanto, este uso pode interferir nas moléculas da enzima e trazer etapas de separação adicionais, incentivando o desenvolvimento de processos livres de solvente. A água presente na enzima também possui um papel importante na atividade catalítica e pode ser influenciada pela solubilidade da água no meio reacional, uma vez que a catálise lipolítica ocorre na interface óleo/água (FREGOLENTE et al., 2008). Outros parâmetros importantes no processo são: seleção e concentração da enzima, temperatura, pH e razão glicerol:óleo. O Quadro 1 apresenta uma revisão da literatura sobre os resultados obtidos através da glicerólise enzimática de diversos óleos para produção de MAGs e DAGs. As enzimas mais utilizadas são as produzidas pelas espécies de fungos *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica*, sendo esta última muito citada devido aos melhores resultados em comparação com outras enzimas (HE et al., 2016).

Pesquisas recentes vêm avaliando a utilização de óleos alternativos como substrato para essa produção. Dentre eles, deve-se destacar o óleo de espécies de microalgas graças ao alto

teor de TAGs e ácidos graxos poli-insaturados, juntamente com os benefícios atrelados à produção desta biomassa, como a biofixação do dióxido de carbono (HE et al., 2016; HE et al., 2019). Entretanto, as pesquisas utilizando o óleo de microalgas para esta finalidade ainda são muito escassas e necessitam de maior investigação.

Wang et al. (2018) avaliaram a utilização do óleo da microalga *Schizochytrium* sp. na produção de DAGs altamente puros, ricos em ácido docosapentaenóico (C22:5), através da glicerólise enzimática aplicando quatro enzimas comerciais (Novozym[®] 435, Lipozyme[®] 435, Lipozyme[®] TL IM e Lipozyme[®] RM IM). Os autores concluíram que as condições ótimas de produção (48,4%) foram obtidas com a enzima Lipozyme[®] 435 num sistema com temperatura igual a 50 °C, tempo de reação de 8h, razão glicerol:óleo igual 2:1 e razão terc-butanol:óleo igual a 0,8:1. Os resultados foram considerados mais eficientes em comparação com a produção de DAGs ricos em ácido docosapentaenóico produzidos a partir de outros tipos de óleo.

Quadro 1 – Revisão da literatura sobre a reação de glicerólise utilizando enzimas visando a produção de MAGs e/ou DAGs.

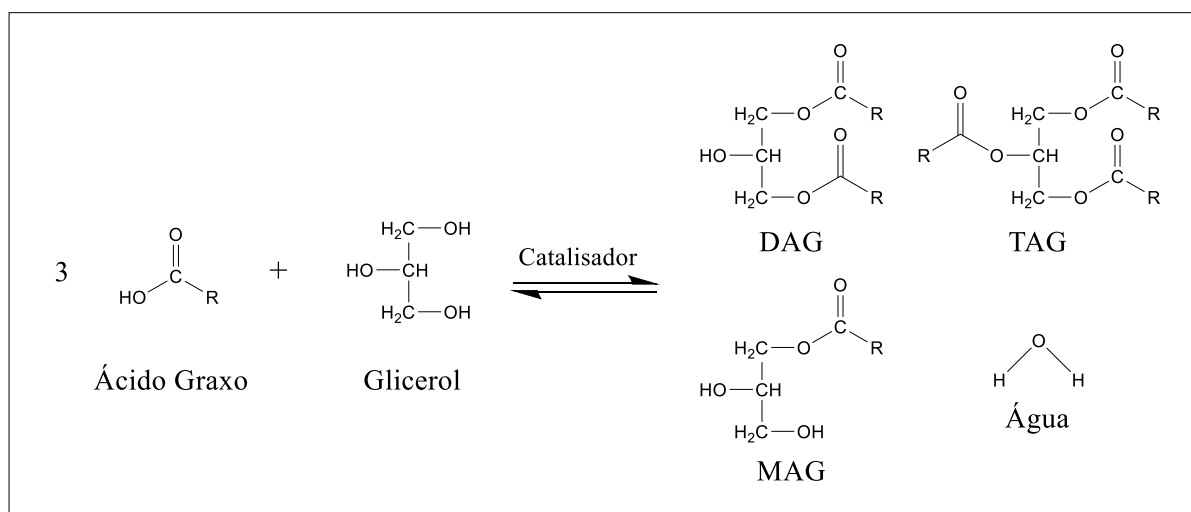
Reagente	Enzima	Sistema e Parâmetros de Reação	Resultados e Métodos Analíticos	Ref.
Óleo de rícino	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina (Novozyme 435)	Frascos de vidro com três bocas (100 mL) sob agitação magnética em um banho de óleo, razão glicerol:óleo 6:1, enzima 5%, 90 °C, 300 rpm, 3 h, sem solvente.	Conversão ≈ 92.5% Rendimento ≈ 38% DAG, 54.5% MAG GC-FID	(SUN; WANG; WANG, 2018)
Banha de porco derretida	<i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada (Lipozyme RMIM)	Pré-tratamento com ultrassom (250 W a 45 °C por 5 min), tubos de centrífuga incubados em banho-maria com agitação, razão glicerol:óleo 1:1, enzima 4% em peso, 50 °C, 180 rpm, 4 h, sem solvente.	Conversão ≈ 76.7% Rendimento ≈ 46.9% DAG HPLC-RID	(ZHAO et al., 2018)
Óleo de oliva	<i>Candida rugose</i> imobilizada em óxido de grafeno (rGBO ₄)	Tubos (50 mL), razão glicerol:óleo 4,5:1, enzima 15% em peso, 40 °C, 6 h, razão misturas de solventes (terc-butanol / álcool isopropílico 5:4):óleo 4:1 (m/m), 10 % em massa de solução salina tamponada com fosfato (com base no glicerol).	Conversão ≈ 74.9% Rendimento ≈ 22% DAG, 52% MAG HPLC-RID	(CHEN et al., 2020)
	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina (Novozyme 435)	Balão encamisado (40 mL) com termostato e agitação mecânica, razão glicerol:óleo 6:1, enzima 10% em peso, 55 °C, 600 rpm, 12 h, razão solvente terc-butanol:óleo 1:1 (v/v). Balão encamisado (40 mL) com termostato e agitação mecânica, razão glicerol:óleo 6:1, enzima 9% em peso, 70 °C, 600 rpm, 2 h, sem solvente, surfactante Tween 65 16% em peso.	Conversão ≈ 85% Rendimento ≈ 20% DAG, 60% MAG GC-FID Conversão ≈ 63.21% Rendimento ≈ 43.17% DAG + MAG HPLC-RID	(VOLL et al., 2011) (VALÉRIO et al., 2010)
Óleo de fígado de peixe (quimera)	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina (Novozyme 435)	Sistema de reator kiloclave (1 L) com termostato e agitação mecânica, razão glicerol:óleo 1:1, enzima 9,4% em peso, 40 °C, 200 rpm, 48 h, solvente ciclopentanona 67% em peso.	Conversão ≈ 98.4% TAG, 75.2% DAGE Rendimento ≈ 44.2% MAGE + DAG, 32.1% MAG LC-ELSD	(CORZO-MARTÍNEZ et al., 2016)
Óleo de sardinha	<i>Candida antarctica</i> B imobilizada (Lipozyme 435)	Reator em batelada encamisado (1 L) com agitação mecânica, razão glicerol:óleo 1:3, enzima 5%, 50 °C, 200 rpm, 2h, razão solvente terc-butanol:substratos 1,5:1 em peso.	Conversão ≈ 89.6% Rendimento ≈ 17.4% DAG, 67% MAG NP-HPLC	(SOLAESA et al., 2016a)
		Vials em banho-maria com agitação orbital, razão glicerol:óleo 3:1, enzima 10% em peso, 50 °C, 170 rpm, 8 h, solvente terc-butanol 68% em peso.	Conversão ≈ 94.1% Rendimento ≈ 6.9% DAG, 83.3% MAG NP-HPLC	(SOLAESA et al., 2016b)
Óleo de microalga (<i>Schizochytrium</i> sp.)	<i>Candida antarctica</i> B imobilizada (Lipozyme 435)	Balão de fundo redondo com refluxo de condensação, agitação magnética e temperatura controlada, razão glicerol:óleo 2:1, enzima 10% em peso, 50 °C, 500 rpm, 8 h, razão solvente terc-butanol: óleo 4:5.	Conversão ≈ 85.2% Rendimento ≈ 48.4% DAG, 36.3% MAG HPLC-ELSD	(WANG et al., 2018)
Óleo de soja	<i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em sílica (SBA-15)	Mistura de reação em um banho de óleo com agitação magnética, razão glicerol:óleo 1:2, enzima 5,7% em peso, 60 °C, 200 rpm, 24 h, sem solvente.	Conversão ≈ 83% Rendimento ≈ 59% DAG, 24% MAG RP-HPLC	(ZHONG et al., 2019a)
	<i>Candida antarctica</i> B imobilizada (Novozyme 435)	Frascos cônicos (100 mL) em banho-maria com agitação, razão glicerol:óleo 1:6,23, enzima 1% em peso, 50 °C, 200 rpm, 24 h, solvente terc-butanol 60% (v / m).	Conversão ≈ 95.24% Rendimento ≈ 47.63% DAG, 47.61% MAG HPLC-RID	(WANG et al., 2011)

Fonte: Artigo em processo de publicação. Source: From Ferreira G. F., Pessoa, J. G. B., Ríos Pinto, L. F., Maciel Filho, R., Fregolente, L. V. Mono- and diglycerides production from microalgae: Challenges and perspectives towards high-value emulsifiers. Trends in Food Science and Technology (Manuscript submitted, under review. The content of the present version may change after revisions). Copyright notice: The content of this manuscript is licensed under the Ethical Guidelines to Publication of Elsevier B. V. p. Please contact credited rights holders directly for permission to reproduce material.

2.3.1.2 Esterificação

A produção de MAGs e DAGs através da esterificação direta do glicerol (Figura 15) representa uma rota de maior custo, uma vez que os ácidos graxos utilizados no processo têm um valor mais elevado do que os óleos e/ou gorduras (TAGs), matérias-primas do processo de glicerólise. Além disso, uma quantidade maior de glicerol juntamente com uma temperatura mais elevada usualmente são necessárias para realização da esterificação direta, devido à baixa solubilidade dos ácidos graxos no meio, elevando ainda mais os custos do processo (LO et al., 2008). Entretanto, esta rota é considerada promissora para casos em que o óleo trabalhado apresenta um elevado nível de ácidos graxos livres em sua composição e muitas vezes é utilizada como pré-tratamento para estes óleos antes da transesterificação para produzir biodiesel. Alguns autores classificam a esterificação direta usando glicerol como um processo de glicerólise, dividindo esta reação em duas classes: a glicerólise de TAGs (glicerólise tradicional) e a glicerólise de ácidos graxos livres (esterificação) (MAMTANI; SHAHBAZ; FARID, 2020).

Figura 15 – Representação da esterificação entre ácidos graxos e glicerol com os respectivos produtos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os principais fatores que podem influenciar no rendimento da esterificação são: temperatura, tipo de reator, razão glicerol:ácidos graxos, solvente, agitação, pureza do glicerol e tipo de catalisador. Dentre os catalisadores químicos utilizados neste tipo de reação se destacam o ácido sulfúrico e o hidróxido de sódio (homogêneos); óxido de magnésio, óxido de zinco e sílica SBA-15 sulfatada (heterogêneos) (MAMTANI; SHAHBAZ; FARID, 2020). Em relação ao uso de biocatalisadores, as lipases também são avaliadas para promover a esterificação de ácidos graxos livres com o glicerol devido as vantagens produzidas por esses

biocatalisadores como mencionado anteriormente. O Quadro 2 apresenta uma revisão da literatura sobre a esterificação de diversos ácidos graxos catalisada por diferentes lipases.

A utilização do óleo de microalga para esta reação é pouca investigada e trabalhos relatando os resultados obtidos neste tipo de aplicação são muito escassos. Medina et al. (1999) avaliaram a esterificação do óleo de microalga (*Porphyridium cruentum*) com o glicerol, utilizando a enzima Novozyme[®] 435. O objetivo do trabalho era a produção de TAGs ricos em PUFAs porém a formação de MAGs e DAGs também foi reportada. A produção de MAGs foi insignificante, atingindo no máximo 1,7% do meio reacional, enquanto a síntese de DAGs atingiu 17,3%, ambos resultados coletados com 48h de reação. Apesar dos valores menores em comparação com outros estudos para produção de MAGs e DAGs, deve-se levar em conta que o objetivo do estudo era outro e a reação foi otimizada para a produção de TAGs. Portanto, pode-se concluir que o óleo de microalga é uma matéria-prima em potencial que necessita ser mais explorada com o foco na produção de emulsificantes

Quadro 2 – Revisão da literatura sobre a reação de esterificação entre ácidos graxos e glicerol utilizando enzimas.

Reagente	Enzima	Sistema e Parâmetros de Reação	Resultados e Métodos Analíticos	Ref.
Ácidos graxos destilados de palma	<i>Rhizomucor miehei</i> produzida por fermentação sólida	Reator aberto em batelada (30 mL) com termostato e agitação magnética, razão glicerol:ác. graxo 2:1, enzima 20% em peso, água 9.6% em peso, 50 °C, 48 h, sem solvente.	Conversão = 86,9% Rendimento = 40% DAG e 25% MAG GC-FID	(COLLAÇO et al., 2021)
	<i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada (Lipozyme RM-IM)	Reator aberto em batelada (30 mL) com termostato e agitação magnética, razão glicerol:ác. graxo 1:1, enzima 3% em peso, 50 °C, 10 h, sem solvente.	Conversão = 85% Rendimento = 53,05% DAG e 27,9% MAG GC-FID	
Ácido Palmítico (C16:0)	<i>Penicillium camembertii</i> imobilizada em compósito epóxi SiO ₂ -PVA	Reator de vidro esférico e fechado com agitação magnética, razão glicerol:ác. graxo 8:1, enzima 5% em peso, 45 – 65 °C, 200 rpm, 6 h, sem solvente.	Conversão = 55,76% Rendimento = 6.39% DAG e 45.86% MAG	(FREITAS et al., 2010)
Ácido esteárico (C18:0)			Conversão = 59,73% Rendimento = 13.37% DAG e 42.16% MAG	
Ácido Oleico (C18:1)			Conversão = 56,12% Rendimento = 7.56% DAG e 32.92% MAG GC-FID	
Mistura dos ácidos caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0)	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina (Novozyme 435)	Erlenmeyer (25 mL) aquecido com agitação magnética, razão glicerol:ác. graxo 1:1, enzima 5% em peso, peneira molecular 10%, 50 °C, 300 rpm, 30 min, sem solvente.	Conversão = 90% Rendimento = 24% DAG e 58% MAG GC-FID	(ESPERÓN-ROJAS et al., 2017)
Mistura de ácidos graxos rica em EPA (20:5) e DHA (22:6)	MAS1 (<i>Streptomyces</i> sp.) imobilizada em resina XAD1180	Erlenmeyer aquecido com agitação magnética, razão glicerol:ác. graxo 5:1, enzima 200 U.g ⁻¹ , atmosfera inerte (N ₂), 65 °C, 200 rpm, 12 h, sem solvente.	Conversão = 94,38% Rendimento = 49,23% DAG e 21,71% MAG TLC-GC e HPLC-RID	(WANG et al., 2021)
PUFAs de microalga (<i>Porphyridium cruentum</i>)	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina (Novozyme 435)	Erlenmeyer (50 mL) em um banho maria com agitador, concentrado de PUFA 0,4 g, glicerol 41,7 mg, enzima 100 mg, atmosfera inerte (Ar), água 48 µL, 50 °C, 175 rpm, 24h, hexano 9 mL.	Conversão = 94,7% Rendimento = 17,3% DAG 1,7% MAG TLC-GC	(MEDINA et al., 1999)
Mistura de ácidos graxos rica em DHA (22:6)	<i>Candida antarctica</i> B (CAL-B) imobilizada em resina acrílica macroporosa	Sistema fechado aquecido com agitação magnética, concentrado de DHA 0.49 g, glicerol 46 mg, enzima 50 mg, água 26 µL, 50 °C, 300 rpm, 24 h, hexano 3 mL.	Conversão = 69,0% Rendimento = 20,3% DAG 36,3% MAG HPLC-RID	(BHANDARI; CHAURASIA; DALAI, 2015)
Óleo de soja com alto teor de ácidos graxos	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina (Novozyme 435)	Balão de vidro (50 mL) em um banho com agitação magnética, óleo de soja ácido 30 g, glicerol 2,40 g, enzima 1,567 g, 60 °C, 500 rpm, 12 h, sem solvente.	Conversão = 99,7% Rendimento = 68,95% DAG 12,37% MAG RP-HPLC	(ZHONG et al., 2019b)

2.3.2 Etil Ésteres

As duas principais áreas de aplicação de ésteres etílicos de ácidos graxos são produção de biodiesel e formulação de produtos farmacêuticos. Na indústria farmacêutica, os ésteres da família ômega-3 já são utilizados como remédio para redução do nível de triglicerídeos no sangue. Este medicamento foi aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA e atualmente é comercializado sob o nome de Lovaza® (Figura 16) (HAVRIUSHENKO; UDOVENKO; GLADKIY, 2020). Apesar desta aplicação, a utilização de diversos óleos vegetais para produção do biodiesel de etil ésteres é mais investigada e reportada na literatura do que a rota para produção de produtos farmacêuticos/nutracêuticos (STAMENKOVIĆ; VELIČKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2011).

Figura 16 – Medicamento Lovaza a base de etil ésteres de ácidos graxos ω -3.



Fonte: Site Drugs.com. Acesso em 15 mar. 2021.

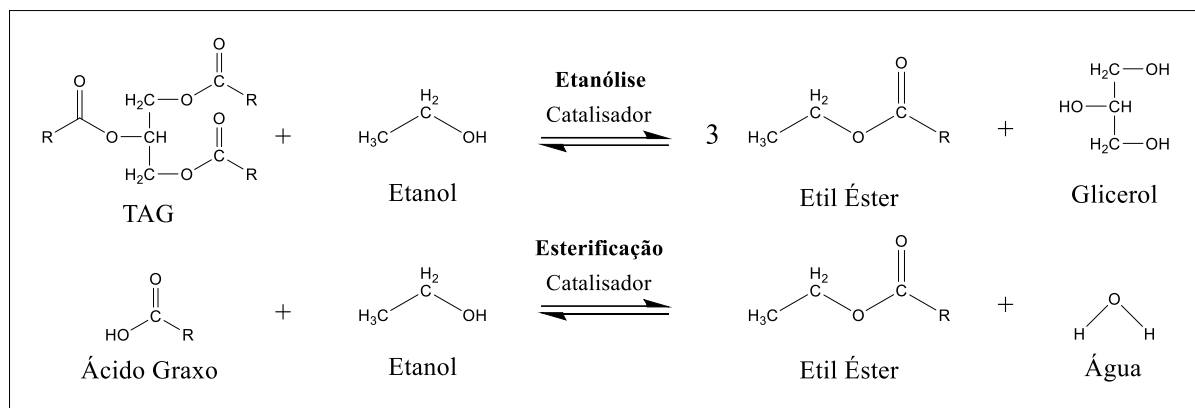
Disponível em: <https://www.drugs.com/pro/lovaza.html>

A produção de etil ésteres de ácidos graxos pode ser realizada através da etanolise de gorduras/óleos ou esterificação de ácidos graxos com o etanol (Figura 17), aplicando-se uma variedade de catalisadores (YUSOFF; XU; GUO, 2014). Dentre eles, os catalisadores homogêneos alcalinos (hidróxidos de sódio e potássio ou os alcoolatos correspondentes) se destacam devido a maior atividade e menor temperatura do processo. Outros catalisadores que também são utilizados: homogêneos ácidos (ácido sulfúrico ou fosfórico), heterogêneos (óxidos de metal ou carbonatos do grupo II e zeólitas) e biológicos (lipases) (HAVRIUSHENKO; UDOVENKO; GLADKIY, 2020).

Apesar do grande número de possíveis catalisadores, a aplicação dos mesmo para fins nutraceuticos/farmacêuticos é reduzida, uma vez que o catalisador deve ser atóxico e facilmente removido da reação. Neste quesito, as lipases imobilizadas se destacam como catalisadores promissores. Vários autores relataram a produção enzimática de ésteres etílicos ricos em ômega-3, estudando inúmeras condições de reação e o comportamento de diferentes lipases quanto às propriedades de atividade, seletividade e estabilidade, e também à procura de novas

matérias-primas ricas nesses ácidos graxos, como as microalgas (CASTEJÓN; SEÑORÁNS, 2020). O Quadro 3 apresenta uma revisão da literatura sobre este campo de pesquisa.

Figura 17 – Representação das reações para produção de ésteres etílicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O processo de produção de etil ésteres é afetado principalmente pela proporção de etanol/óleo ou etanol/ácidos graxos, concentração de catalisador, concentração de água, temperatura e pelo tempo de reação, que normalmente deve ser aumentado para um melhor processamento (STAMENKOVIĆ; VELIČKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2011). Na indústria farmacêutica, a produção de concentrados de ácidos graxos ômega-3 se dá a partir de óleos vegetais e óleo de peixe através da síntese química ou enzimática. A maioria dos concentrados de ômega 3 no mercado são ésteres etílicos e eles são amplamente utilizados como aditivos para a produção de alimentos e produtos funcionais (CASTEJÓN; SEÑORÁNS, 2020).

2.4 CONCLUSÃO

As microalgas apresentam uma composição lipídica muito rica e a utilização de seu óleo para aplicações além da produção de biodiesel se apresenta como um caminho favorável para o desenvolvimento do setor. Todavia, trabalhos empregando o óleo de microalga para fins cosméticos, nutricionais e farmacêuticos são muito escassos na literatura em comparação com os artigos que focam na produção de biocombustíveis. Portanto, a pesquisa focada na criação de tecnologias para a síntese de lipídios funcionais de alto valor agregado a partir de microalgas se faz necessária e contribui para o desenvolvimento de biorrefinarias, incentivando o avanço de uma bioeconomia capaz de reduzir os danos causados ao meio ambiente.

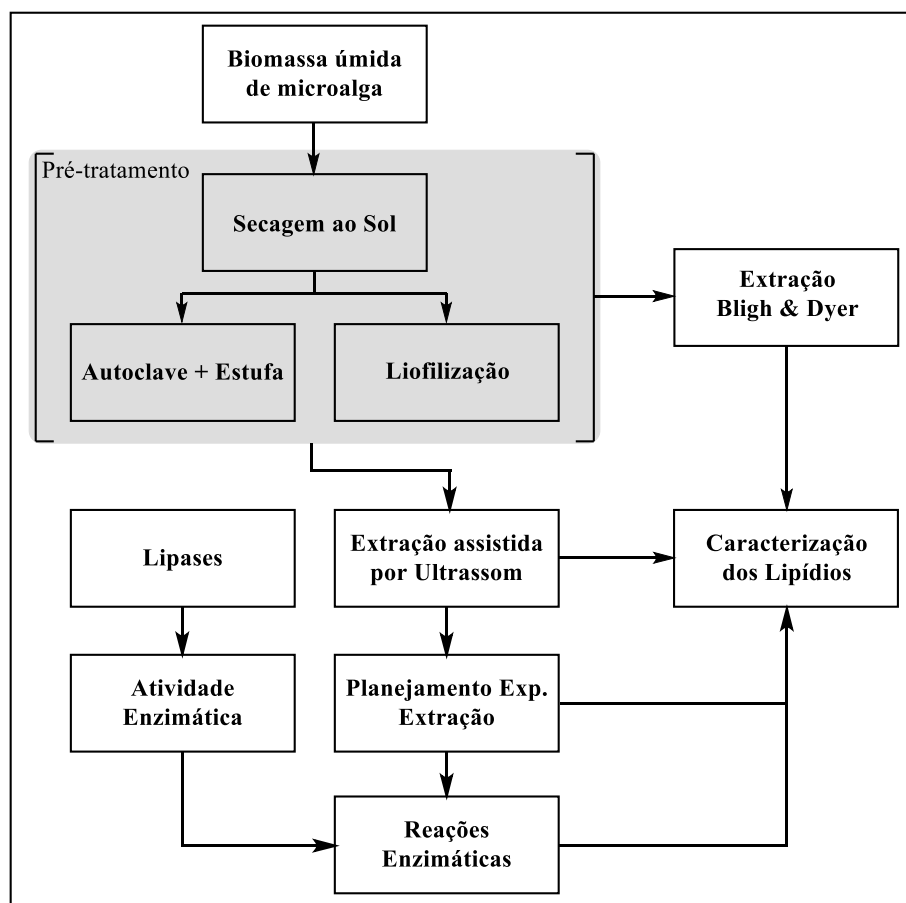
Quadro 3 – Revisão da literatura sobre a produção de etil ésteres ricos em ômega-3 utilizando enzimas.

Reagente	Enzima	Sistema e Parâmetros de Reação	Resultados e Métodos Analíticos	Ref.
Óleo de chia	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada (Lipozyme TL-IM)	Frascos de vidro (2,5 mL) em agitador orbital, razão etanol:óleo 10: 1 M, enzima 4% em peso, 25 °C, 200 rpm, 24 h, hexano 80% em volume.	Rendimento = 97,7% HPLC-ELSD e GC-MS	(CASTEJÓN et al., 2019)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em copolímero acrílico (Immobead 150)		Rendimento = 87,7% HPLC-ELSD e GC-MS	
Óleo de fígado de peixe pescador	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina (Novozyme 435)	Frascos (5 mL) com tampa revestida de PTFE, razão etanol:óleo 3,2:1 M, enzima 10% em peso, 28 °C, 220 rpm, 24, 48 e 72h.	Rendimento = 44%, 61% e 63% RMN e GC-FID	(AGUILERA-OVIEDO et al., 2021)
	<i>Rhizopus oryzae</i> livre		Rendimento = 53%, 54% e 61% RMN e GC-FID	
	<i>Aspergillus flavus</i> livre		Conversão = 32%, 38% e 46% RMN e GC-FID	
Óleo de peixe	<i>Aspergillus niger</i> livre (NS81006)	Balão de vidro com três bocas (500 mL) em banho termostático e agitação mecânica, razão etanol:óleo 5:1 M, enzima 1.5% em peso, água 10% em peso, 45 °C, 1000 rpm, 6h.	Rendimento = 65% GC-FID	(YAN et al., 2018)
Óleo de microalga (<i>Scenedesmus ecornis</i>)	<i>Candida antarctica</i> imobilizada em resina (Novozyme 435)	Frascos (3 mL), 161 mg de óleo de microalga, 500 µL de etanol, enzima 10% em peso, 30 °C, 150 rpm, 24h.	Rendimento = 83% GC-MS	(DE ALMEIDA et al., 2018)
Óleo de microalga (<i>Isochrysis galbana</i>)	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada (Lipozyme TL-IM)	Frascos âmbar (25 mL) com tampa em banho termostático com agitação magnética, razão etanol:óleo 8:1 M, enzima 10% em peso, água 5% em peso, 25 °C, 300 rpm, 6h.	Rendimento = 85-90% TLC-FID e GC-FID	(HE et al., 2018)
Óleo de microalga (<i>Schizochytrium sp.</i>)	<i>Candida antarctica</i> B imobilizada (Lipozyme 435)	Reator de vidro encamisado (25 mL) com agitação magnética, razão etanol:óleo 10:1 M, enzima 10% em peso, 30 °C, 300 rpm, 3h.	Rendimento = 60% TLC-GC, GC-FID e HPLC-RID	(ZHANG et al., 2018b)

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

As etapas experimentais seguidas neste trabalho são apresentadas na Figura 18. Inicialmente, a biomassa úmida foi processada de diferentes formas (secagem ao sol, autoclavagem + secagem em estufa e liofilização) e testes foram realizados para analisar a possível influência do método de pré-tratamento na eficiência de extração e no perfil de ácidos graxos do óleo. Após este ensaio, extrações assistidas por ultrassom foram realizadas a fim de se obter um método alternativo ao tradicional Bligh & Dyer. A metodologia mais promissora considerando eficiência, custo e perfil de ácidos graxos foi otimizada através de um planejamento experimental avaliando os fatores temperatura e razão solvente:biomassa. Após a otimização da metodologia e extração de todo o óleo, as lipases disponíveis foram avaliadas quanto à atividade enzimática, no intuito de selecionar a de maior potencial para ser aplicada nas reações de glicerólise, esterificação e etanolise, visando a produção de lipídios funcionais. O óleo bruto e os produtos das reações foram caracterizados através de cromatografia gasosa (GC-FID) e as reações enzimáticas foram avaliadas de acordo com a maior aplicabilidade na indústria, dentro das condições estudadas.

Figura 18 – Esquema das etapas presentes na metodologia experimental seguida por este trabalho.



3.1 BIOMASSA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A biomassa úmida da microalga *Scenedesmus* sp. LF01 (80–90% de umidade) foi gentilmente doada pela empresa Algae Biotecnologia (Holambra, SP). A cepa foi obtida no banco do Laboratório de Ficologia (LAFIC) da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos - SP). Nenhuma informação sobre os parâmetros de cultivo ou colheita foi fornecida. Toda a biomassa foi seca ao sol por 3 dias espalhada em uma camada fina sob uma lona de plástico com uma tela protetora na parte superior para evitar o contato com insetos e outros materiais.

3.2 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

Após a secagem ao sol, as camadas secas de biomassa foram trituradas e maceradas em almofariz até a obtenção de um pó uniforme. Para remover a maior parte do teor de umidade da biomassa, dois métodos diferentes de pré-tratamento também foram realizados para comparação: secagem em forno após a ruptura celular em autoclave e liofilização. Uma amostra de biomassa seca foi suspensa em 10 mL de água destilada e autoclavada por 5 min a 125 °C. Após a autoclavagem, a amostra foi seca em estufa a 60 °C até peso constante. As amostras liofilizadas foram mantidas em ultracongelador a -80 °C por 12 h e secas por 24h em liofilizador (Terroni modelo Enterprise 1-A). Todas as amostras foram maceradas novamente para garantir a uniformidade da biomassa.

3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGA

A metodologia B&D (BLIGH; DYER, 1959) foi comparada com extrações assistidas por ultrassom utilizando diferentes solventes. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e todos os solventes utilizados eram de grau analítico. Além da eficiência, outros fatores como o custo de solvente, toxicidade e perfil de ácidos graxos foram avaliados para se definir qual é a metodologia mais viável para a produção de lipídios funcionais. Dessa forma, visa-se definir o processo que consiga a maior quantidade de óleo com um perfil de ácidos graxos mais rico em AGPIs.

O método B&D foi utilizado para comparar os resultados dos diferentes pré-tratamentos por ser considerado o procedimento padrão para extração de lipídios em tecidos biológicos (BREIL et al., 2017). Esta etapa tem como objetivo verificar se há uma alteração na eficiência de extração e/ou no perfil de ácidos graxos dependendo do processamento da biomassa. Para avaliar os diferentes métodos de extração, a biomassa liofilizada foi escolhida pois o conteúdo de água ainda presente na amostra após secagem ao sol poderia interferir nos resultados. As

eficiências de extração foram calculados em percentual de biomassa seca e comparados usando teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

3.3.1 Bligh & Dyer

Neste trabalho, uma versão modificada do método B&D foi realizada para extrair o óleo de amostras de microalga (FERREIRA et al., 2019c). Primeiramente, adicionou-se 1,6 mL de água (H₂O), 2 mL de clorofórmio (CHCl₃) e 2 mL de metanol (CH₃OH) em 50 mg de biomassa seca e agitou-se esta mistura em vortex por 10 min. Então, adicionou-se mais 2 mL de água (H₂O), 2 mL de clorofórmio (CHCl₃) e agitou-se a mistura em vortex por 2 min. Após este processo, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min e a fase inferior foi coletada para determinação do conteúdo lipídico de forma gravimétrica, evaporando os solventes até peso constante.

3.3.2 Extrações Assistidas por Ultrassom

O procedimento de extração lipídica assistida por ultrassom realizado neste trabalho foi proposto com base em estudos anteriores encontrados na literatura (LI et al., 2014; RANJAN; PATIL; MOHOLKAR, 2010). Os solventes testados separadamente para extrair o óleo da cepa *Scenedesmus* sp. LF01 foram n-hexano, clorofórmio: metanol (1:1 v/v) e etanol. O processo consistiu em adicionar 10 mL de solvente a 1 g de biomassa liofilizada, seguindo uma razão solvente:biomassa de 10:1 (v/m). A extração foi realizada em frascos âmbar tampados com rolhas plásticas e imersos em um banho ultrassônico (Unique[®] modelo USC1850-A, 3,8 L, dimensões 30 x 15 x 10 cm, intensidade de ultrassom 154W) por 1h trabalhando a 25 kHz com controle de temperatura definido em 60 °C. Ao final da extração, a biomassa foi removida por filtração enquanto o sistema ainda estava quente (≈ 50 °C) para garantir maior lipossolubilidade no solvente. A fração lipídica foi determinada gravimetricamente com a evaporação dos solventes até peso constante.

3.3.3 Otimização da Extração

A extração assistida por ultrassom mais promissora, de acordo com a eficiência, perfil de ácidos graxos, toxicidade e custo do(s) solvente(s), foi otimizada por meio de um planejamento de experimentos (DOE). Um planejamento fatorial em dois níveis (2^k) com dois fatores e 4 repetições no ponto central foi empregado para analisar a influência da razão solvente:biomassa e temperatura no processo de extração com a mesma duração dos

experimentos anteriores (1 h). Os valores reais dos níveis máximo (+) e mínimo (-) dos fatores estudados estão apresentados na Tabela 4. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do software *Statistica*® 10 aplicando-se um nível de confiança de 95%.

Tabela 4 – Valores dos níveis para cada fator analisado no planejamento experimental da extração.

Fator	Nível -1	Ponto Central (0)	Nível +1
Temperatura (°C)	40	60	80
Razão Solvente:Biomassa	5	10	15

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As quatro lipases estudadas neste trabalho (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium solitum*, *Rhizopus javanicus*) foram fornecidas purificadas e liofilizadas pelo grupo de pesquisa da Universidade São Francisco, liderado pela Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho. As atividades enzimáticas foram determinadas através do método descrito por Sperb et al. (2018) com algumas modificações, descritas a seguir. Esta metodologia consiste na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase na hidrólise do azeite de oliva.

Uma emulsão de azeite de oliva (10%) em uma solução de goma xantana (1%) foi preparada durante 5 min em agitação a 700 rpm. O meio reacional contendo 5 ml da emulsão, 2 mL de tampão fosfato de sódio (100mM, pH = 7,0) e 1 mL de uma solução de enzima (5 mg/mL) foi então incubado a 37 °C durante 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 15 mL de etanol e a liberação de ácidos graxos foi quantificada através da titulação com uma solução de NaOH (10mM ou 50mM), utilizando fenolftaleína como indicador. O mesmo processo foi realizado para quantificar os ácidos graxos livres no branco, introduzindo a solução de enzima após a adição de etanol no meio reacional.

Dessa forma, a determinação da atividade de cada enzima foi realizada em quadruplicata e calculada utilizando a Equação 1, de acordo com a seguinte definição: “Uma unidade de atividade lipolítica corresponde a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido graxo titulável por minuto durante a hidrólise a 37 °C”.

$$AE \text{ (U.mg}^{-1}\text{)} = \frac{(V_A - V_B) \cdot [\text{NaOH}]}{\frac{V_E \cdot t}{[E]}} \quad (1)$$

Sendo V_A : volume de NaOH utilizado para titular a amostra; V_B : volume de NaOH utilizado para titular o branco; $[\text{NaOH}]$: concentração da solução de NaOH utilizada na titulação em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$; V_E : volume da solução de enzima; t : tempo de incubação; $[E]$: concentração da solução de enzima.

3.5 PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS FUNCIONAIS

As reações de glicerólise, esterificação e etanólise do óleo bruto da microalga *Scenedesmus* sp. LF01 por via enzimática foram realizadas em um sistema fechado descontínuo (batelada) sob agitação magnética e controle de temperatura (Figura 19). As metodologias aplicadas para cada tipo de reação foram propostas com base em trabalhos publicados na literatura e estão apresentadas nas tabelas abaixo (Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7).

Figura 19 – Sistema utilizado para produção de lipídios funcionais por via enzimática.



Fonte: Autor.

Este estudo não teve a finalidade de otimizar as reações mas sim avaliar qual delas teria a melhor aplicabilidade para o óleo bruto de microalga nas condições estudadas. Testes sem adição de solvente não foram realizados devido à alta viscosidade do óleo bruto obtido. Dessa forma, a escolha de um solvente para aumentar a miscibilidade dos reagentes foi necessária para realizar as reações de glicerólise e esterificação. O hexano foi escolhido para ser aplicado devido a sua menor toxicidade, em comparação ao metanol e clorofórmio, e sua vasta aplicação na indústria alimentícia para extração de óleos vegetais (SHIN et al., 2014). Para a reação de etanólise, o etanol atua como reagente e proporciona maior miscibilidade dos componentes do meio reacional, não necessitando a adição de outros solventes orgânicos. Após o tempo determinado para cada reação, as amostras foram filtradas à vácuo para remoção do catalisador (lipase livre do *Rhizopus javanicus*) e mantidas em freezer até a realização das análises de caracterização lipídica. O cálculo para definir as razões molares nos experimentos de glicerólise foi baseado no peso molar do óleo de microalga do gênero *Scenedesmus* obtido por Baumgärtner et al. (2012).

Tabela 5 – Parâmetros reacionais propostos para a glicerólise enzimática do óleo bruto de microalga.

Amostra	Razão Glicerol:Óleo	[Lipase] (m de óleo)	Razão (v/m) Hexano:Óleo	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Ref.
1	01:01 (M/M)	10%	08:01	45	12	
2	03:01 (M/M)	6%	05:01	45	12	(WANG et al., 2018)
3	01:01 (M/M)	2%	08:01	55	12	
4	01:01 (m/m)	5%	08:01	55	24	

Tabela 6 – Parâmetros reacionais propostos para a esterificação enzimática do óleo bruto de microalga.

Amostra	Razão Glicerol:Óleo	[Lipase] (m de óleo)	Razão (v/m) Hexano:Óleo	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Ref.
1	10% (m/m)	10%	06:01	50	24	(BHANDARI; CHAURASIA; DALAI, 2015)
2	10% (m/m)	25,0%	22,5:01	55	48	(MEDINA et al., 1999)

Tabela 7 – Parâmetros reacionais propostos para a etanólise enzimática do óleo bruto de microalga.

Amostra	Razão Etanol:Óleo	[Lipase] (m total)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Ref.
1	10:01 (v/m)	8%	30	2	(ZHANG et al., 2018b)
2	16:01 (v/m)	10%	25	6	(HE et al., 2018)

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDIOS

O óleo bruto e os meios reacionais provenientes das reações enzimáticas de glicerólise, esterificação e etanólise foram caracterizados quanto ao perfil de ácidos graxos e composição de acilgliceróis a fim de se obter a eficiência do processo e as possíveis aplicações dos lipídios funcionais produzidos. Todas as análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a um detector ionizado por chama (GC-FID Agilent 6890). A determinação de ácidos graxos livres presentes no óleo bruto também foi investigada através de um método titulométrico.

3.6.1 Perfil de Ácidos Graxos

O perfil de ácidos graxos foi obtido seguindo a metodologia da norma EN14103 do Comitê Europeu de Normalização. Para a realização desta metodologia, as amostras de lipídios extraídos da biomassa de microalga foram esterificadas a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) de acordo com Hartman e Lago (1973). As condições da análise cromatográfica foram descritas por De Jesus et al. (2019). O perfil de FAMES foi identificado através dos resultados obtidos pelos padrões da solução *Supelco*[®] 37 *Component FAME Mix* (Sigma Aldrich[®]) na curva de calibração. O cálculo do percentual correspondente a cada ácido graxo

foi realizado através da adição de um padrão interno de ácido heptadecanóico (C17:0) que não está naturalmente presente nas amostras de microalga. A Equação 2 e 3 apresentam como calcular o percentual de acordo com a resposta do padrão interno segundo Breuer et al. (2013).

$$C_{\text{Ác. Graxo}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mg}_{\text{Amostra}}} \right) = \frac{m_{\text{P.I.}} \cdot \frac{A_{\text{Ác. Graxo}}}{A_{\text{P.I.}} \cdot \text{Fator}_{\text{Resp. Rel.}}}}{m_{\text{Amostra}}} \quad (2)$$

Sendo $m_{\text{P.I.}}$: massa adicionada do padrão interno na amostra; $A_{\text{Ác. Graxo}}$: área do ácido graxo no cromatograma; $A_{\text{P.I.}}$: área do padrão interno no cromatograma; $\text{Fator}_{\text{Resp. Rel.}}$ = Fator calculado pela relação entre a concentração e a área do padrão interno e de determinado ácido graxo na curva de calibração; m_{Amostra} = massa de amostra esterificada.

$$\text{Fator}_{\text{Resp. Rel.}} = \frac{C_{\text{P.I. Cal.}}}{C_{\text{Ác. Graxo Cal.}}} \cdot \frac{A_{\text{Ác. Graxo Cal.}}}{A_{\text{P.I. Cal.}}} \quad (3)$$

Sendo $C_{\text{P.I. Cal.}}$: concentração do padrão interno na curva de calibração; $C_{\text{Ác. Graxo Cal.}}$: concentração do ácido graxo na curva de calibração; $A_{\text{Ác. Graxo Cal.}}$: área do ácido graxo na curva de calibração; $A_{\text{P.I. Cal.}}$ = área do padrão interno na curva de calibração.

3.6.2 Composição de Acilgliceróis

A proporção de TAGs, DAGs, MAGs junto com a fração de Ácidos Graxos Livres/Ésteres foi determinada seguindo as metodologias das normas EN14105 do Comitê Europeu de Normalização e ASTM D6584 da Sociedade Americana para Teste de Materiais. As amostras foram pesadas (20 a 50 mg) em vials de 10 mL e depois adicionou-se 100 μL de cada um dos padrões internos Butanetriol e Tricaprin. Após a adição dos padrões, 100 μL do reagente derivatizante MSTFA (N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoroacetamide) foi pipetado. Após 30 minutos, as amostras foram diluídas em 8 mL de n-heptano e filtradas em filtro de seringa apropriado para a análise em GC-FID.

3.6.3 Determinação de Ácidos Graxos Livres

A quantificação dos ácidos graxos livres presentes no óleo bruto de microalga foi avaliada através do método Ca 5a-40 da *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 2004). Esta metodologia é considerada padrão para este tipo de determinação e pode ser utilizada para óleo de origem vegetal e marinha, e gorduras de origem animal. Ela se baseia na dissolução do óleo em etanol previamente neutralizado seguida de uma titulação com uma solução de NaOH, utilizando a fenolftaleína como indicador. A quantidade de amostra, o volume de etanol e a concentração da solução de NaOH seguem as indicações presentes na Tabela 8. A determinação

é obtida pelo cálculo da porcentagem (em peso) de ácidos graxos livres, em relação a um ácido graxo específico, como o ácido oleico (Equação 4) ou outro ácido graxo que esteja presente em maiores quantidades na amostra (OSAWA; GONÇALVES; RAGAZZI, 2006).

$$[\text{Ác. Graxos Livres (\%)}]_{\text{Ác. Oleico}} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot [\text{NaOH}] \cdot 28,2}{m_{\text{Amostra}}} \quad (4)$$

Sendo V_{NaOH} : volume necessário para titular amostra; $[\text{NaOH}]$: concentração da solução de NaOH utilizada na titulação, conforme Tabela 8; m_{Amostra} : massa da amostra que foi titulada, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Instruções do método Ca 5a-40 para determinação dos ácidos graxos livres por titulação.

Faixa de Ácidos Graxos Livres (%)	Amostra (g)	Etanol (mL)	[NaOH]
0 a 0,2	56,4	50	0,1 M
0,2 a 1,0	28,2	50	0,1 M
1,0 a 30,0	7,05	75	0,25 M
30,0 a 50,0	7,05	100	0,25 ou 1 M
50,0 a 100,0	3,525	100	1 M

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esta seção apresenta as investigações referentes a extração do óleo (lipídios) de microalga (pré-tratamento e método de extração) e produção de lipídios funcionais (reações enzimáticas). Os resultados foram discutidos e comparados com trabalhos similares presentes na literatura.

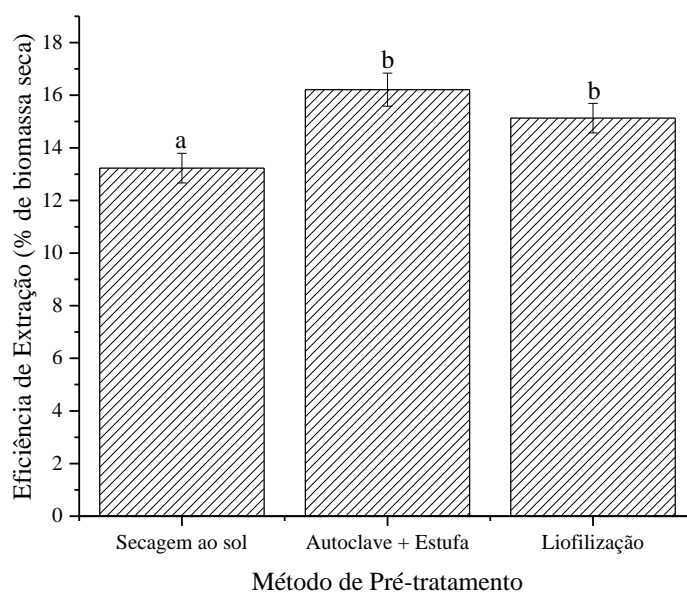
4.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGA

Os métodos de pré-tratamento da biomassa foram investigados no intuito de verificar seus possíveis efeitos na eficiência de extração e no perfil de ácidos graxos do óleo de microalga. Após esta análise, os métodos assistidos por ultrassom foram avaliados em comparação com o método B&D. Por fim, o método considerado mais promissor foi otimizado através de um planejamento experimental.

4.1.1 Pré-tratamento da Biomassa

As médias da eficiência de extração pelo método B&D para as amostras com diferentes pré-tratamentos estão apresentadas na Figura 20. O Apêndice A apresenta o resultado obtido em cada replicata, juntamente com o cálculo estatístico do desvio padrão. A biomassa seca ao sol apresentou a menor eficiência ($13,23 \pm 0,56\%$), enquanto as amostras liofilizadas ($15,13 \pm 0,56\%$) e autoclavadas e secas em estufa ($16,21 \pm 0,62\%$) apresentaram resultados semelhantes que não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey.

Figura 20 – Eficiência de extração pelo método B&D com diversos pré-tratamentos da biomassa.



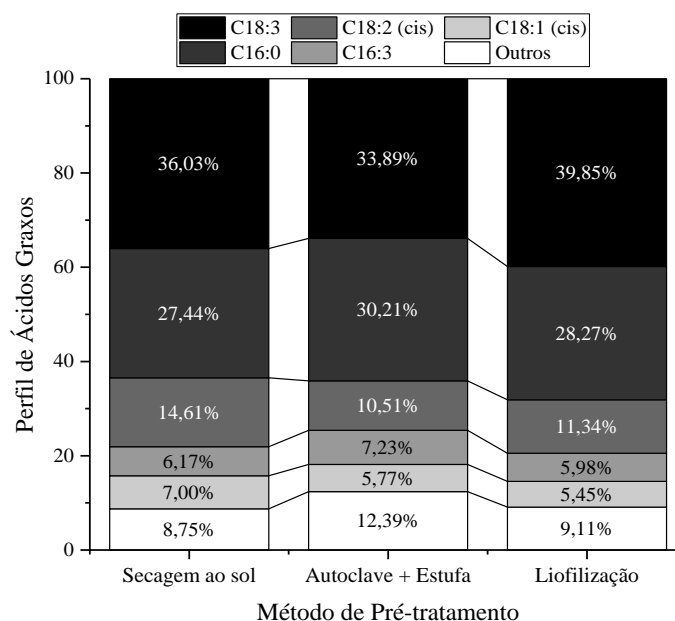
Esses resultados indicam que a autoclavagem em alta temperatura e pressão não foi um método eficiente para o rompimento celular da cepa LF01 e não melhorou a eficiência de extração em relação ao método de liofilização. Lee et al. (2010) estudaram a influência de diferentes métodos de ruptura celular na extração de lipídios de uma cepa da microalga *Scenedesmus* sp. e também relataram que a autoclavagem não foi um método eficiente, obtendo resultados (5 a 10%) que não foram significativamente melhores em comparação com a biomassa sem nenhum tratamento.

As amostras secas ao sol podem ter apresentado uma eficiência de extração mais baixa porque a secagem em estufa e a liofilização são técnicas mais eficientes na redução do teor de umidade da biomassa (CHEN; CHANG; LEE, 2015). A umidade das amostras secas ao sol foi posteriormente determinada ($9,5 \pm 0,1\%$), evidenciando que o tempo de secagem (3 dias) não foi suficiente. Já que em outros estudos, como o de Guldhe et al. (2014a), as três técnicas de secagem para o gênero *Scenedesmus* não apresentaram diferença significativa no teor de lipídios final.

Além dos artigos citados, outros estudos sobre a extração da fração lipídica da microalga *Scenedesmus* sp. pelo método B&D também foram reportados na literatura, obtendo resultados similares a este trabalho. Shin et al. (2014) cultivaram a microalga da cepa UTEX B72, secaram sua biomassa em estufa por 48h (24h a 60 °C e 24h a 100 °C) e obtiveram uma eficiência de $12,8 \pm 0,7\%$. Tripathi, Singh e Thakur (2015) cultivaram a microalga em um meio com suplementação de 100mM de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e conseguiram um teor de lipídios de 20% com a biomassa seca por 24h em estufa a 100 °C. Bermudez-Sierra (2018) avaliou a extração pelo método B&D com a biomassa liofilizada por 24h a - 48 °C da cepa BR003 e obteve uma eficiência em torno de 15%. Portanto, pode-se concluir que o conteúdo lipídico da biomassa de microalga é variável dentro de uma determinada faixa e pode ser influenciado não só pelo pré-tratamento, mas também pelas condições de cultivo e a cepa estudada. Um aspecto que precisa ser considerado no contexto do pré-tratamento é avaliar seu custo de operação e o aumento promovido na eficiência de extração para checar se o processo é economicamente viável.

Após a análise da eficiência de extração, as amostras foram esterificadas e o perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa, como apresentado na Figura 21. A Figura 21 apresenta os cinco ácidos graxos predominantes nas amostras enquanto os constituintes de menores concentrações foram agrupados na categoria “Outros”. Os perfis de ácidos graxos detalhados para cada amostra estão presentes no Apêndice B.

Figura 21 – Perfil de ácidos graxos das amostras com diferentes pré-tratamentos pelo método B&D.



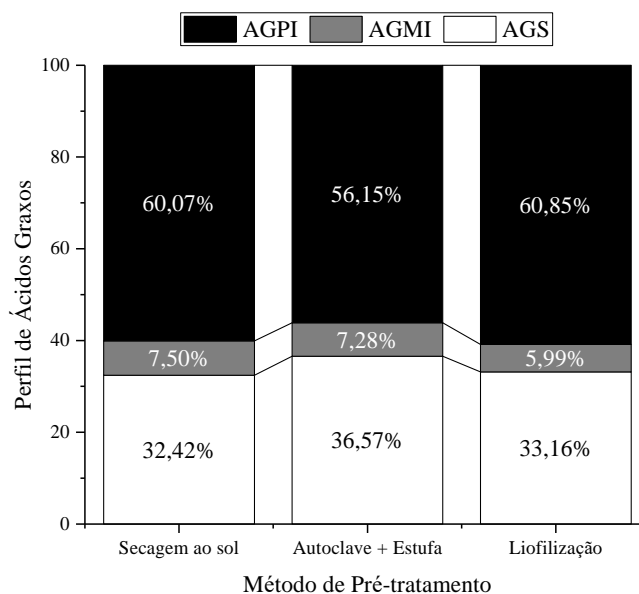
Os perfis de ácidos graxos obtidos a partir do óleo da biomassa com os três pré-tratamentos não mostraram diferenças significativas entre si. A cepa LF01 apresentou o ácido α -linolênico (C18:3) como seu principal constituinte, independente do pré-tratamento utilizado, contribuindo de 33,89% a 39,85% na composição total do perfil. O ácido palmítico (C16:0) foi outro componente predominante, variando de 27,44% a 30,21%. Outros ácidos graxos identificados em maiores quantidades foram os ácidos linoleico – C18:2 (10,51% a 14,61%), hexadecatrienoico – C16:3 (5,98% a 7,22%) e oleico – C18:1 (5,45% a 7,00%).

Shin et al. (2014) quantificaram uma concentração de ácido linolênico em suas amostras (31,36%) semelhante a encontrada neste trabalho. Entretanto, a concentração de ácido palmítico foi menor (13,20%). Zhang et al. (2018) obtiveram os ácidos oleico e o ácido palmítico como principais componentes do perfil com concentrações de 43,9% e 12,5%, respectivamente. Os resultados de Bermudez-Sierra (2018) indicaram o ácido palmítico como maior componente de perfil (39,1%), seguido pelo ácido oleico (34,74%) e ácido linolênico (21,85%). Nos estudos de Tripathi, Singh e Thakur (2015), os principais ácidos encontrados no perfil foram o oleico com concentração de 24,9% e o esteárico (C18:0) com concentração de 21,2%.

A Figura 22 representa os perfis de ácidos graxos agrupando-os de acordo com ausência (saturado – AGS), presença de uma (monoinsaturado – AGMI) ou presença de mais de uma ligação dupla (poli-insaturado – AGPI) em sua estrutura. Todos os perfis, independente do pré-tratamento da biomassa, indicam que a microalga *Scenedesmus* sp. LF01 é uma matéria-prima

promissora na produção de óleo com alto valor agregado, principalmente para a indústria alimentícia e farmacêutica, devido ao alto percentual de AGPIs.

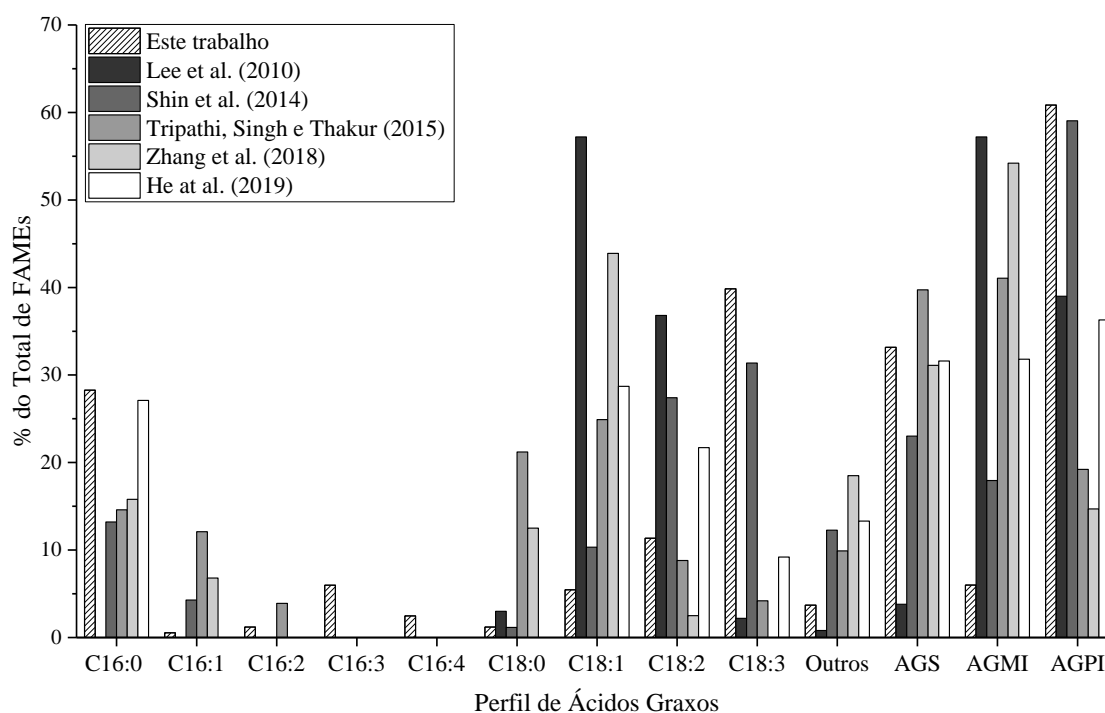
Figura 22 – Perfil de ácidos graxos dividido entre ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), mono insaturados (AGMI) e saturados (AGS) do método B&D.



Quantidades semelhantes de AGS (32,42% a 36,57%), AGMI (5,99% a 7,50%) e AGPI (56,15% a 60,85%) foram observadas, divergindo do trabalho de Guldhe et al. (2014a) que relatou variações significativas no perfil entre os diferentes métodos de pré-tratamento. A biomassa autoclavada e seca em estufa apresentou a menor quantidade de conteúdo de AGPIs e isso pode indicar uma degradação térmica causada pela alta temperatura da autoclave. Não foi encontrada diferença significativa na identificação de FAMES apresentada pelos diferentes pré-tratamentos ($18,33 \pm 0,94\%$).

Um estudo avaliou a influência da concentração de nitrato de sódio no meio de cultura da *Scenedesmus sp.* e obteve uma média de perfil com 8,43% de AGPI, 64,72% de AGMI e 26,85% de AGS, divergindo deste trabalho (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017). Outros autores obtiveram um perfil mais rico em AGS (56,97%), em relação a AGPI (24,59%) e AGMI (18,44%) (BASILY et al., 2018). Outro trabalho mais recente apresentou um perfil de ácidos graxos bem equilibrado entre AGPI (36,3%), AGMI (31,8%) e AGS (31,6%) (HE et al., 2019).

A Figura 23 apresenta o perfil de ácidos graxos do óleo da biomassa liofilizada da cepa LF01 em comparação com outras cepas do gênero *Scenedesmus sp.* que foram reportadas na literatura através da extração por versões do método B&D. Pode-se observar de forma mais clara a variação significativa que ocorre entre os perfis de ácidos graxos do óleo obtido por microalgas do mesmo gênero.

Figura 23 – Perfil de ácidos graxos obtido neste trabalho em comparação com outros estudos da literatura.

Essas diferenças são comuns porque o perfil de ácidos graxos também é influenciado pelas condições de cultivo. Além disso, a disponibilidade de luz e a taxa de crescimento específica na qual a biomassa é colhida são outros fatores que podem afetar a composição de ácidos graxos. Liu et al. (2012) estudaram o efeito da intensidade da luz no crescimento e no acúmulo de lipídios da microalga *Scenedesmus* sp., cepa 11-1. Eles relataram que a intensidade da luz pode influenciar o perfil de ácidos graxos, afetando especialmente a quantidade de AGMI e AGPI. Liang e Mai (2005) avaliaram o efeito da fase de crescimento nas composições de ácidos graxos para quatro espécies diferentes de microalgas marinhas. Seus resultados mostraram que a fase de crescimento tem um efeito significativo sobre a maioria dos conteúdos em todas as espécies. O teor de AGS (exceto para uma espécie) e de AGMI aumentou enquanto o de AGPI diminuiu com a idade da cultura. Apesar das diferenças apresentadas por cada estudo na Figura 23, alguns ácidos graxos, como ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (C18:1), linoléico ácido (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) são consistentes na maioria das composições do perfil. A cepa LF01 obteve a maior quantidade de ácido linolênico e o maior teor de AGPI enquanto apresentou a menor quantidade de AGMI, em comparação com os estudos apresentados neste trabalho.

O melhor pré-tratamento da biomassa não é uma escolha simples, pois precisa ser a opção de menor custo que possa se adequar à escala de produção e aplicação do óleo de microalga. A secagem ao sol leva mais tempo em comparação com a secagem em estufa e

liofilização. No entanto, essas duas técnicas requerem consumo de energia, o que aumenta o custo geral do processo. Guldhe et al. (2014a) avaliaram esses métodos de secagem e o custo geral em ordem crescente foi secagem ao sol, seguida pela secagem em estufa e liofilização. Esta análise foi baseada no consumo de energia e na sofisticação dos equipamentos utilizados. A secagem ao sol não requer energia elétrica para funcionar e, claro, depende das condições climáticas, enquanto a secagem em forno e a liofilização exigiram 6 kW e 21,9 kW, respectivamente.

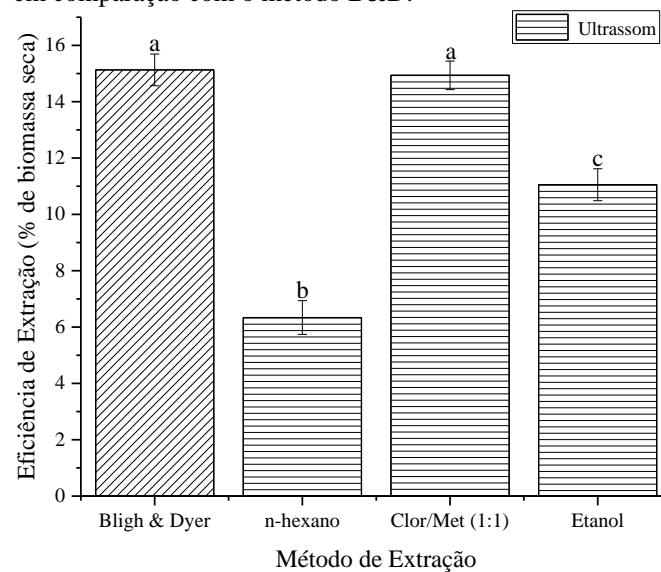
Portanto, a secagem ao sol se enquadra nos casos em que a produção ocorre em larga escala em locais com condições climáticas favoráveis. Este método apresenta o menor custo e sua principal limitação é a exigência de grandes áreas de secagem. A secagem em estufa é mais apropriada para locais onde o clima não é favorável e a aplicação de microalgas é mais refinada (indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia). É mais difícil controlar a contaminação e a entrada de materiais estranhos em grandes áreas de secagem ao sol e esta técnica não parece ser uma opção muito segura para esta aplicação. A liofilização é indicada para aplicações específicas onde atingir o mínimo teor de umidade na biomassa sem aplicação de altas temperaturas faz grande diferença na qualidade do produto final, por se tratar de um método mais caro e complexo.

4.1.2 Extração assistida por Ultrassom

A escolha de qual solvente utilizar para extração de lipídios assistida por ultrassom é um fator importante, pois afeta não apenas a eficiência geral do processo, mas também seu custo e toxicidade. A Figura 24 apresenta as eficiências médias de cada método e os seus desvios padrão. Todos foram aplicados na biomassa liofilizada e os resultados foram comparados com o método B&D. O Apêndice A apresenta o resultado obtido em cada replicata, juntamente com o cálculo estatístico do desvio padrão.

Pode-se observar uma redução significativa (58,1%) na eficiência de extração comparando o método B&D ($15,13 \pm 0,56\%$) com o método assistido por ultrassom com n-hexano ($6,34 \pm 0,60\%$). Uma redução maior que 50% entre os dois métodos também foi reportada por Ranjan, Patil e Moholkar (2010). Estes autores determinaram que a seletividade do solvente foi o fator determinante na eficiência final do processo ao invés da convecção promovida pela aplicação do ultrassom. Dessa forma, os resultados indicam que os lipídios presentes na microalga *Scenedesmus* sp. têm maior afinidade com solventes mais polares como o clorofórmio e o metanol (B&D) do que com solventes apolares, como o n-hexano.

Figura 24 – Eficiência das extrações assistidas por ultrassom em comparação com o método B&D.



Shin et al. (2014) extraíram o óleo através da utilização de n-hexano sem auxílio do ultrassom a 25 °C durante 1h com uma razão solvente:biomassa de 20 mL:1 g. A eficiência obtida ($2,4 \pm 0,7\%$) foi menor que a apresentada neste trabalho ($6,34 \pm 0,60\%$). Este fato demonstra que a aplicação do ultrassom juntamente com uma temperatura maior (60 °C) auxiliaram no processo, já que a biomassa estudada por Shin et al. (2014) apresentou um teor de extração similar a biomassa deste trabalho no método B&D ($12,8 \pm 0,7\%$ em comparação com $13,23 \pm 0,56\%$).

Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2017) avaliaram a capacidade de produção de lipídios da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada sob diferentes níveis de nitrato de sódio, carbonato de sódio e ferro. O método de extração durou 6h e consistiu na utilização do solvente n-hexano na proporção de 100 mL a cada 1 g de microalga liofilizada e pré-tratada com ultrassom (24 kHz por 5 min). As eficiências variaram entre 20 – 40%, indicando que o aumento do tempo e da razão solvente/biomassa pode otimizar a extração. Entretanto, o acréscimo nestas variáveis dificulta o escalonamento do processo para extração de óleo em larga escala.

O método assistido por ultrassom utilizando clorofórmio/metanol (1:1) obteve uma eficiência similar ($14,94 \pm 0,51\%$) ao tradicional B&D ($15,13 \pm 0,56\%$), uma vez que ambos os métodos não foram considerados significativamente diferentes pelo teste de Tukey. A vantagem da utilização do ultrassom está associada a redução da razão solvente:biomassa (10 mL por 1 g) obtendo a mesma eficiência, já que o método B&D utiliza uma quantidade de solvente que impossibilita sua aplicação em larga escala (4 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol para 50 mg de amostra), além das suas etapas extras.

A aplicação de ultrassom para extração dos lipídios da *Scenedesmus sp.* utilizando os solventes clorofórmio/metanol (1:1) já foi avaliada em estudos prévios. Uma metodologia proposta foi sonicação prévia por 5 min (10 kHz) e extração por 5 min na proporção 0,5 g para 100 mL a temperatura ambiente. A eficiência obtida foi de 7,25% e a menor eficiência em comparação com este estudo pode ser atribuída ao menor tempo de extração. Vale a pena ressaltar que a utilização da sonicação neste trabalho quase triplicou a eficiência de extração em comparação com a amostra sem pré-tratamento (LEE et al., 2010).

Keris-Sen et al. (2014) avaliaram a aplicação de ultrassom (30 kHz, 60 min) como pré-tratamento na extração utilizando clorofórmio/metanol (1:1) e n-hexano (ambos na proporção 50 mL para 25 mg). A eficiência de extração com clorofórmio/metanol (26,8%) foi maior que a eficiência com n-hexano (17,6%), uma diferença que também foi reportada neste estudo. Ao realizar o procedimento tradicional Bligh & Dyer, os autores obtiveram uma porcentagem de lipídios em torno de 50% (Tabela 2), bem diferente da obtida pela cepa estudada neste trabalho (15,13%). Dessa forma, estes resultados indicam que a metodologia utilizando clorofórmio/metanol deste estudo foi mais eficiente para a cepa analisada pois conseguiu se equiparar a eficiência de um método tradicional. Uma das possíveis razões para a maior eficiência pode ser a utilização do ultrassom durante o processo de extração, não sendo utilizado como um pré-tratamento.

A extração utilizando etanol obteve uma eficiência intermediária ($11,05 \pm 0,57\%$) dentre todos os métodos assistidos por ultrassom que foram avaliados. A principal vantagem do etanol em relação aos demais solventes testados está relacionada com a sua menor toxicidade. O clorofórmio é considerado tóxico por inalação, nocivo por ingestão, suspeito de provocar câncer (carcinogênico), afeta o fígado e rins após exposição prolongada e provoca irritação cutânea e irritação ocular grave. O metanol é considerado tóxico por ingestão, contato com a pele e inalação, além de afetar os olhos. O hexano pode ser mortal por ingestão e penetração nas vias respiratórias, pode afetar o sistema nervoso após exposição prolongada, é suspeito de afetar a fertilidade ou o nascituro e provoca irritação cutânea. O etanol, por sua vez, possui uma menor toxicidade podendo provocar irritação nas vias respiratórias e irritação ocular grave (JOSHI; ADHIKARI, 2019).

Outra vantagem da aplicação do etanol na extração do óleo de microalga é o baixo custo deste solvente. De acordo com o site fornecedor de produtos químicos *Lab Alley* (25/02/2020), os custos de um tonel de 55 galões (≈ 208 L) para cada solvente são: clorofórmio (USD\$ 2490), metanol (USD\$ 600), hexano (USD\$ 900) e etanol (USD\$ 700). Apesar do baixo custo do metanol e a maior eficiência do método clorofórmio/metanol, o alto custo do clorofórmio em

conjunto com a sua alta toxicidade indicam que a utilização do etanol é a mais viável para a extração do óleo da cepa *Scenedesmus* sp. LF01. Além disso, utilizar o etanol no processo de extração possibilita a integração desse processo em biorrefinarias que produzem este solvente.

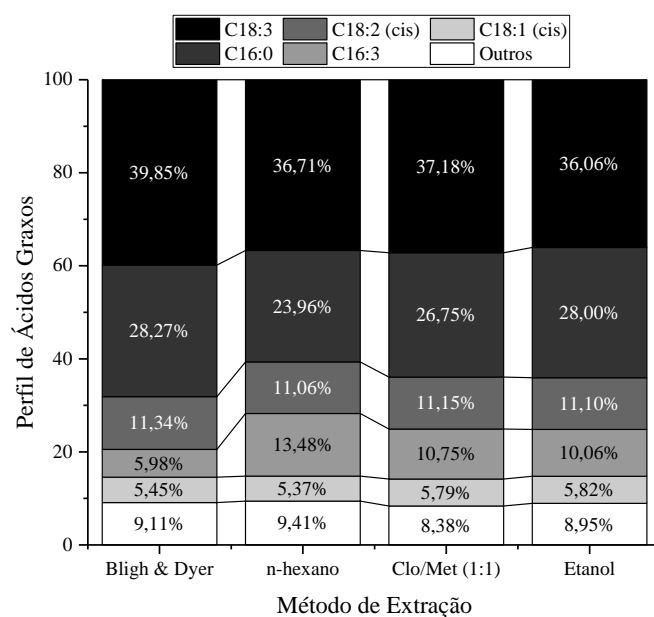
Estudos prévios avaliaram a eficiência do etanol na extração dos lipídios da microalga *Scenedesmus* sp. de acordo com diferentes metodologias. Cho et al. (2012) compararam o método de extração similar ao B&D (clorofórmio/metanol 2:1) com novos métodos utilizando n-hexano (95%) e etanol (70%). As extrações ocorreram a temperatura ambiente com agitação a 400 rpm durante 24h em um reator batelada na proporção 1 g de biomassa liofilizada para 50 ml de solvente. As eficiências obtidas foram: clorofórmio/metanol (15%), n-hexano (2,1%) e etanol (11,1%). Pode-se observar que os resultados da extração utilizando clorofórmio/metanol e etanol foram similares aos obtidos neste trabalho, indicando que o uso do ultrassom a 60 °C pode reduzir o tempo de extração e a razão solvente biomassa.

Outro trabalho avaliou diferentes formas de pré-tratamento da biomassa como liofilização, secagem por estufa e secagem ao sol, aplicando clorofórmio/etanol (1:1) para extração dos lipídios. A metodologia consistiu em duas bateladas de extração na proporção 1 g para 10 mL de solvente em um sonicador (15 kHz) por 2 min. O melhor resultado obtido foi com a biomassa liofilizada ($19,85 \pm 0,35\%$) porém os outros pré-tratamentos obtiveram eficiências similares com diferenças menores que 1% (GULDHE et al., 2014a). A adição de clorofórmio aparentemente melhorou o processo de extração se compararmos com o resultado obtido neste trabalho utilizando apenas etanol ($11,05\% \pm 0,57$). Todavia, esta melhora não pode ser afirmada por se tratar de uma comparação entre cepas diferentes com diferentes acúmulos de lipídios. Além disso, não se pode deixar de avaliar as desvantagens relacionadas ao clorofórmio já relatadas, como maior toxicidade e maior custo.

Basily et al. (2018) testaram diversos solventes na proporção 1 g para 6 mL num procedimento de extração utilizando uma sonda ultrassônica (20 kHz) por 15 min a temperatura ambiente, dentre eles: clorofórmio/metanol (1:1), n-hexano e etanol. Os resultados indicaram que o etanol apresentou a melhor eficiência (7,6%) em relação ao clorofórmio/metanol (6,8%) e o n-hexano (5%). Ao comparar os resultados com este trabalho, pode-se supor que o aumento da temperatura, da proporção biomassa/solvente e o maior tempo de extração favoreceram a obtenção de melhores resultados, apesar dos estudos avaliarem cepas diferentes.

Após a análise da eficiência de extração com diferentes métodos assistidos por ultrassom, o perfil de ácidos graxos obtido por cada um deles também foi determinado para fins de comparação, como apresentado na Figura 25.

Figura 25 – Perfil de ácidos graxos dos métodos avaliados com as amostras de biomassa liofilizada.



Pode-se observar na Figura 25 que todos os métodos apresentaram os mesmos cinco ácidos graxos majoritários e grandes diferenças não foram apresentadas. A diferença mais significativa entre os perfis foi o aumento da concentração de ácido hexadecatrienóico (C16:3) nos métodos assistidos por ultrassom, especialmente quando se utiliza o n-hexano. Isso indica que a ruptura celular causada pela cavitação do ultrassom melhora a extração de lipídios que contêm esse ácido graxo. Consequentemente, a cepa LF01 deve armazenar o ácido hexadecatrienóico em estruturas mais intracelulares.

A identificação de FAMES obtida por cada método mostrou uma ligeira diferença entre eles. B&D apresentou a maior identificação (17,94%) seguido por clorofórmio/metanol (1:1 v/v) (16,68%), n-hexano (15,15%) e etanol (15,11%). Esses resultados sugerem que o clorofórmio e o metanol podem extrair mais lipídios transesterificáveis da cepa LF01. No entanto, o uso de solventes menos tóxicos consegue alcançar resultados comparáveis. Um estudo anterior determinou o perfil de ácidos graxos de *Scenedesmus* sp. usando n-hexano e também apresentou ácido linolênico (28,55%) e ácido palmítico (14,10%) como os dois principais componentes (SHIN et al., 2014). No entanto, o perfil observado por Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2017) apresentou o ácido oleico e o ácido palmítico como componentes principais, alternando suas concentrações de acordo com o meio de cultura. A mistura clorofórmio/metanol (1:1 v/v) foi testada por Lee et al. (2010) e o perfil apresentou ácido oleico (57,2%) e ácido linoleico (36,8%) como principais ácidos graxos no óleo. O perfil extraído por etanol foi analisado por Basily et al. (2018), apresentando ácido palmítico (42%) e ácido linoleico (13,5%) como principais constituintes.

4.1.3 Aplicações do óleo

O óleo de microalgas *Scenedesmus* sp. foi extensivamente estudado como uma matéria-prima alternativa para a produção de biodiesel (EL-SHEEKH et al., 2018; GULDHE et al., 2014a; SHIN et al., 2014; TRIPATHI; GUPTA; THAKUR, 2019; TRIPATHI; SINGH; THAKUR, 2015). Porém, a cepa LF01 apresentou um perfil de ácidos graxos que não se adequa a esta produção, conforme relata a literatura. De acordo com Singh et al. (2014), uma especificação da ASTM afirma que o teor de ácido linolênico no biodiesel não deve exceder 12%. Uma alta concentração desse ácido graxo pode diminuir a estabilidade à oxidação, exigindo maior adição de antioxidantes que, conseqüentemente, aumentam o custo do biodiesel. Outros requisitos para a produção de biodiesel de alta qualidade são alto teor de AGMI e baixo teor de AGPI. Conforme relatado pelo Departamento de Energia dos EUA, de acordo com Cao et al. (2014), uma composição ideal de biodiesel seria principalmente composta de AGMI porque eles promovem melhor fluidez a baixa temperatura e estabilidade oxidativa. Altas concentrações de AGPI no biodiesel diminuem a estabilidade e aumentam as emissões de óxido de nitrogênio, não atendendo às especificações para motores a diesel (KNOTHE, 2012). Portanto, o óleo da microalga *Scenedesmus* sp. LF01 não é uma matéria-prima adequada para a esta produção, considerando seu alto teor de ácido linolênico (> 30%), baixo teor de AGMI (<8%) e alto teor de AGPI (> 60%).

O perfil de ácidos graxos apresentado pela cepa LF01 a torna uma matéria-prima promissora para aplicações mais refinadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Dentre os cinco principais ácidos graxos em todos os perfis obtidos neste trabalho, o ácido palmítico (C16: 0) é o único que deve ser ingerido em doses mais controladas. Por ser um ácido graxo saturado, sua ingestão em grandes quantidades promove um aumento dos níveis de colesterol LDL no sangue, o que aumenta as chances de desenvolver doenças cardiovasculares (AGOSTONI; MORENO; SHAMIR, 2016). Os outros quatro ácidos graxos apresentam benefícios para a saúde humana já relatados na literatura: o ácido linolênico (C18:3), principalmente em sua configuração alfa, possui propriedades neuroprotetoras (BLONDEAU et al., 2015); o ácido linoleico (C18:2) tem efeitos anticarcinogênicos, antidiabéticos e antiateroscleróticos (KHANAL, 2004); o ácido hexadecatrienóico (C16: 3) exibe propriedades antibacterianas (DESBOIS et al., 2008); O ácido oleico (C18:1) promove efeitos benéficos contra o câncer, doenças autoimunes e inflamatórias, além de sua capacidade de facilitar a cicatrização de feridas (SALES-CAMPOS et al., 2013). Estes ácidos graxos podem ser utilizados para a síntese de lipídios funcionais que além de promoverem os benefícios à saúde

supracitados, podem ser aplicados para outras finalidades como os mono e diacilgliceróis que são utilizados como emulsificantes.

Na indústria de cosméticos, o uso de ácidos graxos e derivados inclui a produção de géis de limpeza, uso como aditivos para modificar as propriedades reológicas de suspensões e bastões, uso como emulsionantes para estabilizar emulsões e aplicação como aditivos para promover modificação da superfície da pele e do cabelo (KELM; WICKETT, 2017). Os ácidos graxos também podem ser aplicados em cremes anti-envelhecimento como um agente reafirmante da pele. O ácido linoleico, por exemplo, desempenha um papel importante na saúde da pele: normalizando seu metabolismo, fortalecendo a barreira lipídica da epiderme e protegendo contra a perda de água. Este ácido também auxilia a pele oleosa, melhorando o trabalho das glândulas sebáceas e desobstruindo os poros, proporcionando uma redução no número de cravos e espinhas (ZIELIŃSKA; NOWAK, 2014).

No geral, os ácidos das séries ω -6 e ω -3 podem diminuir a perda de água na pele, ativar a regeneração da barreira lipídica danificada da epiderme, curar inflamações e estabilizar o metabolismo da pele (BALIĆ et al., 2020). Portanto, todas as possíveis aplicações do óleo da cepa LF01 citadas neste trabalho incentivam a implementação de uma tecnologia de extração com baixa toxicidade, considerando que solventes tóxicos não são adequados para essa finalidade devido a exigências regulatórias.

Avaliando todos os métodos testados, a extração utilizando etanol assistido por ultrassom se apresenta como a metodologia mais viável, aliando baixa toxicidade e menor custo do solvente com eficiência e perfil de ácidos graxos favoráveis. Dessa forma, este método foi escolhido para ser otimizado através de um planejamento experimental visando avaliar a influência da temperatura e da razão solvente/biomassa no processo.

4.1.4 Otimização da Extração com Etanol

Um planejamento de experimentos 2^2 com quatro repetições no ponto central foi realizado para otimizar a extração assistida por ultrassom utilizando etanol. A Tabela 9 apresenta a eficiência de extração (% de biomassa seca) obtida por cada amostra. Boa reprodutibilidade foi observada nos resultados das repetições do ponto central. Um teste prévio foi realizado com a biomassa seca ao sol ao invés da liofilizada para verificar se uma redução nas etapas de processamento era possível para redução de custos. A eficiência de extração observada ($11,07 \pm 0,55\%$) foi semelhante ao da biomassa liofilizada ($11,05 \pm 0,57\%$), sugerindo que esses dois pré-tratamentos não apresentam resultados significativamente

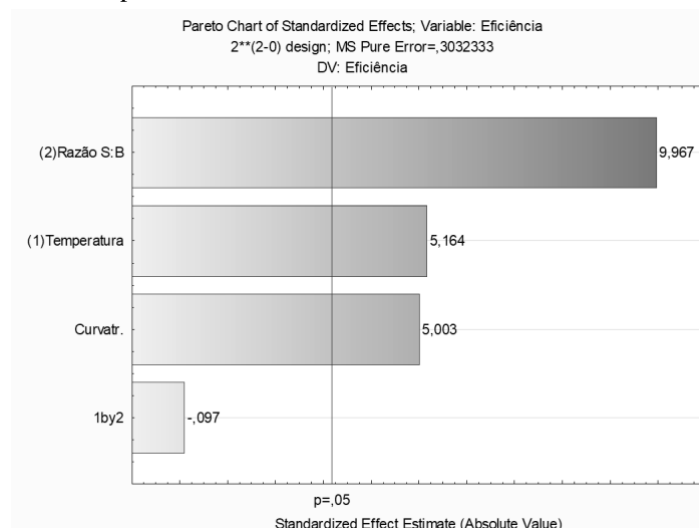
diferentes na aplicação da extração assistida por ultrassom com etanol. Portanto, todas as amostras analisadas no planejamento de experimentos consistiram na extração por 1 h da fração lipídica da biomassa seca ao sol.

Tabela 9 – Eficiência da extração com etanol para as amostras analisadas no planejamento experimental.

Amostra	Temperatura (°C)	Razão Solvente:Biomassa	Eficiência (%)
1	40	5	4,93
2	80	5	7,83
3	40	15	10,48
4	80	15	13,26
5 (C)	60	10	10,92
6 (C)	60	10	10,36
7 (C)	60	10	11,47
8 (C)	60	10	11,55

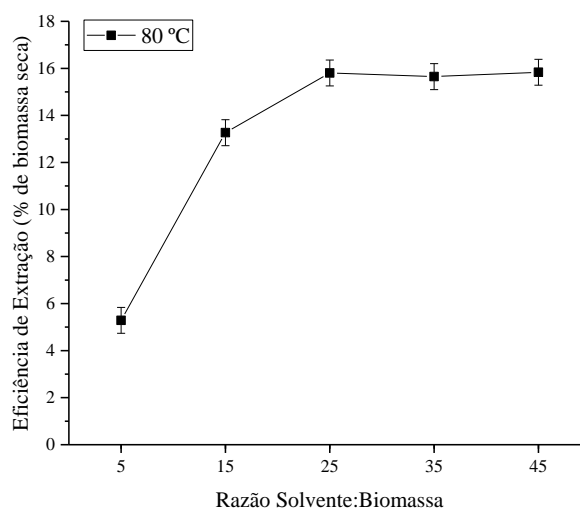
O gráfico de Pareto dos efeitos padronizados foi traçado para determinar a significância estatística de cada fator e realizar uma verificação de curvatura (Figura 26). Ambas as análises foram avaliadas com um nível de confiança de 95%. Pode-se observar que os dois fatores avaliados foram significativos para o processo e que o aumento de ambos favorece uma maior eficiência de extração. Vale a pena ressaltar que a razão solvente:biomassa influencia mais o resultado que a temperatura, visto que apresentou um coeficiente maior. Pelo teste de curvatura, pode-se concluir que o modelo linear proposto pelo planejamento não consegue representar os resultados do processo adequadamente, pois a região analisada apresentou uma curvatura significativa. Portanto, um modelo quadrático, através de um planejamento fatorial completo 3^2 ou o planejamento composto central rotacional, poderia ser proposto para obter as condições ótimas do processo, juntamente com um modelo apropriado para descrever os resultados.

Figura 26 – Gráfico de Pareto dos fatores avaliados na extração assistida por ultrassom utilizando etanol.



Todavia, o aumento da temperatura para valores próximos a 100 °C pode causar a degradação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes no óleo, conforme relatado na literatura (MOYA MORENO et al., 1999). Dessa forma, como a razão solvente:biomassa tem maior influência na eficiência, as razões de 25, 35 e 45 foram propostas para verificar o melhor resultado que pode ser alcançado mantendo a temperatura a 80 °C. A Figura 27 mostra o gráfico obtido com diferentes razões testadas. Pode-se observar que os resultados comprovam a curvatura observada no planejamento de experimentos.

Figura 27 – Eficiência com diferentes razões solvente:biomassa a 80 °C.



A eficiência de extração atingiu seu pico com a razão de 25 mL de solvente para 1 grama de biomassa, apresentando um valor de $15,80 \pm 0,55\%$. Este resultado foi maior do que a eficiência do método B&D para biomassa seca ao sol ($13,23 \pm 0,56\%$). Todavia, o método B&D possui a vantagem de extrair mais lipídios transesterificáveis devido à mistura de diferentes solventes utilizada (MENEGAZZO; FONSECA, 2019) e apresentou maior identificação de FAMES na amostra, como reportado na Tabela 10 que compara o perfil de ácidos graxos de ambos os métodos. Os resultados obtidos pelas razões solvente:biomassa de 35:1 e 45:1 não aumentaram a eficiência de extração logo não foram relatados em detalhes com relação ao perfil.

Os perfis de ácidos graxos apresentados pelos dois métodos não apresentaram diferenças significativas entre si. De fato, todas as amostras analisadas pelo planejamento experimental apresentaram perfis semelhantes ao da Tabela 10: C16: 0 ($27,22 \pm 0,48\%$), C16: 3 ($9,45 \pm 0,29\%$), C18: 1 ($5,73 \pm 0,07\%$), C18: 2 ($11,50 \pm 0,12\%$), C18: 3 ($39,23 \pm 0,40\%$) e outros ($6,86 \pm 1,14\%$). Isto indica que, na faixa estudada, a temperatura e a razão solvente:biomassa não influenciaram na seletividade dos ácidos graxos extraídos.

Tabela 10 – Comparação dos perfis de ácidos graxos pelo método Bligh & Dyer e pelo método com etanol

Ácido Graxo	B&D		ETOH+U (25:1)	
	% amostra	% perfil	% amostra	% perfil
C14:0	0	0	0	0
C14:1	0	0	0	0
C15:0	0,398	1,973	0,186	1,296
C16:0	5,536	27,442	3,961	27,544
C16:1 (cis)	0,101	0,503	0,109	0,755
C16:2	0,217	1,075	0,163	1,132
C16:3	1,244	6,168	1,397	9,713
C16:4	0,442	2,188	0,327	2,276
C18:0	0,372	1,845	0,113	0,786
C18:1 (cis)	1,412	7,002	0,832	5,789
C18:2 (cis)	2,947	14,609	1,657	11,520
C18:3 (gamma)	0,256	1,269	0,199	1,384
C18:3 (alpha)	7,012	34,762	5,436	37,804
C22:0	0,121	0,598	0	0
C24:0	0,114	0,567	0	0
Total	20,173	100	14,379	100
AGS	6,541	32,423	4,260	29,626
AGMI	1,514	7,504	0,941	6,544
AGPI	12,118	60,072	9,178	63,830
Eficiência	13,23 ± 0,56%		15,81 ± 0,55	

% amostra – percentual do total da massa analisada;

% perfil – percentual do total do perfil de ácidos graxos.

Wiyarno et al. (2010) estudaram a extração de lipídios da microalga *Nannochloropsis* sp. utilizando ultrassom e etanol através de um planejamento de experimentos avaliando os fatores: tempo, temperatura e razão solvente:biomassa. A condição ótima de temperatura reportada foi de 70 °C, sugerindo que o desempenho da extração de lipídios de microalgas com etanol é favorecido a temperaturas mais altas. De acordo com o estudo, temperaturas mais altas, desde que não degradem o material, contribuem para a aceleração da ruptura das células de microalgas, melhorando a eficiência do processo. O valor ótimo da razão solvente:biomassa foi de 10:1, sugerindo que este fator pode variar dependendo de qual cepa de microalga está sendo avaliada (WIYARNO; YUNUS; MEL, 2010).

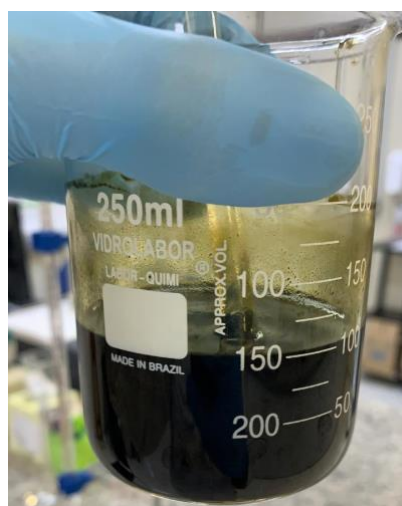
Nenhum estudo investigando a influência desses fatores na extração lipídica da microalga *Scenedesmus* sp. foi encontrado na literatura até a presente data. Apesar da maior identificação de FAMES obtida pelo método de B&D, a extração assistida por ultrassom da microalga *Scenedesmus* sp. LF01 utilizando etanol apresenta grande potencial para futuras aplicações. O uso de solventes tóxicos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética está

sendo regulamentado e os produtos de alto valor agregado podem futuramente compensar os custos adicionais relacionados à aplicação do ultrassom.

4.2 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

A composição de acilgliceróis do óleo bruto extraído pelo método assistido por ultrassom com etanol apresentou uma quantidade insignificante (0,24%) de monoacilgliceróis (MAG), 5,13% de diacilgliceróis (DAG), 17,21% de triacilgliceróis (TAG) e 77,42% de ácidos graxos livres (AGLs) + ésteres (Anexo A). No intuito de investigar a quantidade correspondente apenas aos ácidos graxos livres, a determinação pelo método titulométrico foi realizada (AOCS, 2004). Todavia, apesar do método se apresentar como adequado para óleo marinhos, não foi possível realizá-lo com o óleo bruto da cepa LF01 devido a coloração do mesmo (Figura 28) que impede a visualização do ponto de viragem da fenolftaleína no processo de titulação.

Figura 28 – Coloração do óleo bruto em etanol pré-titulação.



Fonte: Autor.

Segundo Branco et. al (2014), a realização prévia de um processo de purificação do óleo para remoção de pigmentos como a clorofila se faz necessária para possibilitar a determinação do teor de ácidos graxos do óleo bruto da microalga do gênero *Scenedesmus* pelo método titulométrico. Como o escopo deste trabalho foi avaliar o óleo bruto, a purificação do mesmo foi sugerida para trabalhos futuros.

O teor de TAGs da cepa LF01 foi considerado baixo em comparação com estudos sobre outras cepas de microalgas *Scenedesmus* sp. que relataram valores podendo atingir até 50% (HE et al., 2019; WANG et al., 2019; WU; YU; HU, 2014). Uma possível explicação para este baixo teor de TAG e alto teor de ácidos graxos livres foi discutida por Chen et al. (2012). Estes

autores avaliaram a influência da temperatura no armazenamento da biomassa por um dia e do tempo de armazenamento de 1 a 4 dias a temperatura de 4 °C.

De acordo com este estudo, a concentração de TAGs e ácidos graxos livres não se altera significativamente no armazenamento por 1 dia a -80 e -20 °C. Porém, a 4 °C mudanças significativas foram observadas, como a redução de 72,1% para 40,5% no teor de TAGs e um aumento no teor de ácidos graxos livres de um valor insignificante para 26,9% após 1 dia. O aumento no tempo de armazenamento da biomassa da microalga *Scenedesmus* sp. também reduziu ainda mais o teor de TAG. Após quatro dias de armazenamento a 4 °C, uma nova extração foi realizada e o óleo apresentou apenas 11,2% de TAG e 62% de ácidos graxos livres.

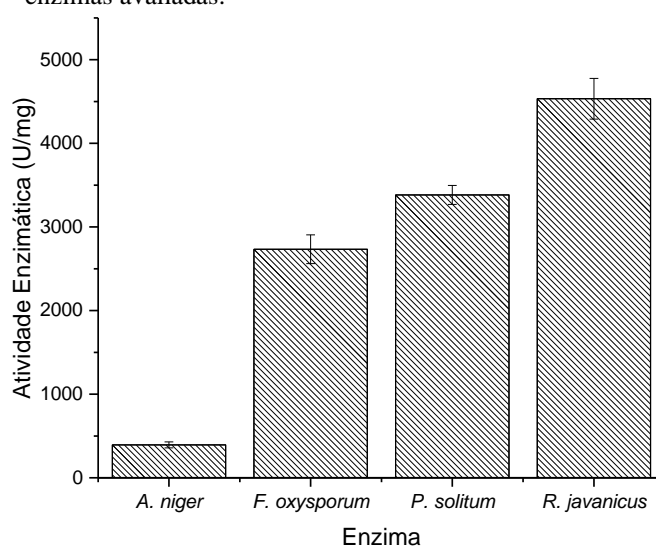
Dessa forma, os autores observaram que a diminuição de TAGs foi acompanhada por um aumento nos ácidos graxos livres, pois o conteúdo lipídico total permaneceu constante. Além disso, um aumento no conteúdo de DAGs foi observado, sendo uma prova da conversão de TAGs. Assim, os autores concluíram o estudo supondo que o aumento no teor de ácidos graxos livres foi produzido pela hidrólise dos TAGs, que possivelmente foram degradados por lipases, peroxidases e fosfolipases presentes nas células de microalga ou produzidas por microrganismos contaminantes presentes na biomassa (CHEN et al., 2012).

Como biomassa doada para este presente trabalho foi seca ao sol e mantida em refrigerador, a hipótese da hidrólise dos TAGs em ácidos graxos livres pode ser uma possível explicação para os resultados obtidos com a cepa LF01. Outra suposição para o grande percentual obtido pela faixa AGL + éster é a possível produção de etil ésteres durante o processo de extração devido à aplicação do ultrassom e à temperatura (RODRIGUES et al., 2009). Ambas hipóteses necessitam de maior investigação em trabalhos futuros.

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As atividades enzimáticas determinadas pelo método titulométrico estão apresentadas na Figura 29. Pode-se observar que a lipase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* apresentou a menor atividade ($393,33 \pm 35,28$ U.mg⁻¹), não sendo indicada para ser avaliada na promoção das reações enzimáticas. As atividades das enzimas dos fungos *Fusarium oxysporum* ($2733,33 \pm 172,13$ U.mg⁻¹) e *Penicillium solitum* ($3383,33 \pm 113,85$ U.mg⁻¹) se apresentaram consideravelmente maiores que a do *A. niger*. Todavia, a lipase do fungo *Rhizopus javanicus* se destacou com a maior atividade ($4533,33 \pm 243,43$ U.mg⁻¹) e, conseqüentemente, foi escolhida para ser aplicada nas reações de produção de lipídios funcionais. O Apêndice C apresenta os resultados e cálculos detalhados para cada amostra e suas replicatas.

Figura 29 – Resultado da atividade enzimática das quatro enzimas avaliadas.



Além da maior atividade, a lipase produzida pela espécie *R. javanicus* também apresenta outras características favoráveis, como sua estabilidade térmica que é mantida até 55 °C (KOBLOITZ; PASTORE, 2006; POGORI; XU; CHEIKHYOUSSEF, 2007), possibilitando investigar a melhor temperatura para o processo sem alterar a configuração enzimática e eficiência da catálise.

De acordo com Uyttenbroeck et al. (1993), esta enzima se mantém estável numa faixa de pH entre 4 e 8, abrangendo os valores mais utilizados nos diversos testes de reações enzimáticas reportados na literatura para produção de lipídios funcionais. Em seus estudos, Uyttenbroeck et al. (1993) avaliaram diversos métodos de purificação e obtiveram resultados de atividade enzimática similares ao reportado neste trabalho quando a purificação da lipase foi realizada por coluna CM-Sepharose (4330 U.mg⁻¹), procedimento de diálise (4229 U.mg⁻¹) e dispositivo de filtração Centriprep 10 (4248 U.mg⁻¹).

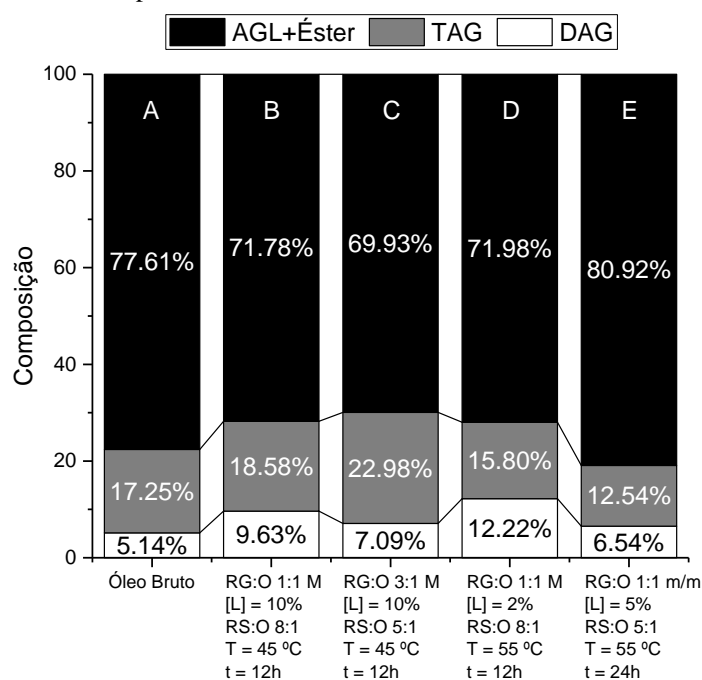
4.4 PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS FUNCIONAIS

Esta seção apresenta os resultados obtidos por cada rota enzimática no intuito de avaliar a aplicabilidade para o óleo bruto de microalga, dentro das condições estudadas. Para tanto, a enzima livre do fungo *Rhizopus javanicus* foi aplicada seguindo as metodologias de glicerólise, esterificação e etanólise com posterior análise por cromatografia gasosa (GC-FID) para avaliação dos produtos formados após o tempo de reação pré-determinado.

4.4.1 Glicerólise

A Figura 30 representa os resultados obtidos pelos métodos de glicerólise (B, C, D e E) em comparação com o óleo bruto (A). A produção de MAG não foi observada e o percentual de cada amostra não foi apresentado devido aos valores insignificantes ($< 0,5\%$). Pode-se observar que nas amostras B, C e D o número de AGL+Éster diminuiu, sugerindo que o excesso de ácidos graxos livres no meio pode ter direcionado a reação para a rota de esterificação de AGLs no glicerol ao invés da glicerólise de TAGs. Se a glicerólise de TAGs tivesse sido observada, o teor de AGL+Éster deveria ter se mantido constante e a porcentagem de TAGs deveria ter diminuído proporcionalmente ao aumento de DAGs e/ou MAGs. A amostra E apresentou um aumento na faixa AGL+Éster, sugerindo uma possível hidrólise dos TAGs presentes no óleo de microalga. Portanto, nenhuma metodologia testada foi capaz de apresentar resultados satisfatórios que indicam se a reação de glicerólise realmente ocorreu, logo, esta reação não é adequada para o óleo bruto e a enzima estudados neste trabalho.

Figura 30 – Resultados da metodologia de glicerólise para o óleo bruto da cepa LF01.



Wang et al. (2018) avaliaram a produção de diacilgliceróis ricos em DHA a partir do óleo da microalga *Schizochytrium* sp., atingindo resultados de até 50% da composição final dos produtos de reação, juntamente com uma produção de MAG significativa (em torno dos 30%). Uma possível explicação para o melhor rendimento desses autores em comparação com este trabalho pode ser a utilização de uma enzima comercial (Novozyme® 435) e a realização dos experimentos com um óleo de microalga purificado que foi adquirido pelos autores e mantido

a – 80 °C para evitar mudanças em sua composição. Dessa forma, uma separação dos TAGs presentes no óleo de microalga para remover componentes como clorofila, glicolipídios e fosfolipídios pode ser um caminho para a otimização desta reação. Além disso, outras enzimas devem ser testadas para exploração do potencial das mesmas para a promoção da glicerólise.

Comparando os resultados das diferentes metodologias, pode-se observar que o aumento na quantidade de glicerol e diminuição do uso de solvente entre as amostras B e C proporcionou uma maior esterificação para formação de TAGs. Entre as amostras B e D, pode-se constatar que a diminuição da concentração de enzima aliada ao aumento da temperatura favoreceu a produção de DAGs, evidenciando a importância do fator temperatura para o processo. O excesso de glicerol e o aumento na concentração de enzima da amostra E em relação a amostra D inibiu a esterificação e proporcionou uma maior hidrólise de TAGs para produzir AGLs. Isto se deve ao fato de que a presença excessiva de glicerol no sistema aumenta a viscosidade do meio de reação, ocasionando possíveis limitações de transferência de massa. Além disso, este excesso aumenta a polaridade do sistema e estudos comprovam que lipases em meios de reação polar tem uma atividade catalítica relativamente baixa devido ao efeito do glicerol na estabilidade da enzima (VOLL et al., 2011). Portanto, um planejamento de experimentos é uma alternativa viável para otimizar a quantidade de glicerol necessária para promover a maior formação de MAGs/DAGs sem interferir na viscosidade do sistema e estabilidade da enzima.

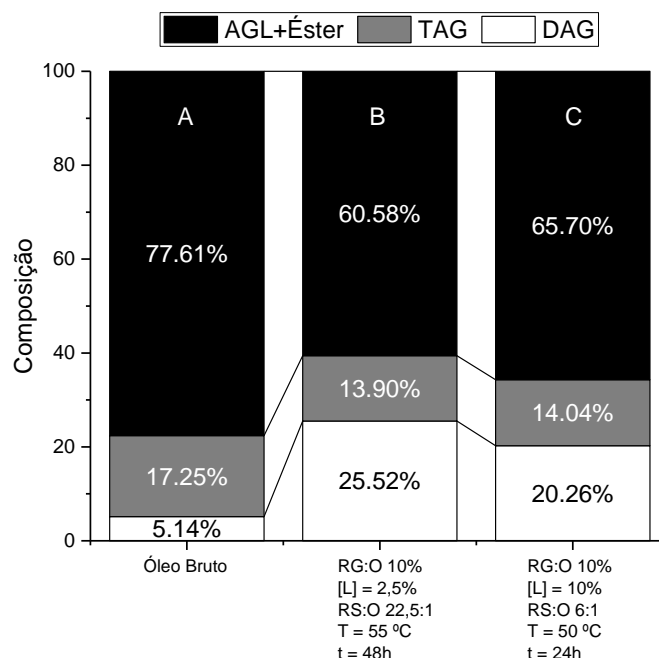
4.4.2 Esterificação

Os resultados obtidos através da aplicação de métodos de esterificação (B e C) em comparação com o óleo bruto (A) estão apresentados na Figura 31. Assim como na reação de glicerólise, a síntese de MAGs não foi observada e o percentual de cada amostra não foi apresentado devido aos valores insignificantes (< 1,0%). As amostras que foram submetidas às metodologias de esterificação apresentaram uma produção maior de DAGs do que as amostras de glicerólise apresentadas anteriormente. Isto é decorrente do elevado nível de ácidos graxos livres no meio que favorece métodos direcionados para a reação de esterificação.

A metodologia baseada em Medina et al. (1999) foi aplicada na amostra B e o resultado obtido para a produção de DAGs (25,52%) foi superior ao reportado pelos autores (17,3%) que trabalharam com ácidos graxos poli-insaturados livres da microalga *Porphyridium cruentum*. Entretanto, Medina et al. (1999) alcançaram altos níveis de esterificação para produção de TAGs (80%), o que não foi observado neste trabalho (13,90%). Os autores também não

reportaram uma produção significativa de MAGs com percentuais atingindo o máximo de 1,7%.

Figura 31 – Resultados da metodologia de esterificação para o óleo bruto da cepa LF01.



Um método baseado em Bhandari, Chaurasia e Dalai (2015) foi aplicado na amostra C e a produção de DAGs (20,26%) e o teor de TAGs (14,04%) foram similares a um dos experimentos realizados pelos autores (20,3% e 12,6%) onde utilizaram um concentrado de DHA na forma de ácidos graxos livres e a enzima comercial CAL-B (*Candida antarctica B* imobilizada em resina acrílica macro porosa). Todavia, os autores reportaram altos níveis de produção de MAGs (36,3%), o que não foi observado neste trabalho. Comparando as duas metodologias de esterificação, pode-se observar que o método de Medina et al. (1999) utiliza menos enzima, mais solvente no meio de reação e necessita de mais horas para atingir o resultado final. Já o método de Bhandari, Chaurasia e Dalai (2015) consegue um resultado semelhante na metade do tempo e com menor utilização de solvente mas, para isso, ele depende de uma maior quantidade de enzima. Todos essas parâmetros precisam ser avaliados por um viés técnico-econômico para se otimizar a produção de MAGs/DAGs utilizando o óleo de microalga.

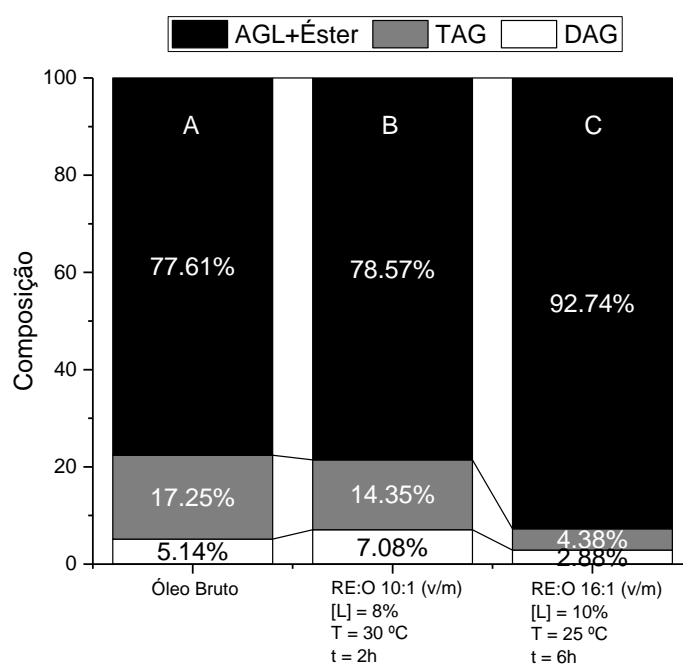
Avaliando os estudos utilizados como referência neste trabalho, pode-se supor que a produção de MAGs está de certa forma relacionada com a pureza do óleo investigado. Todos os estudos que observaram uma produção significativa de MAGs utilizaram óleos previamente purificados/concentrados enquanto que este trabalho e o de Medina et al. (1999), realizados

com óleos brutos/com poucas alterações, não atingiram produções maiores que 2%. Portanto, a separação da fração de TAGs e a purificação dos AGLs no óleo de microalga se apresentam como etapas necessárias para melhorar a eficiência da produção de MAGs por glicerólise e esterificação, respectivamente. Assim, ambas reações não foram consideradas viáveis para a aplicação no óleo bruto da microalga *Scenedesmus* sp. LF01.

4.4.3 Etanólise

A Figura 32 apresenta os resultados das reações de etanólise (B e C) em comparação com o óleo bruto (A). Os percentuais de MAG também foram omitidos por representarem valores insignificantes (< 0,3%) em comparação com o total da amostra. O método baseado nos estudos de Zhang et al. (2018b) representado pela amostra B não apresentou resultados significativos em comparação com o óleo bruto (A). A concentração de AGL+Éster se manteve praticamente constante e uma possível explicação para este resultado pode estar atrelada ao tempo de reação. Zhang et al. (2018b) realizaram a reação com uma enzima comercial (Lipozyme® 435) que usualmente apresenta maior eficiência em comparação com enzimas produzidas em laboratório, como as utilizadas nesse estudo. Dessa forma, pode-se supor que a enzima aplicada neste trabalho necessita de um maior tempo de reação para promover a etanólise e uma metodologia com maior tempo de duração foi testada.

Figura 32 – Resultados da metodologia de etanólise para o óleo bruto da cepa LF01.



A metodologia descrita por He et al. (2018) foi aplicada na amostra C e apresentou resultados promissores para produção de etil ésteres a partir do óleo de microalga. Apesar do método de cromatografia gasosa utilizado não distinguir os ácidos graxos livres (AGLs) dos ésteres, o aumento da concentração nesta faixa sugere um aumento na quantidade de etil ésteres. Supondo que a faixa AGL+Éster seja majoritariamente composta por etil ésteres, o resultado obtido neste trabalho se assemelhou ao estudo de He et al. (2018) que obteve eficiências em torno de 85 a 90%.

Este trabalho se mostrou mais eficiente em comparação com o estudo apresentado por De Almeida et al. (2018) que também avaliou uma cepa de microalga do gênero *Scenedesmus* (83% de eficiência em 24h), atingindo uma maior conversão em menor tempo. A maior razão etanol:óleo pode ser uma possível explicação para o melhor resultado, visto que He et al. (2018) relataram uma melhora na eficiência da reação quando este parâmetro era maximizado. Todavia, vale ressaltar que uma análise mais específica para distinguir os AGLs dos etil ésteres produzidos é necessária para confirmar a eficiência da reação apresentada por este trabalho.

Dentre as rotas enzimáticas testadas com o óleo bruto da microalga *Scenedesmus* sp. LF01, a etanolise representa a rota mais promissora pois indica um maior rendimento em comparação com a glicerólise e a esterificação, com menor tempo de reação e temperatura. O perfil de ácidos graxos da amostra C foi analisado para verificar possíveis alterações após a reação. Nenhuma mudança significativa foi observada em comparação com os perfis analisados em seções anteriores e a amostra C apresentou os ácidos α -linolênico – C18:3 (35,74%), palmítico – C16:0 (29,63%), linoleico – C18: 2 (11,78%), hexadecatrienoico – C16: 3 (10,29%) e oleico – C18: 1 (6,22%), como principais constituintes.

Portanto, o óleo bruto da cepa LF01 é uma matéria-prima propícia para produção de etil ésteres de AGPIs, especialmente ricos em α -linolênico, um ácido graxo que promove benefícios para saúde humana (SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA et al., 2014) e é pouco encontrado em óleos vegetais. Alves et al. (2019) analisaram 21 óleos vegetais comerciais comprados no mercado brasileiro e apenas o óleo de linhaça apresentou uma quantidade considerável deste ácido graxo (46,5%), com o resto das amostras não obtendo valores maiores de 6%.

A formulação de produtos nutracêuticos/farmacêuticos a partir do óleo de microalga e de seus etil ésteres abre o caminho para uma nova rota de exploração com alto valor agregado para esta matéria-prima. Remédios formulados a partir de etil ésteres de ácidos ômega 3 já são comercializados no mercado e o desenvolvimento desta produção com o óleo de microalgas se apresenta como uma alternativa promissora para expandir este setor da bioeconomia.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados discutidos neste trabalho em conjunto com os dados já descritos na literatura, pode-se concluir que:

- O pré-tratamento de ruptura celular por autoclave não foi eficiente para a cepa estudada, obtendo eficiência de extração similar à da biomassa liofilizada;
- A biomassa após secagem ao sol apresentou a menor eficiência de extração e este resultado pode estar associado a menor eficiência na remoção de umidade;
- Nenhuma diferença significativa entre os perfis de ácidos graxos das amostras com diferentes pré-tratamentos e métodos de extração foi observada, evidenciando que a microalga *Scenedesmus* sp. LF01 é uma fonte de AGPI rica em ácido α -linolênico (C18:3);
- A aplicação do ultrassom em técnicas de extração auxilia na redução da quantidade de solvente utilizada. A extração do óleo de microalga utilizando etanol assistido por ultrassom é um método promissor obtendo resultados comparáveis ao método B&D. Os fatores temperatura e razão solvente:biomassa são significativos para o processo de extração, com o segundo exercendo uma maior influência sobre os resultados;
- O óleo da cepa LF01 apresentou um baixo teor de triacilgliceróis e alto percentual de ácidos graxos livres + ésteres em comparação a literatura;
- A lipase livre do fungo *Rhizopus javanicus* apresentou a maior atividade enzimática e foi considerada a mais adequada para aplicação nas rotas enzimáticas;
- Indícios de que a reação de glicerólise enzimática ocorreu não foram observados e isto se deve ao elevado teor de ácidos graxos livres que direcionam a enzimas a favor da reação de esterificação;
- A esterificação enzimática apresentou resultados comparáveis com a literatura em relação a produção de DAGs, porém nenhuma síntese de MAGs foi observada. Isto sugere que o óleo bruto pode apresentar componentes que interferem na reação;
- A etanólise enzimática representou a rota mais favorável para aplicação do óleo bruto, explorando uma nova forma de valorização deste matéria-prima através da produção de etil ésteres ricos em ácidos ômega 3.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos experimentos realizados, algumas ações foram sugeridas para dar continuidade a este trabalho, tais como:

- Testar métodos de remoção da clorofila presente no óleo bruto para possibilitar a titulação dos ácidos graxos livres;
- Investigar a interferência do tempo de armazenamento da biomassa na composição do óleo, devido ao baixo teor de TAGs apresentado;
- Investigar a possível produção de etil ésteres durante o processo de extração;
- Fazer uma análise técnico-econômico avaliando os custos da aplicação do ultrassom e o valor de mercado dos bioprodutos obtidos;
- Avaliar métodos de purificação do óleo bruto para separação da fração de triacilgliceróis;
- Realizar as rotas enzimáticas testadas com enzimas comerciais para verificar se rendimentos maiores com o óleo bruto são possíveis;
- Aplicar um método de caracterização capaz de quantificar a fração de ésteres e ácidos graxos livres separadamente, como a cromatografia líquida de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC);
- Otimizar os parâmetros de etanólise enzimática através de um planejamento experimental.

REFERÊNCIAS

ABDEL GHALY, M. A. HATTAB. Microalgae Oil Extraction Pre-treatment Methods: Critical Review and Comparative Analysis. **Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications**, v. 05, n. 04, 2015.

ABEDI, E.; SAHARI, M. A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. **Food Science and Nutrition**, v. 2, n. 5, p. 443–463, 2014.

ABOMOHRRA, A. E.-F. et al. Enhancement of biodiesel yield and characteristics through in-situ solvo-thermal co-transesterification of wet microalgae with spent coffee grounds. **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124640, mar. 2021.

AGOSTONI, C.; MORENO, L.; SHAMIR, R. Palmitic Acid and Health: Introduction. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 12, p. 1941–1942, 2016.

AGUILERA-OVIEDO, J. et al. Sustainable synthesis of omega-3 fatty acid ethyl esters from monkfish liver oil. **Catalysts**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2021.

AKOH, C. C. **Handbook of Functional Lipids**. 1. ed. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

ALABDULKARIM, B.; BAKEET, Z. A. N.; ARZOO, S. Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. **Journal of King Saud University - Science**, v. 24, n. 4, p. 319–329, out. 2012.

ALAM, M. A.; XU, J.-L.; WANG, Z. (EDS.). **Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products**. Singapore: Springer Singapore, 2020.

ALONSO, D. L. et al. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 5, p. 461–471, jun. 2000.

ALVES, A. Q. et al. The fatty acid composition of vegetable oils and their potential use in wound care. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 32, n. 8, p. 1–8, 2019.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: AOCS Press, 2004.

ARAÚJO, G. S. et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 95–98, 2013.

ARCHANAA, S.; MOISE, S.; SURAIHKUMAR, G. K. Chlorophyll interference in microalgal lipid quantification through the Bligh and Dyer method. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 805–808, 2012.

ARNAULD, S. et al. Modulation of the hepatic fatty acid pool in peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase B-null mice exposed to the selective PPARalpha agonist Wy14,643. **Biochimie**, v. 91, n. 11–12, p. 1376–1386, 2009.

ARNESON, W.; BRICKELL, J. **Clinical chemistry: A laboratory perspective**. Philadelphia:

F.A. Davis Co., 2007.

ASTM D6584-17, Standard Test Method for Determination of Total Monoglycerides, Total Diglycerides, Total Triglycerides, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2017, www.astm.org

BAEZA-JIMÉNEZ, R. et al. Lipase-catalyzed glycerolysis of fish oil to obtain diacylglycerols. **Grasas y Aceites**, v. 64, n. 3, p. 237–242, 2013.

BAEZA-JIMÉNEZ, R.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. X.; GARCÍA, H. S. Biocatalytic modification of food lipids: Reactions and applications. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 13, n. 1, p. 29–47, 2014.

BALIĆ, A. et al. Omega-3 versus Omega-6 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of inflammatory skin diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 2020.

BASILY, H. et al. Extraction of algal lipid as a natural cosmetic component. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 17, n. 1, p. 13, 2018.

BAUMGÄRTNER, T. R. DA S. et al. Different methods for extracting oil from the microalga *Scenedesmus accuminatus* for biodiesel production. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 10, p. 441–445, 2012.

BENAMOUN, L.; AFZAL, M. T.; LÉONARD, A. Drying of alga as a source of bioenergy feedstock and food supplement – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1203–1212, out. 2015.

BERMUDEZ-SIERRA, J. J. EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. COM DIFERENTES MISTURA DE SOLVENTES ORGÂNICOS. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 16, n. 2, p. 88–98, 2018.

BHANDARI, K.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Lipase-Catalyzed Esterification of Docosahexaenoic Acid-Rich Fatty Acids with Glycerol. **Chemical Engineering Communications**, v. 202, n. 7, p. 920–926, 2015.

BHATTACHARYA, M.; GOSWAMI, S. Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, n. December 2019, 2020.

BLASBALG, T. L. et al. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 5, p. 950–962, 2011.

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.

BLONDEAU, N. et al. Alpha-linolenic acid: An omega-3 fatty acid with neuroprotective properties - Ready for use in the stroke clinic? **BioMed Research International**, v. 2015, n. Figure 1, 2015.

BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. **Enzyme and**

Microbial Technology, v. 17, p. 578–586, 1995.

BORNSCHEUER, U. T. **Enzymes in Lipid Modification**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

BRANCO, K. B. Z. F. et al. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Scenedesmus accuminatus* VISANDO À PRODUÇÃO DE BIODIESEL**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, XX. **Anais...** Florianópolis: 2014

BREIL, C. et al. “Bligh and Dyer” and Folch methods for solid–liquid–liquid extraction of lipids from microorganisms. Comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1–21, 2017.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BREUER, G. et al. Analysis of fatty acid content and composition in microalgae. **Journal of visualized experiments : JoVE**, v. 5, n. 80, p. 1–9, 2013.

BRODIE, J.; ZUCCARELLO, GIUSEPPE C. Systematics of the species-rich algae: Red algal classification, phylogeny and speciation. In: HODKINSON, T. R.; PARNELL, J. A. N. (Eds.). **Reconstructing the Tree of Life**. 1. ed. ed. London: CRC Press, 2007. p. 323–336.

BROWN, M. R. et al. EFFECTS OF HARVEST STAGE AND LIGHT ON THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE DIATOM THALASSIOSIRA PSEUDONANA1. **Journal of Phycology**, v. 32, n. 1, p. 64–73, fev. 1996.

BUX, F. **Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products**. Boca Raton: CRC Press, 2013.

CAO, Y. et al. Production of free monounsaturated fatty acids by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

CARVALHO, M. et al. Effective complete replacement of fish oil by combining poultry and microalgae oils in practical diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 529, p. 735696, dez. 2020.

CASTEJÓN, N. et al. Synthesis of omega-3 ethyl esters from chia oil catalyzed by polyethylene glycol-modified lipases with improved stability. **Food Chemistry**, v. 271, p. 433–439, jan. 2019.

CASTEJÓN, N.; SEÑORÁNS, F. J. Enzymatic modification to produce health-promoting lipids from fish oil, algae and other new omega-3 sources: A review. **New Biotechnology**, v. 57, n. March, p. 45–54, 2020.

CHEMAT, F. et al. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. **Molecules**, v. 24, n. 16, 2019.

CHEN, C. L.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Dewatering and Drying Methods for Microalgae. **Drying Technology**, v. 33, n. 4, p. 443–454, 2015.

CHEN, L. et al. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic

conversion. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 208–214, 2012.

CHEN, M. et al. Preparation of reduced graphene oxide porous beads for lipase immobilization and its application for oil adsorption and glycerolysis reaction in situ. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 294, n. September 2019, p. 109920, 2020.

CHISTI, Y. Society and Microalgae: Understanding the Past and Present. In: LEVINE, I. A.; FLEURENCE, J. (Eds.). . **Microalgae in Health and Disease Prevention**. 1 ed. ed. London: Elsevier, 2018. p. 11–21.

CHO, S. C. et al. Enhancement of lipid extraction from marine microalga, *Scenedesmus* associated with high-pressure homogenization process. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

CHRISTIE, W. W. **High-performance liquid chromatography and lipids: a practical guide**. 1. ed. New York: Pergamon Press, 1987.

COLLAÇO, A. C. A. et al. Development of an integrated process involving palm industry co-products for monoglyceride/diglyceride emulsifier synthesis: Use of palm cake and fiber for lipase production and palm fatty-acid distillate as raw material. **Lwt**, v. 135, n. August 2020, p. 110039, 2021.

COONEY, M.; YOUNG, G.; NAGLE, N. Extraction of Bio-oils from Microalgae. **Separation & Purification Reviews**, v. 38, n. 4, p. 291–325, dez. 2009.

CORZO-MARTÍNEZ, M. et al. Production of a bioactive lipid-based delivery system from ratfish liver oil by enzymatic glycerolysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 311–322, 2016.

CRUZ-HERNANDEZ, C. et al. Monoacylglycerol-enriched oil increases EPA / DHA delivery to circulatory system in humans with induced lipid malabsorption conditions. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 12, p. 2208–2216, 2016.

DAMSTRUP, M. L. et al. Solvent Optimization for Efficient Enzymatic Monoacylglycerol Production Based on a Glycerolysis Reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 8, p. 559–564, 2005.

DE ALMEIDA, G. F. et al. Fatty acid ethyl esters from microalgae of *scenedesmus ecornis* by enzymatic and acid catalysis. **Quimica Nova**, v. 41, n. 1, p. 1–4, 2018.

DE JESUS, S. S. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. **Renewable Energy**, v. 143, p. 130–141, 2019.

DESBOIS, A. P. et al. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 755–764, 2008.

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

DESMORIEUX, H.; DECAEN, N. Convective drying of spirulina in thin layer. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 4, p. 497–503, fev. 2005.

DOGDU OKCU, G.; TUNACAN, T.; DIKMEN, E. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of lipid and biomass production in *Scenedesmus* sp. **Environmental Research and Technology**, v. 2, n. 3, 30 set. 2019.

EL-SHEEKH, M. et al. Screening of different species of *Scenedesmus* isolated from Egyptian freshwater habitats for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 129, p. 114–120, 2018.

EN14103:2011 “Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester content”, European Committee for Standardization, Management Centre: Avenue Marnix 17: B-1000 Brussels.

EN14105:2011-07 “Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, and triglyceride contents”, European Committee for Standardization, Management Centre: Avenue Marnix 17: B-1000 Brussels.

ESCORSIM, A. M. et al. Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids using a mixture of ethanol and hexane as solvent. **Biomass and Bioenergy**, v. 108, n. January 2017, p. 470–478, 2018.

ESPERÓN-ROJAS, A. A. et al. Structured mono- and diacylglycerols with a high content of medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, v. 66, n. 9, p. 991–996, 2017.

EUGLENA. **What is Euglena?** Disponível em: <<https://www.euglena.jp/whatis Euglena/>>. Acesso em: 9 mar. 2021.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 5, p. 337–364, 2005.

FAHY, E. et al. Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 11, p. 637–647, 2011.

FELTES, M. M. C. et al. The Production , Benefits , and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 17–35, 2013.

FERREIRA, G. F. et al. Microalgal biomass as a source of polyunsaturated fatty acids for industrial application: A mini-review. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, n. December 2018, p. 163–168, 2019a.

FERREIRA, G. F. et al. A review on lipid production from microalgae : Association between cultivation using waste streams and fatty acid pro fi les. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 109, n. April, p. 448–466, 2019b.

FERREIRA, G. F. et al. Biomass and lipid characterization of microalgae genera *Botryococcus*, *Chlorella*, and *Desmodesmus* aiming high-value fatty acid production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 1, 2019c.

FERRETTI, C. A. et al. Monoglyceride synthesis by glycerolysis of methyl oleate on solid acid – base catalysts. **Chemical Engineering Journal**, v. 161, p. 346–354, 2010.

FLORENTINO DE SOUZA SILVA, A. P. et al. Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae. **Renewable Energy**, v. 63, p. 762–766, 2014.

FON SING, S. et al. Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of

a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: A novel protocol for commercial microalgal biomass production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 47–54, jun. 2014.

FREGOLENTE, P. B. L. et al. Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1–3, p. 165–172, 2008.

FREITAS, L. et al. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 87–90, 2010.

GENTILI, F. G.; FICK, J. Algal cultivation in urban wastewater: an efficient way to reduce pharmaceutical pollutants. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 255–262, 3 fev. 2017.

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, 2014a.

GULDHE, A. et al. Synthesis of biodiesel from *Scenedesmus* sp. by microwave and ultrasound assisted in situ transesterification using tungstated zirconia as a solid acid catalyst. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1503–1511, ago. 2014b.

GUNSTONE, F. D. **Fatty Acid and Lipid Chemistry**. Berlim: Springer, 1996.

GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 12, p. 1535–1549, 1999.

GUNSTONE, F. D. **Modifying Lipids for Use in Food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. **The Lipid Handbook**. 3^o Edition ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

GUNSTONE, F. D.; HERSLÖF, B. G. **Lipid Glossary 2**. Bridgwater: Woodhead Publishing, 2000.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N. **Lipid Biochemistry**. 5. ed. Oxford: Blackwell Science, 2002.

GYAMFI, D.; OFORI AWUAH, E.; OWUSU, S. Classes, Nomenclature, and Functions of Lipids and Lipid-Related Molecules and the Dietary Lipids. In: **The Molecular Nutrition of Fats**. London: Elsevier, 2019. p. 3–16.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 7, p. 475–476, 1973.

HAVRIUSHENKO, K. O.; UDOVENKO, O. O.; GLADKIY, F. F. THE TECHNOLOGY OF MODIFICATION OF FATS (ACYLGLYCEROLS) BY CHANGING THE COMPOSITION OF THE ALKYL GROUP. **Nauka i studia**, v. 209, n. 7, p. 44–58, 2020.

HE, Y. et al. The near-ideal catalytic property of *Candida antarctica* lipase A to highly concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via one-step ethanolysis of triacylglycerols. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 466–478, 2016.

- HE, Y. et al. Synthesis of novel medium-long-medium type structured lipids from microalgae oil via two-step enzymatic reactions. **Process Biochemistry**, v. 68, p. 108–116, 2018.
- HE, Y. et al. Comparison of fatty acid composition and positional distribution of microalgae triacylglycerols for human milk fat substitutes. **Algal Research**, v. 37, n. November 2018, p. 40–50, 2019.
- HEO, H. Y.; HEO, S.; LEE, J. H. Comparative Techno-Economic Analysis of Transesterification Technologies for Microalgal Biodiesel Production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 40, p. 18772–18779, 2019.
- HO, S. et al. Perspectives on microalgal CO₂ -emission mitigation systems — A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 189–198, 2011.
- HODSON, L.; SKEAFF, C. M.; CHISHOLM, W. A. H. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 908–915, 2001.
- HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, maio 2008.
- HUA, L. et al. Effects of anodic oxidation of a substoichiometric titanium dioxide reactive electrochemical membrane on algal cell destabilization and lipid extraction. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 112–117, mar. 2016.
- JACOB-LOPES, E. et al. **Handbook of Microalgae-Based Processes and Products**. London: Academic Press - Elsevier, 2020.
- JOSHI, D. R.; ADHIKARI, N. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 28, n. 3, p. 1–18, 2019.
- KAEWTHONG, W. et al. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1525–1530, 2005.
- KANG, Z. et al. A cost analysis of microalgal biomass and biodiesel production in open raceways treating municipal wastewater and under optimum light wavelength. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 109–118, 2015.
- KAPOORE, R. et al. Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery. **Biology**, v. 7, n. 1, p. 18, 2018.
- KATIYAR, R.; ARORA, A. Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. **Algal Research**, v. 46, p. 101800, mar. 2020.
- KELM, G. R.; WICKETT, R. R. **The Role of Fatty Acids in Cosmetic Technology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- KERIS-SEN, U. D. et al. An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 407–413, 2014.
- KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.

KHANAL, R. C. Potential health benefits of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1315–1328, 2004.

KLEIN, B. C. et al. Low carbon biofuels and the New Brazilian National Biofuel Policy (RenovaBio): A case study for sugarcane mills and integrated sugarcane-microalgae biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, n. February, p. 109365, 2019.

KNOTHE, G. Fuel properties of highly polyunsaturated fatty acid methyl esters. Prediction of fuel properties of algal biodiesel. **Energy and Fuels**, v. 26, n. 8, p. 5265–5273, 2012.

KOBA, K.; YANAGITA, T. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 8, n. 6, p. e525–e532, 2014.

KORKHOVOY, V.; TSARENKO, P.; BLUME, Y. Genetically Engineered Microalgae for Enhanced Biofuel Production. **Current Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 256–265, 7 nov. 2016.

KRIS-ETHERTON, P. et al. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 179S-188S, 1 jan. 2000.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, n. 21, p. 2747–2757, 2002.

KUCMANOVÁ, A.; GERULOVÁ, K. Microalgae Harvesting: A Review. **Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology**, v. 27, n. 44, p. 129–143, 1 jun. 2019.

KUIPERS, R. S. et al. Fetal intrauterine whole body linoleic, arachidonic and docosahexaenoic acid contents and accretion rates. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 86, n. 1–2, p. 13–20, 2012.

KUKSIS, A. **Fatty Acids and Glycerides**. New York: Springer, 1978.

KUO, C.-H. et al. Synthesis of DHA/EPA Ethyl Esters via Lipase-Catalyzed Acidolysis Using Novozym® 435: A Kinetic Study. **Catalysts**, v. 10, n. 5, p. 565, 19 maio 2020.

LARSOON, K. et al. **Lipids: Structure, physical properties and functionality**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006.

LARSSON, K. et al. **Lipids: Structure, Physical Properties and Functionality**. Bridgwater: Oily Press, 2006.

LASZLO, J. A.; COMPTON, Æ. D. L.; VERMILLION, K. E. Acyl Migration Kinetics of Vegetable Oil 1,2-Diacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 307–312, 2008.

LE THI, T. X. et al. Separation and Enrichment of Omega 3, 6, and 9 Fatty Acids from the By-Products of Vietnamese Basa Fish Processing using Deep Eutectic Solvent. **Journal of Chemistry**, v. 2018, 2018.

LEE, J. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S75–S77, 2010.

- LEE, S. Y. et al. Techniques of lipid extraction from microalgae for biofuel production: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 231–251, 2021.
- LI, Y. et al. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 14, p. 1–9, 2014.
- LIANG, Y.; MAI, K. Effect of growth phase on the fatty acid compositions of four species of marine diatoms. **Journal of Ocean University of China**, v. 4, n. 2, p. 157–162, abr. 2005.
- LIBONG, D. et al. Lipid Analysis with the Corona CAD. In: **Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 221–287.
- LIU, J. et al. Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 2127–2137, 2012.
- LO, S.-K. et al. Diacylglycerol Oil — Properties , Processes and Products : A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 223–233, 2008.
- MAKI, K. C. et al. Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 1230–1236, 2002.
- MAMTANI, K.; SHAHBAZ, K.; FARID, M. M. Glycerolysis of free fatty acids: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. xxxx, p. 110501, 2020.
- MEDINA, A. R. et al. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 35, n. C, p. 379–391, 1999.
- MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. **Encyclopedia of Food Chemistry**. Cambridge: Elsevier, 2019.
- 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, n. January, p. 87–107, 2019.
- MIMOUNI, V. et al. Lipids From Microalgae. In: LEVINE, I. A.; FLEURENCE, J. (Eds.). . **Microalgae in Health and Disease Prevention**. 1 ed. ed. London: Elsevier, 2018. p. 109–131.
- MINIHANE, A. M.; LOVEGROVE, J. A. **Health benefits of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2006.
- MINOLETTI, F.; HERMOSO, M.; GRESSIER, V. Separation of sedimentary micron-sized particles for palaeoceanography and calcareous nannoplankton biogeochemistry. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 14–24, 11 jan. 2009.
- MIRIZADEH, S. et al. Repetitive non-destructive extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* grown under stress conditions. **Bioresource Technology**, v. 326, p. 124798, abr. 2021.
- MORAIS, W. G. et al. Microalgae for biotechnological applications : Cultivation , harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, v. 528, n. January, p. 735562, 2020.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. D.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639–648, 2009.

MOYA MORENO, M. C. M. et al. Analytical evaluation of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 50, n. 2, p. 269–275, 1999.

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.

NAYAK, M.; KAREMORE, A.; SEN, R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. **Algal Research**, v. 16, p. 216–223, jun. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th Ed. ed. New York: W. H. Freeman, 2004.

NICOLAOU, A.; KOKOTOS, G. **Bioactive Lipids**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004.

NITBANI, F. O. et al. Reaction Path Synthesis of Monoacylglycerol from Fat and Oils. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 35, n. 1, p. 126–136, 2015.

ODJADJARE, E. C.; MUTANDA, T.; OLANIRAN, A. O. Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 37–52, 2 jan. 2017.

OSAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G.; RAGAZZI, S. Cibele Cristina Osawa* e Lireny Ap. Guaraldo Gonçalves. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 593–599, 2006.

OSÓRIO, N. M. et al. Interesterification of fat blends rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids catalysed by immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase under high pressure. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52–53, n. 1–4, p. 58–66, 2008.

PALACIOS, D. et al. Lipase-catalyzed glycerolysis of anchovy oil in a solvent-free system: Simultaneous optimization of monoacylglycerol synthesis and end-product oxidative stability. **Food Chemistry**, v. 271, n. July 2018, p. 372–379, 2019.

PANDEY, A.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, S. Isolation, screening and comprehensive characterization of candidate microalgae for biofuel feedstock production and dairy effluent treatment: A sustainable approach. **Bioresource Technology**, v. 293, p. 121998, dez. 2019.

PATEL, A. et al. Biodiesel production from microalgae *Dunaliella tertiolecta*: a study on economic feasibility on large-scale cultivation systems. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 6 jan. 2021.

PAVITHRA, K. G. et al. Microalgae for biofuel production and removal of heavy metals: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 1905–1923, 8 nov. 2020.

PHUAH, E. et al. Review on the Current State of Diacylglycerol Production Using Enzymatic Approach. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 6, p. 1169–1186, 2015.

- PRAJAPATI, H. N.; DALRYMPLE, D. M.; SERAJUDDIN, A. T. M. A Comparative Evaluation of Mono-, Di- and Triglyceride of Medium Chain Fatty Acids by Lipid / Surfactant / Water Phase Diagram, Solubility Determination and Dispersion Testing for Application in Pharmaceutical Dosage Form Development. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 285–305, 2012.
- PRAVST, I. Oleic Acid: Production, Uses and Potential Health Effects. In: WHELAN, L. (Ed.). **Oleic Acid: Production, Uses and Potential Health Effects**. 1. ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014. p. 35–54.
- RAJAH, K. K. **Fats in Food Technology**. 2. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2014.
- RAJARAM, S. Health benefits of plant-derived α -linolenic acid. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. suppl_1, p. 443S-448S, 1 jul. 2014.
- RAJESH BANU, J. et al. Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy-techno economic and life-cycle analysis. **Bioresource Technology**, v. 302, n. November 2019, p. 122822, 2020.
- RAM, S.; PALIWAL, C.; MISHRA, S. Growth medium and nitrogen stress sparked biochemical and carotenogenic alterations in *Scenedesmus* sp. CCNM 1028. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. March, p. 100194, 2019.
- RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, V. S. Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 2979–2985, 2010.
- RAROKAR, N. R. et al. Progress in Synthesis of Monoglycerides for Use in Food and Pharmaceuticals. **Journal of Food and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 13–19, 2017.
- RODRIGUES, S. et al. Optimization of the production of ethyl esters by ultrasound assisted reaction of soybean oil and ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 2, p. 361–366, jun. 2009.
- ROS, E. Linoleic acid intake and reduction in mortality: The icing on the cake of health benefits from n-6 PUFAs? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 112, n. 1, p. 3–4, 2020.
- RUMIN, J. et al. **A bibliometric analysis of microalgae research in the world, Europe, and the European Atlantic area**. [s.l: s.n.]. v. 18
- SALES-CAMPOS, H. et al. An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201–210, 2013.
- SANDERS, T. A. B. Introduction: The Roles of Fats in Human Diet. In: **Functional Dietary Lipids**. London: Elsevier, 2016. p. 1–20.
- SATI, H. et al. Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. **Algal Research**, v. 38, n. January, p. 101413, 2019.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, maio 1998.
- SHIN, H. Y. et al. Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. **Fuel**, v. 130, p. 66–69, 2014.

SHOW, K.-Y.; LEE, D.-J.; MUJUMDAR, A. S. Advances and Challenges on Algae Harvesting and Drying. **Drying Technology**, v. 33, n. 4, p. 386–394, 12 mar. 2015.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic diseases. **Forum of nutrition**, v. 56, p. 67–70, 2003.

SINGH, B. et al. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 216–245, 2014.

SINGH, S.; KATE, B. N.; BANERJEE, U. C. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 73–95, 10 jan. 2005.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Enhancement of total lipid yield by nitrogen, carbon, and iron supplementation in isolated microalgae. **Journal of Phycology**, v. 53, n. 4, p. 855–868, 2017.

SOKOŁA-WYSOCZAŃSKA, E. W. A. et al. Characteristics of polyunsaturated fatty acids ethyl esters with high alpha-linolenic acid content as a component of biologically active health-promoting supplements. **Przemysł Chemiczny**, v. 93, n. 11, p. 1923–1927, 2014.

SOLAESA, Á. G. et al. Kinetic study and kinetic parameters of lipase-catalyzed glycerolysis of sardine oil in a homogeneous medium. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 4, p. 596–606, 2016a.

SOLAESA, Á. G. et al. Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation. **Food Chemistry**, v. 190, p. 960–967, 2016b.

SOLTANI, J. Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. London: Elsevier, 2016. p. 275–292.

SOLUTEX. **Vegan DHA Monoglyceride**. Disponível em: <<https://solutecorp.com/products/next-gen/monoglyceride/>>. Acesso em: 9 mar. 2021.

SPERB, J. G. C. et al. Simultaneous production of biosurfactants and lipases from *Aspergillus Niger* and optimization by response surface methodology and desirability functions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 857–868, 2018.

STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIČKOVIĆ, A. V.; VELJKOVIĆ, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3141–3155, 2011.

STANKIEWICZ, E. H.; ANDRADE, L. F.; DOMINGUES, L. L. **Levantamento ficológico do Rio Iguaçu, algas unicelulares I**. 1 ed. ed. Curitiba: Surhema, 1981.

STARK, A. H.; CRAWFORD, M. A.; REIFEN, R. Update on alpha-linolenic acid. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 6, p. 326–332, 2008.

SUBROTO, E. Monoacylglycerols and diacylglycerols for fat-based food products: A review. **Food Research**, v. 4, n. 4, p. 932–943, 2020.

- SUN, J. et al. Microalgae biodiesel production in China: A preliminary economic analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 104, n. December 2018, p. 296–306, 2019.
- SUN, S.; WANG, G.; WANG, P. A cleaner approach for biodegradable lubricants production by enzymatic glycerolysis of castor oil and kinetic analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 188, p. 530–535, 2018.
- SUN, X.-M. et al. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 272, 4 dez. 2018.
- SÜNDERMANN, A.; EGGERS, L. F.; SCHWUDKE, D. Liquid Extraction: Bligh and Dyer. In: **Encyclopedia of Lipidomics**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p. 1–4.
- TAHER, H. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 57–66, 2014.
- TAKASE, H. Metabolism of diacylglycerol in humans. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 398–403, 2007.
- TANG, D. Y. Y. et al. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. **Bioresource Technology**, v. 304, n. February, p. 122997, 2020.
- THOMPSON, G. A. Lipids and membrane function in green algae. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1302, n. 1, p. 17–45, jul. 1996.
- TO, T. Q. et al. Low cost ionic liquid–water mixtures for effective extraction of carbohydrate and lipid from algae. **Faraday Discussions**, v. 206, p. 93–112, 2018.
- TRAVERSIER, M. et al. **Polar lipids in cosmetics: recent trends in extraction, separation, analysis and main applications**. [s.l: s.n.]. v. 17
- TRIPATHI, R.; GUPTA, A.; THAKUR, I. S. An integrated approach for phycoremediation of wastewater and sustainable biodiesel production by green microalgae, *Scenedesmus* sp. ISTGA1. **Renewable Energy**, v. 135, p. 617–625, 2019.
- TRIPATHI, R.; SINGH, J.; THAKUR, I. S. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 74, p. 774–781, 2015.
- TSAVATOPOULOU, V. D.; ARAVANTINO, A. F.; MANARIOTIS, I. D. Biofuel conversion of *Chlorococcum* sp. and *Scenedesmus* sp. biomass by one- and two-step transesterification. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 11 dez. 2019.
- UYTTENBROECK, W. et al. Molecular characterization of an extracellular acid-resistant lipase produced by *Rhizopus javanicus*. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 374, n. 1–6, p. 245–254, 1993.
- VALENZUELA, A.; DELPLANQUE, B.; TAVELLA, M. Stearic acid: A possible substitute for trans fatty acids from industrial origin. **Grasas y Aceites**, v. 62, n. 2, p. 131–138, 2011.
- VALENZUELA, R.; VALENZUELA, A. Overview About Lipid Structure. In: **Lipid Metabolism**. London: InTech, 2013. p. 3–20.

- VALÉRIO, A. et al. Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 7, p. 805–812, 2010.
- VÉRON, B.; DAUGUET, J.-C.; BILLARD, C. Sterolic biomarkers in marine phytoplankton. I. Free and conjugated sterols of *Pavlova lutheri* (Haptophyta). **European Journal of Phycology**, v. 31, n. 3, p. 211–215, ago. 1996.
- VOLL, F. et al. Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 107–115, 2011.
- WANDERS, R. J. A.; KOMEN, J.; KEMP, S. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. **FEBS Journal**, v. 278, n. 2, p. 182–194, 2011.
- WANG, S. et al. Comparative lipidomic studies of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) and *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) reveal their differences in lipid production under nitrogen starvation. **Journal of Phycology**, v. 55, n. 6, p. 1246–1257, 2019.
- WANG, W. et al. Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 192–196, 2011.
- WANG, X. et al. Synthesis of docosapentaenoic acid-enriched diacylglycerols by enzymatic glycerolysis of *Schizochytrium* sp. oil. **Bioresource Technology**, v. 262, n. April, p. 278–283, 2018.
- WANG, X. et al. Immobilized MAS1 lipase-catalyzed synthesis of N-3 pufa-rich triacylglycerols in deep eutectic solvents. **Journal of Oleo Science**, v. 70, n. 2, p. 227–236, 2021.
- WEE, L. H. et al. Synthesis of Monoglycerides by Esterification of Oleic Acid with Glycerol in Heterogeneous Catalytic Process Using Tin – Organic Framework Catalyst. **Catalysis Letters**, v. 143, p. 356–363, 2013.
- WHITEHURST, R. J. **Emulsifiers in Food Technology**. Northampton: Blackwell Publishing, 2004.
- WIYARNO, B.; YUNUS, R. M.; MEL, M. Ultrasound Extraction Assisted (UEA) of Oil from Microalgae (*Nannochloropsis* sp.). **International Journal of Science Engineering and Technology**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2010.
- WU, Y. H.; YU, Y.; HU, H. Y. Effects of Initial Phosphorus Concentration and Light Intensity on Biomass Yield per Phosphorus and Lipid Accumulation of *Scenedesmus* sp. LX1. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 3, p. 927–934, 2014.
- YAN, X. et al. Enzymatic ethanolysis of fish oil for selective concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) with flexible production of corresponding glycerides and ethyl esters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 8, p. 2399–2405, 2018.
- YE, S. et al. Simultaneous wastewater treatment and lipid production by *Scenedesmus* sp. HXY2. **Bioresource Technology**, v. 302, n. January, p. 1–7, 2020.
- YU, X. et al. Investigations on cell disruption of oleaginous microorganisms: Hydrochloric acid digestion is an effective method for lipid extraction. **European Journal of Lipid Science and**

Technology, v. 117, n. 5, p. 730–737, maio 2015.

YUSOFF, M. F. M.; XU, X.; GUO, Z. Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: A review on processing and production requirements. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 4, p. 525–531, 2014.

ZHANG, T. Y. et al. Inhibitory effects of soluble algae products (SAP) released by *Scenedesmus* sp. LX1 on its growth and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 643–648, 2013.

ZHANG, Y. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp. **Renewable Energy**, v. 125, p. 1049–1057, 2018a.

ZHANG, Y. et al. Synthesis of 2-docosaheptaenoylethylglycerol by enzymatic ethanolysis. **Bioresource Technology**, v. 251, n. October 2017, p. 334–340, 2018b.

ZHANG, Y. et al. Successful isolation of a tolerant co-flocculating microalgae towards highly efficient nitrogen removal in harsh rare earth element tailings (REEs) wastewater. **Water Research**, v. 166, p. 115076, dez. 2019.

ZHAO, X. et al. Ultrasonic pretreatment promotes diacylglycerol production from lard by lipase-catalysed glycerolysis and its physicochemical properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, n. May, p. 11–18, 2018.

ZHONG, N. et al. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production. **Food Chemistry**, v. 271, n. March 2018, p. 739–746, 2019a.

ZHONG, N. et al. Enzymatic Production of Diacylglycerols from High-Acid Soybean Oil. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 96, n. 8, p. 967–974, 2019b.

ZIELIŃSKA, A.; NOWAK, I. Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. **Chemik**, v. 68, n. 2, p. 103–110, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – CÁLCULO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO OBTIDA NOS DIFERENTES ENSAIOS

Tabela A1 – Cálculo da média e desvio padrão da eficiência de extração obtida pelo método Bligh & Dyer a partir da amostra seca ao sol.

Amostra	Peso Biomassa Seca (mg)	Peso Tubo (g)	Peso Final (g)	Peso Extrato (mg)	Eficiência (% biomassa seca)
BD1	125,9	40,0222	40,0379	15,7	12,4702
BD2	125,8	39,9847	40,0021	17,4	13,8315
BD3	125,3	40,1534	40,17	16,6	13,2482
BD4	125,7	40,0533	40,0701	16,8	13,3652
Média	125,6750	-	-	16,6250	13,2288
Desvio Padrão	0,2630	-	-	0,7042	0,5650

Tabela A2 – Cálculo da média e desvio padrão da eficiência de extração obtida pelo método Bligh & Dyer a partir da amostra após autoclave e secagem em estufa.

Amostra	Peso Biomassa Seca (mg)	Peso Tubo (g)	Peso Final (g)	Peso Extrato (mg)	Eficiência (% biomassa seca)
BDR1	125,3	43,6302	43,6515	21,3	12,4702
BDR2	125,5	44,0825	44,1022	19,7	13,8315
BDR3	125,9	44,2848	44,3055	20,7	13,2482
BDR4	126,0	44,531	44,5508	19,8	13,3652
Média	125,6750	-	-	20,375	16,2131
Desvio Padrão	0,3304	-	-	0,7632	0,6285

Tabela A3 – Cálculo da média e desvio padrão da eficiência de extração obtida pelo método Bligh & Dyer a partir da amostra liofilizada.

Amostra	Peso Biomassa Seca (mg)	Peso Tubo (g)	Peso Final (g)	Peso Lipídios (mg)	Eficiência (% biomassa seca)
BDL1	125,6	40,1682	40,1880	19,8	15,7643
BDL2	125	40,2916	40,3105	18,9	15,1200
BDL3	125,7	40,3005	40,3186	18,1	14,3994
BDL4	125,4	40,2736	40,2927	19,1	15,2313
Média	125,4250	-	-	18,9750	15,1287
Desvio Padrão	0,3096	-	-	0,6994	0,5617

Tabela A4 – Cálculo da média e desvio padrão da eficiência de extração obtida pelo método com n-hexano assistido por ultrassom a partir da amostra liofilizada.

Amostra	Peso Biomassa Seca (mg)	Peso Tubo (g)	Peso Final (g)	Peso Extrato (mg)	Eficiência (% biomassa seca)
HU1	1003,1	39,9194	39,9795	60,1	5,9914
HU2	1004,6	40,0526	40,1183	65,7	6,5399
HU3	1004,1	39,7069	39,778	71,1	7,0810
HU4	1005,3	40,7265	40,7842	57,7	5,7396
Média	1004,2750	-	-	63,6500	6,3380
Desvio Padrão	0,9251	-	-	5,9919	0,5975

Tabela A5 – Cálculo da média e desvio padrão da eficiência de extração obtida pelo método com clorofórmio:metanol (1:1) assistido por ultrassom a partir da amostra liofilizada.

Amostra	Peso Biomassa Seca (mg)	Peso Tubo (g)	Peso Final (g)	Peso Extrato (mg)	Eficiência (% biomassa seca)
CMU1	1,0035	44,2754	44,4181	0,1427	14,2202
CMU2	1,0032	44,6831	44,833	0,1499	14,9422
CMU3	1,0026	39,6265	39,7792	0,1527	15,2304
CMU4	1,0052	40,4318	40,5861	0,1543	15,3502
Média	1,0036	-	-	0,1499	14,9357
Desvio Padrão	0,0011	-	-	0,0051	0,5068

Tabela A6 – Cálculo da média e desvio padrão da eficiência de extração obtida pelo método com etanol assistido por ultrassom a partir da amostra liofilizada.

Amostra	Peso Biomassa Seca (mg)	Peso Tubo (g)	Peso Final (g)	Peso Extrato (mg)	Eficiência (% biomassa seca)
ELU1	1,0028	39,9055	40,0227	0,1172	11,6873
ELU2	1,0034	39,7466	39,8584	0,1118	11,1421
ELU3	1,0038	39,712	39,8155	0,1035	10,3108
ELU4	1,0041	40,0669	40,1781	0,1112	11,0746
Média	1,0035	-	-	0,1109	11,0537
Desvio Padrão	0,0006	-	-	0,0056	0,5661

Tabela A7 – Cálculo da média e desvio padrão da eficiência de extração obtida pelo método com etanol assistido por ultrassom a partir da amostra seca ao sol.

Amostra	Peso Biomassa Seca (mg)	Peso Tubo (g)	Peso Final (g)	Peso Extrato (mg)	Eficiência (% biomassa seca)
ESU1	1,0045	40,5082	40,6179	0,1097	10,9209
ESU2	1,0008	39,4923	39,596	0,1037	10,3617
ESU3	1,0029	39,7179	39,8329	0,115	11,4667
ESU4	1,0045	40,2695	40,3855	0,116	11,5480
Média	1,0032	-	-	0,1111	11,0743
Desvio Padrão	0,0018	-	-	0,0057	0,5507

APÊNDICE B – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DETALHADO PARA CADA AMOSTRA DE ÓLEO DE MICROALGA

Tabela B1 – Perfis de ácidos graxos das amostras com diferentes pré-tratamentos pelo método Bligh & Dyer.

Ácido Graxo	Seca ao Sol		Autoclave + Estufa		Liofilização	
	% amostra	% perfil	% amostra	% perfil	% amostra	% perfil
C14:0	0	0	0,0627	0,3554	0	0
C14:1	0	0	0,0584	0,3308	0	0
C15:0	0,3979	1,9725	0,4115	2,3314	0,4678	2,6073
C16:0	5,5356	27,4415	5,3324	30,2127	5,0718	28,2671
C16:1 (cis)	0,1014	0,5026	0,1033	0,5853	0,0966	0,5382
C16:2	0,2168	1,075	0,202	1,1448	0,2152	1,1996
C16:3	1,2443	6,1684	1,2758	7,2283	1,0734	5,9823
C16:4	0,4415	2,1884	0,3711	2,1029	0,4441	2,4753
C18:0	0,3722	1,845	0,3305	1,8725	0,214	1,1926
C18:1 (cis)	1,4124	7,0017	1,0184	5,7704	0,9782	5,4521
C18:2 (cis)	2,947	14,6092	1,855	10,5103	2,0349	11,3412
C18:3 (gamma)	0,256	1,2691	0,2337	1,3243	0,2547	1,4193
C18:3 (alpha)	7,0124	34,7622	5,7479	32,5672	6,8952	38,4297
C20:0	0	0	0,0953	0,5402	0	0
C20:1 (cis)	0	0	0,1041	0,5899	0	0
C20:3 (cis)	0	0	0,1045	0,5923	0	0
C20:4	0	0	0,1198	0,679	0	0
C22:0	0,1206	0,5977	0,1034	0,5858	0,0984	0,5486
C24:0	0,1143	0,5666	0,1194	0,6766	0,0981	0,5466
Total	20,1725	100	17,6494	100	17,9424	100
Principais	18,4077	91,2521	15,4632	87,6132	16,3082	90,8917
Outros	1,7647	8,7478	2,186	12,3869	1,6342	9,1082
AGS	6,5406	32,4233	6,4552	36,5746	5,9501	33,1622
AGMI	1,5138	7,5043	1,2842	7,2764	1,0748	5,9903
AGPI	12,118	60,0723	9,9098	56,1491	10,9175	60,8474

% amostra – percentual do total da massa analisada;

% perfil – percentual do total do perfil de ácidos graxos.

Tabela B2 – Perfis de ácidos graxos da amostra liofilizada com diferentes métodos de extração assistidos por ultrassom.

Ácido Graxo	N-hexano		Clorofórmio/Metanol (1:1)		Etanol	
	% amostra	% perfil	% amostra	% perfil	% amostra	% perfil
C14:0	0	0	0	0	0,0527	0,3490
C14:1	0	0	0	0	0	0
C15:0	0,7772	5,1302	0,6179	3,7049	0,1981	1,3110
C16:0	3,6303	23,9635	4,4615	26,7513	4,2316	28,0020
C16:1 (cis)	0,0807	0,5327	0,1225	0,7345	0,0816	0,5402
C16:2	0,1566	1,0336	0,1773	1,0633	0,1690	1,1186
C16:3	2,0423	13,4811	1,7927	10,7490	1,5207	10,0633
C16:4	0,3032	2,0017	0,3477	2,0850	0,3128	2,0698
C18:0	0,1076	0,7105	0,1329	0,7967	0,1191	0,7881
C18:1 (cis)	0,8139	5,3726	0,9652	5,7877	0,8802	5,8245
C18:2 (cis)	1,6762	11,0644	1,8597	11,1508	1,6772	11,0986
C18:3 (gamma)	0,2006	1,3242	0,2172	1,3023	0,1466	0,9702
C18:3 (alpha)	5,3606	35,3854	5,9830	35,8744	5,3032	35,0936
C20:0	0	0	0	0	0	0
C20:1 (cis)	0	0	0	0	0,0590	0,3907
C20:3 (cis)	0	0	0	0	0,1044	0,6906
C20:4	0	0	0	0	0,1050	0,6948
C22:0	0	0	0	0	0,0816	0,5403
C24:0	0	0	0	0	0,0687	0,4546
Total	15,1493	100	16,6775	100	15,1117	100
Principais	13,7239	90,5912	15,2792	91,6156	13,7595	91,0522
Outros	1,4253	9,4087	1,3983	8,3844	1,3522	8,9478
AGS	4,5151	29,8042	5,2122	31,2529	4,7519	31,4450
AGMI	0,8946	5,9053	1,0877	6,5222	1,0209	6,7554
AGPI	9,7395	64,2904	10,3776	62,2249	9,3390	61,7996

% amostra – percentual do total da massa analisada;

% perfil – percentual do total do perfil de ácidos graxos.

APÊNDICE C – CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Tabela C1 – Cálculo da atividade com a enzima do fungo *Aspergillus niger* utilizando uma solução de NaOH (10mM).

Amostra (5mg)	Volume	Va - Vb	U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹
Branco	11,2	-	-	-
1	14,1	2,9	1933,3333	386,6667
2	14,4	3,2	2133,3333	426,6667
3	14,3	3,1	2066,6667	413,3333
4	13,8	2,6	1733,3333	346,6667
Média	-	-	1966,6667	393,3333
Desvio Padrão	-	-	176,3834	35,2767

Tabela C2 – Cálculo da atividade com a enzima do fungo *Fusarium oxysporum* utilizando uma solução de NaOH (50mM).

Amostra (5mg)	Volume	Va - Vb	U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹
Branco	2,6	-	-	-
1	6,4	3,8	12666,6667	2533,3333
2	6,8	4,2	14000	2800
3	7	4,4	14666,6667	2933,3333
4	6,6	4	13333,3333	2666,6667
Média	-	-	13666,6667	2733,3333
Desvio Padrão	-	-	860,6630	172,1326

Tabela C3 – Cálculo da atividade com a enzima do fungo *Penicillium solitum* utilizando uma solução de NaOH (50mM).

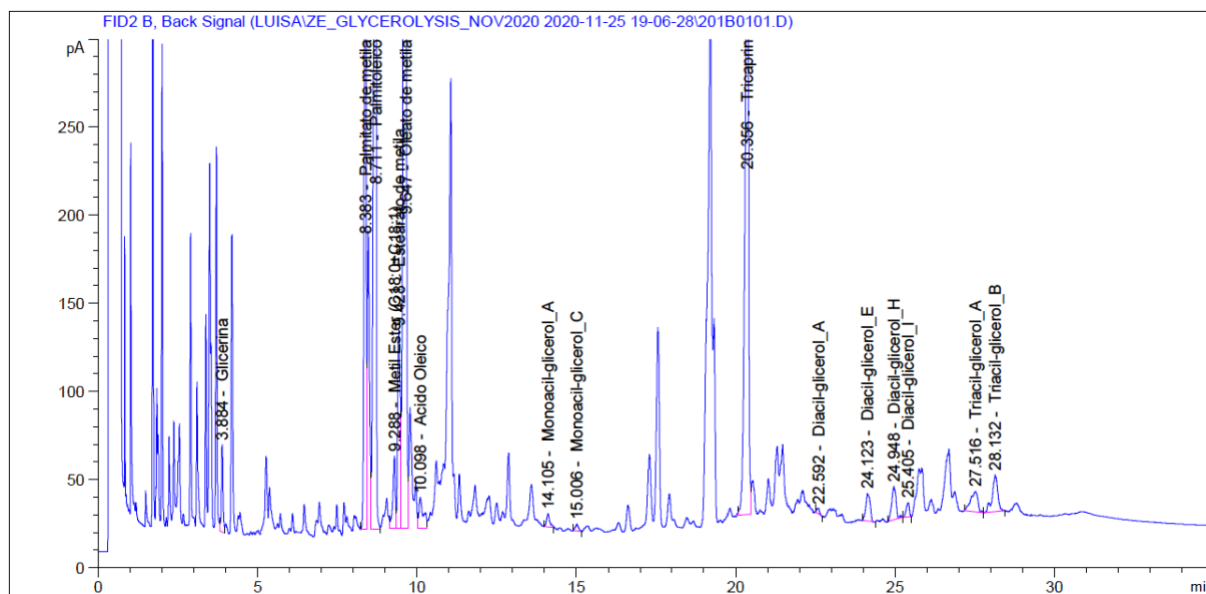
Amostra (5mg)	Volume	Va - Vb	U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹
Branco	2,9	-	-	-
1	7,8	4,9	16333,3333	3266,6667
2	8,2	5,3	17666,6667	3533,3333
3	7,9	5	16666,6667	3333,3333
4	8	5,1	17000	3400
Média	-	-	16916,6667	3383,3333
Desvio Padrão	-	-	569,2750	113,8550

Tabela C4 – Cálculo da atividade com a enzima do fungo *Rhizopus javanicus* utilizando uma solução de NaOH (50mM).

Amostra (5mg)	Volume	Va - Vb	U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹
Branco	2,80	-	-	-
1	9,40	6,60	22000	4400
2	9,20	6,40	21333,3333	4266,6667
3	10,00	7,20	24000	4800
4	9,80	7,00	23333,3333	4666,6667
Média	-	-	22666,6667	4533,3333
Desvio Padrão	-	-	1217,1612	243,4322

ANEXOS

ANEXO A – CROMATOGRAMA DO PERFIL DE ACILGLICERÓIS DO ÓLEO BRUTO OBTIDO PELO METÓDO COM ETANOL ASSISTIDO POR ULTRASSOM



ISTD Percent Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Tuesday, December 22, 2020 19:57 PM
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Sample Amount: : 30.20000 [mg]
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Sample ISTD Information:

ISTD ISTD Amount Name
 # [mg]

1 1.00000e-1 Butanotriol
 2 8.00000e-1 Tricaprin

RetTime [min]	Type	ISTD used	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount %	Grp	Name
3.884	VV	1	162.78151	0.00000	0.000000		Glicerina
4.594		1	-	-	-		Butanotriol
8.383	BV	2	2232.82935	3.63911e-1	0.755250	4	Palmitato de metila
8.711	VB	2	4301.27002	3.63911e-1	1.454896	4	Palmitoleico
9.288	VV	2	222.88722	3.63911e-1	0.075391	4	Metil Ester (C18:0+C18:1)
9.428	VV	2	650.97028	3.63911e-1	0.220189	4	Estearato de metila
9.647	VV	2	6681.64453	3.63911e-1	2.260053	4	Oleato de metila
10.098	VV	2	172.43570	2.89388e-1	0.046382	4	Acido Oleico
14.105	BB	2	53.75132	0.00000	0.000000	1	Monoacil-glicerol_A
14.465		2	-	-	-	1	Monoacil-glicerol_B
15.006	BB	2	24.09017	6.57087e-1	0.014713	1	Monoacil-glicerol_C
20.356	BV	I	2849.98438	1.00000	2.649007		Tricaprin

22.592	BB	2	15.32028	8.77211e-1	0.012491	2	Diacil-glicerol_A
23.030		2	-	-	-	2	Diacil-glicerol_B
23.664		2	-	-	-	2	Diacil-glicerol_C
23.796		2	-	-	-	2	Diacil-glicerol_D
24.123	BB	2	143.70313	8.77211e-1	0.117168	2	Diacil-glicerol_E
24.288		2	-	-	-	2	Diacil-glicerol_F
24.590		2	-	-	-	2	Diacil-glicerol_G
24.948	BB	2	180.64522	8.77211e-1	0.147289	2	Diacil-glicerol_H
25.405	BV	2	51.30767	8.77211e-1	0.041834	2	Diacil-glicerol_I
27.516	BV	2	177.36810	2.68814	0.443167	3	Triacil-glicerol_A
28.132	VB	2	250.86630	2.68814	0.626808	3	Triacil-glicerol_B
29.113		2	-	-	-	3	Triacil-glicerol_C
29.487		2	-	-	-	3	Triacil-glicerol_D
30.297		2	-	-	-	3	Triacil-glicerol_E
30.877		2	-	-	-	3	Triacil-glicerol_F
31.568		2	-	-	-	3	Triacil-glicerol_G
33.127		2	-	-	-	3	Triacil-glicerol_H

Totals without ISTD(s) : 6.215632

Group summary :

Group ID	Use	Area [pA*s]	Amount %	Group Name
1	G	77.84149	1.47131e-2	Monoacilglicerois
2	G	390.97630	0.318783	Diacilglicerois
3	G	428.23441	1.069975	Triacilglicerois
4	G	1.42620e4	4.812161	Acidos Graxos e Esteres