



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LAENNE BARBARA SILVA DE MORAES

**USO DE MÉTODOS FÍSICOS NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO LIPÍDICA DE
Haematococcus pluvialis PRODUZIDA EM CULTIVO MIXOTRÓFICO VISANDO A
OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS E ASTAXANTINA DA BIOMASSA RESIDUAL**

**Recife
2019**

LAENNE BARBARA SILVA DE MORAES

**USO DE MÉTODOS FÍSICOS NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO LIPÍDICA DE
Haematococcus pluvialis PRODUZIDA EM CULTIVO MIXOTRÓFICO VISANDO A
OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS E ASTAXANTINA DA BIOMASSA RESIDUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ranilson Bezerra

Coorientadora: Profa. Dra. Danielli Dantas

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Gálvez

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Moraes, Laenne Barbara Silva de

Uso de métodos físicos na otimização da extração lipídica de *Haematococcus pluvialis* produzida em cultivo mixotrófico visando a obtenção de proteínas e astaxantina da biomassa residual / Laenne Barbara Silva de Moraes. – 2019.

74 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson Bezerra.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Danielli Dantas.

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Gálvez.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2019.

Inclui referências e anexo.

1. Algas. 2. Lipídios. 3. Proteínas. I. Bezerra, Ranilson (orientador). II. Dantas, Danielli (coorientadora). III. Gálvez, Alfredo (Coorientador). III. Título.

579.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 – 194

LAENNE BARBARA SILVA DE MORAES

**USO DE MÉTODOS FÍSICOS NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO LIPÍDICA DE
Haematococcus pluvialis PRODUZIDA EM CULTIVO MIXOTRÓFICO VISANDO A
OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS E ASTAXANTINA DA BIOMASSA RESIDUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 25/02/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof.^a. Dr.^a Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr. Thiago Barbosa Cahú

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico esta dissertação aos meus pais pelo apoio incondicional em toda minha formação e ao meu irmão, pela grande amizade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me permitir fazer tudo o que fiz até aqui.

À minha família e amigos, por todo amor, apoio e ensinamentos.

À UFPE e UFRPE, por conceder as condições necessárias para uma boa formação.

Ao orientador, Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, pelo acolhimento e apoio nesse período de mestrado.

Ao coorientador, Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez, pela confiança desde o primeiro período da graduação e ensinamentos em todo o processo.

À coorientadora, Profa. Dra. Danielli Dantas, por toda colaboração.

À Profa. Dra. Ana Mendonça Melo do Laboratório de Radiobiologia, pela contribuição.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, por todo conhecimento compartilhado.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pela disponibilidade para realização das análises, principalmente aos pesquisadores: Carolina Malafaia, Túlio Silva e Isaac Martins.

Ao Laboratório de Enzimologia pela disponibilidade e contribuições.

Ao Laboratório de Produção de Alimento Vivo e todos os que passaram por lá, deixando sua contribuição e amizade.

Aos órgãos de fomento, FACEPE, CNPq e CAPES, pela concessão da bolsa e suporte financeiro, essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram no decorrer dessa jornada.

RESUMO

A microalga *Haematococcus pluvialis* tem despertado grande interesse pelo seu conteúdo celular, principalmente astaxantina e lipídios, sendo comumente cultivada para produção de biocombustível, contudo, para que essa produção seja sustentável faz-se necessário o uso de métodos de extração lipídica eficientes e o aproveitamento da biomassa residual. O presente estudo tem como objetivo avaliar métodos de pré-tratamento para a extração de lipídios e analisar a biomassa residual da microalga *H. pluvialis*. A microalga foi cultivada em sistema mixotrófico e semi-contínuo, sendo inoculadas a 10% do volume, partindo de tubos de ensaio de 40 mL até volumes de 20L, tendo seu crescimento acompanhado através de microscópio óptico, coletando-se a biomassa na fase de macrozoóide (vegetativa) e aplanósporo (cística). Essas amostras foram centrifugadas (3500 g por 15 minutos) e liofilizadas, sendo determinada a produtividade em biomassa seca e submetidas à extração lipídica. A extração ocorreu por método químico, utilizando como solvente o clorofórmio:metanol, e teve como métodos de pré-tratamento: biomassa com clorofórmio:metanol sob ultrassom (BCMU), biomassa com clorofórmio:metanol sob radiação γ (BCMR) e biomassa seca sob radiação γ (BSR); nas fases vegetativa e cística do ciclo de vida, em triplicata. Após extração lipídica, a biomassa residual foi seca e submetida às análises quantitativas de proteínas, nas fases vegetativa e cística, e astaxantina, apenas na fase cística, todos em triplicata. A produtividade em biomassa seca foi de $0,135 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ na fase vegetativa e de $0,317 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ na cística. O conteúdo lipídico total foi maior na fase vegetativa ($P < 0,05$), sendo em média $0,113 \pm 0,02 \text{ g}$ e na fase cística $0,076 \pm 0,02 \text{ g}$, com rendimento médio de 16% e 11% do peso seco, respectivamente, sendo o método BCMR o de maior rendimento, nas duas fases. Quanto à concentração de astaxantina na biomassa residual da fase cística, observou-se sua preservação ao utilizar o método BSR ($76,2 \pm 11,5 \text{ mg L}^{-1}$), sendo semelhante à biomassa bruta ($79,0 \pm 6,8 \text{ mg L}^{-1}$), enquanto a biomassa residual dos demais métodos apresentou baixa concentração de astaxantina (BCMU: $10,07 \pm 2,0$ e BCMR: $10,3 \pm 2,3$). Já o conteúdo proteico foi em média de $44,26 \pm 2,29\%$ do peso seco para a fase vegetativa e $19,9 \pm 2,17\%$ para a cística, não diferenciando significativamente ($P > 0,05$) para a biomassa residual, proveniente da extração lipídica com os diferentes métodos de pré-tratamento, e a biomassa bruta. Portanto, o método de extração lipídica com irradiação gama foi eficiente para as células vegetativas de *H. pluvialis*, principalmente em biomassa com clorofórmio:metanol (BCMR); contudo, considerando a preservação da astaxantina na biomassa residual, constatou-se como melhor método a irradiação gama em biomassa seca

(BSR). Ademais, foi possível atestar que independente do método de extração lipídica, a biomassa residual apresentou-se como excelente fonte proteica, nas duas fases do ciclo de vida. Este é o primeiro estudo a utilizar radiação gama como método de pré-tratamento de biomassa algal para extração lipídica.

Palavras-chave: Extração de lipídios. Irradiação gama. Astaxantina. Mixotrófico.

ABSTRACT

The microalgae *Haematococcus pluvialis* has aroused great interest in its cellular content, mainly astaxanthin and lipids, and is commonly cultivated for the production of biofuel. However, for this production to be sustainable, it is necessary to use efficient lipid extraction methods and the use of residual biomass. The present study aims to evaluate pretreatment methods for the extraction of lipids and to analyze the residual biomass of the microalgae *H. pluvialis*. The microalgae was cultivated in a mixotrophic and semi-continuous system, being inoculated to 10% of the volume, starting from 40 mL test tubes to 20L volumes, and its growth was monitored through an optical microscope, collecting the biomass in the macrozooid phase (vegetative) and aplanospore (cystic) phase. These samples were centrifuged (3500 g for 15 minutes) and lyophilized, being determined the productivity in dry biomass and submitted to lipid extraction. The extraction was by chemical method, using chloroform:methanol as solvent, and had pre-treatment methods: biomass with chloroform:methanol under ultrasound (BCMU), biomass with chloroform:methanol under γ -radiation (BCMR) and dry biomass under γ -radiation (BSR); in the vegetative and cystic phases of the life cycle, in triplicate. After lipid extraction, the residual biomass was dried and submitted to quantitative analysis of proteins, in the vegetative and cystic phases, and astaxanthin, only in the cystic phase, all in triplicate. The dry biomass yield was 0.135 ± 0.07 g L⁻¹ in the vegetative phase and 0.317 ± 0.04 g L⁻¹ in the cystic. The total lipid content was higher in the vegetative phase ($P < 0.05$), with a mean of 0.113 ± 0.02 g and in the cystic phase 0.076 ± 0.02 g, with a mean yield of 16% and 11% of the dry weight, respectively, with the BCMR method being the one with the highest yield in both phases. Regarding the astaxanthin concentration in the residual biomass of the cystic phase, it was observed its preservation using the BSR method (76.2 ± 11.5 mg L⁻¹), similar to the crude biomass (79.0 ± 6.8 mg L⁻¹), while the residual biomass of the other methods presented low astaxanthin concentration (BCMU: 10.07 ± 2.0 and BCMR: 10.3 ± 2.3). The protein content was, on average, $44.26 \pm 2.29\%$ of the dry weight for the vegetative phase and $19.9 \pm 2.17\%$ for the cystic, not significantly different ($P > 0.05$) for the residual biomass, from the lipid extraction with the different pretreatment methods, and the crude biomass. Therefore, the lipid extraction method with gamma irradiation was efficient for the vegetative cells of *H. pluvialis*, mainly in biomass with chloroform:methanol (BCMR). However, considering the preservation of astaxanthin in the residual biomass, gamma irradiation in dry biomass (BSR) was the best

method. In addition, it was possible to attest that independent of the lipid extraction method, the residual biomass presented as an excellent protein source, in the two phases of the life cycle. This is the first study to use gamma radiation as an algal biomass pretreatment method for lipid extraction.

Keywords: Lipids extraction. Gamma irradiation. Astaxanthin. Mixotrophic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagens microscópicas de <i>H. pluvialis</i> ao longo do seu ciclo de vida.	18
Figura 2 –	Classificação dos métodos de pré-tratamento.	21
Figura 3 –	Representação esquemática da técnica de pré-tratamento com micro-ondas..	22
Figura 4 –	Esquema do pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.....	24
Figura 5 –	Modelo de biorrefinaria de algas.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Rendimento lipídico (% peso seco) utilizando diferentes métodos de pré-tratamento celular nas duas fases do ciclo de vida da <i>H. pluvialis</i>	38
Tabela 2–	Concentração de astaxantina em biomassa residual de <i>H. pluvialis</i> na fase cística, após extração lipídica utilizando diferentes métodos de pré-tratamento celular.....	42
Tabela 3–	Conteúdo proteico (% peso seco) da biomassa residual de <i>H. pluvialis</i> , após extração lipídica utilizando diferentes métodos de pré-tratamento celular nas duas fases do ciclo de vida.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral	14
1.1.2	Objetivos Específicos	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	MICROALGAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	16
2.2	BIOLOGIA, CULTIVO E APLICAÇÕES DA <i>Haematococcus pluvialis</i>	17
2.3	PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS	20
2.3.1	Métodos de pré-tratamento celular.....	21
2.3.1.1	Radiação gama para pré-tratamento celular.....	23
2.3.2	Modelo de Biorrefinaria de algas	24
3	USO DE RADIAÇÃO GAMA COMO PRÉ-TRATAMENTO PARA EXTRAÇÃO LIPÍDICA DE <i>Haematococcus pluvialis</i> PRODUZIDA EM CULTIVO MIXOTRÓFICO E OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS E ASTAXANTINA DA BIOMASSA RESIDUAL	27
4	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE – NORMAS DO PERIÓDICO	61

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são seres microscópicos, fotossintetizantes, capazes de capturar energia solar e converter dióxido de carbono em biocompostos tais como, proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos graxos polinsaturados e carotenoides, favorecendo a sua aplicação em várias áreas biotecnológicas, como na aquicultura, indústria farmacêutica, biomedicina, área de alimentos, biorremediação, biofixação de CO₂ e produção de biocombustíveis (KATIYAR et al., 2017). No entanto, a capacidade de produzir tais moléculas depende da espécie e das condições de cultivo empregadas, como temperatura, pH, salinidade, luminosidade e meio de cultura (GEORGE et al., 2014). A microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) possui grande importância pelo seu conteúdo celular e sua capacidade de produzir astaxantina, sendo comumente cultivada para a extração desse carotenoide e para a produção de biocombustível, por ser uma excelente fonte lipídica, acumulando ácidos graxos, principalmente ácido oleico (desejável para o biodiesel), concomitantemente à produção de astaxantina, acionada através de um fator de estresse no cultivo, como luminosidade, temperatura e fonte de carbono (DORIA et al., 2018; DAMIANI et al., 2010).

Os biocombustíveis surgem como alternativa diante do cenário atual, onde se faz necessário reduzir o uso de combustíveis fósseis e as emissões de carbono, a fim de uma produção de energia sustentável, sendo as microalgas uma fonte promissora na obtenção de óleo para esse fim (SHUBA e KIFLE, 2018). Comparando com as culturas terrestres, as microalgas possuem maior produtividade de biomassa, rápido crescimento, baixa necessidade de renovação de água em seu cultivo, uso de menores extensões de área e não se utiliza de contaminantes (pesticidas ou herbicidas), requerendo apenas luz solar, água e nutrientes (ENAMALA et al., 2018). Contudo, a capacidade de produzir grandes quantidades de lipídios e possuir o perfil de ácidos graxos requerido para produção de biocombustíveis, é intrínseca à espécie, condições e tempo de cultivo, além do estágio do ciclo de vida da microalga (FOTEINIS et al., 2018).

Os custos relacionados à produção de biocombustível por microalga estão associados ao cultivo da microalga, colheita da biomassa, extração e processamento do óleo (WU et al., 2018). Dentre esses, o método de extração lipídica possui destaque, devendo ter baixo custo efetivo, ser rápido, eficiente e causar baixa degradação dos lipídios, fundamental não apenas para o processo produtivo, bem como para assegurar a qualidade do óleo (ENAMALA et al., 2018). Os métodos de extração de lipídios mais utilizados são os químicos, podendo também

ser uma combinação com os métodos físicos. Na extração química utilizam-se diferentes solventes, como clorofórmio, metanol, hexano e etanol; devendo ser barato, de baixa toxicidade, puro, imiscível em água e seletivo, para evitar extração de compostos indesejáveis (RAMLUKAN et al., 2014). Dentre os métodos físicos há utilização, principalmente, de ultrassom (através de jatos de alta pressão e velocidade, formando forças de cisalhamento) e micro-ondas (radiação eletromagnética que interage com moléculas polares, aquecendo a biomassa), sendo estes, métodos de pré-tratamento celular, para posterior uso de solvente (MUBARAK et al., 2015).

Outro método físico de pré-tratamento celular pode ser através de irradiação gama, pois se tem demonstrado seu uso na degradação de polissacarídeos de algas, como açúcar, alginato, carragenana e laminarina (YOON et al., 2012), podendo causar o rompimento ou despolimerização da estrutura de polissacarídeos e assim, ser um método efetivo de pré-tratamento da biomassa para extração de óleo. Contudo para microalgas, não há estudos que demonstrem o uso de irradiação com essa finalidade, apenas no acúmulo de lipídios e expressão de genes reguladores envolvidos na biossíntese lipídica (TALE et al., 2018), na elevação do valor nutritivo e atividade antioxidante (SHABANA et al., 2017), além de atuar melhorando a taxa de crescimento e o rendimento de astaxantina em *H. pluvialis* (CHENG et al., 2016).

Após a extração do óleo para produzir biocombustível, a biomassa algal resultante pode ser utilizada para a geração de energia ou outros combustíveis líquidos e gasosos (CHIA et al., 2018), como também na indústria de alimentos, nutracêutica e farmacêutica, por possuir ampla variedade de biomoléculas em sua composição, tais como, proteínas, carboidratos, vitaminas, pigmentos e antioxidantes, podendo garantir a sustentabilidade da produção de biocombustíveis a partir de microalgas (CHEW et al., 2017; CHEN et al., 2018).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar métodos de pré-tratamento para a extração de lipídios e analisar a biomassa residual da microalga *Haematococcus pluvialis*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produtividade em biomassa seca da *H. pluvialis* cultivada em sistema mixotrófico, nas fases vegetativa e cística da microalga;

- Avaliar a eficiência dos métodos de pré-tratamento celular utilizando radiação gama e ultrassom, nas fases vegetativa e cística do ciclo de vida da *H. pluvialis*;
- Determinar a concentração de proteínas da biomassa residual proveniente da extração de lipídios, nas fases vegetativa e cística da *H. pluvialis*;
- Determinar a concentração de astaxantina da biomassa residual proveniente da extração de lipídios na fase cística da *H. pluvialis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROALGAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Microalgas são organismos microscópicos presentes em ecossistemas aquáticos (marinhos ou dulciaquícolas) e terrestres (úmidos), com grande variedade de espécies, incluindo clorofíceas, dinoflagelados, crisofíceas e diatomáceas, que se adaptam a diferentes condições ambientais (RIZWAN et al., 2018), produzindo biomassa a partir da absorção da luz solar, da captura do CO₂ e do meio aquático, além de contribuir na produção de oxigênio atmosférico (SINGH et al., 2011). Sendo assim, são utilizadas para monitoramento de substâncias tóxicas ambientais, biorremediação, bioensaios e mitigação das emissões de CO₂ (NAYAK et al., 2016).

Diante da variedade de espécies de microalgas, há uma gama de aplicações biotecnológicas oriundas dos compostos produzidos pelas mesmas. Dentre esses compostos estão os diferentes tipos de pigmentos (clorofilas e carotenoides), lipídios, ácidos graxos poli-insaturados, esteróis, peptídeos e vitaminas (MORENO-GARCIA et al., 2017), sendo comercialmente utilizadas em nutrição humana e animal, produtos cosméticos, fármacos, antimicrobianos, antivirais, antibacterianos, anticancerígenos, antioxidantes, pigmentos, biocombustíveis e biofertilizantes para extração de moléculas de alto valor (SUGANYA et al., 2016; RIZWAN et al., 2018). Contudo, a produção desses biocompostos depende da espécie e das condições de cultivo a qual está sendo submetida, como temperatura, pH, luminosidade, meio de cultura e sistema de cultivo (GEORGE et al., 2014).

O cultivo pode ser realizado em sistema autotrófico, quando se utiliza de carbono inorgânico e luz como fontes de energia; heterotrófico, mediante inserção de carbono orgânico e fonte de energia orgânica, na ausência de luz; e mixotrófico, na presença de carbono orgânico e inorgânico, luz e compostos orgânicos como fontes de energia (PEREZ-GARCÍA e BASHAN, 2015). Algumas espécies, como *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* são capazes de crescer em todas essas condições, podendo inclusive haver aumento na biomassa e na produção de moléculas orgânicas, quando cultivadas em sistema heterotrófico e mixotrófico (PEREZ-GARCÍA e BASHAN, 2015; RIZWAN et al., 2018).

Dentre os compostos produzidos por esses microrganismos, os lipídios possuem grande participação, podendo incluir lipídios neutros e polares, ésteres de cera, esteróis, hidrocarbonetos e derivados fenólicos, como tocoferóis, terpenos, quinonas e derivados

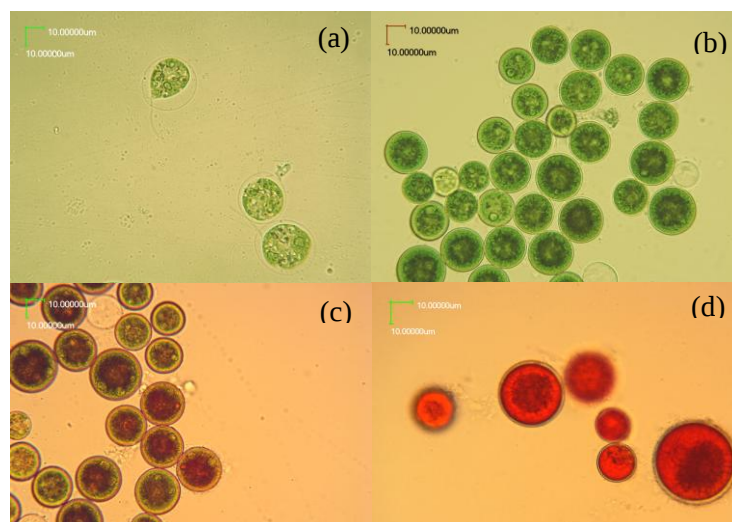
pirrólicos, tais como clorofilas (NAIK et al., 2010). As algas sintetizam ácidos graxos principalmente por esterificação de lipídios de membrana à base de glicerol, o que constitui cerca de 5-20% do peso seco de célula, esses podem formar cadeia média (C_{10} - C_{14}), cadeia longa (C_{16} - C_{18}) e cadeia muito longa ($\geq C_{20}$) (HU et al., 2008). Hidrocarbonetos e outros tipos de lipídios neutros são encontrados em algas com uma quantidade inferior a 5% (LEE e LOEBLICH, 1971).

A capacidade de produção de lipídios em microalga é intrínseca à espécie e à cepa, variando também com as condições de cultivo (DAMIANI et al., 2010). Para algumas espécies de microalgas, condições desfavoráveis de crescimento, como alta salinidade (LIU e LIN, 2001), escassez de nitrogênio (ZHEKISHEVA et al., 2002) e alta intensidade luminosa (GORDILLO et al., 1998), podem causar o aumento do conteúdo lipídico. Assim como, a fase do cultivo e o estágio do ciclo de vida podem mudar essa composição (FIDALGO et al., 1998; SHAH et al., 2016).

2.2 BIOLOGIA, CULTIVO E APLICAÇÕES DA *Haematococcus pluvialis*

A microalga *Haematococcus pluvialis* pertence à Divisão Chlorophyta, Classe Chlorophyceae, Ordem Volvocales e Família Haematococcaceae (HOEK et al., 1995). Seu ciclo de vida possui quatro estágios, com morfologias distintas: microzoóides, macrozoóides (zoósporos) e palmela, pertencentes à fase vegetativa verde e, hematocistos ou aplanósporos, referente à fase encistada vermelha (SHAH et al., 2016). As células vegetativas flageladas (Figura 4A), microzoóides e macrozoóides (diferenciadas pelo tamanho), predominam sob condições de cultura favoráveis no estágio inicial do crescimento vegetativo, com crescimento rápido. Sob condições desfavoráveis, os macrozoóides começam a perder flagelos e expandem seu tamanho, formando uma estrutura de múltiplas camadas à medida que se desenvolvem em palmelas (Figura 4B) não móveis; com o estresse ambiental contínuo e a cessação da divisão celular, a palmela se transforma em aplanósporo (Figura 4C, 4D), apresentando uma bainha trilaminar espessa e rígida e uma parede celular secundária de material resistente à acetólise (HAGEN et al., 2002).

Figura 1 - Imagens microscópicas de *H. pluvialis* ao longo do seu ciclo de vida.



(a) Célula móvel vegetativa verde (Zoósporos); (b) Célula Palmela vegetativa verde; (c) Células Palmela acumulando astaxantina, em transição para aplanósporos; (d) Hematocistos ou Aplanósporos.

A *H. pluvialis* possui a capacidade de crescer sob condições de cultivo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (GÖKSAN et al. 2011, ZHANG et al., 2016; PANG e CHEN, 2017). Tem-se demonstrado que seu cultivo em meio mixotrófico, resulta em maiores taxas de crescimento, produtividade de biomassa e produção de astaxantina (PARK et al., 2014; PANG e CHEN, 2017), utilizando o acetato de sódio como principal fonte de carbono orgânico (OROSA et al., 2005). Ademais, é adotado um sistema dividido em duas fases: a primeira denominada fase verde, onde se obtém o máximo crescimento celular em menor tempo de cultivo; e a segunda fase denominada de indução, onde ocorre a síntese e acúmulo de astaxantina (AFLALO et al., 2007).

Essa espécie possui grande interesse pelo seu conteúdo celular e, principalmente, pela sua capacidade de produzir o carotenoide astaxantina (KIM et al., 2018). A síntese de astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4, 4'-diona) está relacionada a mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas células, devido a fatores como alta luminosidade, presença de nutrientes e suas concentrações nos meios de cultura, dentre eles a baixa concentração de nitrogênio e o acréscimo de fontes de carbono orgânico (NUNES et al., 2013; DORIA et al., 2018). Esse carotenoide é amplamente utilizado na indústria farmacêutica, nutracêutica, de cosméticos e de alimentos, por ter propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética e imunomoduladora, além de ser utilizada na aquicultura, tanto para pigmentação quanto para melhorar a resposta imune e o desempenho zootécnico de camarões e peixes (DING et al., 2018; XIE et al., 2018).

Além da astaxantina, representando cerca de 4% do conteúdo celular no estágio cístico, possui em sua composição altas concentrações de proteínas, carboidratos e lipídios, variando de acordo com o modo de cultivo e a fase do ciclo de vida (CHEKANOV et al., 2014; SHAH et al., 2016). Na fase verde, o conteúdo de proteínas e de carboidratos varia entre 24-45% e 15-17% do peso seco, respectivamente e, no estágio vermelho, de 20-23% e 37-74%, respectivamente (RECHT et al., 2012; KIM et al., 2015). Enquanto a concentração de lipídios totais pode chegar até 25% na fase vegetativa e 37% na fase cística (SHAH et al., 2016). O acúmulo de lipídios ocorre de modo mais expressivo durante a formação dos aplanósporos, induzido por fatores de estresse, como limitação de nutrientes, alta intensidade de luz e fontes de carbono orgânico, simultaneamente à produção de astaxantina (ZHEKISHEVA et al., 2002; SAHA et al., 2013; ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

Quanto ao perfil de ácidos graxos, são semelhantes tanto sob condições controle quanto sob estresse, sendo os principais componentes: os ácidos oleico (18:1n9c), palmítico (16:0), linoleico (18:2n6c), esteárico (18:0), linolênico (18:3n3) e linolelaídico (18:2n6t) (DAMIANI et al., 2010; BILBAO et al., 2016). Assim como em outras espécies de clorofíceas, os ácidos palmítico e oleico são os ácidos graxos saturado e monoinsaturado, respectivamente, predominantes em *H. pluvialis*, tanto na fase vegetativa quanto cística (HU et al., 2008). O perfil adequado de ácidos graxos, predominantemente saturados com pequeno ou médio comprimento de carbonos, e seu alto conteúdo lipídico faz com que essa microalga seja comumente cultivada também para produção de biocombustível (DAMIANI et al., 2010; NIGAM e SINGH, 2011; SAHA et al., 2013).

Entretanto, para que essa produção seja viável faz-se necessário o uso de métodos eficientes de extração de lipídios, levando em conta a estrutura da parede celular, principalmente, na fase cística, onde possui forma mais espessa e resistente contra ataques mecânicos e químicos, diminuindo a biodisponibilidade dos compostos acumulados (HAGEN et al., 2002). Essa parede é composta de uma bainha trilaminar de algaenano, abaixo da qual se encontra uma camada secundária composta em grande parte de celulose e manose em um arranjo homogêneo e, a camada terciária com celulose e manose dispostos de forma heterogênea (HAGEN et al., 2002; PRAVEENKUMAR et al., 2015). Portanto, técnicas eficazes de ruptura da parede celular devem ser empregadas (KIM et al., 2016), como também a aplicação de novos métodos deve ser avaliada.

2.3 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

O aumento populacional aliado à maior demanda de energia provocou grande necessidade em produzir biocombustíveis, evitando-se o uso de combustíveis fósseis, devido ao esgotamento dos recursos e ao acúmulo dos gases do efeito estufa no meio ambiente (SINGH et al., 2011). Contudo, a viabilidade da produção de biocombustíveis de primeira geração é questionável devido ao conflito com a oferta de alimentos, como também, o uso de oleaginosas, resíduos de óleo de cozinha e gorduras animais para produzir biodiesel, não é capaz de substituir o combustível fóssil (SONG et al., 2008), surgindo como alternativa viável o uso de microalgas (KHAN et al., 2009).

Esses microrganismos possuem grande potencial de substituir completamente os combustíveis fósseis, pois, diferente das oleaginosas, possuem a capacidade de crescer rapidamente, dobrando sua biomassa em 24 horas; muitas espécies possuem alto conteúdo lipídico, excedendo 80% do peso da biomassa seca; e utiliza-se de menores áreas, apresentando produtividade de óleo entre 58 700 e 136 900 L ha⁻¹, enquanto a soja apresenta produtividade de aproximadamente 446 L ha⁻¹ (SPOLAORE et al., 2006; CHISTI, 2007). Além dessas vantagens, são capazes de causar efeito positivo no ambiente, uma vez que absorve grande quantidade de CO₂, auxiliando na diminuição dos gases do efeito estufa.

A produção de biocombustível por microalga esbarra em custos relacionados ao cultivo, à colheita da biomassa, à extração dos lipídios e ao processamento do óleo (WU et al., 2018). Sendo a etapa de extração, uma das mais importantes, que pode comprometer a economia da produção (GULDHE et al., 2014). Portanto, para escolher o método mais apropriado, deve-se considerar, a composição da parede celular e a natureza do composto desejado (RIZWAN et al., 2018), custo efetivo, velocidade e eficiência do processo, além da manutenção da integridade dos lipídios, fundamental para a qualidade do óleo (ENAMALA et al., 2018).

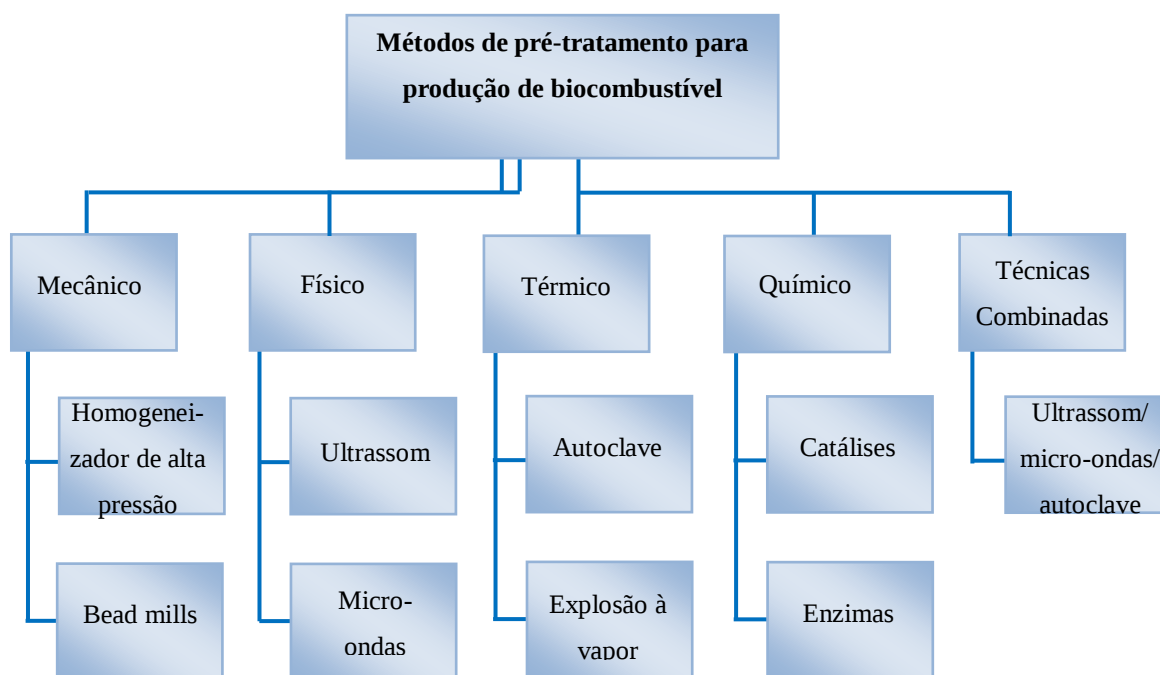
A extração dos lipídios é realizada através de métodos químicos, físicos, ou a combinação destes, sendo o uso de pressão mecânica combinada a solventes químicos, o mais comumente utilizado em escala comercial (SHUBA e KIFLE, 2018). A extração química por solventes é um método rápido e eficiente, de baixa degradação dos lipídios, podendo utilizar-se de diferentes solventes, como clorofórmio, metanol, hexano, etanol, benzeno e éter; devendo ser barato, de baixa toxicidade, puro, imiscível em água e seletivo, para evitar extração de compostos indesejáveis (RAMLUCKAN et al., 2014).

Os métodos mais comumente utilizados são os de Bligh e Dyer (1959) e Folch (1957), utilizando um solvente polar e um apolar (metanol e clorofórmio, respectivamente) para extrair as frações lipídicas correspondentes das células (KUMARI et al., 2011). Em substituição ao metanol se utiliza também o etanol, embora seja considerado um solvente eficaz para a extração de lipídios, também pode ser usado para a extração de alguns outros contaminantes celulares, por exemplo, açúcares, aminoácidos, sais, proteínas hidrofóbicas e pigmentos (RIZWAN et al., 2018). As desvantagens do uso de solvente em escala comercial são: o requerimento de entrada extra de energia e o potencial de contaminação, restringindo assim as opções para seu uso final (SHUBA e KIFLE, 2018).

2.3.1 Métodos de pré-tratamento celular

Contudo, para melhor eficiência na extração faz-se necessário o uso de métodos de pré-tratamento das células (Figura 2), precedendo o uso dos solventes. Novas metodologias com maior rendimento, tempo de tratamento reduzido e baixo custo, cada vez mais estão sendo empregadas; seja utilizando métodos mecânicos, físicos, térmicos ou químicos (KHANRA et al., 2018). Ainda assim, outras técnicas devem ser avaliadas.

Figura 2 - Classificação dos métodos de pré-tratamento.

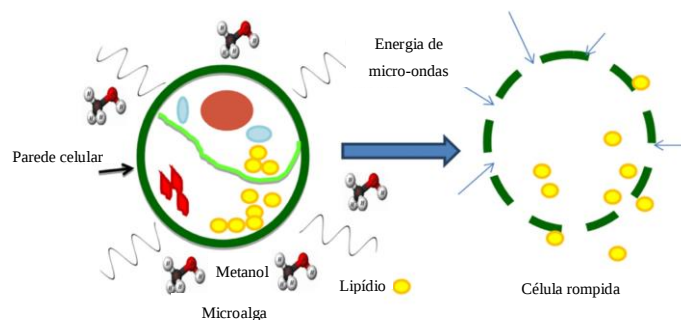


Fonte: Adaptado de ONUMAEGBU et al. (2018).

Os métodos mecânicos como, moagem por esferas (bead milling) e homogeneizador de alta pressão, aumentam a eficiência de ruptura das células, e mesmo possuindo alto custo e grande consumo de energia são comercialmente utilizados no pré-tratamento de microalgas (GÜNERKEN et al., 2015) e macroalgas (TEDESCO et al., 2014; ONUMAEGBU et al., 2018). O processo de moagem por esferas ocorre pela colisão de esferas minúsculas girando em alta velocidade (ONUMAEGBU et al., 2018), devendo-se haver o controle da temperatura para a efetiva desintegração das células (BALASUNDARAM et al., 2012). Já o homogeneizador de alta pressão consiste em uma ou duas bombas de deslocamento que forçam a suspensão de células sob uma alta pressão (até 400 MPa) através de um orifício que colide contra a válvula do assento, as células são então espalhadas pela superfície do assento e, eventualmente, colidem com o anel de impacto (LEE et al., 2012).

A extração por solvente aliada às técnicas físicas de ruptura celular (ultrassom ou micro-ondas) resulta em melhor rendimento, pois facilitam o contato entre lipídios e solventes, reduzem o uso de produtos químicos tóxicos e o tempo de extração, quando comparadas às técnicas convencionais (GULDHE et al., 2014). No método de ultrassom, as ondas sonoras formam bolhas de cavitação em meio líquido que, após o colapso, geram energia química e mecânica, desorganizando a parede celular das microalgas (VYAS et al., 2010). Enquanto na técnica de micro-ondas (Figura 2), a energia possibilita a rotação do dipolo molecular, que interrompe as ligações de hidrogênio fracas e provocam o movimento de íons dissolvidos, aumentando a penetração do solvente nas células (CRAVOTTO et al., 2008). O pré-tratamento com irradiação por micro-ondas possibilita aquecimento uniforme e rápido, pouco consumo de solventes, tempo de extração curto, com alto rendimento e sem necessidade de tratamento adicional (DAI et al., 2014; GULDHE et al., 2014; ONUMAEGBU et al., 2018).

Figura 3 - Representação esquemática da técnica de pré-tratamento com micro-ondas.



Fonte: Adaptado de ONUMAEGBU et al. (2018).

Os tratamentos térmicos, com autoclave e secagem por pulverização, e o tratamento enzimático são considerados inapropriados para microalgas, por conta do alto custo, dificuldade de escalonamento e longo tempo de processamento (KHANRA et al., 2018). Enquanto, o uso de explosão à vapor, que consiste na exposição à temperaturas entre 180 e 240 °C (1,03-3,45 MPa) seguido de despressurização repentina à condição ambiental, pode ser adequado para operação em larga escala, devido à facilidade de ruptura da parede celular, alta liberação de moléculas intracelulares, custo operacional relativamente baixo e não causar prejuízos ambientais (LORENTE et al., 2015). Todavia, o uso de técnicas combinadas de pré-tratamento podem aumentar o rendimento lipídico, comparado ao uso de apenas uma técnica, contudo, esse processo é muito complexo e de alto custo (ONUMAEGBU et al., 2018).

2.3.1.1 Radiação gama para pré-tratamento celular

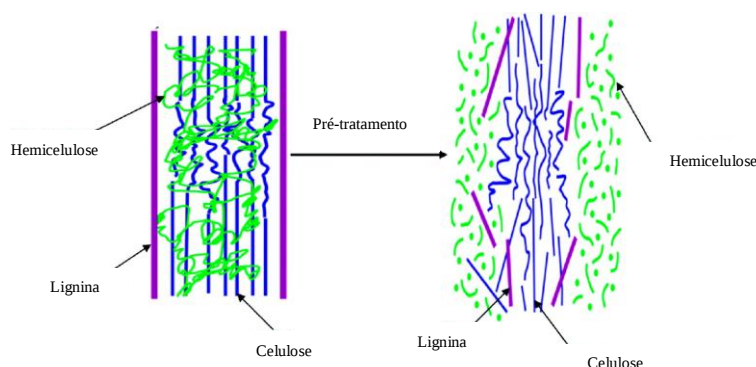
Os raios gama (γ) são a forma mais energética de radiação eletromagnética, apresentando desde alguns keV até alguns MeV e, são, portanto, mais penetrantes que outras radiações (KOVÁCS e KERESZTES, 2002). Por serem pertencentes à radiação ionizante, agem de duas formas: diretamente pela interação com moléculas biológicas, levando à excitação, lesão e cisão da estrutura polimérica, ou indiretamente pela interação com átomos ou moléculas, produzindo radicais livres nas células; podendo assim, danificar ou modificar componentes importantes das células, afetando morfologia, anatomia, bioquímica e fisiologia de vegetais, dependendo do nível de irradiação (WI et al., 2005, 2007; SINGH et al., 2016). O efeito da radiação sobre um microrganismo depende também dos fatores físicos e fisiológicos durante a irradiação, sendo mais sensíveis em solução líquida do que quando suspensos no estado congelado ou em condições secas, devido à imobilização ou a baixa formação dos radicais livres, de modo que o efeito indireto que eles causam é reduzido (SINGH et al., 2016).

A radiação γ é uma técnica eficaz para pré-tratamento de biomassa e quando esse método é combinado com outros (químicos, físicos) há um aumento na eficiência de todo o processo, produzindo os mesmos resultados usando doses menores (TORUN, 2017). As vantagens desse processo incluem temperatura moderada, tempo de reação curto, baixo impacto ambiental, baixo investimento de capital e poucos processos perigosos (WANG et al., 2012; LIU et al., 2015; LI et al., 2016).

É um método bastante utilizado para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (Figura 5), composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, cuja forte associação

existente entre esses compostos, dificulta a utilização desses materiais como matérias-primas para processos químicos e biotecnológicos, razão pela qual existe a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento, de modo a modificar sua estrutura, reduzindo o grau de polimerização da celulose, podendo resultar na destruição de paredes celulares (YOON et al., 2012; LI et al., 2016; TORUN, 2017). Por isso, é também utilizado na remoção de patógenos (FOLEY et al., 2002), esterilização de aloenxertos teciduais (SINGH et al., 2016) e hidrólises enzimáticas (LEE BM et al., 2017). Alguns estudos indicam seu uso na degradação de polissacarídeos, como alginato, carragenana e laminarina, em macroalgas, podendo causar o rompimento ou despolimerização da estrutura da parede celular (YOON et al., 2012; CHOI e LEE, 2017).

Figura 4 - Esquema do pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.



Fonte: KUMAR et al. (2009).

Contudo para microalgas, não há estudos que demonstrem o uso de radiação γ com essa finalidade, havendo relatos de sua atuação no acúmulo de lipídios e expressão de genes reguladores envolvidos na biossíntese lipídica (TALE et al., 2018), na elevação do valor nutritivo e atividade antioxidante (SHABANA et al., 2017) e, no aumento da taxa de crescimento e rendimento de astaxantina em *H. pluvialis* (CHENG et al., 2016). Levando em consideração seus efeitos em estruturas polissacarídicas, surge como um potencial método de pré-tratamento da biomassa algal para extração de lipídios.

2.3.2 Modelo de Biorrefinaria de algas

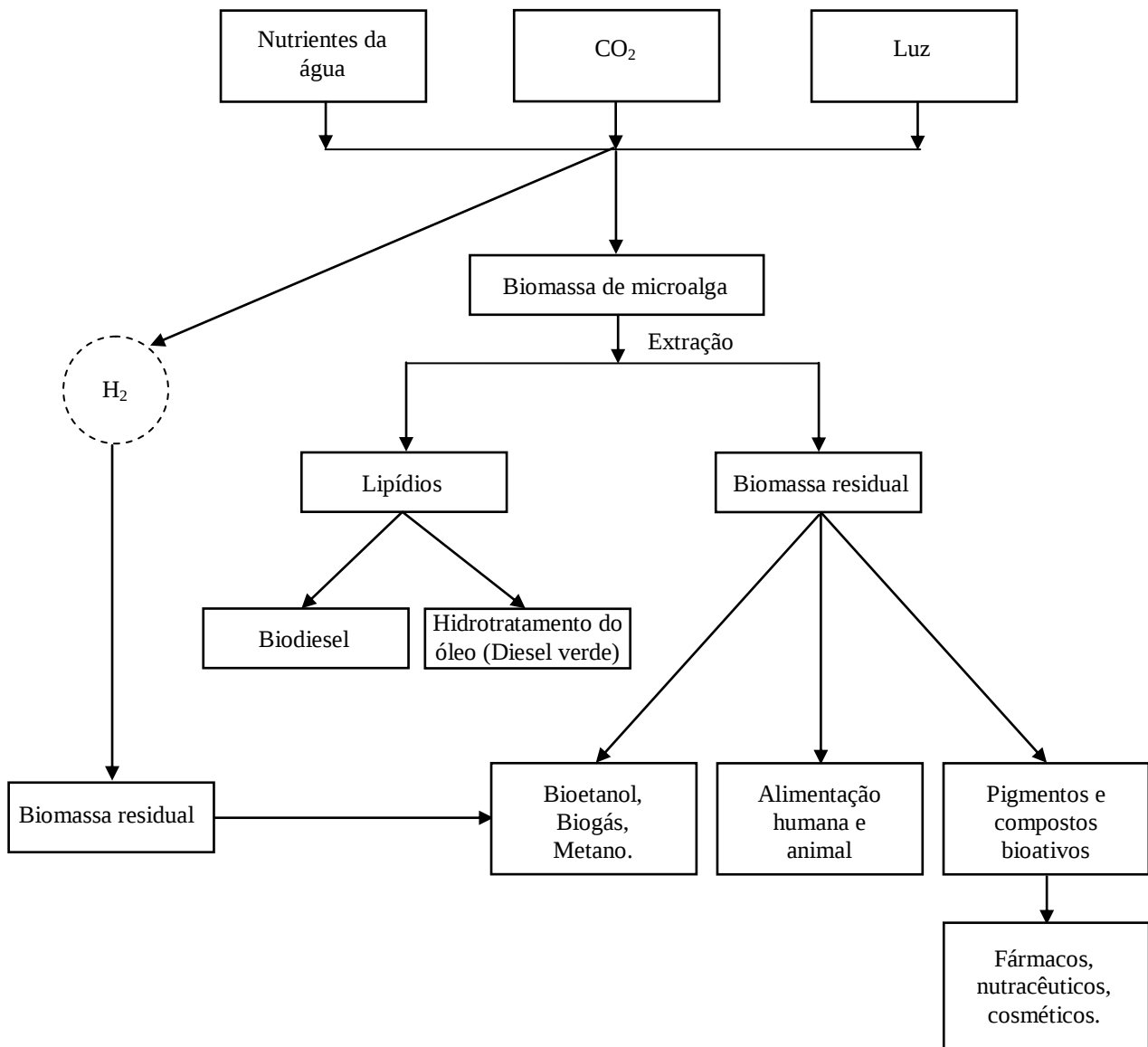
Uma das sugestões para enfrentar os problemas econômicos dos biocombustíveis a base de algas é a possibilidade de aplicar-se o conceito de biorrefinaria (Figura 3), produção de biocombustíveis e coprodutos de alto valor, pela integração de bioprocessamento e tecnologias químicas apropriadas, de baixo impacto ambiental e economicamente viável

(CHIST, 2007). As biorrefinarias são encontradas em setores amplamente difundidos em escala industrial, permitindo que se concentrem no processamento de múltiplos produtos (CHEW et al., 2017), onde a integração das configurações de produção pode ser aplicada para produzir produtos de valor agregado, lucrando com uma única fonte de matéria-prima (MONCADA et al., 2015).

As biorrefinarias de algas objetivam extrair e separar produtos comerciais da biomassa algal, seja proteínas, carboidratos, pigmentos ou coprodutos do processamento dos lipídios (NAIK et al., 2010; ZHU, 2015). Nesse sentido, a biomassa residual dos processos de produção de biodiesel, logo após extração dos lipídios, rica em carboidratos e proteínas (SHUBA e KIFLE, 2018), pode ser utilizada para produzir alimentos ricos em proteínas para consumo animal (BRUTON et al., 2009), metano por digestão anaeróbica para gerar a energia elétrica necessária nas instalações de produção de biomassa de microalgas (CHIST, 2007), fertilizante orgânico (MATA et al., 2010), como fonte de carbono em indústrias de fermentação (CHEW et al., 2017), entre outros. No entanto, faz-se necessário o uso de técnicas adequadas, que promovam uma extração eficiente e não causem danos às outras frações da biomassa (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

As características da *H. pluvialis* fazem dela uma cepa adequada para o desenvolvimento de biorrefinarias de algas que produzem produtos de alto valor e moléculas de biocombustível. Após a extração simultânea do produto de alto valor (astaxantina) e produto de biocombustível (triglicerídeos), a biomassa residual pode ser utilizada como matéria-prima suplementar para a produção de biogás usando digestão anaeróbica que ajudaria ainda mais na extração de energia residual deste bioprocessos integrado (SHAH et al., 2016).

Figura 5 – Modelo de Biorrefinaria de algas.



Fonte: Adaptado de NAIK et al. (2010)

3 ARTIGO: Uso de radiação gama como pré-tratamento para extração lipídica de
4 *Haematococcus pluvialis* produzida em cultivo mixotrófico e obtenção de proteínas e
5 *astaxantina* da biomassa residual

6 Laenne B.S. Moraes^{a,b}, Carolina B. Malafaia^c, Túlio D. Silva^c, Ana M.M.A. Melo^d, Danielli
7 M.M. Dantas^e, Alfredo O. Gálvez^b, Ranilson S. Bezerra^a.

8 ^aLaboratório de Enzimologia Prof. Luiz Accioly, Departamento de Bioquímica, Universidade
9 Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil.

10 ^bLaboratório de Produção de Alimento Vivo, Departamento de Pesca e Aquicultura,
11 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

12 ^cCentro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Cidade Universitária, 50740-545, Recife,
13 PE, Brasil.

14 ^dLaboratório de Radiobiologia, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade
15 Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil.

16 ^eLaboratório de Biotecnologia de Microalgas, Departamento de Pesca e Aquicultura,
17 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 56909-
18 535, Serra Talhada, PE, Brasil.

19
20 * Artigo à ser publicado no periódico “Biomass & Bioenergy”.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo aplicar a radiação gama como método de pré-tratamento celular para extração lipídica e determinar as concentrações de proteínas e astaxantina na biomassa residual da *Haematococcus pluvialis*. A microalga foi cultivada em sistema mixotrófico, coletando-se a biomassa na fase de macrozoóide (vegetativa) e aplanósporo (cística), sendo centrifugada, liofilizada, determinada a produtividade em biomassa seca e submetida à extração lipídica. As extrações ocorreram por método químico, utilizando clorofórmio:metanol, e teve como métodos de pré-tratamento: biomassa com clorofórmio:metanol sob ultrassom (BCMU), biomassa com clorofórmio:metanol sob radiação γ (BCMR) e biomassa seca sob radiação γ (BSR). Após extração, a biomassa residual foi submetida às análises de proteínas e astaxantina. A produtividade em biomassa seca foi de $0,135 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ na fase vegetativa e de $0,317 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ na cística. O conteúdo lipídico total foi maior na fase vegetativa, com rendimento médio de 16% do peso seco, enquanto na fase cística obteve 11%, sendo o método BCMR superior, para as duas fases. Quanto à concentração de astaxantina na biomassa residual observou-se sua preservação ao utilizar o método BSR ($76,2 \pm 11,5 \text{ mg L}^{-1}$), sendo semelhante à biomassa bruta. Portanto, o método de extração lipídica com irradiação gama foi eficiente para as células vegetativas de *H. pluvialis*, principalmente em biomassa com clorofórmio:metanol; contudo, se considerada a preservação da astaxantina na biomassa residual, constatou-se como melhor método o BSR. Ademais, foi possível atestar que independente do método de extração lipídica, a biomassa residual apresentou-se como excelente fonte proteica.

Palavras-chave: Extração de lipídios; Irradiação gama; Astaxantina; Mixotrófico.

ABSTRACT

The present study aims to apply gamma radiation as a cellular pretreatment method for lipid extraction and to determine the protein and astaxanthin concentrations in the residual biomass of *Haematococcus pluvialis*. The microalgae was cultivated in a mixotrophic system, the biomass being collected in the macrozooid phase (vegetative) and aplanospore (cystic) phase, being centrifuged, lyophilized, determined the yield in dry biomass and submitted to lipid extraction. The extraction was by chemical method, using chloroform:methanol, and had pre-treatment methods: biomass with chloroform:methanol under ultrasound (BCMU), biomass with chloroform:methanol under γ -radiation (BCMR) and dry biomass under γ -radiation (BSR). After extraction, the residual biomass was submitted to protein and astaxanthin analyzes. The dry biomass yield was $0.135 \pm 0.07 \text{ g L}^{-1}$ in the vegetative phase and $0.317 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$ in the cystic. The total lipid content was higher in the vegetative phase, with an average yield of 16% of the dry weight, while in the cystic phase it was 11%, and the BCMR method was superior for the two phases. Regarding astaxanthin concentration in the residual biomass, it was observed its preservation using the BSR method ($76.2 \pm 11.5 \text{ mg L}^{-1}$), being similar to the crude biomass. Therefore, the lipid extraction method with gamma irradiation was efficient for the vegetative cells of *H. pluvialis*, mainly in biomass with chloroform:methanol. However, considering the preservation of astaxanthin in the residual biomass, BSR was the best method. In addition, it was possible to attest that independent of the lipid extraction method, the residual biomass presented as an excellent protein source.

Keywords: Lipids extraction; Gamma irradiation; Astaxanthin; Mixotrophic.

1. Introdução

A microalga *Haematococcus pluvialis* tem despertado grande interesse pelo seu conteúdo celular, sendo comumente cultivada para a extração do carotenoide astaxantina [1]. Além da astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4, 4'-diona), representando cerca de 4% do conteúdo celular no estágio vermelho, possui em sua composição altas concentrações de proteínas, carboidratos e lipídios, variando de acordo com o modo de cultivo e a fase do ciclo de vida, vegetativa ou cística [2]. O acúmulo de lipídios ocorre de modo mais expressivo durante a formação dos aplanósporos, simultaneamente à produção de astaxantina, principalmente em cultivos mixotróficos e induzido por fatores de estresse, como a privação de nutrientes no meio [3,4]. O alto conteúdo lipídico e o perfil adequado de ácidos graxos fazem com que essa microalga apresente potencial para produção de biocombustível [5].

A viabilidade da produção de biocombustível a partir de microalgas depende diretamente do método de extração, que deve proporcionar bom rendimento, possuir baixo custo efetivo e manter a integridade dos lipídios, sendo fundamental para o processo produtivo e para assegurar a qualidade do óleo [6]. O método mais utilizado em escala comercial é através de solventes, devendo esses serem de baixa toxicidade, puro, imiscível em água e seletivo, caracterizando assim, um método rápido e de baixa degradação dos lipídios [7]. Contudo, faz-se necessário o uso de métodos de pré-tratamento da biomassa, sejam eles: mecânicos, físicos, térmicos ou químicos; facilitando o contato entre lipídios e solvente, promovendo alto rendimento, tempo de tratamento reduzido e baixo custo [8].

Portanto, para que essa produção seja possível em *H. pluvialis* faz-se necessário o uso de métodos eficientes de pré-tratamento das células e de extração dos lipídios, levando em conta a estrutura da parede celular, principalmente, na fase cística, quando é constituída por uma bainha trilaminar de algaenano e duas camadas polissacarídicas, possuindo forma mais espessa e altamente resistente contra ataques mecânicos e químicos [9]. Surgindo assim, a

necessidade da aplicação de novos métodos de pré-tratamento, como o uso de radiação gama (γ), caracterizada como a forma mais energética de radiação eletromagnética, mostrando-se assim como um potencial método de pré-tratamento da biomassa algal, tendo em vista seus efeitos em modificar estruturas polissacarídicas [10,11,12].

Além disso, uma das alternativas para otimizar a produção de biocombustíveis a base de algas é a aplicação do conceito de biorrefinaria, aliando essa produção à extração de coprodutos de alto valor, como proteínas, carboidratos, clorofilas, carotenoides, metabólitos secundários ou subprodutos, como o proveniente do processamento dos lipídios [13,14]. Com essa biomassa residual, pós-extração lipídica, é possível produzir alimentos ricos em proteínas para consumo animal [15], polímero biodegradável [14], metano por digestão anaeróbica para gerar a energia elétrica necessária nas instalações de produção de biomassa de microalgas [16], fertilizante orgânico [17], entre outros.

Visto que, a questão da eficiência energética e custo-efetividade da ruptura das células e extração dos lipídios são os principais desafios na comercialização de biocombustíveis de microalgas, surge a necessidade de novas pesquisas nessas áreas [8]. Assim, objetivou-se com o presente estudo aplicar a radiação gama como método de pré-tratamento celular previamente à extração lipídica e determinar o conteúdo de proteínas e astaxantina na biomassa residual da microalga *H. pluvialis*.

2. Material e Métodos

2.1. Delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido em escala laboratorial e dividido em três bioensaios: 1- extração lipídica; 2- análise de astaxantina; 3- análise proteica. No primeiro bioensaio desenvolveu-se um delineamento bifatorial, sendo o fator 1 representado por três métodos de pré-tratamento celular: biomassa com clorofórmio:metanol sob ultrassom (BCMU), biomassa com clorofórmio:metanol sob radiação γ (BCMR) e biomassa seca sob radiação γ (BSR);

enquanto o fator 2 considerou as duas fases da microalga: vegetativa e cística; as interações entre os fatores representaram 6 combinações, em triplicata, totalizando 18 unidades experimentais. Enquanto no bioensaio 2, realizado apenas para a microalga na fase cística, foi desenvolvido um delineamento inteiramente casualizado de 4 tratamentos com 3 repetições, sendo os tratamentos: biomassa residual proveniente de extração lipídica utilizando três métodos de pré-tratamento (BCMU, BCMR e BSR) e biomassa bruta, que não foi submetida a pré-tratamento e extração lipídica (controle). Já no bioensaio 3, foi comparado o conteúdo proteico da biomassa residual proveniente da extração lipídica utilizando três métodos de pré-tratamento celular (BCMU, BCMR e BSR) e da biomassa bruta, nas fases vegetativa e cística, através de delineamento bifatorial, representado por 8 combinações, em triplicata, totalizando 24 unidades experimentais.

O processo de obtenção do extrato lipídico e da biomassa residual de *H. pluvialis*, nas fases vegetativa e cística do ciclo de vida, está descrito na figura 1, sendo dividido nas etapas de: cultivo, obtenção da biomassa, extração lipídica e uso da biomassa residual. A partir da biomassa residual, quantificou-se o conteúdo proteico nas duas fases do ciclo de vida e obteve-se o conteúdo de astaxantina dos aplanósporos.

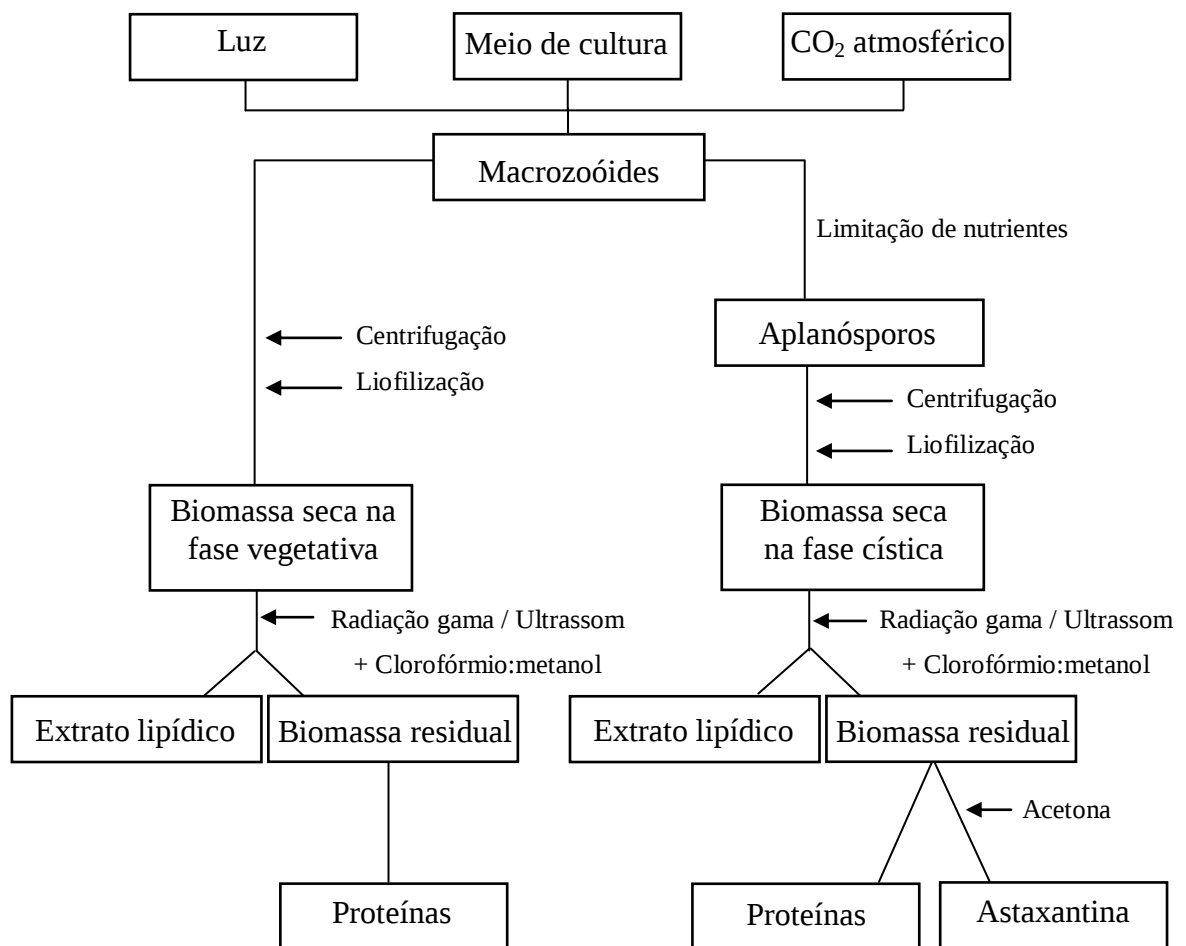


Figura 1 - Fluxograma do processo de obtenção do extrato lipídico e da biomassa residual de *H. pluvialis*, nas fases vegetativa e cística do ciclo de vida.

2.2. Cultivo da microalga

A *H. pluvialis* foi obtida do banco de cepas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), localizado no Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O cultivo da microalga foi realizado em água doce previamente tratada e autoclavada, enriquecida com o meio de cultura Provasoli modificado, apresentando em mg L⁻¹: 15 C₃H₇Na₂O₆P; 1,98 C₂H₃NaO₂; 2,0 Extrato de levedura; 105 NaNO₃; 0,075 ZnCl₂; 0,0015 CoCl₂.2H₂O; 3,0 H₃BO₃; 24,9 EDTA-Na₂.2H₂O; 0,15 FeCl₃.6H₂O; 10,6 Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6 H₂O; 0,6 MnCl₂.4H₂O.

A microalga foi cultivada em sistema mixotrófico e semi-contínuo, sendo inoculadas a 10% do volume, partindo de tubos de ensaio de 40 mL até volumes de 20L. Foram mantidas com aeração constante, em temperatura de 24 ± 1 °C, fotoperíodo integral e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo “Daylight”). Tendo seu crescimento acompanhado diariamente, através de microscópio óptico (40x de aumento) com auxílio de câmera de Neubauer.

2.3. Obtenção da biomassa

A microalga foi coletada na fase de zoósporos (estado vegetativo) e na fase de aplanósporo (estado cístico), onde houve o acúmulo de astaxantina estimulado por fontes de carbono orgânico e pela privação de nutrientes que ocorre naturalmente ao longo do cultivo. Amostras de 40 mL foram centrifugadas a 3500 g por 15 minutos (22°C) e a biomassa úmida ficou armazenada a -20°C até a etapa de liofilização. Após a secagem, as amostras foram pesadas para determinação da biomassa seca.

2.4. Pré-tratamento celular

O pré-tratamento celular com ultrassom, em frequência de 40 kHz e potência de 135 W (em dois ciclos de 15 minutos), foi realizado em 0,7 g de biomassa liofilizada homogeneizada com 14 mL do solvente clorofórmio:metanol (1:1 v/v), em vórtex por 2 minutos.

A irradiação gama foi realizada no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando ^{60}Co raio- γ com taxa de dose de 1,871 kGy/h e dose de 5,0 kGy, sendo a radiação aplicada de dois modos: na biomassa seca e na biomassa homogeneizada com solvente clorofórmio:metanol (1:1 v/v).

2.5. Extração de lipídios

As extrações lipídicas foram realizadas adaptando metodologia desenvolvida por Bligh e Dyer [18], após o uso de três métodos de pré-tratamento celular, tanto para a biomassa

na fase vegetativa quanto na fase cística. Após o pré-tratamento, à biomassa seca irradiada (BSR) foi adicionado o solvente clorofórmio:metanol (1:1 v/v) e homogeneizado em vórtex por 2 minutos, seguindo as demais etapas como realizado para as amostras BCMU e BCMR, onde foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos, coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 5,25 mL de água Milli-Q, homogeneizando-o em vórtex por 2 minutos e centrifugando-o à 10.000 rpm por 5 minutos. Todo o conteúdo foi transferido para funis de separação e permaneceram por 1 hora, até a coleta da fração lipídica. A fração lipídica foi coletada em tubos de vidro previamente pesados que permaneceram em capela de fluxo até evaporação total do solvente. Após isso, os tubos foram pesados para o cálculo de rendimento lipídico (% peso seco), sendo em seguida armazenados a -20 °C protegidos da luz, assim como a biomassa residual.

2.6. Concentração de astaxantina

A determinação de astaxantina seguiu metodologia de Dong et al. [19], em que 5 mg de biomassa residual oriunda de extração lipídica com diferentes métodos de pré-tratamento e 5 mg de biomassa bruta liofilizada (controle) foram tratadas com 1 mL de HCl (4M) e colocadas em estufa a 70°C por 2 minutos, sendo posteriormente arrefecidas e centrifugadas (5.000 × g; 5 minutos). A amostra tratada com HCl foi lavada duas vezes com água destilada, centrifugada (5.000 × g; 5 minutos), ressuspensa em 1 mL de acetona a 90% e submetidas a banho ultrassônico em gelo por 10 min. Posteriormente, a amostra foi novamente centrifugada (3500 × g; 5 minutos) e o extrato obtido foi armazenado em vials âmbar para quantificação em UPLC-MS.

A cromatografia foi executada em um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters), sendo empregada uma coluna HSS T3 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,8 µm. As fases móveis utilizadas consistiram de solução de Acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente A), solução metanólica contendo 0,1%

de ácido fórmico (eluente B) e solução de acetato de etila contendo 0,1% de ácido fórmico, que foram bombeadas a uma vazão de 0,37 mL/min; a eluição foi realizada em modo isocrático (10% A/ 50% B/ 40% C) mantida por 5 minutos. Foram injetados dez microlitros de amostra e as temperaturas da coluna e do autoinjeter, foram mantidas a 40 °C e 10 °C, respectivamente. O sistema UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa single quadrupolo SQ Detector 2 (Waters). A voltagem do capilar foi de 1,5 Kv, a voltagem do cone 50 V e a temperatura de dessolvatação foi de 350 °C, com fluxo de gás da fonte de 650 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo *Selected Ion Recording* (SIR), buscando a massa da astaxantina (597,35 Da), em ionização positiva. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foi feita através do software MassLynx™ (Waters).

2.7. Conteúdo proteico

Para determinar o teor de proteína bruta foi utilizado o método de Kjeldahl [20], com fator de conversão de Nitrogênio (N=4,78) proposto para microalgas. Foram utilizados 100 mg de biomassa residual e bruta, adicionando-se K₂SO₄, CuSO₄ e H₂SO₄. A seguir foi feita a digestão ácida em bloco digestor, a 150 °C (30 min) e a 400 °C (2h30min), após resfriamento adicionou-se 10 mL de água destilada e 25 mL da solução de NaOH (40%), recolhendo o destilado (50 mL) em erlenmeyer contendo 10 mL de solução indicadora (ácido bórico, vermelho de metila e verde de bromocresol), titulando-se, em seguida, com solução de HCl (0,02N). Para determinar a quantidade de proteína bruta na amostra utilizou-se a fórmula: %PB = $V \times M \times 14 \times 100 / A \times 4,78$, onde, V é o volume de HCl (0,02N) gasto na titulação, M é a concentração molar da solução de HCl e A é a quantidade da amostra utilizada (mg).

2.8. Análises estatísticas

As variáveis respostas dos tratamentos foram submetidas ao teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett ($P < 0,05$) e também ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$). Para os dados em que a ANOVA denotou diferença significativa, foi aplicado o teste de

comparação de médias de Tukey ($P < 0,05$) para estabelecer as diferenças entre as combinações e/ou as interações (ANOVA fatorial) e tratamentos (ANOVA um fator). Os dados que não obtiveram distribuição normal, mesmo após as transformações, foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) para ANOVA de um fator.

3. Resultados e Discussão

3.1. Produtividade em biomassa seca

A obtenção da biomassa de *H. pluvialis* na fase vegetativa ocorreu na faixa estacionária de crescimento, na forma de macrozoóide, no quinto dia de cada ciclo de cultivo, tendo uma produtividade de $0,135 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$, superior ao resultado obtido por Sun et al. [21], que alcançaram produtividade de $0,116 \pm 0,01$, em sistema mixotrófico com intensidade luminosa maior, sendo incrementada ao longo do cultivo partindo de 50 até $80 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Já na fase cística a obtenção de biomassa em forma de aplanósporo ocorreu no oitavo dia com produtividade de $0,317 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$, valor superior ao encontrado na fase vegetativa, como justificado por Park et al. [22] e Pang e Chen [23], ao registrar maior produtividade de *H. pluvialis* na fase cística em sistemas mixotróficos, utilizando carbono orgânico e luz como fontes de energia.

A produtividade em biomassa seca de $0,317 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ alcançada na fase cística é considerada significativa, visto que no presente cultivo utilizou-se intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, não houve inserção de CO_2 e apresentou-se semelhante à produtividade obtida por Saha et al. [3] de $0,354 \text{ g L}^{-1}$, ao utilizar meio de cultura BBM, tendo como fatores de estresse a privação de fosfato e baixa concentração de nitrato, com intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (duas vezes maior). Por outro lado, este resultado foi inferior a produtividade de $0,865 \text{ g L}^{-1}$ encontrada por Saha et al. [3] quando utilizaram o meio BBM, tendo como fatores de estresse a privação de fosfato e intensidade luminosa de $240 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (seis vezes maior). Da mesma forma, Pang e Chen [23] utilizando como fontes

de carbono orgânico manose, frutose e acetato de sódio, em meio de cultura BG-11 enriquecido com CO₂ a 1%, obtiveram produtividades de 0,78±0,07, 0,81±0,05 e 0,89±0,02 g L⁻¹, respectivamente, superiores a do presente experimento.

3.2. Rendimento lipídico

O conteúdo lipídico total variou significativamente (P<0,05) de acordo com a fase do ciclo de vida da *H. pluvialis*, sendo em média 0,113±0,02 g para a fase de zoósporo (vegetativa) e 0,076±0,02 g para a fase de aplanósporo (cística), com rendimento médio de 16% e 11% do peso seco, respectivamente (Tabela 1). Como também, se diferenciou significativamente (P<0,05) baseado no método de extração aplicado, onde o BCMR resultou em maior conteúdo lipídico, de 0,1287±0,008 g para os zoósporos e, 0,0949±0,003 g para os aplanósporos, com rendimento de 18,7±0,006% e 13,7±0,004%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimento lipídico (% peso seco) utilizando diferentes métodos de pré-tratamento celular nas duas fases do ciclo de vida da *H. pluvialis*.

Métodos de pré - tratamento	Lipídios (% peso seco)	
	Vegetativa	Cística
celular		
BCMU	15,7±0,011 ^{bA}	10,3±0,002 ^{bB}
BSR	14,0±0,046 ^{bA}	8,67±0,002 ^{bB}
BCMR	18,7±0,006 ^{Aa}	13,7±0,004 ^{aB}

Média de 3 repetições ± desvio padrão. Os valores médios entre os tratamentos em mesma coluna com letras minúsculas diferentes sobrescritas e em mesma linha com letras maiúsculas diferentes sobrescritas diferem significativamente (P < 0,05) por ANOVA fatorial e teste de Tukey. BCMU: biomassa com clorofórmio:metanol sob ultrassom; BSR: biomassa seca sob radiação γ; BCMR: biomassa com clorofórmio:metanol sob radiação γ.

Na fase vegetativa, o conteúdo lipídico pode chegar até 25%, variando de acordo com as condições de cultivo: temperatura, pH, intensidade luminosa, meio de cultura e sistema de cultivo [2,5,24]. Contudo, no presente estudo, o rendimento lipídico de 16% é um resultado

positivo, devido às condições de cultivo serem diferentes das encontradas na literatura, quando há inserção de CO₂ e alta intensidade de luz, entre 100 e 300 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ [5,24]. Ao considerar os métodos de extração, todos foram adequados para as características morfológicas da espécie, principalmente baseando-se na composição de sua parede celular [25]. Nessa fase, os zoósporos possuem parede celular formada basicamente por celulose, biossintetizada durante a formação da parede primária, e por resíduos de algaenano, um biopolímero formado por ácidos dicarboxílicos, alcoóis e ácidos graxos (C₂₂ – C₂₆), resistente a diversos tratamentos químicos e enzimáticos [26,27]. Essas características revelam a necessidade de um pré-tratamento celular físico seguido do uso de agentes químicos, como os empregados no presente estudo.

Na fase cística, o conteúdo lipídico dos aplanósporos foi inferior ao das células vegetativas (Tabela 1) e apresentou concentrações menores ao que é observado em sistemas de cultivo semelhantes, quando atingem até 37% do peso seco e acumulam-se concomitantemente à produção de astaxantina [2,5]. Os aplanósporos possuem em sua parede celular uma bainha trilaminar de algaenano, abaixo da qual se encontra uma camada secundária composta em grande parte de celulose e manose em um arranjo homogêneo e, a camada terciária com celulose e manose dispostos de forma heterogênea, resultando numa parede celular notavelmente mais espessa (2 a 3 vezes mais) que a das células vegetativas e altamente resistente contra ataques mecânicos e químicos, diminuindo a biodisponibilidade dos compostos acumulados [9,26,28]. Essas peculiaridades dificultaram a eficácia dos métodos empregados para pré-tratamento celular do presente estudo.

As diferenças constatadas entre a parede celular das células císticas e das vegetativas baseiam-se, principalmente, em alterações nas ligações entre algaenano e outros compostos presentes, como os polissacarídeos, conferindo maior resistência às rupturas físicas e químicas aos cistos [26]. Essas características levam à necessidade de se utilizar métodos mais

agressivos no pré-tratamento celular, como os raios γ , que são a forma mais energética de radiação eletromagnética e, portanto, mais penetrante que outras radiações [10]. A radiação gama atua de duas formas: diretamente pela interação com moléculas biológicas, levando à excitação, lesão e cisão da estrutura polimérica, ou indiretamente pela interação com átomos ou moléculas, produzindo radicais livres nas células; podendo assim, danificar ou modificar componentes importantes das células, dependendo do nível de irradiação [29,30,31]. O método BCMR, nas duas fases da microalga, apresentou-se mais eficaz do que a irradiação em biomassa seca (BSR) (Tabela 1), por conta da alta formação dos radicais livres que ocorre em solução líquida e conseqüentemente, maior efeito indireto, diferente do que ocorre quando suspensos no estado congelado ou em condições secas [31].

A radiação γ é uma técnica eficaz para pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, cuja forte associação dificulta a utilização desses materiais como matérias-primas para processos químicos e biotecnológicos, razão pela qual existe a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento, modificando sua estrutura, reduzindo o grau de polimerização da celulose e desestruturando a parede celular; e quando esse método é combinado com outros (químicos ou físicos) há um aumento na eficiência de todo o processo, possibilitando produzir os mesmos resultados usando doses menores de radiação [11,32,33]. No presente estudo, utilizando dose de 5,0 kGy, constatou-se maior eficiência na desestruturação da parede celular das células vegetativas de *H. pluvialis*, visto o maior rendimento lipídico dessas comparado aos aplanósporos, que naturalmente acumula maior quantidade de lipídios [5]. Em outros estudos, doses de 2,5 e 5,0 kGy provocaram rompimento e despolimerização da estrutura da parede celular de vegetais, formada basicamente por celulose [10,34]. Cheng et al. [35], utilizando radiação γ para provocar mutações em *H. pluvialis*, observaram que uma dose de 4,0 kGy

estimula o crescimento e a produção de astaxantina, enquanto doses maiores causam danos irreversíveis às células vegetativas.

Quanto à vibração ultrassônica, esta possui proporção direta com a potência, proporcionando efeitos físicos como, a elevação de osmose e difusão de solutos, além de turbulências entre as superfícies e danos à parede celular [36], onde potências de 400-1000 W combinadas a altas temperaturas e uso de solventes resultam em efeitos mais intensos [37]. Lee SY et al. [37] ao utilizar ultrassom combinado com acetona, após tratamento prévio com HCl (4M) à 70°C, obtiveram rendimento lipídico de $33,3 \pm 1,1\%$ para a *H. pluvialis* na fase cística, superior ao alcançado com o uso de hexano, isopropanol, óleo de soja e clorofórmio:metanol. O tratamento ultrassônico geralmente requer uma quantidade relativamente alta de energia por conta da atenuação da potência dentro do meio e mediante alta concentração celular, devido ao aumento da viscosidade [37]. Além disso, a potência utilizada deve estar aliada às características da parede celular da espécie, por exemplo, para as microalgas *Nannochloropsis* e *Chlorella* o rendimento lipídico máximo é atingido com potências de 400 e 1000 W, respectivamente [38,39], bastante superiores à aplicada neste estudo (135 W).

Portanto, considerando as características morfológicas dos aplanósporos, potências mais elevadas de ultrassom e doses mais altas de radiação, certamente propiciariam maior ruptura da parede, possibilitando maior rendimento lipídico, contudo há a necessidade de verificar a vulnerabilidade de outros compostos presentes, como a astaxantina.

3.3. Concentração de astaxantina

O acúmulo do carotenoide astaxantina, ocorre de modo mais expressivo em sistemas mixotróficos [5,40] e estimulado por fatores de estresse, dentre eles, limitação de nutrientes, intensidade luminosa e inclusão de carbono orgânico [3,4,41]. No presente estudo, a produção de astaxantina foi induzida através do uso de duas fontes de carbono orgânico, acetato de

sódio e extrato de levedura, e pela privação de nutrientes que ocorre naturalmente ao longo do cultivo. Em condições semelhantes, a concentração desse carotenoide pode alcançar até 5% do peso seco da biomassa de *H. pluvialis* [2], entretanto nesta pesquisa obteve-se concentração média de 1,58% do peso seco ou $79,0 \pm 6,8 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 2), apresentando-se superior às obtidas por: Xi et al. [42] ($17,2 \pm 2,3 \text{ mg L}^{-1}$), Kim et al. [1] ($32,6 \pm 1,2 \text{ mg L}^{-1}$), Fábregas et al. [43] ($33,0 \pm 2,3 \text{ mg L}^{-1}$) e Cheng et al. [35] ($46,0 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$).

Quando considerada a concentração de astaxantina na biomassa residual (pós-extração lipídica), observou-se sua preservação ao utilizar o método BSR (Tabela 2), sendo semelhante à biomassa bruta (controle). Esse método obteve rendimento lipídico semelhante ao BCMU e inferior ao BCMR (Tabela 1), entretanto a concentração do carotenoide em sua biomassa residual foi superior (Tabela 2). Baseando-se no fato de que os métodos de pré-tratamento não foram suficientes para o rompimento celular dos aplanósporos, a concentração de astaxantina na biomassa residual deveria ser mantida, porém os métodos BCMU e BCMR causaram a degradação desse carotenoide.

Tabela 2 - Concentração de astaxantina em biomassa residual de *H. pluvialis* na fase cística, após extração lipídica utilizando diferentes métodos de pré-tratamento celular.

Métodos de pré-tratamento	Astaxantina (mg L^{-1})	Astaxantina (% peso seco)
BCMU	$10,07 \pm 2,0^b$	$0,20 \pm 0,0004^b$
BSR	$76,2 \pm 11,5^a$	$1,52 \pm 0,0023^a$
BCMR	$10,3 \pm 2,3^b$	$0,21 \pm 0,0005^b$
Controle	$79,0 \pm 6,8^a$	$1,58 \pm 0,0014^a$

Média de 3 repetições $\pm$ desvio padrão. Os valores médios com letras sobrescritas distintas na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) por Kruskal-Wallis. BCMU: biomassa com clorofórmio:metanol sob ultrassom; BSR: biomassa seca sob radiação γ ; BCMR: biomassa com clorofórmio:metanol sob radiação γ ; Controle: biomassa não submetida à pré-tratamento e extração lipídica (biomassa bruta).

A atuação dos raios γ em biomassa em soluções líquidas causa elevada formação de radicais livres, o que contribuiu para a maior ruptura da parede celular e consequentemente maior rendimento lipídico, como também, para a maior atuação da astaxantina como doadora de elétrons, neutralizando os radicais livres, devido a sua propriedade antioxidante [44]. Além disso, esse carotenoide é uma molécula altamente insaturada que se decompõe facilmente quando exposta ao calor, luz e oxigênio, cujas reações podem ser causadas pela formação dos radicais livres [45,46,47]. Sua exposição à luz ultravioleta tanto pode resultar na isomerização cis-trans, quanto causar a destruição dessa molécula, em condições mais energéticas, como, quando exposta a comprimento de onda menor que 300 nm, imersa nos solventes lipofílicos clorofórmio e acetona [45]. Considerando o fato de a radiação gama possuir comprimento de onda muito pequeno e ser muito energética [10], aliado ao uso do clorofórmio:metanol na biomassa, nota-se maior degradação da astaxantina após o uso desse método de extração lipídica.

Outro método que provocou a degradação da astaxantina foi o de ultrassom, onde o fenômeno de cavitação produzido no solvente pela propagação da onda ultrassônica envolve a formação, crescimento e colapso de bolhas microscópicas, gerando altas temperaturas e ação mecânica entre interfaces sólidas e líquidas, aumentando assim, a eficiência de extração de compostos orgânicos [48]. Nessa técnica, o conteúdo de astaxantina diminui à medida que a potência e o tempo de tratamento aumentam, podendo reduzir em 3,11% (100 W), 5,74% (300 W) e 6,42% (600 W) após 1 min de tratamento; e em 25,1% (100 W), 25,5% (300 W) e 29,4% (600 W) após 6 min [47], ou até 87% após extração lipídica em potência de 135 W por 30 min, e posterior extração de astaxantina na mesma potência por 10 min, como visto neste trabalho.

Esse carotenoide é o bioproduto de maior valor em *H. pluvialis*, devido às suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética e imunomoduladora,

sendo amplamente utilizado na indústria farmacêutica, nutracêutica, de cosméticos e de alimentos, inclusive na aquicultura, tanto para pigmentação quanto para melhorar a resposta imune e o desempenho zootécnico de camarões e peixes [1,44,49].

3.4. Conteúdo proteico

Além de astaxantina, *H. pluvialis* possui em sua composição altas concentrações de proteínas, variando de acordo com o modo de cultivo e a fase do ciclo de vida [2]. Na fase vegetativa possui conteúdo proteico de 24 a 45% do peso seco, enquanto no estágio cístico varia entre 20 e 23% [2,50]. No presente estudo, a concentração de proteínas totais foi em média de $44,26 \pm 2,29\%$ do peso seco para a fase vegetativa e $19,9 \pm 2,17\%$ para a cística, apresentando diferença significativa entre as fases ($P < 0,05$) e sendo semelhante ($P > 0,05$) para a biomassa residual, proveniente da extração lipídica com os diferentes métodos de pré-tratamento celular, e biomassa bruta (controle) (Tabela 3). Destacando desse modo, que a biomassa residual é uma excelente fonte proteica, como observado também por Gerde et al. [51].

Tabela 3 – Conteúdo proteico (% peso seco) da biomassa residual de *H. pluvialis*, após extração lipídica utilizando diferentes métodos de pré-tratamento celular nas duas fases do ciclo de vida.

Métodos de pré - tratamento	Proteínas (% peso seco)	
	Vegetativa	Cística
celular		
BCMU	$43,40 \pm 1,6^{aA}$	$19,23 \pm 2,6^{aB}$
BSR	$45,57 \pm 3,2^{aA}$	$18,60 \pm 0,92^{aB}$
BCMR	$43,03 \pm 1,6^{aA}$	$20,33 \pm 2,49^{aB}$
Controle	$45,03 \pm 0,006^{aA}$	$21,60 \pm 2,63^{aB}$

Média de 3 repetições $\pm$ desvio padrão. Os valores médios entre os tratamentos em mesma coluna com letras minúsculas diferentes sobrescritas e em mesma linha com letras maiúsculas diferentes sobrescritas diferem significativamente ($P < 0,05$) por ANOVA fatorial e teste de Tukey. BCMU: biomassa com clorofórmio:metanol sob ultrassom; BSR: biomassa seca sob radiação γ ; BCMR: biomassa com clorofórmio:metanol sob radiação γ ; Controle: biomassa não submetida à pré-tratamento e extração lipídica (biomassa bruta).

De acordo com esses resultados, é possível constatar que a biomassa residual pode ser utilizada como fonte proteica para diversos fins, principalmente para alimentação animal, na formulação de ração ou como suplemento alimentar [52]. Patterson e Gatlin [53] observaram que é possível a substituição de até 10% da proteína bruta de farinha de peixe e proteína de soja por biomassa residual de *Navicula* sp. e *Nannochloropsis salina* sem haver perdas no desempenho zootécnico do peixe vermelho (*Sciaenops ocellatus*). Do mesmo modo, Ju et al. [54] ao utilizar biomassa pós-extração lipídica, contendo 40,3% de proteína bruta, em substituição parcial à proteína de farinha de peixe na dieta de *Litopenaeus vannamei*, observaram melhores taxas de crescimento e conversão alimentar quando substituiu-se 12,5% do conteúdo proteico de uma dieta controle (32,3% PB) e similares resultados produtivos à dieta controle em maiores níveis de substituição (25%, 37,5% e 50%), além de melhor pigmentação do camarão por conta da astaxantina. Contudo, a utilização direta dessa biomassa como alimento para animais está sujeita a verificação da inexistência de compostos tóxicos como metais pesados ou resquícios de solventes de extração [55].

Com relação à otimização da produção de biocombustível a partir da aplicação da biorrefinaria, foi verificado que a obtenção de proteína na biomassa residual de microalgas pode reduzir em até 16% o custo líquido da produção de biodiesel [56] e quando considerada a coprodução de astaxantina e polihidroxibutirato (polímero biodegradável), esse custo pode ser reduzido até 80%, principalmente devido à inclusão da receita de astaxantina [14].

4. Conclusões

O método de extração lipídica utilizando radiação gama foi eficiente para as células vegetativas de *H. pluvialis*, principalmente em biomassa com clorofórmio:metanol, apresentando rendimento lipídico superior aos demais. Já para a preservação da astaxantina na biomassa residual dos aplanósporos, constatou-se como melhor método de extração o uso de radiação gama em biomassa seca. Por outro lado, foi possível atestar que independente do

método de extração lipídica, a biomassa residual apresentou-se como excelente fonte proteica. Ademais, evidenciou-se que o cultivo em sistema mixotrófico contribuiu para elevada produtividade em biomassa seca da *H. pluvialis*.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) [sob o número de concessão 14722.01/16] e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento das pesquisas; e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pela disponibilidade para realização das análises.

6. Referências

- [1] J. Kim, C. Lee, M.S. Jeon, J. Park, Y.E. Choi, Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment, *Bioresour. Technol.* 268 (2018) 815-819.
- [2] M. Shah, R. Mahfuzur, Y. Liang, J. Cheng, M. Daroch, Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 531.
- [3] S.K. Saha, E. Mchugh, J. Hayes, S. Moane, D. Walsh, P. Murray, Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*, *Bioresour. Technol.* 128 (2013) 118-124.
- [4] V. Andruleviciute, V. Makareviciene, V. Skorupskaite, M. Gumbyte, Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol, *J. Appl. Phycol.* 26 (1) (2014) 83-90.

- [5] M. Damiani, C. Popovich, D. Constenla, P. Leonardi, Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock, *Bioresour. Technol.* 101 (11) (2010) 3801-3807.
- [6] M. Enamala, S. Enamala, M. Chavali, J. Donepudi, R. Yadavalli, B. Kolapalli, T. Aradhyula, J. Velpuri, C. Kuppam, Production of biofuels from microalgae-A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 94 (2018) 49-68.
- [7] K. Ramluckan, K. Moodley, F. Bux, An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method, *Fuel* 116 (2014) 103-108.
- [8] C. Onumaegbu, J. Mooney, A. Alaswad, A. Olabi, Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 93 (2018) 16-26.
- [9] C. Hagen, S. Siegmund, W. Braune, Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation, *Eur. J. Phycol.* 37 (2) (2002) 217-226.
- [10] E. Kovács, A. Keresztes, Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells, *Micron* 33 (2) (2002) 199-210.
- [11] M. Yoon, J. Choi, J. Lee, D. Park, Improvement of saccharification process for bioethanol production from *Undaria* sp. by gamma irradiation, *Radiat. Phys. Chem.* 81 (8) (2012) 999-1002.
- [12] J. Choi, S. Lee, Saccharification of Seaweed by Acid Hydrolysis with Gamma-Irradiation, *J. Eng. Appl. Sci.* 12 (10) (2017) 2640-2643.
- [13] L. Zhu, Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: an innovative framework, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41 (2015) 1376-1384.

- [14] C. Prieto, F. Ramos, V. Estrada, M. Villar, M. Diaz, Optimization of an integrated algae-based biorefinery for the production of biodiesel, astaxanthin and PHB, *Energy* 139 (2017) 1159-1172.
- [15] T. Bruton, H. Lyons, Y. Lerat, M. Stanley, M. Rasmussen, A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland, Technical Report, Sustainable Energy Ireland: Dublin, Ireland, 2009.
- [16] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25 (3) (2007) 294-306.
- [17] T.M. Mata, A.A. Martins, N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (1) (2010) 217-232.
- [18] E. Bligh, W. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911-917.
- [19] S. Dong, Y. Huang, R. Zhang, S. Wang, Y. Liu, Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci. World J.* 2014 (2014) ID 694305.
- [20] AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Washington D.C., AOAC International (1998) 1051p.
- [21] H. Sun, B. Liu, X. Lu, K.W. Cheng, F. Chen, Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*, *Bioresour. Technol.* 233 (2017) 326-331.
- [22] J. Park, S. Choi, M. Hong, S. Sim, Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37 (10) (2014) 2039-2047.
- [23] N. Pang, S. Chen, Effects of C5 organic carbon and light on growth and cell activity of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions, *Algal Res.* 21 (2017) 227-235.

- 524 [24] K. Chekanov, E. Lobakova, I. Selyakh, L. Semenova, R. Sidorov, A. Solovchenko,
 525 Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White
 526 Sea coastal rocks (Russia), Mar. Drugs 12 (8) (2014) 4504-4520.
- 527 [25] M. Rizwan, G. Mujtaba, S. Memon, K. Lee, N. Rashid, Exploring the potential of
 528 microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review, Renew. Sustain. Energy
 529 Rev. 92 (2018) 394-404.
- 530 [26] A. Montsant, A. Zarka, S. Boussiba, Presence of a nonhydrolyzable biopolymer in the
 531 cell wall of vegetative cells and astaxanthin-rich cysts of *Haematococcus pluvialis*
 532 (Chlorophyceae), Mar. Biotechnol. 3 (6) (2001) 515-521.
- 533 [27] S.B. Wang, Q. Hu, M. Sommerfeld, F. Chen, Cell wall proteomics of the green alga
 534 *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae), Proteomics 4 (3) (2004) 692-708.
- 535 [28] R. Praveenkumar, K. Lee, J. Lee, Y.K. Oh, Breaking dormancy: an energy-efficient
 536 means of recovering astaxanthin from microalgae, Green Chem. 17 (2) (2015) 1226-1234.
- 537 [29] S. Wi, B. Chung, J. Kim, M. Baek, D. Yang, J. Lee, J. Kim, Ultrastructural changes of
 538 cell organelles in *Arabidopsis* stems after gamma irradiation, J. Plant Biol. 48 (2) (2005) 195-
 539 200.
- 540 [30] S. Wi, B. Chung, J.S. Kim, J.H. Kim, M. Baek, J. Lee, Y. Kim, Effects of gamma
 541 irradiation on morphological changes and biological responses in plants, Micron 38 (6) (2007)
 542 553-564.
- 543 [31] R. Singh, D. Singh, A. Singh, Radiation sterilization of tissue allografts: A
 544 review, World J. Radiol. 8 (4) (2016) 355.
- 545 [32] Q.M. Li, X.J. Li, X.Y. Xiong, Q.L. Hu, X.H. Tan, K.Q. Wang, X.J. Su, Analysis of
 546 degradation products and structural characterization of giant reed and Chinese silvergrass
 547 pretreated by ^{60}Co - γ irradiation, Ind. Crops Prod. 83 (2016) 307-315.

- [33] M. Torun, in: Y. Sun, A. Chmielewski (Eds.), Applications of ionizing radiation in materials processing, Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warszawa, 2017, p. 447.
- [34] E. Kovaács, Macro-and microstructural changes of irradiated and calcium treated fruits, DSc Thesis, Budapest, Hungary (1995) 1-163.
- [35] J. Cheng, K. Li, Z. Yang, J. Zhou, K. Cen, Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress, Bioresour. Technol. 204 (2016) 49-54.
- [36] Y. Gao, B. Nagy, X. Liu, B. Simándi, Q. Wang, Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound, J. Supercrit. Fluids 49 (3) (2009) 345-350.
- [37] S.Y. Lee, J.M. Cho, Y.K. Chang, Y.K. Oh, Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review, Bioresour. Technol. 244 (2017) 1317-1328.
- [38] F. Adam, M. Abert-Vian, G. Peltier, F. Chemat, "Solvent-free" ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process, Bioresour. Technol. 114 (2012) 457-465.
- [39] R. Natarajan, W. Ang, X. Chen, M. Voigtmann, R. Lau, Lipid releasing characteristics of microalgae species through continuous ultrasonication, Bioresour. Technol. 158 (2014) 7-11.
- [40] T. Li, Y. Zheng, L. Yu, S. Chen, Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production, Biomass Bioenergy, 66 (2014) 204-213.
- [41] M. Zhekisheva, S. Boussiba, I. Khozin-Goldberg, A. Zarka, Z. Cohen, Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters, J. Phycol. 38 (2) (2002) 325-331.

- [42] T. Xi, D. Kim, S. Roh, J. Choi, Y. Choi, Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy, Appl. Microbiol. Biotechnol. 100 (14) (2016) 6231-6238.
- [43] J. Fábregas, A. Domínguez, A. Maseda, A. Otero, Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 61 (5-6) (2003) 545-551.
- [44] W. Ding, Y. Zhao, J.W. Xu, P. Zhao, T. Li, H. Ma, X. Yu, Melatonin: A Multifunctional Molecule That Triggers Defense Responses against High Light and Nitrogen Starvation Stress in *Haematococcus pluvialis*, J. Agric. Food Chem. 66 (29) (2018) 7701-7711.
- [45] A. Christophersen, H. Jun, K. Jørgensen, L. Skibsted, Photobleaching of astaxanthin and canthaxanthin—quantum-yields dependence of solvent, temperature, and wavelength of irradiation in relation to packaging and storage of carotenoid pigmented salmonoids, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 192 (5) (1991) 433-439.
- [46] F.O. Bobbio, P.A. Bobbio, Introdução à química de alimentos, Livraria Varela, São Paulo, 3rd ed., 2003.
- [47] L. Zhao, G. Zhao, F. Chen, Z. Wang, J. Wu, X. Hu, Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-astaxanthin, J. Agric. Food Chem. 54 (21) (2006) 8346-8351.
- [48] A. Vyas, J. Verma, N. Subrahmanyam, A review on FAME production processes, Fuel 89 (1) (2010) 1-9.
- [49] S. Xie, W. Fang, D. Wei, Y. Liu, P. Yin, J. Niu, L. Tian, Dietary supplementation of *Haematococcus pluvialis* improved the immune capacity and low salinity tolerance ability of post-larval white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Fish Shellfish Immunol. 80 (2018) 452-457.

- 596 [50] J. Kim, M. Affan, J. Jang, M. Kang, A. Ko, S. Jeon, D. Kang, Morphological,
597 molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga
598 *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) isolated from Korea, J.
599 Microbiol. Biotechnol. 25 (2) (2015) 238-246.
- 600 [51] J.A. Gerde, T. Wang, L. Yao, S. Jung, L.A. Johnson, B. Lamsal, Optimizing protein
601 isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass, Algal
602 Res. 2(2) (2013) 145-153.
- 603 [52] S. Gattrel, K. Lum, J. Kim, X.G. Lei, Potential of defatted microalgae from biofuel
604 industry as an ingredient to replace corn and soybean meal in swine and poultry diets, J.
605 Anim. Sci. 92 (2014) 1306-1314.
- 606 [53] D. Patterson, D.M. Gatlin III, Evaluation of whole and lipid-extracted algae meals in
607 the diets of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*), Aquaculture 416 (2013) 92-98.
- 608 [54] Z.Y. Ju, D.F. Deng, W. Dominy, A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*)
609 meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp
610 (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931), Aquaculture 354 (2012) 50-55.
- 611 [55] R. Maurya, C. Paliwal, T. Ghosh, I. Pancha, K. Chokshi, M. Mitra, A. Ghosh, S.
612 Mishra, Applications of de-oiled microalgal biomass towards development of sustainable
613 biorefinery, Bioresour. Technol. 214 (2016) 787-796.
- 614 [56] S.S. Gupta, Y. Shastri, S. Bhartiya, Impact of protein co-production on techno-
615 economic feasibility of microalgal biodiesel, Comput. Aided Chem. Eng. 38 (2016) 1803-
616 1808.

4 CONCLUSÃO

O cultivo em sistema mixotrófico contribuiu para elevada produtividade em biomassa seca da *H. pluvialis*, para as duas fases do ciclo de vida. Em contrapartida, o método de extração lipídica utilizando radiação gama foi eficiente apenas para as células vegetativas, principalmente em biomassa diluída, apresentando maior rendimento lipídico que os demais métodos. Quanto à concentração de astaxantina na biomassa residual dos aplanósporos, foi observada sua preservação ao utilizar o método de extração lipídica com radiação gama em biomassa seca. Por outro lado, foi possível constatar que independente do método de extração lipídica, a biomassa residual apresentou-se como excelente fonte proteica, possuindo níveis proteicos semelhantes à biomassa bruta.

Este é o primeiro estudo a utilizar radiação gama como método de pré-tratamento de biomassa algal para extração lipídica. Ademais, serão realizadas a caracterização lipídica e a quantificação de astaxantina dos extratos lipídicos obtidos neste trabalho, para maior fundamentação.

REFERÊNCIAS

- AFLALO, C.; MESHULAM, Y.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. On the relative efficiency of two-vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 300-305, 2007.
- ANDRULEVICIUTE, V.; MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V.; GUMBYTE, M. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal of applied phycology**, v. 26, n. 1, p. 83-90, 2014.
- BALASUNDARAM, B.; SKILL, S.; LLEWELLYN, C. A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. **Biochemical engineering journal**, v. 69, p. 48-56, 2012.
- BILBAO, P.G.S.; DAMIANI, C.; SALVADOR, G.A.; LEONARDI, P. *Haematococcus pluvialis* as a source of fatty acids and phytosterols: potential nutritional and biological implications. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 6, p. 3283-3294, 2016.
- BLIGH, E.; DYER W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, p.911-917, 1959.
- BRUTON, T.; LYONS, H.; LERAT, Y.; STANLEY, M.; RASMUSSEN, M. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. **Sustainable energy Ireland**. 2009.
- CHEKANOV, K.; LOBAKOVA, E.; SELYAKH, I.; SEMENOVA, L.; SIDOROV, R.; SOLOVCHENKO, A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). **Marine drugs**, v. 12, n. 8, p. 4504-4520, 2014.
- CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 336-346, 2018.
- CHENG, J.; LI, K.; YANG, Z.; ZHOU, J.; CEN, K. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. **Bioresource technology**, v. 204, p. 49-54, 2016.
- CHEW, K.; YAP, J.; SHOW, P.; SUAN, N.; JUAN, J.; LING, T.; LEE D.J.; CHANG, J. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.
- CHIA, S.; CHEW, K.; SHOW, P.; YAP, Y.; ONG, H.; LING, T.; CHANG, J. Analysis of economic and environmental aspects of microalgae biorefinery for biofuels production: a review. **Biotechnology journal**, p. 1700618, 2018.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- CHOI, J.; LEE, S. Saccharification of Seaweed by Acid Hydrolysis with Gamma-Irradiation. **Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 12, n. 10, p. 2640-2643, 2017.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M.; CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 898-902, 2008.

DAI, Y.; CHEN, K.; CHEN, C. Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 250, p. 267-273, 2014.

DAMIANI, M.; POPOVICH, C.; CONSTENLA, D.; LEONARDI, P. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. **Bioresource technology**, v. 101, n. 11, p. 3801-3807, 2010.

DING, W.; ZHAO, Y.; XU, J.W.; ZHAO, P.; LI, T.; MA, H.; YU, X. Melatonin: A Multifunctional Molecule That Triggers Defense Responses against High Light and Nitrogen Starvation Stress in *Haematococcus pluvialis*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 29, p. 7701-7711, 2018.

DORIA, E.; TEMPORITI, M.; DAMIANI, M.; POPOVICH, C.; LEONARDI, P.; NIELSEN, E. Influence of light stress on the accumulation of xanthophylls and lipids in *Haematococcus pluvialis* CCALA 1081 Grown under autotrophic or mixotrophic conditions. **Journal of marine biology and aquaculture**, v. 4, n. 1, p. 30-35, 2018.

ENAMALA, M.; ENAMALA, S.; CHAVALI, M.; DONEPUDI, J.; YADAVALLI, R.; KOLAPALLI, B.; ARADHYULA, T.; VELPURI, J.; KUPPAM, C. Production of biofuels from microalgae-A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 94, p. 49-68, 2018.

FIDALGO, J.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, v. 166, n. 1-2, p. 105-116, 1998.

FOLCH, J.; LESS, M. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of biological chemistry**, p. 266, 1957.

FOLEY, D.; PICKETT, K.; VARON, J.; LEE, J.; MLN, D.; CAPORASO, R.; PRAKASH, A. Pasteurization of fresh orange juice using gamma irradiation: microbiological, flavor, and sensory analyses. **Journal of food science**, v. 67, n. 4, p. 1495-1501, 2002.

FOTEINIS, S.; ANTONIADIS-GAVRIIL, A.; TSOUTSOS, T. Life cycle assessment of algae-to-biodiesel shallow pond production systems in the Mediterranean: influence of species, pond type, by (co)-product valorisation and electricity mix. **Biofuels, bioproducts and biorefining**, v. 12, n. 4, p. 542-558, 2018.

GEORGE, B.; PANCHAL, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource technology**, v. 171, p. 367-374, 2014.

GÖKSAN, T.; AK, İ.; KILIÇ, C. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. **Turkish journal of fisheries and aquatic sciences**, v. 11, n. 3, 2011.

GORDILLO, F.; GOUTX, M.; FIGUEROA, F.; NIELL, F. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. **Journal of applied phycology**, v. 10, n. 2, p. 135-144, 1998.

GULDHE, A.; SINGH, B.; RAWAT, I.; RAMLUCKAN, K.; BUX, F. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. **Fuel**, v. 128, p. 46-52, 2014.

GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 2, p. 243-260, 2015.

HAGEN, C.; SIEGMUND, S.; BRAUNE, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **European journal of phycology**, v. 37, n. 2, p. 217-226, 2002.

HOEK, V.D.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. Algae: an introduction to phycology. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 623 p, 1995.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The plant journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

KATIYAR, R.; GURJAR, B.; BISWAS, S.; PRUTHI, V.; KUMAR, N.; KUMAR, P. Microalgae: an emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 72, p. 1083-1093, 2017.

KHAN, S.A.; HUSSAIN, M.Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U.C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009.

KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. **Food and bioproducts processing**, 2018.

KIM, D.Y.; VIJAYAN, D.; PRAVEENKUMAR, R.; HAN, J.I.; LEE, K.; PARK, J.Y.; CHANG, W.S.; LEE, J.S.; OH, Y.K. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource technology**, v. 199, p. 300-310, 2016.

KIM, J.; AFFAN, M.; JANG, J.; KANG, M.; KO, A.; JEON, S.; KANG, D. Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (*Haematococcaceae*, Chlorophyta) isolated from Korea. **Journal of microbiology biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 238-246, 2015.

KIM, J.; LEE, C.; JEON, M.S.; PARK, J.; CHOI, Y.E. Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. **Bioresource technology**, v. 268, p. 815-819, 2018.

KOVÁCS, E.; KERESZTES, A. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. **Micron**, v. 33, n. 2, p. 199-210, 2002.

KUMAR, P.; BARRETT, D.; DELWICHE, M.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMARI, P.; REDDY, C.; JHA, B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. **Analytical biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 134-144, 2011.

LEE, A.K.; LEWIS, D.M.; ASHMAN, P.J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. **Biomass and bioenergy**, v. 46, p. 89-101, 2012.

LEE, B.M.; JEUN, J.; KANG, P. Enhanced enzymatic hydrolysis of kenaf core using irradiation and dilute acid. **Radiation physics and chemistry**, v. 130, p. 216-220, 2017.

LEE, R.; LOEBLICH, A. Distribution of 21: 6 hydrocarbon and its relationship to 22: 6 fatty acid in algae. **Phytochemistry**, v. 10, n. 3, p. 593-602, 1971.

LI, Q.M.; LI, X.J.; XIONG, X.Y.; HU, Q.L.; TAN, X.H.; WANG, K.Q.; SU, X.J. Analysis of degradation products and structural characterization of giant reed and Chinese silvergrass pretreated by ⁶⁰Co-γ irradiation. **Industrial crops and products**, v. 83, p. 307-315, 2016.

LIU, C.; LIN, L. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 42, 2001.

LIU, Y.; ZHOU, H.; WANG, S.; WANG, K.; SU, X. Comparison of γ-irradiation with other pretreatments followed with simultaneous saccharification and fermentation on bioconversion of microcrystalline cellulose for bioethanol production. **Bioresource technology**, v. 182, p. 289-295, 2015.

LORENTE, E.; FARRIOL, X.; SALVADÓ, J. Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. **Fuel Processing Technology**, v. 131, p. 93-98, 2015.

MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MONCADA, J.; CARDONA, C.A.; RINCÓN, L.E. Design and analysis of a second and third generation biorefinery: The case of castorbean and microalgae. **Bioresource technology**, v. 198, p. 836-843, 2015.

MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉ, K.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 76, p. 493-506, 2017.

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.

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

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, 2016.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in energy and combustion science**, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011.

NUNES, M.; VIEIRA, A.; PINTO, E.; CARNEIRO, R.; MONTEIRO, A. Carotenogênese em células de *Haematococcus pluvialis* induzidas pelos estresses luminoso e nutricional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 825-832, 2013.

ONUMAEGBU, C.; MOONEY, J.; ALASWAD, A.; OLABI, A. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 93, p. 16-26, 2018.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource technology**, v. 96, n. 3, p. 373-378, 2005.

PANG, N.; CHEN, S. Effects of C5 organic carbon and light on growth and cell activity of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. **Algal Research**, v. 21, p. 227-235, 2017.

PARK, J.; CHOI, S.; HONG, M.; SIM, S. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 10, p. 2039-2047, 2014.

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics. **Algal biorefineries**. Springer, Cham, 61-131, 2015.

PRAVEENKUMAR, R.; LEE, K.; LEE, J.; OH, Y.K. Breaking dormancy: an energy-efficient means of recovering astaxanthin from microalgae. **Green Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 1226-1234, 2015.

PRIETO, C.; RAMOS, F.; ESTRADA, V.; VILLAR, M.; DIAZ, M. Optimization of an integrated algae-based biorefinery for the production of biodiesel, astaxanthin and PHB. **Energy**, v. 139, p. 1159-1172, 2017.

RAMLUCKAN, K.; MOODLEY, K.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, v. 116, p. 103-108, 2014.

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1495-1503, 2012.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

SAHA, S.K.; MCHUGH, E.; HAYES, J.; MOANE, S.; WALSH, D.; MURRAY, P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource technology**, v. 128, p. 118-124, 2013.

SHABANA, E.; GABR, M.; MOUSSA, H.; EL-SHAER, E.; ISMAIEL, M. Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in response to gamma irradiation. **Food chemistry**, v. 214, p. 550-555, 2017.

SHAH, M.; MAHFUZUR, R.; LIANG, Y.; CHENG, J.; DAROCH, M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 531, 2016.

SHUBA, E.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 81, p. 743-755, 2018.

SINGH, A.; NIGAM, P.; MURPHY, J. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 26-34, 2011.

SINGH, R.; SINGH, D.; SINGH, A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. **World journal of radiology**, v. 8, n. 4, p. 355, 2016.

SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. **Chinese journal of biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 341-348, 2008.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H.H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 55, p. 909-941, 2016.

TALE, M.; DEVI SINGH, R.; KAPADNIS, B.; GHOSH, S. Effect of gamma irradiation on lipid accumulation and expression of regulatory genes involved in lipid biosynthesis in *Chlorella* sp. **Journal of applied phycology**, v. 30, n. 1, p. 277-286, 2018.

TEDESCO, S.; MAC LOCHLAINN, D.; OLABI, A. Particle size reduction optimization of *Laminaria* spp. biomass for enhanced methane production. **Energy**, v. 76, p. 857-862, 2014.

TORUN, M. Applications of ionizing radiation in materials processing. SUN, Y.; CHMIELEWSKI, A. (Eds.). **Institute of nuclear chemistry and technology**, Warszawa, p. 447, 2017.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R.; BARBOSA, M.; EPPINK, M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource technology**, v. 135, p. 142-149, 2013.

VYAS, A.; VERMA, J.; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. **Fuel**, v. 89, n. 1, p. 1-9, 2010.

WANG, K.; XIONG, X.; CHEN, J.; CHEN, L.; SU, X.; LIU, Y. Comparison of gamma irradiation and steam explosion pretreatment for ethanol production from agricultural residues. **Biomass and bioenergy**, v. 46, p. 301-308, 2012.

WI, S.; CHUNG, B.; KIM, J.; BAEK, M.; YANG, D.; LEE, J.; KIM, J. Ultrastructural changes of cell organelles in *Arabidopsis* stems after gamma irradiation. **Journal of plant biology**, v. 48, n. 2, p. 195-200, 2005.

WI, S.; CHUNG, B.; KIM, J.; KIM, J.; BAEK, M.; LEE, J.; KIM, Y. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. **Micron**, v. 38, n. 6, p. 553-564, 2007.

WU, W.; LIN, K.H.; CHANG, J.S. Economic and life-cycle greenhouse gas optimization of microalgae-to-biofuels chains. **Bioresource technology**, v. 267, p. 550-559, 2018.

XIE, S.; FANG, W.; WEI, D.; LIU, Y.; YIN, P.; NIU, J.; TIAN, L. Dietary supplementation of *Haematococcus pluvialis* improved the immune capacity and low salinity tolerance ability of post-larval white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 80, p. 452-457, 2018.

YOON, M.; CHOI, J.; LEE, J.; PARK, D. Improvement of saccharification process for bioethanol production from *Undaria* sp. by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 999-1002, 2012.

ZHANG, Z.; WANG, B.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; LI, Y.; HAN, D. A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 113, n. 10, p. 2088-2099, 2016.

ZHEKISHEVA, M.; BOUSSIBA, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; ZARKA, A.; COHEN, Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 325-331, 2002.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: an innovative framework. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.

APÊNDICE – NORMAS DO PERIÓDICO



BIOMASS & BIOENERGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0961-9534

DESCRIPTION

Biomass & Bioenergy is an international journal publishing original research papers and short communications, review articles and case studies on **biological resources**, chemical and biological processes, and biomass products for new **renewable sources of energy and materials**.

The scope of the journal extends to the **environmental, management and economic** aspects of biomass and bioenergy.

Key areas covered by the journal:

- **Biomass:** sources, energy crop production processes, genetic improvements, composition. Please note that research on these biomass subjects must be linked directly to bioenergy generation.
- **Biological Residues:** residues/rests from agricultural production, forestry and plantations (palm, sugar etc), processing industries, and municipal sources (MSW). Papers on the use of biomass residues through innovative processes/technological novelty and/or consideration of feedstock/system sustainability (or unsustainability) are welcomed. However waste treatment processes and pollution control or mitigation which are only tangentially related to bioenergy are not in the scope of the journal, as they are more suited to publications in the environmental arena. Papers that describe conventional waste streams (ie well described in existing literature) that do not empirically address 'new' added value from the process are not suitable for submission to the journal.
- **Bioenergy Processes:** fermentations, thermochemical conversions, liquid and gaseous fuels, and petrochemical substitutes
- **Bioenergy Utilization:** direct combustion, gasification, electricity production, chemical processes, and by-product remediation
- Biomass and the **Environment:** carbon cycle, the net energy efficiency of bioenergy systems, assessment of sustainability, and biodiversity issues.

The journal does not consider papers on the following subjects:

- Performance of fuel combustion in engines
- Technical aspects of first generation biofuels
- Soil science papers with no direct linking to bioenergy generation
- Isolation of yeast/bacterial strains
- Purely analytical biochemistry derived studies that have no direct linking to bioenergy generation

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Agroindustrialists, biotechnologists, chemical engineers, renewable energy and resources researchers.

IMPACT FACTOR

2017: 3.358 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Biotechnology
Environmental Periodicals Bibliography
SciSearch
Ecological Abstracts
Engineering Village - GEOBASE
Research Alert
Focus on Global Change
Scopus
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Biotechnology Citation Index
AGRICOLA
Academic Search (EBSCO)
Elsevier BIOBASE
Compendex
Engineering Information Database EnCompass LIT (Elsevier)
FLUIDEX
PubMed
OCLC Contents Alert
Personal Alert
Plant Science Database (Elsevier)
Engineering Index Monthly
Biological Abstracts
BIOSIS Previews
SciSearch/Science Citation Index Expanded
Web of Science

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Patricia Thornley, University of Manchester, Manchester, England, UK

Managing Editor

Jon Paul McCalmont, The University of Exeter, Exeter, England, UK

Associate Editors

Wiebren de Jong, Delft University of Technology, Delft, Netherlands

Manuel Garcia-Perez, Washington State University, Richland, Washington, USA

Walter Haslinger, Bioenergy 2020+ GmbH, Graz, Austria

Yan Liu, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

Solange Mussatto, Danmarks Tekniske Universitet (DTU), Kongens Lyngby, Denmark

Marty Schmer, USDA-ARS-AMRU, Lincoln, Nebraska, USA

International Editorial Board

P.C. Abhilash, Inst. of Environment & Sustainable Development (IESD), Banaras Hindu University, Varanasi, India

Lawrence P. Abrahamson, Department of Forest and Natural Resources, State University of New York (SUNY), Syracuse, New York, USA
D.I. Bransby, Dept. of Agronomy & Soils, Auburn University, Auburn, Alabama, USA
Tony Bridgewater, Dept. of Engineering and Applied Science, Aston University, Birmingham, UK
Robert Brown, Iowa State University, Ames, Iowa, USA
Andre Faaij, Academic Director of the Energy Academy Europe, Groningen, Netherlands
 Distinguished Professor at Groningen University
 Affiliated to ESRIG, the Energy and Sustainability Research Institute Groningen
J. Fernandez, ETSI Agronomos-Botanica, Madrid, Spain
Ghislain Gosse, Unite de Recherche en Bioclimatologie, INRA Centre d'Orléans, Thiverval-Grignon, France
Stephen Karekezi, African Energy Policy Res Netw, Nairobi, Kenya
Michael. R. Ladisch, Department of Agricultural & Biological Engineering, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA
Xiaobo Liu, School of Biological Sciences, The University of Hong Kong, Hong Kong, China
I. Obernberger, Inst. of Chemical Engineering, Graz University of Technology, Graz, Austria
Charles Peterson, Dept. of Biological & Agric Eng, Idaho State University, Moscow, Idaho, USA
N.H. Ravindranath, Centre for Ecological Sciences, Indian Institute of Science, Bangalore, India
Fernando Rubiera, INCAR - Instituto Nacional del Carbón, Spanish National Research Council, Oviedo, Spain
Raffaele Spinelli, Istituto per la Valorizzazione del Legno (IVALSA), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Sesto Fiorentino, Italy
M. Tanticharoen, School Energy & Materials, King Mongkuts Inst Technology, Bangkok, Thailand
David Tillman, Global New Products, Foster Wheeler Development Cor, Clinton, New Jersey, USA
R.L. Vetter, AgriBio Systems Inc, Elgin, Illinois, USA
Avigad Vonshak, J. Blaustein Institutes for Desert Research, Ben Gurion University of the Negev, Beersheva, Israel
Ann Wilkie, Dept. of Soil and Water Science, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Types of Contributions

These may take the form of research papers describing original studies (4000 to 6000 words), shorter technical notes and short communications (600 to 2000 words), state-of-the-art reviews, and topical reports. Society news and reviews of publications in this field are also accepted.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/ethicalguidelines>. All authors of the manuscript must mutually agree that it is to be submitted to the journal.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex](#) and [gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior

to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3700**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://ees.elsevier.com/jbb>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's

homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. When submitting a manuscript, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found [here](#).

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor. All submitted manuscripts must be double-spaced. Manuscripts must also have all pages numbered consecutively and line numbering activated.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

All tables should be submitted as a separate file.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/biomass-and-bioenergy>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] M. Renouf, M. Wegener, L. Nielsen, An environmental life cycle assessment comparing Australian sugarcane with US corn and UK sugar beet as producers of sugars for fermentation, *Biomass Bioener.* 32 (12) (2008) 1144-1155.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, Macmillan, New York, 3rd ed., 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age, E-Publishing*, New York, 1994, p. 281.

[4] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking](#) page.

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals](#) page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or

setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- Figures must be submitted as a separate document
- Tables must be submitted as a separate document
- Figure caption must be submitted as a separate document
- Line numbers must be numbered throughout the manuscript until the end of the references
- Page numbers must be included
- Author must suggest 3 potential reviewers without any conflict of interest

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://service.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>