

Irradiación infrarroja: un método novedoso para asistir la extracción de pigmentos Fotosintéticos en microalgas

Infrared irradiation: a novel method to assist photosynthetic pigment extraction in microalgae

Gloria Viviana Cerrillo-Rojas¹, Teodoro Ibarra Pérez² y Hans Christian Correa-Aguado^{2*}

¹ Universidad Autónoma de Durango campus Zacatecas, Escuela de Medicina, 98057, México. ² Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas (UPIIZ). Circuito del Gato 202, Cd. Administrativa, 98160. Zacatecas, Mexico.

*Autor de correspondencia: hcorreaa@ipn.mx

RESUMEN

Las microalgas contienen una valiosa composición de metabolitos de interés para la industria de los alimentos, cosmética, farmacéutica, nutracéutica y de los biocombustibles. Sin embargo, la fuerte pared celular de las microalgas ha dificultado la extracción de sus compuestos bioactivos, como clorofilas y carotenoides. Este trabajo presenta la implementación de un método novedoso para asistir la extracción de clorofilas y carotenoides totales basado en la irradiación infrarroja en la microalga *Scenedesmus obliquus*. Además, se evaluó la capacidad extractiva de nueve mezclas con disolventes polares y no polares a diferentes proporciones. Los resultados obtenidos se compararon con el método de extracción de Soxhlet. Los disolventes que mostraron mejor eficiencia de extracción fueron hexano/metanol y acetato de etilo/metanol. El método Soxhlet mostró una eficiencia ligeramente mayor en la extracción de clorofila a (Ca) 2.75-22.53 µg mL⁻¹, clorofila b (Cb) 0.29-8.97 µg mL⁻¹ y carotenoides totales (CT) 0.7-6.35 µg mL⁻¹ en comparación con la extracción asistida con infrarrojo (EAIR), 1.71-13.41 µg mL⁻¹, 0.26-5.72 µg mL⁻¹ y 0.55-5.03 µg mL⁻¹ para Ca, Cb y CT respectivamente. Sin embargo, las condiciones de extracción Soxhlet, como el tiempo (180 min), energía (calor) y disolvente (150 mL), fueron significativamente mayores a aquellas necesarias en la EAIR (10 min y 10 mL de disolvente). Para mejorar la eficiencia de extracción de la EAIR son necesarios estudios de optimización de las condiciones de extracción como la proporción de los disolventes, el tiempo y temperatura de extracción y la intensidad de la irradiación.

Palabras clave: Carotenoides, Clorofilas, EAIR, *Scenedesmus obliquus*, Extracción Soxhlet.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son los organismos más primitivos y dominantes del planeta con una capacidad y eficiencia fotosintética, que supera ampliamente al de las plantas

ABSTRACT

Microalgae contain a valuable metabolite composition of interest to the food, cosmetic, pharmaceutical, nutraceutical, and biofuel industries. However, the strong cell wall of microalgae has hindered the extraction of their bioactive compounds, such as chlorophylls and carotenoids. This work presents the implementation of a novel method to facilitate the extraction of chlorophylls and total carotenoids based on infrared irradiation in the microalga *Scenedesmus obliquus*. In addition, the extractive capacity of nine mixtures of polar and non-polar solvents at different ratios was evaluated. The results obtained were compared with the Soxhlet extraction method. The solvents that showed the best extraction efficiency were hexane/methanol and ethyl acetate/methanol. The Soxhlet method showed slightly higher efficiency in the extraction of chlorophyll a (Ca) 2.75-22.53 µg mL⁻¹, chlorophyll b (Cb) 0.29-8.97 µg mL⁻¹ and total carotenoids (CT) 0.7-6.35 µg mL⁻¹ compared to infrared assisted extraction (IRAE), 1.71-13.41 µg mL⁻¹, 0.26-5.72 µg mL⁻¹ and 0.55-5.03 µg mL⁻¹ for Ca, Cb and CT respectively. However, the Soxhlet extraction conditions, such as time (180 min), energy (heat), and solvents (150 mL), were significantly higher than those in IRAE (10 min and 10 mL solvent). To improve the extraction efficiency of IRAE, optimization studies of the extraction conditions, such as solvent ratio, extraction time and temperature, and irradiation intensity, are needed.

Keywords: Carotenoids, Chlorophylls, IRAE, *Scenedesmus obliquus*, Soxhlet extraction.

INTRODUCTION

Microalgae are the most primitive and dominant organisms on the planet, with a photosynthetic capacity and efficiency far exceeding that of plants (Chisti, 2020). Consequently, microalgae are a sustainable source of metabolites of industrial interest in functional foods, nutraceuticals, pharmaceuticals, cosmetics, and aquaculture

(Chisti,2020). Las microalgas son una fuente sustentable de metabolitos de interés industrial en las áreas de los alimentos funcionales, nutracéuticos, productos farmacéuticos, cosméticos, y acuicultura (Silva et al., 2020). Proteínas, antioxidantes, ácido fólico, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), triglicéridos, vitaminas, clorofilas y carotenoides son ejemplo de los metabolitos presentes en las microalgas (Sathasivam et al., 2019).

Scenedesmus obliquus es una microalga que ha sido utilizada en diversas aplicaciones biotecnológicas debido a su alta tasa de crecimiento, su extrema resistencia a condiciones desfavorables de cultivo, y a su alto contenido nutricional. *S. obliquus* contiene pigmentos como clorofilas (a y b), luteína, además de carotenoides importantes como β -caroteno y astaxantina. Estos metabolitos son esenciales en la suplementación humana, ya que no son sintetizados endógenamente por las personas (Oliveira et al., 2021).

La mayor limitación en la recuperación de pigmentos en microalgas proviene de su rígida y gruesa pared celular, esto disminuye la eficiencia en la obtención de metabolitos e incrementa los costes de extracción (Alhattab et al., 2019). Diversas metodologías de disrupción celular se han utilizado para incrementar la extracción de estos compuestos con resultados prometedores, como por ejemplo la sonicación, microondas, homogeneización, extracción a con fluidos supercríticos, extracción enzimática entre otras (Pagels et al., 2021). Sin embargo, no existe una metodología establecida para llevar a cabo una extracción eficiente de pigmentos en microalgas. Por lo anterior, es indispensable la investigación y desarrollo de métodos que aborden la eficacia, la selectividad y el tiempo de extracción, los costes de mantenimiento y operación, el consumo de energía, y la degradación de los compuestos extraídos en microalgas.

La irradiación infrarroja es una potencial alternativa para facilitar la extracción de productos naturales con menores tiempos de extracción, menor consumo energético, menores desechos y subproductos indeseados, y mayores rendimientos del producto (Escobedo et al., 2016). El infrarrojo (IR) es la parte del espectro electromagnético ubicada entre las regiones visible y de microondas. Las moléculas orgánicas absorben la IR y la convierten en energía de rotación molecular a una frecuencia de 100 cm^{-1} . A frecuencias absorbidas de $10,000\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ la molécula dispersa la energía en forma de vibración. Por lo que, la IR es una forma no convencional, pero directa de calentamiento (Chemat et al., 2020). La extracción asistida con infrarrojos (EAIR) ha sido utilizada para facilitar la obtención de ácidos fenólicos y diterpenoides en *Radix Salviae miltiorrhizae* (Chen et al., 2010). (Li et al., 2015), evaluaron el efecto de la EAIR junto con hidróxido de tetrabutilfosfonio (TBPH), para extraer salidroside a partir de *Rhodiola crenulata* y compararon la eficiencia de los extractos obtenidos por IR y por un método de extracción convencional, logrando mejoras con el primer método. Recientemente, también se evaluó la IR en la extracción de compuestos polifenólicos como la punicalagina y la punicalina de cáscara de granada (*Punica*

(Silva et al., 2020). Proteins, antioxidants, folic acid, polysaccharides, polyunsaturated fatty acids, triglycerides, vitamins, chlorophylls, and carotenoids are metabolites in microalgae.

Scenedesmus obliquus is a microalga that has been used in various biotechnological applications due to its high growth rate, extreme resistance to unfavorable culture conditions, and high nutritional content. *S. obliquus* contains pigments such as chlorophylls (a and b), lutein, and important carotenoids such as β -carotene and astaxanthin. These metabolites are essential in human supplementation, as they are not synthesized endogenously by humans (Oliveira et al., 2021).

The major drawback in microalgae pigment recovery comes from their rigid and thick cell wall. This decreases the efficiency of obtaining metabolites and increases extraction costs (Alhattab et al., 2019). Several microalgae cell disruption techniques have been used to increase the extraction of these compounds with promising results, such as sonication, microwaves, homogenization, supercritical fluid extraction, and enzymatic extraction, among others (Pagels et al., 2021). However, an established methodology for efficient pigment extraction in microalgae has yet to be established. Therefore, research and development methods that address the efficiency, selectivity and extraction time, maintenance and operation costs, energy consumption, and degradation of the extracted compounds in microalgae are essential.

Infrared irradiation is a potential alternative to assist the natural products extraction with shorter extraction times, lower energy consumption, reduced waste and unwanted by-products, and higher product yields (Escobedo et al., 2016). The infrared (IR) is the part of the electromagnetic spectrum located between the visible and microwave regions. Organic molecules absorb IR and convert it into molecular rotational energy at a frequency of 100 cm^{-1} . At absorbed frequencies of $10,000\text{-}100\text{ cm}^{-1}$, the molecule scatters the energy in vibration. Thus, IR is an unconventional but direct form of heating (Chemat et al., 2020). Infrared-assisted extraction (IRAE) has been used to facilitate obtaining phenolic acids and diterpenoids in *Radix Salviae miltiorrhizae* (Chen et al., 2010). Li et al., (2015), evaluated the effect of IRAE and tetrabutyl phosphonium hydroxide (TBPH) to extract salidroside from *Rhodiola crenulata* and compared the efficiency of extracts obtained by IR and by a conventional extraction method, achieving improvements with the former method. Recently, IR was also evaluated in extracting polyphenolic compounds such as punicalagin and punicalin from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, with good results (Rajha et al., 2019). The IRAE implementation possesses unique features such as simple, safe, robust, controlled operation, low energy consumption, fast heating, and high mass transfer. In addition, this method allows for using renewable resources such as microalgae and less toxic solvents and aiming for a non-denatured product (Neetoo and Chen, 2014).

This study compared the extraction efficiency of photosynthetic pigments in *Scenedesmus obliquus* using

granatum L.) con buenos resultados (Rajha et al., 2019). La implementación de la EAIR posee características únicas como un funcionamiento sencillo, seguro, robusto y controlado, un bajo consumo energético, un rápido calentamiento y alta transferencia de masa. Además, este método permite utilizar recursos renovables como las microalgas, utilizar disolventes menos tóxicos, y aspirar a un producto no desnaturalizado (Neetoo and Chen, 2014)

En este estudio se comparó la eficiencia de extracción de pigmentos fotosintéticos en *Scenedesmus obliquus* utilizando una técnica convencional de extracción como Soxhlet y una novedosa tecnología de extracción asistida con irradiación infrarroja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de biomasa de *S. obliquus*

En recipientes de 1 L, se adicionaron 845 mL de medio Basal Bold (MBB) estéril, y 5 mL de un cultivo de *S. obliquus* (UTEX 3031, Universidad de Texas, E.U.A) a una densidad óptica de 0.20 ± 0.01 medida a 750 nm (D.O.₇₅₀) (Uv-vis, Thermo Scientific Genesys 10s). Los recipientes se taparon y se abastecieron con un flujo de aire a 1500 cc/min. Los cultivos se incubaron a $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, bajo un fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 h con lámparas de luz blanca-fría fluorescente (OSRAM 096/850), y una intensidad $76 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ hasta la detección de la fase estacionaria temprana.

Las cinéticas de crecimiento de los cultivos se determinaron por conteo celular directo. La concentración celular (C) se determinó a través de un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad (Hausser Scientific™ Bright-Line™). Las muestras (10 μL) se observaron en un microscopio óptico (Olympus CH30 LF 100) con un aumento de 40X cada 48 h hasta la detección de la fase estacionaria temprana. La concentración celular (células/mL) se determinó de acuerdo con la ecuación 1:

$$C = [(N/4)/10^{-6}] \times \text{factor de dilución} \quad \text{ec. 1}$$

Donde N = promedio de células presentes en los 5 cuadros pequeños del cuadro central del hematocitómetro.

Posteriormente, los cultivos fueron decantados y centrifugados a 10,000 rpm por 10 min. La biomasa obtenida se lavó con agua destilada (5 mL, 3 veces), y se liofilizó. El peso seco (PS) de la biomasa liofilizada de *S. obliquus* se determinó gravimétricamente.

Extracción de pigmentos de *S. obliquus* por el Método de Soxhlet

En un cartucho de celulosa (25X80 mm, AHLSTROM) se agregaron 0.2 ± 0.01 g de biomasa liofilizada de *S. obliquus*, y se colocó dentro de la cámara de extracción del equipo Soxhlet. Enseguida, los pigmentos se extrajeron por 3 horas a reflujo (2 gotas por segundo) con 40 mL de cada una de las mezclas de disolventes indicadas en la Tabla 1. El exceso de disolvente de las muestras se evaporó a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo presión reducida en roto-evaporador.

DOI: <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v7i1.1646>

a conventional extraction technique such as Soxhlet and a novel infrared radiation-assisted extraction technology.

MATERIALS AND METHODS

Biomass production from *S. obliquus*

In 1 L vessels, 845 mL of sterile Basal Bold medium (BBM) and 5 mL of a dense culture of *S. obliquus* (UTEX 3031, University of Texas, USA) was added at an optical density of 0.20 ± 0.01 measured at 750 nm (D.O.₇₅₀) (Uv-vis, Thermo Scientific Genesys 10s). Vessels were capped and supplied with airflow at 1500 cc/min. Cultures were incubated at $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, under a 16/8 h light/dark photoperiod with fluorescent cool-white light lamps (OSRAM 096/850), and intensity $76 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ until detection of early stationary phase.

Growth kinetics were determined by direct cell counting. Cell concentration (C) was determined through a 0.1 mm deep hemacytometer (Hausser Scientific™ Bright-Line™). Samples (10 μL) were observed under an optical microscope (Olympus CH30 LF 100) at 40X magnification every 48 h until the detection of the early stationary phase. Cell concentration (cells/mL) was determined according to equation 1:

$$C = [(N/4)/10^{-6}] \times \text{dilution factor} \quad \text{ec. 1}$$

Where N = average cells number present in the five small squares in the hemacytometer central square.

Subsequently, the cultures were decanted and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The biomass obtained was washed with distilled water (5 mL, three times) and lyophilized. The *S. obliquus* dry weight (DW) lyophilized biomass was determined gravimetrically.

Extraction of pigments from *S. obliquus* by the Soxhlet Method

In a cellulose cartridge (25X80 mm, AHLSTROM), 0.2 ± 0.01 g *S. obliquus* lyophilized biomass was added and placed inside the Soxhlet extraction chamber. Then, the pigments were extracted for 180 min at reflux (2 drops per second) with 40 mL of each solvent mixture indicated in Table 1. Finally, solvent excess was evaporated at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ under reduced pressure in a roto-evaporator, and the recovered extracts were kept in the dark at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ until use.

S. obliquus pigment extraction assisted with IRAE.

Freeze-dried microalgae biomass (0.2 ± 0.01 g) was added to a 250 mL round bottom flask coupled to a condenser. Then, 10 mL of each solvent mixture was added according to Table 1. Pigment extraction was assisted with an incandescent infrared (IR) light lamp (BR40 6015 250 W ADIR lighting, Mexico) placed 2 cm from the bottom of flask for 10 min. Excess solvent was evaporated at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ and reduced pressure in a roto-evaporator. The recovered extracts were kept in the dark at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ until use.

Los extractos recuperados se mantuvieron en oscuridad a 4 °C hasta su uso.

Extracción de pigmentos de *S. obliquus* asistida con irradiación infrarroja

Se agregaron 0.2 ± 0.01 g de biomasa liofilizada de microalga a un matraz de fondo redondo de 250 mL acoplado a un condensador. Enseguida, se agregaron 10 mL de cada una de las mezclas de disolventes de acuerdo con la tabla 1. La extracción de los pigmentos se asistió con una lámpara incandescente de luz infrarroja (IR) (BR40 6015 250 W ADIR lighting, México) colocada a 2 cm de distancia del matraz durante 10 min. El exceso de disolvente se evaporó a 40 °C y a presión reducida en un roto-evaporador. Los extractos recuperados se mantuvieron en oscuridad a 4 °C hasta su uso.

Chlorophyll determination

The crude extract from each extraction was weighed and dissolved in 100 mL of absolute methanol. Chlorophylls a, b, and total carotenoids were quantified by Uv-vis spectrophotometry (Thermo Scientific Genesys 10s) according to the equations of Wellburn (1994).

Statistical analysis

Three biological replicates were carried out to determine growth kinetics, biomass, and pigment extraction. Data were analyzed using Prisma Windows software, version 8.00 (GraphPad Software, Inc.). Significant differences between

Tabla 1. Condiciones de extracción de clorofilas de *S. obliquus*

Método	Disolventes			Tiempo de Extracción	
	DMP/DP	Proporción (v/v)			
EAIR	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	1:2	2:1	3:2	10
	CH ₂ Cl ₂ :EtOH	1:2	2:1	3:2	
	CH ₂ Cl ₂ :iPrOH	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:MeOH	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:EtOH	1:2	2:1	3:2	
	AcOEt:iPrOH	1:2	2:1	3:2	
	Hex: MeOH	1:2	2:1	3:2	
	Hex:EtOH	1:2	2:1	3:2	
	Hex:iPrOH	1:2	2:1	3:2	
	Soxhlet	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	1:2	2:1	
CH ₂ Cl ₂ :EtOH		1:2	2:1	3:2	
CH ₂ Cl ₂ :iPrOH		1:2	2:1	3:2	
AcOEt:MeOH		1:2	2:1	3:2	
AcOEt:EtOH		1:2	2:1	3:2	
AcOEt:iPrOH		1:2	2:1	3:2	
Hex:MeOH		1:2	2:1	3:2	
Hex:EtOH		1:2	2:1	3:2	
Hex:iPrOH		1:2	2:1	3:2	

DMP: disolvente menos polar. DP: Disolvente polar. EAIR: extracción asistida con irradiación infrarroja.

Determinación de clorofilas

El extracto crudo de cada una de las extracciones se pesó y se disolvió en 100 mL de metanol absoluto. Las clorofilas a, b y carotenoides totales fueron cuantificados por espectrofotometría Uv-vis (Thermo Scientific Genesys 10s) de acuerdo con las ecuaciones de Wellburn, (1994).

Análisis estadístico

La determinación de las cinéticas de crecimiento, biomasa y extracción de pigmentos se llevó a cabo en tres réplicas biológicas. Los datos se analizaron con Prisma software para

treatment means for each variable were compared with a Tukey analysis at a 95% confidence level (*p*-value < 0.05). In addition, the mean values of a data set were compared with an analysis of variance (ANOVA). The graphs' standard deviation (SD) values were represented as error bars.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth of *S. obliquus*

It has been reported that the chlorophylls in microalgae is significantly higher in the stationary phase compared to the

Windows, versión 8.00 (GraphPad Software, Inc.). Las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para cada variable se compararon con un análisis de Tukey a un nivel de confianza del 95% (valor $p < 0,05$). Los valores medios de un conjunto de datos se compararon con un análisis de varianza (ANOVA). Todos los valores de desviación estándar (DE) de los gráficos se representaron como barras de error.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo y cosecha de *S. obliquus*

Se ha reportado que la cantidad de clorofilas en microalgas es significativamente mayor en la fase estacionaria en comparación con la fase logarítmica (Schumann et al., 2005). La tasa de crecimiento de *S. obliquus* en MMB se muestra en fig. 1. Los resultados indican una fase exponencial entre los días 2-13. Al día 15, se detectó el inicio de la fase estacionaria, se determinó el número de células en 11.07×10^6 cél. mL⁻¹ y se cosechó la biomasa en esta fase.

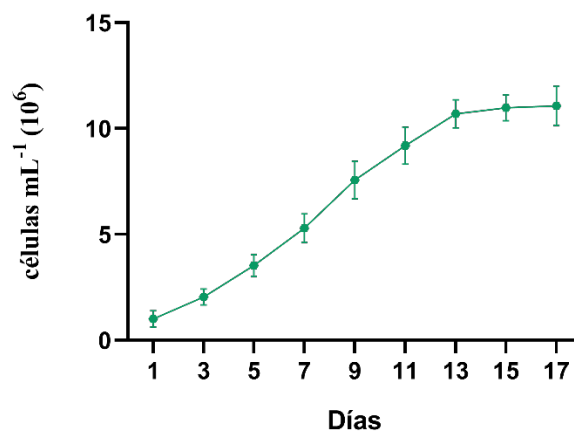


Figura 1. Cinética de crecimiento de *S. obliquus*. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$).

Figure 1. *S. obliquus* growth kinetics. The bars indicate the standard deviation of the mean ($n = 3$).

Extracción de Pigmentos por el método de Soxhlet y por EAIR

Se evaluaron dos diferentes métodos de extracción de pigmentos en *S. obliquus*. En ambos, se probaron nueve mezclas de seis disolventes con polaridad creciente como *n*-hexano, CH₂Cl₂, AcOEt, iPrOH, EtOH y MeOH en proporciones de 1:2, 2:1 y 3:2. Para determinar la eficiencia de extracción, se compararon los resultados entre ambas técnicas (Figura 2).

La eficiencia de extracción de pigmentos depende principalmente del modelo biológico utilizado, la polaridad del disolvente, del tiempo de extracción y de si existe o no, una técnica de ruptura celular. Un procedimiento de extracción ideal requiere resultados rápidos y reproducibles;

logarithmic phase (Schumann et al., 2005). The *S. obliquus* growth rate in MMB is shown in Figure 1. The results indicate an exponential phase between days 2-13. On day 15, the onset of the stationary phase was detected.

Soxhlet and IR *S. obliquus* pigment extraction.

Two different pigment extraction methods were evaluated in *S. obliquus*. In both, nine mixtures of six solvents with increasing polarity, such as *n*-hexane, CH₂Cl₂, AcOEt, iPrOH, EtOH, and MeOH, were tested in ratios of 1:2, 2:1, and 3:2. To determine the extraction efficiency, the results between the two techniques were compared (Figure 2).

Pigment extraction efficiency depends mainly on the biological model used, the polarity of the solvent, the extraction time, and whether a cell disruption technique is present. An ideal extraction procedure requires fast and reproducible results, simple in execution, to be innocuous, and does not cause chemical changes in the pigments (Schagerl and Kunzl, 2007). Figures 3A and 3B show the extracted chlorophyll a (C_a) derived from the Soxhlet method

(SE) and IRAE. The highest amounts of C_a, 18.41 and 22.53 μg mL⁻¹, were obtained with the SE in the Hex/MeOH (3:2 v/v) and AcOEt/MeOH (2:1 v/v) mixtures, respectively. However, IRAE obtained amounts close (13.00-13.41 μg mL⁻¹) to SE with the mixtures of AcOEt/MeOH (1:2 v/v) and CH₂Cl₂/MeOH, and Hex/MeOH (2:1 v/v). Although SE elicited higher amounts of C_a, this process required long heating times (180 min) and larger solvent volumes (150 mL). Therefore, the SE application represents a significant difficulty in correctly disposing of solvents and a high expenditure of energy and inputs. In addition, the long heating periods stimulate the thermal decomposition of the extracted metabolites (Lopez-Bascon and de Castro, 2020). On the other hand, IRAE obtained good C_a yields with only 10 min of extraction and 10 mL of solvent. Infrared energy, when scattered from an infrared emitter, quickly reaches the

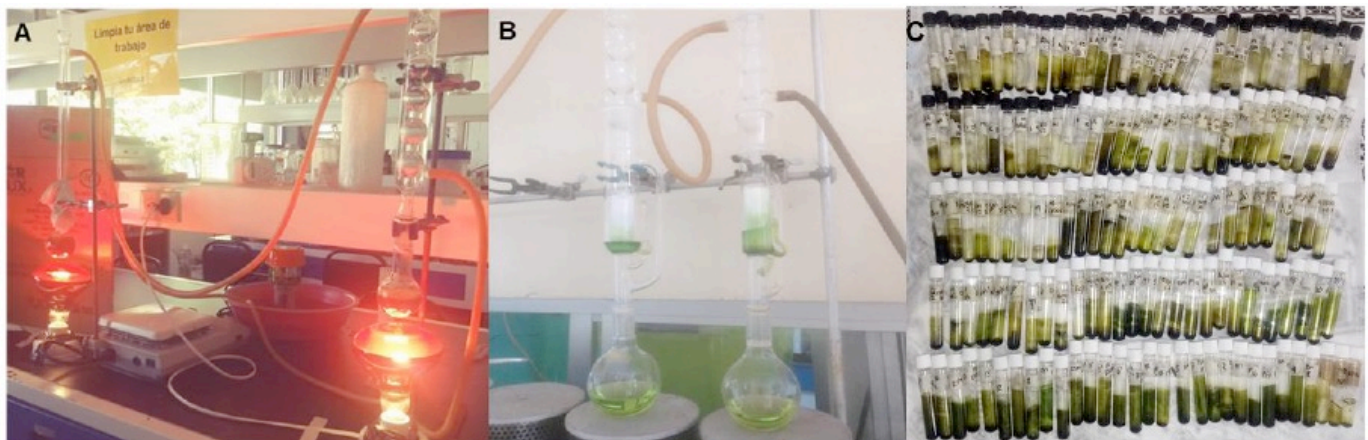


Figura 2. Extracción de pigmentos de *S. obliquus* con solventes. A) EAIR, B) ES, C) Pigmentos totales extraídos.

Figure 2. *S. obliquus* pigment extraction with solvents. A) IRAE, B) Soxhlet extraction, C) Total pigments extracted.

En la Figura 3A y 3B, se muestra la cantidad de clorofila a (C_a) extraída, derivada del método de Soxhlet (ES) y de la EAIR. Las mayores cantidades de C_a , 18.41 y 22.53 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se obtuvieron con la ES en las mezclas de Hex/MeOH (3:2 v/v) y AcOEt/MeOH (2:1 v/v), respectivamente. Sin embargo, la EAIR obtuvo cantidades cercanas (13.00-13.41 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a la ES con las mezclas de AcOEt/MeOH (1:2 v/v) y $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, y Hex/MeOH (2:1 v/v). A pesar de que la ES suscitó mayores cantidades de C_a , este proceso requirió largos periodos de calentamiento (180 min) y mayores volúmenes de disolvente (150 mL). La aplicación de la ES representa una mayor dificultad para desechar correctamente los disolventes, un alto gasto energético, de insumos y además, los largos periodos de calentamiento estimulan la descomposición térmica de los metabolitos extraídos (Lopez-Bascon and de Castro, 2020). Por otro lado, la EAIR con tan sólo 10 min de extracción y 10 mL de disolvente, obtuvo buenos rendimientos de C_a . La energía infrarroja, al dispersarse desde un emisor de infrarrojos, alcanza rápidamente las superficies de cualquier material bajo estudio, el cual la absorbe fácilmente y se calienta. La absorción de la irradiación IR induce una excitación vibracional de los átomos o moléculas, tanto del disolvente como de los componentes celulares. Esto incrementa paulatinamente la energía térmica del sistema y, en el interior celular, el citoplasma inicia un estado de vaporización que facilita la ruptura de la pared celular y la difusión de los metabolitos (Ogundele and Kayitesi, 2019).

En este estudio, diferencias significativas en la extracción de C_a se encontraron dependiendo del tipo de mezcla empleada. Se observó que, independientemente del disolvente menos polar (DMP) de la mezcla, el disolvente polar (DP) como el MeOH, fue el que contribuyó en mayor grado a la extracción de C_a , en comparación con el EtOH y el iPrOH (Fig. 3A y 3B).

Estudios previos han reportado el uso de acetona (Acet) y MeOH como disolventes de extracción en clorofilas. No obstante, la acetona ha mostrado baja capacidad de extracción

surfaces of any material under study, which readily absorbs it and heats up. In addition, IR absorption induces a vibrational excitation of the atoms or molecules of both the solvent and the cellular components. This gradually increases the system's thermal energy inside the cell, and the cytoplasm initiates a state of vaporization that facilitates the rupture of the cell wall and the diffusion of metabolites (Ogundele and Kayitesi, 2019).

This study found significant differences in C_a extraction depending on the type of mixture used. Furthermore, it was observed that, regardless of the least polar solvent (LPS) in the mixture, the polar solvent (PS), such as MeOH, contributed the most to C_a extraction compared to EtOH and iPrOH (Figs. 3A and 3B).

Previous studies have reported using acetone and MeOH as chlorophyll extraction solvents. However, acetone has a low extraction capacity for photosynthetic pigments, unlike MeOH, which has shown better extraction yields (Schumann et al., 2005). The high polarity of MeOH allows it to permeate and penetrate the cell membrane of microalgae, which facilitates the diffusion of pigments into the extracellular matrix. Similarly, AcOEt has shown high lipophilic metabolite extraction capacity in the microalga *Chlorella* sp. (Wu et al., 2017). Due to the non-polar nature of chlorophylls, PS and LPS mixtures were used in this work to increase extraction efficiency.

In chlorophylls b (C_b) extraction, the mixture that showed the best extraction efficiencies were Hex/MeOH (1:2 v/v) with the SE method. In the IRAE, the $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ mixture and Hex/MeOH (1:2 v/v) showed higher extraction amounts than the other mixtures. However, the C_b obtained were slightly lower than SE (Figures 4A and 4B). Combinations of non-polar and polar solvents such as Hex and alcohol have been reported in lipid extraction in *Tetraselmis* sp. As in this study, the extraction efficiency followed the order: Hex/MeOH > Hex/ EtOH > Hex/iPrOH (Shin et al., 2018). Under IRAE, the $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:2) mixture showed the highest C_b extraction capacity compared with the others.

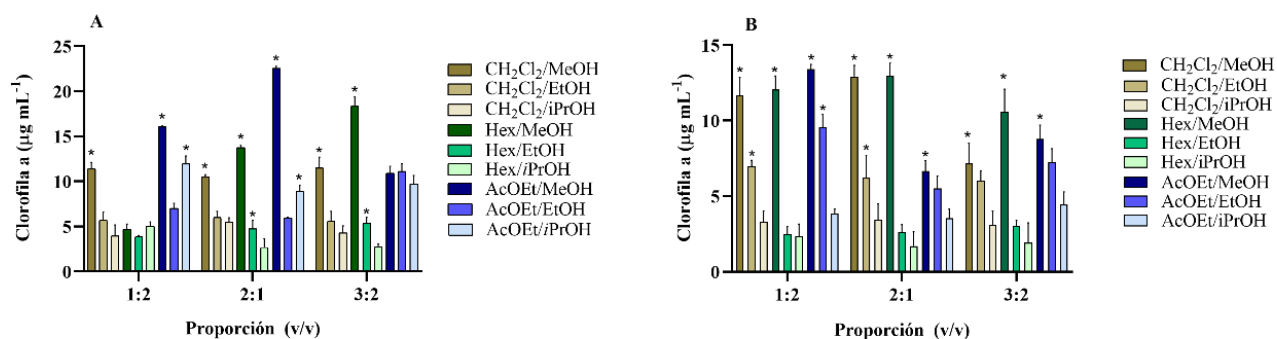


Figura 3. Clorofilas a en *Scenedesmus obliquus*. A. ES: 0.2 g biomasa (PS), 150 mL mezcla de disolventes, tiempo extracción 180 min. B) EAIR: 0.2 g biomasa (PS), 10 mL mezcla de disolventes, tiempo extracción 10 min. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). * indican las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$).

Figure 3. Chlorophyll a in *Scenedesmus obliquus*. A. ES: 0.2 g biomass (DW), 150 mL solvent mixture, extraction time 180 min. B) IRAE: 0.2 g biomass (DW), 10 mL solvent mixture, extraction time 10 min. Bars indicate the standard deviation of the mean ($n = 3$). * Indicate significant differences ANOVA ($p < 0.05$).

de pigmentos fotosintéticos, no así el MeOH, que ha mostrado mejores rendimientos de extracción (Schumann et al., 2005). La alta polaridad del MeOH le permite permear y penetrar la membrana celular de las microalgas lo que facilita la difusión de los pigmentos hacia la matriz extracelular. De igual forma, el AcOEt, ha mostrado una alta capacidad de extracción de metabolitos lipofílicos en la microalga *Chlorella* sp. (Wu et al., 2017).

Debido a la naturaleza apolar de las clorofilas, en este trabajo, se utilizaron mezclas de DP con un DMP con la intención de incrementar la eficiencia de extracción.

En el caso de las clorofilas b (C_b), la mezcla que mostró las mejores eficiencias de extracción fue la de Hex/MeOH (1:2 v/v) con el método ES. En la EAIR, la mezcla de CH_2Cl_2 /MeOH y el Hex/MeOH (1:2 v/v) mostraron mayores cantidades de extracción en comparación con las otras mezclas, sin embargo, las cantidades obtenidas fueron ligeramente inferiores a la ES (Figuras 4A y 4B).

CH_2Cl_2 has been shown to have extraction selectivity of chlorophylls from *Achillea millefolium* L. This can be attributed to its higher dielectric constant ($\epsilon = 9.08$) (Pavlic et al., 2016).

The results of total carotenoid extraction are shown in Figures 5A and 5B. Due to the hydrophobic nature of the carotenoids, the Hex: MeOH mixture (2:1 v/v) allowed a higher extraction over the other mixtures used. Various solvents have been used to extract carotenoids. For example, hexane/iPrOH and ultrasound on *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. Paulensis* macerated in acetone resulted in high carotenoid yields (Mezzomo et al., 2011). Here, AcOEt/MeOH (1:2 v/v) also showed high carotenoid extraction capacity in *S. obliquus*. Similarly, the highest carotenoid yields from Gac fruit peel were obtained with AcOEt compared to acetone, EtOH, and Hex. Although, the authors did not evaluate solvent mixtures (Chuyen et al., 2017).

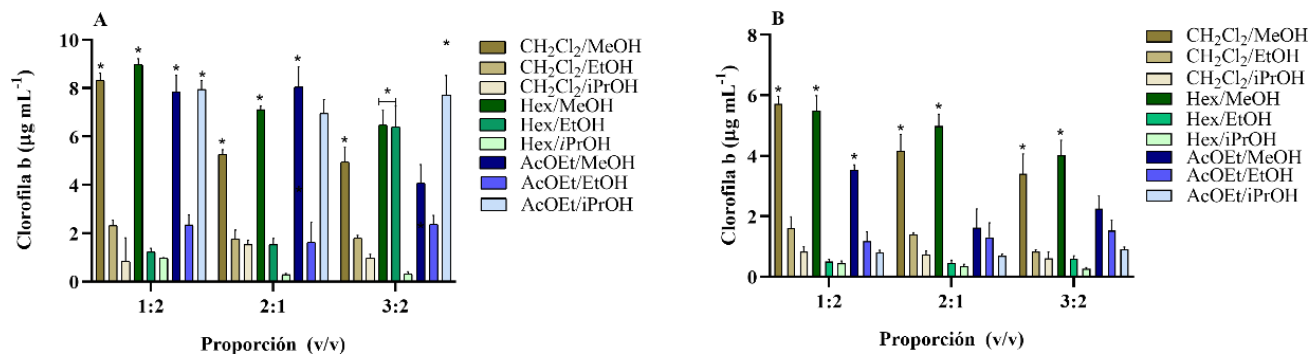


Figura 4. Clorofilas b en *Scenedesmus obliquus*. A. ES: 0.2 g biomasa (PS), 150 mL mezcla de disolventes, tiempo extracción 180 min B) EAIR: 0.2 g biomasa (PS), 10 mL mezcla de disolventes, tiempo extracción 10 min. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). * indican las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$).

Fig. 4. Chlorophyll b in *Scenedesmus obliquus*. A. SE: 0.2 g biomass (DW), 150 mL solvent mixture, extraction time 180 min B) IRAE: 0.2 g biomass (DW), 10 mL solvent mixture, extraction time 10 min. Bars indicate the standard deviation of the mean ($n = 3$). * Indicate significant differences ANOVA ($p < 0.05$).

Combinaciones de disolventes polares y no polares como el Hex y un alcohol, se ha reportado en la extracción de lípidos en *Tetraselmis* sp. Al igual que en este estudio, la eficiencia de extracción siguió el orden: Hex/MeOH > Hex/ EtOH > Hex/iPrOH (Shin et al., 2018). Bajo la EAIR, la mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (1:2) mostró la mayor capacidad de extracción de C_b en comparación con las otras. El CH₂Cl₂ ha demostrado tener selectividad de extracción de clorofilas de *Achillea millefolium* L. Esto se puede atribuir a su mayor constante dieléctrica ($\epsilon = 9,08$) (Pavlic et al., 2016).

Los resultados de la extracción de carotenoides totales se muestran en las figuras 5A y 5B. Debido a la naturaleza hidrofóbica de los carotenoides, la mezcla Hex:MeOH (2:1 v/v) permitió una extracción mayor sobre las demás mezcla utilizadas. Diversos disolventes de han utilizado para extraer carotenoides. Por ejemplo, Hex/iPrOH y ultrasonido en *Paracoccidioides brasiliensis* y *P. Paulensis* macerados en acetona, generaron altos rendimientos de carotenoides (Mezzomo et al., 2011). Además, de la mezcla de Hex:MeO, el AcOEt/MeOH (1:2 v/v) mostró también alta capacidad de extracción de carotenoides en *S. obliquus*. De forma similar, los mayores rendimientos de carotenoides totales fueron obtenidos de la cáscara del fruto de Gac, con AcOEt, en comparación con Acet, EtOH y Hex. Aunque, los autores no evaluaron ninguna mezcla (Chuyen et al., 2017).

Para una extracción eficiente de carotenoides, generalmente se requiere de un tratamiento de disrupción celular para facilitar la entrada de los disolventes. La firme asociación de los carotenoides con proteínas y ácidos grasos, dificultan la transferencia de masa durante el proceso de extracción (Zarrinmehr et al., 2022). Es por esto que la EAIR posee un gran potencial para la extracción de pigmentos de microalgas. La IR no sólo emite calor, la emisión simultánea de un espectro continuo sobre los compuestos orgánicos, produce un mayor flujo y capacidad de arrastre de metabolitos hacia fuera de la matriz intracelular (Chen et al., 2010). En comparación con la ES, la eficiencia de la transferencia de calor de la EAIR es superior, lo que reduce el gasto energético. En un proceso de calentamiento convencional, el calor se dispersa sobre la superficie de la célula microalgal por convección térmica del disolvente, de esta manera, se induce la difusión del metabolito hacia el exterior. Este proceso posee bajas tasas de transferencia de calor y de transferencia de masa. Por otro lado, el calentamiento por IR penetra la muestra y actúa directamente sobre la matriz interior, al mismo tiempo que se calienta el entorno. Esto da lugar a un gradiente de temperatura temporal, bajo un calentamiento homogéneo y una elevada tasa de transferencia de calor en la biomasa microalgal (Xiang et al., 2022).

Aunque la cantidad de pigmentos extraídos por la EAIR (máx. 5.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fue ligeramente menor, en comparación con la ES (máx. 6.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$), es probable que, a una temperatura y a un tiempo de extracción óptimos, se pueda superar la eficiencia de extracción del método de Soxhlet (Figuras 5A y 5B).

Una temperatura de extracción óptima disminuye la viscosidad del disolvente e incrementa la difusión y solubilidad de los compuestos objetivo.

Cell disruption treatment is generally required to facilitate solvent entry for efficient carotenoid extraction. The tight association of carotenoids with proteins and fatty acids hinders the mass transfer during the extraction process (Zarrinmehr et al., 2022). Therefore, IRAE has excellent potential for extracting pigments from microalgae. IR, which emits heat and a continuous spectrum on organic compounds, produces a higher flux and carryover capacity of metabolites out of the intracellular matrix (Chen et al., 2010). Compared to SE, the heat transfer efficiency of IRAE is higher, reducing energy expenditure. In a conventional heating process, heat is dispersed over the surface of the microalgal cell by thermal convection of the solvent, thus inducing outward diffusion of the metabolite. This process has low heat transfer and mass transfer rates. On the other hand, IR heating penetrates the sample and acts directly on the inner matrix while heating the surroundings. This results in a temporal temperature gradient under homogeneous heating and a high heat transfer rate in the microalgal biomass (Xiang et al., 2022).

Although the pigments extracted by IRAE (max. 5.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were slightly lower compared to SE (max. 6.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$), it is likely that, at optimal extraction temperature and time, it can exceed the Soxhlet extraction efficiency (Figures 5A and 5B).

An optimal extraction temperature decreases solvent viscosity and increases the diffusion and solubility of target compounds. While an optimal time increases the contact probabilities between solvents and pigments, facilitating their extraction. In addition, IR can modify the dielectric properties, viscosity, surface tension, and polarity of water (cytoplasm), which can induce higher mass transfer of photosynthetic pigments (Xiang et al., 2022). IR has been used to extract bioactive compounds and, mainly, to synthesize organic compounds (Escobedo et al., 2016). The IR implementation has been highlighted by rapid and uniform heating, shorter extraction/reaction times, lower solvent consumption, lower energy expenditure, simple and inexpensive equipment assembly requirements, and easy and safe process handling. Therefore, infrared irradiation is a potential clean energy source that favors a selective metabolite obtention within a green extraction protocol (Chemat et al., 2012). However, the target compounds degradation due to high temperatures, and larger light exposure times, is a limitation to consider within the IR extraction process. Hence, IR intensity, temperature, and extraction time must be optimized. In addition, comprehensive energy, mechanistic, thermodynamic, and economic analyses will be necessary to establish the feasibility of this technology on a large scale.

In this study, the IRAE implementation for the photosynthetic pigments extraction in *S. obliquus* was shown to be a safe and straightforward method, with less time, and energy expenditure during the process, as opposed to SE. However, future research should address the IRAE optimization in terms of radiation intensity, temperature, and extraction time.

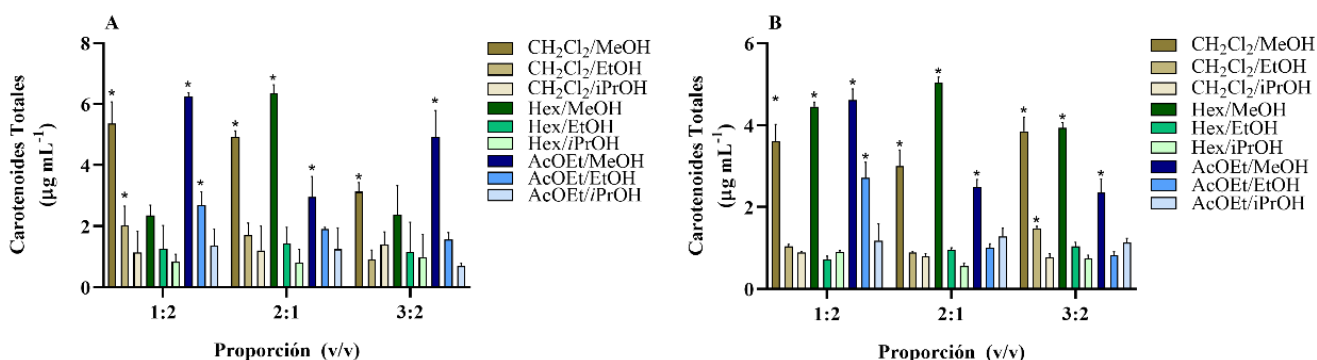


Figura 5. Carotenoides Totales en *Scenedesmus obliquus*. A. ES: 0.2 g biomasa (PS), 150 mL mezcla de disolventes, tiempo extracción 180 min. B) EAIR: 0.2 g biomasa (PS), 10 mL mezcla de disolventes, tiempo extracción 10 min. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). * indican las diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$).

Figure 5. Total carotenoids in *Scenedesmus obliquus*. A. SE: 0.2 g biomass (DW), 150 mL solvent mixture, extraction time 180 min. B) IRAE: 0.2 g biomass (DW), 10 mL solvent mixture, extraction time 10 min. Bars indicate the standard deviation of the mean ($n = 3$). *Indicate significant differences ANOVA ($p < 0.05$).

Mientras que un tiempo óptimo, aumenta las probabilidades de contacto entre los disolventes y los pigmentos, facilitando su extracción. Además, la IR tiene la capacidad de modificar las propiedades dieléctricas, la viscosidad, la tensión superficial y la polaridad del agua (citoplasma), lo que puede inducir una mayor transferencia de masa de los pigmentos fotosintéticos (Xiang et al., 2022). La IR ha sido utilizada para la extracción de compuestos bioactivos y, principalmente en la síntesis de compuestos orgánicos (Escobedo et al., 2016). La implementación de la IR se ha destacado por un calentamiento rápido y uniforme, menores tiempos de extracción/reacción, menor consumo de disolventes, menor gasto energético, requerimientos simples y baratos en el montaje del equipo, y por un manejo fácil y seguro del proceso. Por lo anterior, la irradiación infrarroja es una potencial fuente de energía limpia que puede favorecer la obtención selectiva de metabolitos, dentro de un protocolo de extracción verde (Chemat et al., 2012). Sin embargo, la degradación de los compuestos de interés frente a altas temperaturas, y a largos tiempos de exposición a la luz, es una limitante por considerar dentro del proceso de extracción con IR. De aquí, que la intensidad de la IR, la temperatura y el tiempo de extracción debe ser optimizados cuidadosamente. Además, análisis energéticos, mecánicos, termodinámicos y económicos completos serán necesarios para establecer la viabilidad de esta tecnología a gran escala.

En este estudio, la implementación de la EAIR para la extracción de pigmentos fotosintéticos en *S. obliquus* mostró ser un método seguro y sencillo, con tiempos, insumos y gasto energéticos menores durante el proceso, a diferencia de la ES. Sin embargo, próximas investigaciones deberán abordar la optimización de la EAIR en lo que respecta a la intensidad de la radiación, la temperatura y el tiempo de extracción.

CONCLUSIONS

This study is the first report on using IRAE to extract photosynthetic pigments in microalgae. Good extraction yields of chlorophylls a, b, and total carotenoids were obtained mainly with mixtures of Hex or AcOEt with MeOH. In contrast to SE, IR extraction time was shorter, and energy and solvent consumption were diminished. Finally, optimizing the IRAE conditions is recommended to increase the extraction efficiency of photosynthetic pigments in microalgae.

CONCLUSIONES

Este trabajo es el primer reporte sobre el uso de la EAIR para la extracción de pigmentos fotosintéticos en microalgas. Se obtuvieron buenos rendimientos de extracción de clorofilas a, b y carotenoides totales principalmente con las mezclas de Hex o AcOEt con MeOH. En contraste con la ES, los tiempos de extracción con IR fueron mucho más cortos, y el consumo energético y de disolventes, fueron menores. Finalmente, es recomendable optimizar las condiciones de la EAIR con el fin de incrementar la eficiencia de extracción de los pigmentos fotosintéticos en microalgas.

REFERENCIAS

- Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A. Brooks, M. S. L. 2019. Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. *Journal of Applied Phycology*, 31, 61-88. [10.1007/s10811-018-1560-9](https://doi.org/10.1007/s10811-018-1560-9)
- Chemat, F., Vian, M. A. Cravotto, G. 2012. Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chemat, F., Vian, M. A., Fabiano-Tixier, A. S., Nutrizio, M., Jambrak, A. R., Munkata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Binello, A. Cravotto, G. 2020. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, 22, 2325-2353. [10.1039/C9GC03878G](https://doi.org/10.1039/C9GC03878G)
- Chen, Y. L., Duan, G. L., Xie, M. F., Chen, B. Li, Y. 2010. Infrared-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of eight active compounds in *Radix Salviae miltiorrhizae*. *Journal of Separation Science*, 33, 2888-2897. [10.1002/jssc.201000234](https://doi.org/10.1002/jssc.201000234)
- Chisti, Y. 2020. Microalgae biotechnology: A brief introduction. In: Jacob-López E., Manzoni-Maroneze M. (Ed) *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Academic Press [10.1016/B978-0-12-818536-0.00001-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00001-4)
- Chuyen, H. V., Roach, P. D., Golding, J. B., Parks, S. E. Nguyen, M. H. 2017. Optimisation of extraction conditions for recovering carotenoids and antioxidant capacity from Gac peel using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 972-980. [10.1111/ijfs.13361](https://doi.org/10.1111/ijfs.13361)
- Escobedo, R., Miranda, R. Martinez, J. 2016. Infrared Irradiation: Toward Green Chemistry, a Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17. [10.3390/ijms17040453](https://doi.org/10.3390/ijms17040453)
- Li, F. J., Yuan, Y., Li, H., Zhan, Z. L., Kang, L. P., Li, M., Yang, B. Huang, L. Q. 2015. Infrared-assisted extraction of salidroside from the root of *Rhodiola crenulata* with a novel ionic liquid that dissolves cellulose. *Rsc Advances*, 5, 47326-47333. [10.1039/C5RA07969A](https://doi.org/10.1039/C5RA07969A)
- Lopez-Bascon, M. A. de Castro, M. D. L. 2020. *Soxhlet Extraction*. [10.1016/b978-0-12-816911-7.00011-6](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816911-7.00011-6)
- Mezzomo, N., Maestri, B., dos Santos, R. L., Maraschin, M. Ferreira, S. R. S. 2011. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*, 85, 1383-1391. [10.1016/j.talanta.2011.06.018](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.018)
- Neetoo, H. and Chen, H. (2014). Alternative Food Processing Technologies. In Food Processing (eds S. Clark, S. Jung and B. Lamsal). <https://doi.org/10.1002/9781118846315.ch7>
- Ogundele, O. M. Kayitesi, E. 2019. Influence of infrared heating processing technology on the cooking characteristics and functionality of African legumes: a review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 56, 1669-1682. [10.1007/s13197-019-03661-5](https://doi.org/10.1007/s13197-019-03661-5)
- Oliveira, C. Y. B., Oliveira, C. D. L., Prasad, R., Ong, H. C., Araujo, E. S., Shabnam, N. Galvez, A. O. 2021. A multidisciplinary review of *Tetrademus obliquus*: a microalga suitable for large-scale biomass production and emerging environmental applications. *Reviews in Aquaculture*, 13, 1594-1618. [10.1111/raq.12536](https://doi.org/10.1111/raq.12536)
- Pagels, F., Pereira, R. N., Vicente, A. A. Guedes, A. C. 2021. Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria-A Review on Current Methodologies. *Applied Sciences-Basel*, 11. [10.3390/app11115187](https://doi.org/10.3390/app11115187)
- Pavlič, B., Đurković, A.V., Vladić, J., Gavarić, A., Zeković, Z., Tepić, A. and Vidović, S. (2016), Extraction of Plant Pigments from Yarrow-Rose Hip Mixtures. *J Food Process Eng*, 39: 418-424. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12242>
- Rajha, H. N., Abi-Khattar, A. M., El Kantar, S., Boussetta, N., Lebovka, N., Maroun, R. G., Louka, N. Vorobiev, E. 2019. Comparison of aqueous extraction efficiency and biological activities of polyphenols from pomegranate peels assisted by infrared, ultrasound, pulsed electric fields and high-voltage electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 58. [10.1016/j.ifset.2019.102212](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102212)
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A. Abd Allah, E. F. 2019. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 709-722. [10.1016/j.sjbs.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003)

- Schagerl, M. Kunzl, G. 2007. Chlorophyll a extraction from freshwater algae - a reevaluation. *Biologia*, 62, 270-275. [10.2478/s11756-007-0048-x](https://doi.org/10.2478/s11756-007-0048-x)
- Schumann, R., Haubner, N., Klausch, S. Karsten, U. 2005. Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55, 213-222. [10.1016/j.ibiod.2004.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.12.002)
- Shin, H. Y., Shim, S. H., Ryu, Y. J., Yang, J. H., Lim, S. M. Lee, C. G. 2018. Lipid Extraction from *Tetraselmis* sp Microalgae for Biodiesel Production Using Hexane-based Solvent Mixtures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23, 16-22. [10.1007/s12257-017-0392-9](https://doi.org/10.1007/s12257-017-0392-9)
- Silva, S. C., Ferreira, I., Dias, M. M. Barreiro, M. F. 2020. Microalgae-Derived Pigments: A 10-Year Bibliometric Review and Industry and Market Trend Analysis. *Molecules*, 25. [10.3390/molecules25153406](https://doi.org/10.3390/molecules25153406)
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophyll-a and chlorophyll-b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313. [10.1016/s0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(11)81192-2)
- Wu, J. C., Alam, M. A., Pan, Y., Huang, D. L., Wang, Z. M. Wang, T. J. 2017. Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 71, 323-329. [10.1016/j.jtice.2016.12.039](https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.12.039)
- Xiang, B., Zhou, X., Qin, D. Y., Li, C. Y. Xi, J. 2022. Infrared assisted extraction of bioactive compounds from plant materials: Current research and future prospect. *Food Chemistry*, 371. [10.1016/j.foodchem.2021.131192](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131192)
- Zarrinmehr, M. J., Daneshvar, E., Nigam, S., Gopinath, K. P., Biswas, J. K., Kwon, E. E., Wang, H. L., Farhadian, O. Bhatnagar, A. 2022. The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 344. [10.1016/j.biortech.2021.126303](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126303)