

## A FACE ESCURA DA BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS: A BIOREFINARIA DE MICROALGAS HETEROTRÓFICAS DIRECIONADA PARA A PRODUÇÃO DE LÍPIDOS RICOS EM COMPOSTOS $\omega$ -3 E BIOCOMBUSTÍVEIS

Lopes da Silva T.\*, Moniz P.\*, Reis A.\* \*

\* Unidade de Bioenergia, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, Estrada do Paço do Lumiar, 22, 1648-039 Lisboa, Portugal, [teresa.lopessilva@lneg.pt](mailto:teresa.lopessilva@lneg.pt)

<https://doi.org/10.34637/cies2020.1.4078>

### RESUMO

As microalgas podem crescer em substratos de baixo custo, como subprodutos ou efluentes industriais, conseguindo remover poluentes e, simultaneamente, produzir biocompostos com interesse comercial, contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento da bioeconomia mundial.

As microalgas autotróficas utilizam o dióxido de carbono como fonte de carbono, e necessitam de luz para se desenvolverem. As microalgas heterotróficas não necessitam de luz e utilizam carbono orgânico para se desenvolverem. A não sazonalidade, a não dependência de luz e das condições climáticas são alguns dos pontos fortes da tecnologia de cultivo das microalgas heterotróficas, particularmente adequada para países localizados em latitudes elevadas, como os países da União Europeia.

Algumas destas microalgas produzem altos teores de lípidos que podem ser extraídos e fracionados em compostos  $\omega$ -3 (utilizados nas indústrias farmacêutica e alimentar) e em biodiesel, num conceito de biorefinaria da biomassa algal.

Esta comunicação apresenta as diferentes estratégias que recentemente têm sido utilizadas para cultivar microalgas heterotróficas para produção de lípidos, enfatizando a importância de um sistema integrado que valorize todas as frações lipídicas da biomassa algal para diversas aplicações, tendo em vista um processo sustentável assente nos conceitos da bioeconomia circular.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microalgas heterotróficas, biocombustíveis, biocompostos

### ABSTRACT

Microalgae can grow on low-cost substrates, such as industrial waste, by-products or effluents, being able to remove pollutants and, simultaneously, produce biocompounds with commercial interest, thus contributing to the development of the world bioeconomy.

Autotrophic microalgae use carbon dioxide as a carbon source, and need light to grow. Heterotrophic microalgae do not require light and use organic carbon to develop. Non-seasonality, non-dependence on light and climatic conditions are some of the strengths of the heterotrophic microalgae technology, particularly for countries located at higher latitudes, such the European Union countries.

Some of these microalgae contain high levels of lipids that can be extracted and fractionated into  $\omega$ -3 compounds (used in the pharmaceutical and food industries) and biodiesel, in a real algal biomass biorefinery concept.

This presentation presents the different strategies that have recently been used to grow heterotrophic microalgae for the lipid production, emphasizing the importance of using an integrated system that valorises all the lipid fractions of algal biomass for different applications, foreseeing a sustainable process based on the circular bioeconomy concepts.

**KEYWORDS:** Heterotrophic microalgae, biofuels, biocompounds

## INTRODUÇÃO

As microalgas oleaginosas produzem óleos intracelulares acima de 20% de seu peso seco, o qual pode ser extraído e convertido em biocombustíveis ou outros produtos com interesse comercial. Porém, o biodiesel obtido por via microbiana, incluindo a partir de microalgas, ainda não é economicamente sustentável, pois preço da sua produção ainda não é competitivo com o atual preço dos combustíveis fósseis. Uma forma de reduzir os custos deste processo consiste na utilização de substratos de baixo custo no meio de cultura, para o desenvolvimento das microalgas, nomeadamente efluentes industriais/domésticos, e subprodutos e resíduos industriais. Uma outra abordagem possível para reduzir custos, consiste no aproveitamento dos vários produtos sintetizados pelas microalgas, maximizando o valor de todo o processo, e visando a redução de resíduos, num conceito de biorrefinaria aplicado à biomassa das microalgas. Desta forma, o valor económico de todo o processo pode aumentar, uma vez que se obtêm vários produtos de valor acrescentado a partir da mesma matéria-prima, tais como ácidos gordos polinsaturados (AGPI), carotenóides, proteínas, carboidratos, etc., tornando economicamente viável a produção de biocombustíveis por via microbiana (Lopes da Silva e Reis, 2016).

Os efeitos benéficos dos compostos AGPI  $\omega$ -3 na saúde humana são bem conhecidos, o que tem atraído o interesse e a procura por estes compostos das indústrias farmacêutica, nutracêutica, cosmética, alimentícia e de rações (Lopes da Silva et al. 2019).

As principais fontes AGPI  $\omega$ -3, incluindo os ácidos docosaenoico (DHA) e o eicosapentaenoico (EPA) - os mais procurados pelas indústrias farmacêutica e alimentar - são espécies de peixes gordos, como o arenque, a cavala, a sardinha e o salmão. No entanto, as reservas mundiais de peixes estão a diminuir, não conseguindo fornecer, de forma sustentável e duradoura, ácidos gordos  $\omega$ -3. Por outro lado, a qualidade do óleo de peixe é variável, e depende das espécies de peixes, estação do ano e localização dos locais de captura. Além disso, os óleos de peixe geralmente apresentam um odor desagradável, e podem estar contaminados com policlorobifenilos (PCBs) e metais pesados, tornando-se inadequados para serem incorporados em formulações farmacêuticas/alimentares e em rações. Além disso, como o óleo de peixe marinho é uma mistura complexa de ácidos gordos com comprimentos de cadeia e graus de insaturação variado, a purificação dos EPA/DHA pode ser necessária, encarecendo o processo.

A biomassa das microalgas é particularmente adequada para a extração e purificação do EPA/DHA, uma vez que não contém colesterol, nem contaminantes (metais pesados, policlorobifenilos), sendo o seu paladar muito apreciado. Atualmente, o óleo obtido através das microalgas representa menos de 2% do EPA/DHA destinado para consumo humano, mas a sua contribuição tem aumentando nos últimos anos, devido a diversas características atraentes para públicos-alvo, designadamente a sua origem vegetariana, o facto do seu processamento respeitar o meio ambiente, a ausência de contaminantes, bem como a possibilidade de ser fabricado em condições “kosher” ou “halal”. No entanto, os óleos microalgais obtidos por fermentação e posterior refinamento são atualmente mais caros do que os óleos de peixe.

A maior parte dos trabalhos publicados sobre a produção de biocombustíveis e produtos de valor acrescentado utiliza microalgas autotróficas. No entanto, as microalgas heterotróficas podem ser particularmente interessantes para países localizados em latitudes mais elevadas, como os países Europeus, uma vez que o seu cultivo necessita do fornecimento luz, e não depende da estação do ano. Além disso, os cultivos de microalgas heterotróficas são realizados em fermentadores convencionais, sob condições de esterilidade, sendo menos propensos a contaminações microbianas do que as culturas autotróficas, quando conduzidas ao ar livre. Acresce que cultivo heterotrófico de microalgas pode aumentar a concentração de biomassa microalgal em comparação com o cultivo em condições autotróficas, levando a maiores produtividades de biomassa e lípidos (Khan et al. 2016). Além disso, na maioria dos casos, os sistemas de cultivo heterotróficos são mais baratos e mais fáceis de manter em grande escala do que os sistemas de cultivo autotróficos.

Esta comunicação apresenta as diferentes estratégias que recentemente têm sido utilizadas para cultivar microalgas heterotróficas para produção de lípidos, enfatizando a importância de utilizar um sistema integrado que valorize todas as frações lipídicas da biomassa algal para diversas aplicações, tendo em vista um processo sustentável, assente nos conceitos da bioeconomia circular.

## SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MICROALGAS HETEROTRÓFICAS PARA PRODUÇÃO DE LÍPIDOS

As microalgas heterotróficas mais utilizadas para produzir DHA e EPA são membros das famílias *Thraustochytriaceae* e *Cryptocodiniaceae*, abundantes nos oceanos. Os *Thraustochytrids* incluem os géneros *Aurantiochytrium*, *Schizochytrium* e *Ulkenia*. *Cryptocodinium* pertence ao género da família *Cryptocodiniaceae*. Estes organismos heterotróficos podem exibir um alto teor de óleo (até 50-77% com base no peso seco), principalmente composto por triglicéridos (TG), ricos em DHA. Os substratos de baixo custo que têm sido recentemente utilizados para o crescimento das microalgas heterotróficas, com vista à produção de compostos  $\omega$ -3 são os hidrolisados de resíduos da indústria alimentar (Pleissner et al., 2013), hidrolisado de farinha de colza + resíduo da indústria do melão de

cana-de-açúcar (Gong et al. 2015), sumo de sorgo doce (Liang et al., 2010), xarope de polpa de alfarroba (Mendes et al. 2007) e soro de queijo + licor de milho (Hosoglu and Elibol, 2017).

### PROCESSAMENTO DO ÓLEO DA BIOMASSA ALGAL

No final do cultivo das microalgas, a biomassa é separada do meio de cultura (Figura 1), o que é geralmente realizado por centrifugação ou por filtração rotativa a vácuo, ou filtração direta.

A extração do óleo da biomassa de microalgas inclui prensagem mecânica das células, homogeneização, moagem e subsequente extração por solvente. Uma etapa de secagem é geralmente realizada, a fim de produzir biomassa estável, livre de água, e que pode ser armazenada por longos períodos de tempo, sem deterioração. Normalmente é utilizado um tambor de secagem. Deve dar-se especial atenção aos triglicéridos intracelulares, devido ao facto destes compostos serem muito sensíveis ao calor, evitando a exposição da biomassa a altas temperaturas, pois esses compostos podem degradar em temperaturas acima de 50 °C.

A etapa seguinte envolve a ruptura das células das algas, para facilitar a extração do óleo das células. Uma variedade de métodos podem ser usados para romper as células, como homogeneização de alta pressão, cavitação hidrodinâmica, tratamento com campo elétrico pulsado/por microondas/ com ultra sons, extração com solventes, líquidos iónicos, surfatantes, saponificação direta, enzimas hidrolíticas e tratamentos algicidas (Zhang et al. 2019). O método mais utilizado é a extração por solvente, sendo os solventes comuns as misturas de clorofórmio-metanol, hexano-isopropanol, o hexano, ou outras misturas de solventes (Cuellar-Bermudez et al. 2015). Dependendo da polaridade e/ou solubilidade da fração lipídica, o solvente adequado ou mistura deve ser escolhida para a extração. No entanto, deve notar-se que os lípidos microbianos destinados às indústrias farmacêutica e alimentar não podem ser extraídos com solventes tóxicos, a fim de evitar resíduos de solventes em medicamentos ou alimentos. O procedimento mais económico ainda é a extração com hexano, principalmente quando os lípidos extraídos se destinam a aplicações em rações/alimentos/farmacêuticas/nutraceuticas. Nesse caso, é necessário garantir que nenhum solvente residual permanece no óleo.

Após extração do óleo das células da microalga, este será processado para obtenção de várias fracções com graus de insaturação diferentes. Assim, através de vários métodos é possível separar a fracção contendo lípidos poli-insaturados (que incluem o DHA/EPA) da fracção contendo lípidos monosaturados e saturados.

### A PLATAFORMA DA BIOMASSA DE MICROALGAS HETEROTRÓFICAS

A possibilidade de obter vários produtos derivados de microalgas (TG, pigmentos, proteínas, hidratos de carbono) que podem ter diversas aplicações industriais é uma abordagem ainda pouco aplicada à escala industriais. Este conceito baseia-se no desenvolvimento de biorrefinarias da biomassa de microalgas, tendo por objectivo obter uma gama de bioproductos de origem algal, aproveitando assim diversos produtos constituintes ou sintetizados por estes microrganismos, maximizando, desta forma, o valor derivado de todo o processo, desejavelmente com um impacto ambiental mínimo (Figura 1).

No caso de uma biorrefinaria aplicada à obtenção de produtos lipídicos microalgais, ainda raramente aplicada à biomassa de microalgas heterotróficas para obtenção de compostos lipídicos  $\omega$ -3, estes compostos podem ser separados da restante fracção lipídica monosaturada ou saturada, podendo esta ser dirigida para produção de biodiesel (Figura 1). A biomassa obtida após a extração do óleo é um resíduo do processo que pode ser utilizada como fertilizante, ou pode ser utilizada para produzir biogás, juntamente com o sobrenadante obtido, por centrifugação, após a remoção das células do meio de cultura convertida em biocombustível (Figura 1). Este resíduo também pode ser processado por liquefação hidrotérmica, sendo o combustível obtido um bio-oil, equivalente ao crude do petróleo, antes da refinação. Depois, por reacções de hidrogenação catalítica, cracking catalítico e outras pode obter-se um gasoline-like fuel, com propriedades drop-in, ou seja, pronto a usar como combustível de transporte terrestre (Figura 1).

Este procedimento tem sido utilizado para valorizar subprodutos da indústria de conservas de pescado, produzindo ácidos gordos poli-insaturados e biodiesel (Lopes da Silva et al. 2018).

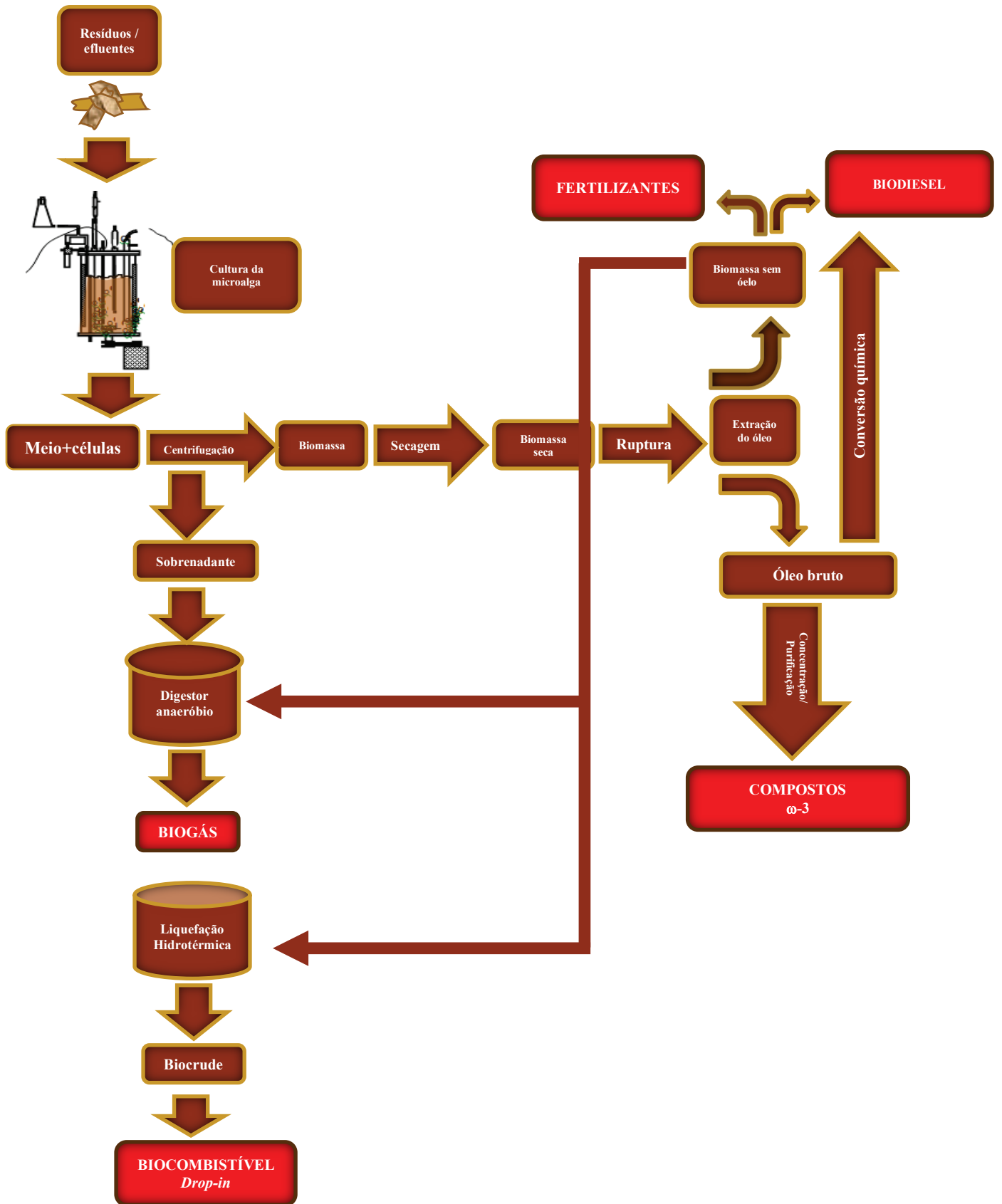


Figura 1 - Diagrama de fluxo de processo de uma biorrefinaria de microalgas heterotróficas

## CONCLUSÕES

A implementação de biorrefinarias baseadas em microalgas heterotróficas, que visem o simultâneo tratamento de efluentes/resíduos e a produção de uma gama de bioprodutos e biocombustíveis, é indispensável para se implementar um processo economicamente sustentável, do ponto de vista ambiental e económico.

Esta abordagem deve basear-se no aproveitamento de todas as frações lipídicas da biomassa das microalgas heterotróficas, explorando a integração de novas tecnologias eficientes para o desenvolvimento das microalgas, extração dos biocompostos, concentração, fracionamento, conversão e purificação dos lípidos de microalgas.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto “OMEGAFUEL – Nova plataforma para a produção de biocombustíveis e compostos ómega-3, a partir da biorrefinaria sustentável da microalga marinha *Cryptocodinium cohnii*”, com a referência PTDC 2017 - PTDC/EAM-AMB/30169/2017, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, FCT, I.P.

## REFERÊNCIAS

- Cuellar-Bermudez S.P., Aguilar-Hernandez I., Cardenas-Chavez D.L., Ornelas-Soto N., Romero-Ogawa. M.A. and Parra-Saldivar R. (2015) Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnol.* 8, 190–209.
- Isleten-Hosoglu M. and Elibol M. (2017) Bioutilization of cheese whey and corn steep liquor by heterotrophic microalgae *Cryptocodinium cohnii* for biomass and lipid production. *Akademik Gida* 15, 233-241.
- Khan M., Karmakar R., Das B., Diba F., and Razu M. (2016) Heterotrophic Growth of Micro Algae. *In Recent Advances in Microalgal Biotechnology*, Liu J. and Sun, Z., (eds), pp. 1–19, OMICS, Hyderabad.
- Liang Y., Sarkany N., Cui Y., Yesuf J., Trushenski J. and Blackburn J. (2010) Use of seet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinun* SR21. *Bioresour. Technol.* 101, 3623-3627.
- Lopes da Silva T. and Reis A. Algal (2016) Scale-up problems for the large scale production of algae. *In Biorefinery: An Integrated Approach*. Das D. (eds), pp. 125-149. Springer, New York.
- Lopes da Silva T., Moniz P., Silva C. and Reis A. 2019. The dark side of microalgae biotechnology: a heterotrophic biorefinery platform directed to  $\omega$ -3 rich lipid production. *Microorganisms* 7, 670.
- Lopes da Silva T., Santos A.R., Gomes R. and Reis A. (2018) Valorising fish canning industry by-products to produce omega-3 compounds and biodiesel. *Environ. Technol. Innov.* 9, 74-81.
- Mendes A., Guerra P., Madeira V., Ruano F., Lopes da Silva T. and Reis A. (2007) Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalgae *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1209-1215.
- Pleissner D., Lam W., Sun Z. and Lin C. (2013) Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresour. Technol.* 137, 139-146.
- Zhang T.-Y., Wu Y.-H., Wang J.-H., Wang X.-X., Victor M.D.-E., Dao G.-H., Tong X. and Hu H.-Y. (2019) Heterotrophic cultivation of microalgae in straw lignocellulose hydrolysate for production of high-value biomass rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA). *Chem. Eng. J.* 367, 37–44.