

Caracterização da composição química da biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanque aberto tipo raceway

Dagon Manoel Ribeiro¹, Pedro L. D. S. Junior², Valérya Carneiro Teles³, Itânia Pinheiro Soares⁴, Lorena Costa Garcia⁵, Paulo C. V. Abreu⁶, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁷

Resumo

A produção de microalgas encontra-se em ascensão e possui potencial para atender a diversas necessidades tecnológicas, como combustíveis limpos e alimentos em um contexto de biorrefinaria. Neste trabalho, a microalga *Nannochloropsis oculata* foi cultivada em tanque aberto e obteve uma produtividade de biomassa de 25,21 mg/L/dia. Na caracterização da biomassa, foi observado acúmulo de diferentes compostos de interesse como lipídios (17,62%), carboidratos (10,62%) e proteínas (32,76%). Além disso, é uma biomassa rica em ácidos graxos poli-insaturados.

Introdução

A exploração da biomassa de microalgas em um contexto de biorrefinaria é uma estratégia promissora para a viabilização econômica dessa matéria-prima para produção de biocombustíveis, biomateriais e commodities químicas (YEN et. al., 2013). Dentro do contexto de biorrefinarias, as microalgas podem ser utilizadas para diferentes fins em razão da possibilidade de aproveitamento integral da sua biomassa. Assim, é possível aproveitar carboidratos (aplicação em processos fermentativos), lipídeos (produção de biodiesel e outros produtos

¹ Biotecnologista, doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade de Brasília, dagon.ribeiro@colaborador.embrapa.br.

² Graduando em Farmácia, Universidade de Brasília, pedro.lopes.junior@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira de alimentos, mestre em Biotecnologia, Universidade do Tocantins, valerya.teles@colaborador.embrapa.br

⁴ Química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

⁵ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Naturais, Universität Bremen, docpca@furg.br

⁷ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

oleaginosos), proteínas (produção de ração), pigmentos e outras moléculas com maior valor agregado (YEN et al., 2013).

Visando o entendimento dos processos de produção de microalgas, são necessários estudos focados em cultivos que extrapolem a escala laboratorial para testes em escala piloto (RAWAT et al., 2013). Dentre as diversas opções de sistemas de cultivo, a utilização de sistemas abertos (ex: tanques abertos tipo raceway) é considerada a melhor alternativa para a produção de biomassa em virtude da sua fácil construção, manutenção e operação (PARK et al., 2011).

Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) é uma microalga marinha, com altas taxas de crescimento e alta produtividade lipídica, além de resistência a condições ambientais adversas. Por essas características, é recomendada para estudos em cultivos de grande escala e é também uma das microalgas promissoras para a produção de biocombustíveis (BORGES et al., 2007). O objetivo deste trabalho é a caracterização química da biomassa de *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanques abertos.

Metodologia

A microalga *Nannochloropsis oculata* foi cultivada na Universidade Federal do Rio Grande em tanque aberto tipo raceway instalado no interior de casa de vegetação. O cultivo foi realizado em volume útil de 216 litros, agitação mecânica por pás-rotativas, temperatura média de 23 ± 5 °C, por um período de 8 dias, utilizando meio de cultivo NPK. Após o cultivo, a biomassa foi coletada, utilizando o floculante Tanfloc 20 ppm, em seguida centrifugada a 1.300 rpm, lavada com formiato de amônio e seca em estufas de circulação a 60 °C.

A biomassa foi caracterizada quanto ao teor de sólidos totais e cinzas (WYCHEN; LAURENS, 2015b), proteínas pela metodologia microKjeldahl (AOAC, 1990) utilizando o fator de conversão de 4,75 específico para microalgas (LAURENS, 2013), carotenoides totais (HUANG; CHEUNG, 2011), carboidratos (WYCHEN; LAURENS, 2015a). A fração de amido foi determinada utilizando o protocolo de Sluiter e Sluiter (2008), a fração lipídica foi obtida pelo método de determinação do Extrato Etéreo (EE) extraído com éter de petróleo a 90 °C por 90 minutos em sistema Ankom XT15 e a caracterização do perfil de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso (AOAC INTERNATIONAL, 2005).

Resultados e discussões

Ao final do cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanques abertos, se obteve uma taxa de 25,21 mg/L/dia de produção de biomassa. Na Tabela 1, pode-se observar a composição química da biomassa e a produtividade estimada de cada componente.

Tabela 1. Composição química (em base seca) e produtividade da *Nannochloropsis oculata*.

Parâmetros	Teor (%)	Produtividade (mg/L/dia)
Sólidos Totais	96,271 ± 0,552	24,28
Cinzas	13,432 ± 0,192	3,39
Proteínas	32,760 ± 0,442	8,26
Carotenoides Totais	0,117 ± 0,011	0,03
Carboidratos Totais	10,624 ± 1,374	2,68
Amido	0,184 ± 0,003	0,05
Lipídios Totais	17,62 ± 0,20	4,44

Foi observado teor de 10,62% de carboidratos totais em *Nannochloropsis oculata* (Tabela 1). Arnold et al. (2015) relatam que os principais polissacarídeos presentes em *N. oculata* são a celulose (parede celular) e a crisolaminarina (leucosina), um polímero linear formado por ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 6), que é sua reserva energética principal. Isso também explica os baixos teores de amido observados nessa microalga (Tabela 1), geralmente a reserva energética mais comum observadas em clorófitas (SUBRAMANIAN et al. 2013).

Neste experimento, obteve-se um teor de lipídios de 17,62% (Tabela 1), nos estudos de Olofsson et al. (2014) com *Nannochloropsis oculata* cultivadas em tanques abertos, é apresentado que a estação do ano e a deficiência de nitrogênio podem aumentar o acúmulo de lipídios em até 60%.

Zhu e Dunford (2013), realizando cultivos com *Nannochloropsis oculata* em frascos fechados, obtiveram teores maiores de lipídios (36,4%) e menores de proteínas (26,6%), mostrando que o modo de cultivo também influencia o acúmulo dos diferentes compostos de interesse.

O ácido graxo predominante encontrado na biomassa de *N. oculata* é o ácido palmítico (29,24%) (Tabela 2). Nascimento e colaboradores (2013) relatam que esse é o ácido graxo predominante na maioria dos extratos lipídios de microalgas. Segundo Sharma et al. (2012), a síntese desse ácido é aumentada em resposta a

altas intensidades luminosas, pois esse ácido está relacionado à fotoproteção das células.

Tabela 2. Perfil Ácidos Graxos da microalga *Nannochloropsis oculata*.

Perfil Ácidos Graxos da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	
Ácido caprílico (C8:0)	0,19 ± 0,001
Ácido láurico (C12:0)	0,38 ± 0,064
Ácido mirístico (C14:0)	4,75 ± 0,161
Ácido miristoleico (C14:1)	0,55 ± 0,022
Ácido pentadecanóico (15:0)	0,78 ± 0,090
Ácido cis-10-pentadecanóico (15:1)	1,78 ± 0,59
Ácido palmítico (C16:0)	29,24 ± 0,921
Ácido palmitoleico (C16:1)	15,75 ± 2,633
Ácido heptadecanóico (C17:0)	0,30 ± 0,003
Ácido cis-10 heptadecanóico (C17:1)	0,37 ± 0,080
Ácido oleico (C18:1)	1,02 ± 0,572
Ácido esteárico (C18:0)	6,77 ± 0,933
Ácido linoleico (C18:2n-6c)	2,06 ± 0,242
Ácido gamalinolênico (C18:3n-ω-6)	0,64 ± 0,107
Ácido alfa-linolênico (C18:3)	7,17 ± 4,481
Ácido cis-11-eicosanoico (C20:1)	1 ± 0,655
Ácido beênico (C24:0)	0,27 ± 0,087
Ácido heneicosanóico (C21:0)	0,18 ± 0,343
Ácido cis-8,11,14-eicosatrienóico (C20:3n6)	1,66 ± 0,546
Ácido cis-11,14,17-eicosatrienóico (C20:3n3)	2,89 ± 0,105
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,52 ± 0,296
Ácido eicosapentaenoico (C20:5 (ω-3))	15,51 ± 2,217
Ácido docosahexaenoico (C22:6n-3)	6,22 ± 0,137

Os dois tipos de ácidos graxos observados em maior concentração (C16:0 e C16:1) em *Nannochloropsis oculata* neste trabalho (Tabela 2), também é visto comumente por outros pesquisadores (BORGES et al., 2011). Recht et al. (2012) observaram que em resposta a estresses, *Nannochloropsis sp.* tende a aumentar a produção de ácidos graxos, pois muitos são responsáveis pela proteção da célula.

Nannochloropsis oculata apresentou altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (Pufa) (C18:3n-6, C18:3, C20:3n-6, C20:3n-3, C20:5 (ω -3) e C22:6n-3), fato relatado em outros estudos (RONQUILLO et al, 2012) e que indica potencial para utilização da biomassa algal para melhoria na qualidade nutricional de ração animal ou humana. Além disso, o mercado da produção de Pufa está crescendo pelas suas diversas propriedades benéficas à saúde e isso tem incentivado a busca de um maior entendimento da bioquímica lipídica das microalgas (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2011).

Conclusão

A *Nannochloropsis oculata* é uma das microalgas potenciais para produção e processamento de bioprodutos em um contexto de biorrefinaria. Essa espécie possui resistência a condições adversas e um alto teor de diferentes compostos de interesse como lipídios (17,62%), carboidratos (10,62%) e proteínas (32,76%) em sua biomassa. O conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados agrega valor à biomassa abrindo uma gama de possibilidades e aplicações tecnológicas.

Referências

- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 11TH ed. Washington, DC, 1990.
- AOAC INTERNATIONAL. Official Procedure. Approved Procedure Ce 1-62 - Fatty Acid Composition by gas chromatography. **American Oil Chemists Society**, 2005.
- AOCS. Official Procedure. Approved Procedure Ce 2-66 - Preparation of methyl esters of fatty acids. **American Oil Chemists Society**, 2005.
- ARNOLD, A. A.; GENARD, B.; ZITO F.; TREMBLAY R.; WARSCHAWSKI, D. E.; MARCOTTE, I. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by C-13 solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, Amsterdam, v. 1848, n. 1, p. 369–377, part B, 2015.
- BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. **Atlântica**, Rio Grande, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.
- BORGES, L.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; DOCA, M. G. M.; ABREU, P. C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 4449 – 4454, 2011.

HUANG, J. J.; CHEUNG, P. C. Enhancement of polyunsaturated fatty acids and total carotenoid production in microalgae by ultraviolet band A (UVA, 365 nm) radiation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 59, n. 9, p. 4629-4636, 2011.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; ISKANDAROV, U.; COHEN, Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, n. 4, p. 905-915, 2011.

LAURENS, L. M. L. **Summative mass analysis of algal biomass**: integration of analytical procedures. Golden: The National Renewable Energy Laboratory, 2013.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O.; VICH, D. V.; CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Research**, New York, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.

OLOFSSON, M.; LAMELA, T.; NILSSON, E.; BERGÉ, J. P.; PINO, V.; URONEN, P.; LEGRAND, C. Combined Effects of Nitrogen Concentration and Seasonal Changes on the Production of Lipids in *Nannochloropsis oculata*. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 4, p. 1891-1910, 2014.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 102, n. 1, p. 35-42, 2011.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, Oxon, v. 103, p. 444-467, 2013.

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**, New York, v. 94, n. 6, p. 1495-1503, 2012.

RONQUILLO, J. D.; FRASER, J.; MCCONKEY, A. J. Effect of mixed microalgal diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 360-361, p. 64-68, 2012.

SHARMA, K. K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, Basel, v. 5, n. 5, p. 1532-1553, 2012.

SLUITER, A.; SLUITER, J. **Determination of starch in solid biomass samples by HPLC**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, [2008].

SUBRAMANIAN, S.; BARRY, A. N.; PIERIS, S.; SAYRE, R. T. Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: implications for biomass and biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, p. 150-162, 2013.

WYCHEN, S. V.; LAURENS, L. M. L. Determination of total carbohydrates in algal biomass. **The National Renewable Energy Laboratory**, 2015a. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60957.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

WYCHEN, S. V.; LAURENS, L. M. L. **Determination of total solids and ash in algal biomass**. Golden: The National Renewable Energy Laboratory, 2015b. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60956.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

YEN, H. W.; HU, I. C.; CHEN, C. Y.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae-based biorefinery: from biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 135 p. 166–174, 2013.

ZHU, Y.; DUNFORD, N. T. Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 90, n. 6, p. 841-849, 2013.