



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de biomassa microalgal

Autor: Vinicius Millán

Orientadora: Profa. Dra. Débora Jung Luvizetto Faccin

Coorientadora: Profa. Dra. Rosane Rech

Coorientador: Paulo Roberto Dall Cortivo

Porto Alegre, dezembro de 16

Agradecimentos

Agradeço a professora e orientadora Débora Jung Luvizetto Faccin, pela orientação e bondade de explicar diversas vezes o que eu estava fazendo.

Agradeço igualmente ao mestrando e coorientador Paulo Roberto Dall Cortivo, pelo auxílio no laboratório durante os experimentos.

Agradeço a professora e coorientadora Rosane Rech e ao professor Marco Antônio Záchia Ayub por terem disponibilizados equipamentos e laboratórios para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e torceu por mim.

Aos amigos que estiveram ao meu lado dividindo alegrias e tristezas.

E um agradecimento especial à minha namorada Taianne que sempre me deu forças e foi paciente mesmo quando eu reclamava que tudo estava perdido.

Resumo

Com o aumento da demanda energética mundial e a redução nas reservas de combustíveis fósseis, cresce o interesse em fontes alternativas de energia. Biocombustíveis são fontes promissoras, sendo o etanol, produzido pela fermentação de açúcares obtidos a partir da biomassa uma opção. Assim, a proposta deste trabalho é obter açúcares fermentescíveis de duas espécies de microalgas e, avaliar a possibilidade de produção de etanol a partir delas. Para tanto, foi realizada a hidrólise enzimática das microalgas *Dunaliella tertiolecta* e *Heterochlorella luteoviridis*. As hidrólises foram conduzidas à temperatura constante de 50 °C sob agitação de 120 rpm durante 72 h e, sem pré-tratamentos, à biomassa microalgal. Três cargas enzimáticas (10, 15 e 20 FPU g⁻¹) do complexo Celluclast 1.5 L foram testadas e as concentrações de glicose, celobiose, xilose e arabinose foram medidas via CLAE ao longo do tempo. A microalga *D. tertiolecta* apresentou as maiores concentrações de glicose após as 72 h de hidrólise com valores de 7,82 g L⁻¹; 9,07 g L⁻¹ e 11,95 g L⁻¹ para as cargas enzimáticas de 10, 15 e 20 FPU g⁻¹ respectivamente. A alga *H. luteoviridis* também teve os valores mais significativos ao final do período de hidrólise. As concentrações obtidas foram 15,8 g L⁻¹ de glicose para 10 FPU g⁻¹ de enzima; 13,08 g L⁻¹ para 15 FPU g⁻¹ e 10,6 g L⁻¹ para 20 FPU g⁻¹. A relação enzima-biomassa mostrou possuir influências antagônicas nas espécies. Enquanto na *D. tertiolecta* um aumento na concentração de enzimas no meio favoreceu a liberação de glicose na *H. luteoviridis* esse efeito não foi observado. Além disso, o presente trabalho avaliou a composição química de ambos microrganismos. Para *D. tertiolecta* o conteúdo lipídico encontrado foi de 11,65 %, proteico 13,06 % e de carboidratos totais 49,67 % do peso seco da microalga. Na outra espécie obteve-se 10,00 % de lipídeos, 13,99 % de proteínas e 51,77 % de carboidratos totais também sobre o peso seco da amostra. Esses resultados, mesmo sem nenhum estudo de otimização, possuem concentrações de glicose que permitiriam a produção de etanol.

Lista de Figuras

Figura 1. Emissões gases estufa por ação antropogênica, 2010. (Retirado de: IEA STATISTICS, 2015)	3
Figura 2. Representação da reação de transesterificação.	3
Figura 3. Produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas (Adaptado de: SIRAJUNNISA; SURENHIRAN, 2016).	4
Figura 4. Fatores ambientais que influenciam na acumulação de carboidratos em algas pela alteração das rotas bioquímicas (Adaptado de: CHENG; HE, 2014).	8
Figura 5. Mecanismo de ação da celulase. (Retirado de: A. PANDEY <i>et al.</i> , 2011)).....	10
Figura 6. Diagrama simplificado do método da sacarificação quantitativa. (Adaptado de: MOXLEY; ZHANG, 2007).....	12
Figura 7. Curva-padrão para análise de proteínas.	14
Figura 8. Cinéticas de liberação de: (A) glicose; (B) celobiose; (C) xilose e (D) arabinose, a partir da hidrólise enzimática da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> durante 72 h. Cargas enzimáticas: D10 10 FPU g ⁻¹ ; D15 15 FPU g ⁻¹ e D20 20 FPU g ⁻¹	19
Figura 9. Cinéticas de liberação de: (A) glicose; (B) celobiose; (C) xilose e (D) arabinose, a partir da hidrólise enzimática da microalga <i>Heterochlorella luteovidiris</i> durante 72 h. Cargas enzimáticas: H10 10 FPU g ⁻¹ ; H15 15 FPU g ⁻¹ e H20 20 FPU g ⁻¹	21

Lista de Tabelas

Tabela 1. Rendimento da produção de etanol a partir de diferentes fontes.	5
Tabela 2. Comparação da vantagens e desvantagens dos métodos de cultivos de microalgas.....	7
Tabela 3. Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida.....	9
Tabela 4. Composição das espécies de microalgas baseada na massa seca de microalgas.	16
Tabela 5. Composição das espécies de microalgas baseada no total de carboidratos presentes nas microalgas.	17
Tabela 6. Composição química da biomassa de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	17
Tabela 7. Composição de açúcares após 72 h de hidrólise para a alga <i>D. tertiolecta</i>	18
Tabela 8. Composição de açúcares após 72 h de hidrólise para a alga <i>H. luteoviridis</i>	18

Lista de Abreviaturas e Siglas

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ATP	Adenosina trifosfato
FBR	Fotobiorreator
pH	Potencial hidrogeniônico
SQ	Sacarificação quantitativa
UV/VIS	Ultravioleta visível
HMF	Hidroximetilfurfural

Lista de Símbolos

%UMIDADE	Percentual de umidade
m_i	Massa inicial
m_f	Massa final
%LIGNINA	Percentual de lignina
m_L	Massa de lignina
m_A	Massa de amostra
m_s	Massa seca de amostra
%LIPÍDEOS	Percentual de lipídeos
m_{LP}	Massa de lipídeos
%CINZAS	Percentual de cinzas
m_C	Massa de cinzas

Sumário

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Siglas	vi
Lista de Símbolos	vii
Sumário	viii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Etanol	3
2.1.1 Etanol de primeira geração	4
2.1.2 Etanol de segunda geração	4
2.1.3 Etanol de terceira geração	5
2.2 Algas	5
2.2.1 Microalgas	6
2.2.2 Características para produção de etanol	7
2.2.3 Cultivo	7
2.2.4 Aprimoramento do conteúdo de carboidratos	8
2.3 Hidrólise	9
2.3.1 Hidrólise ácida	9
2.3.2 Hidrólise enzimática	10
2.4 Conversão de biomassa à açúcares fermentescíveis	10
3 Materiais e Métodos	12
3.1 Microalgas	12
3.2 Métodos analíticos	12
3.2.1 Sacarificação quantitativa	12
3.2.2 Umidade	13
3.2.3 Teor de lignina	13
3.2.4 Análise de açúcares - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	13
3.2.5 Análise lipídeos	13
3.2.6 Análise de proteínas	14
3.2.7 Análise de Carboidratos	15
3.2.8 Determinação do teor de cinzas	15
3.3 Hidrólise enzimática	15
4 Resultados	16
4.1 Hidrólise Enzimática	17
4.1.1 Cinéticas da hidrólise	19
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	23
6 Referências	24

1 Introdução

Ao longo dos anos, o interesse mundial pelos biocombustíveis cresce devido ao provável esgotamento dos combustíveis fósseis e, pela busca por fontes de energia limpas capazes de diminuir os efeitos do aquecimento global. Nessa busca, vários tipos de biomassa foram considerados como matéria-prima para produção de biocombustível. Amido e açúcar de cana já vem sendo usados em escala comercial para produzir etanol, por serem competitivos com o mercado alimentício são classificados como biocombustível de primeira geração.

O etanol classificado como de segunda geração é proveniente da utilização de biomassa lignocelulósica como fonte de açúcares. Atualmente, diversas pesquisas estão sendo conduzidas para reduzir os custos intrínsecos desse processo, mas esbarram na dificuldade do pré-tratamento exigido para remoção da lignina (A. RICHMOND; EMERITUS; QIANG, 2013).

Alternativamente, tem-se o etanol de terceira geração que é obtido a partir da fermentação de açúcares oriundos da biomassa de macro e microalgas. Esta fonte de açúcares é considerada promissora pois a produção da biomassa não compete com a produção de alimentos, além de ser possível utilizar esta biomassa para a produção de biodiesel. Biocombustíveis provenientes dessas biomassas tem atraído muita atenção, visto que, algas podem ser cultivadas com CO₂ e luz solar, utilizando água salgada ou salobra em terras não cultiváveis, além de não apresentarem lignina em sua composição (KYUNG *et al.*, 2013).

Em geral, a produção de etanol envolve as seguintes etapas: pré-tratamento da biomassa, sacarificação das fontes de carbono (apenas para as biomassas de açúcares não fermentescíveis), fermentação e recuperação do produto.

O pré-tratamento mais usual baseia-se na hidrólise química empregando-se ácido sulfúrico ou clorídrico diluídos. Por não apresentarem lignina na sua composição o presente trabalho tem como objetivo liberar os açúcares das microalgas sem pré-tratamentos.

A sacarificação é uma das etapas cruciais já que açúcares fermentescíveis como a glicose precisam ser liberados para poderem ser metabolizados na presença de leveduras para produzir etanol. A hidrólise enzimática é uma alternativa para liberar os açúcares necessários para fermentação. Diferentes enzimas podem ser utilizadas nesta etapa contudo o processo é influenciado por numerosos fatores incluindo a cristalinidade da celulose, área superficial do substrato, espessura da parede celular, porosidade, transferência de massa, e o conteúdo de hemicelulose ou lignina (HARUN; DANQUAH, 2011).

Já a fermentação é um processo milenarmente conhecido e amplamente estudado, envolvendo principalmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para metabolizar os açúcares em etanol o qual é recuperado ao fim da reação.

Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho é obter açúcares fermentescíveis de duas espécies de microalgas, *Dunaliella tertiolecta* e *Heterochlorella luteoviridis*. Através da hidrólise enzimática e, sem a utilização de pré-tratamentos, avaliar a possibilidade de

utilização dessas espécies como matéria-prima para obtenção de etanol de terceira geração.

2 Revisão Bibliográfica

No decorrer dos anos, atividades antropogênicas que prejudicam o meio ambiente devido as mudanças climáticas, aumento do nível dos oceanos e tendência de aumento da temperatura média do planeta terra são menos toleradas. Entre todas atividades humanas que produzem os gases de efeito estufa, o uso de energia (combustão e emissões fugitivas) representa a maior fonte. Quantidades menores correspondem a atividades industriais, agricultura e outros - queimadas, emissões indiretas de N_2O , NO_x , NH_3 e uso de solventes - como pode ser observado na Figura 1. Dentro do setor de energia, o CO_2 resultante da oxidação do carbono durante a combustão domina o total de gases de efeito estufa emitidos, representando aproximadamente 60% das emissões globais (IEA STATISTICS, 2015).

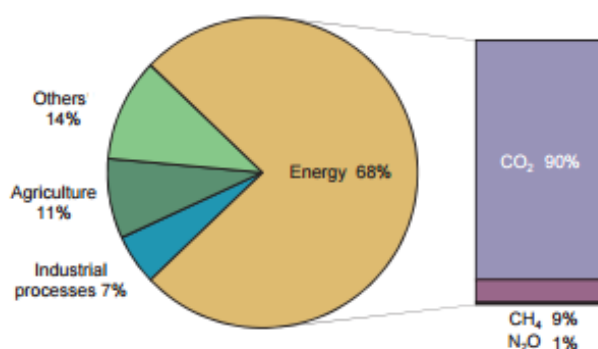


Figura 1. Emissões de gases de efeito estufa por ação antropogênica, 2010. (Retirado de: IEA STATISTICS, 2015)

O uso de combustíveis fósseis está associado a todos esses efeitos. Dessa forma, muitos países aumentaram os esforços no que diz respeito a desenvolver fontes de energia renováveis, as quais, são economicamente e ambientalmente mais amigáveis. Biomassa é uma das fontes renováveis mais promissoras pela sua capacidade de captura do CO_2 atmosférico durante a fotossíntese. Biodiesel e etanol são exemplos de biocombustíveis que podem ser produzidos a partir de biomassas (HO, S. H. *et al.*, 2013).

Biodiesel são ésteres de ácidos graxos sintetizados a partir de gordura animal e/ou óleo vegetal por reações de transesterificação (Figura 2). Apesar de ótima opção, o biodiesel apresenta problemas devido sua alta viscosidade, baixa densidade energética, propriedades de congelamento a baixas temperaturas, além de um longo tempo de armazenamento provocar sua oxidação. Por isso o etanol surge como a melhor opção de biocombustível (BALAT, M.; BALAT, H., 2010).



Figura 2. Representação da reação de transesterificação.

2.1 Etanol

Na década de 1970, devido à crise de combustíveis ao redor do mundo, ganhou força a produção de etanol. É possível classificar a produção em primeira, segunda e terceira

geração baseado na matéria-prima, tecnologia de produção e nível de desenvolvimento (SIRAJUNNISA; SURENHIRAN, 2016). Atualmente, o etanol pode ser produzido a partir de diferentes biomassas, a síntese de cada geração de etanol e suas matérias-primas podem ser observadas na Figura 3.

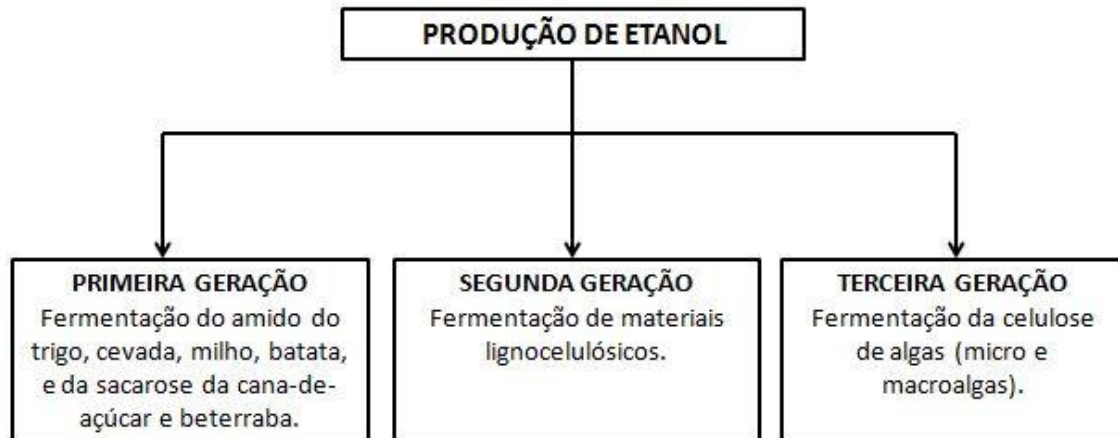


Figura 3. Produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas (Adaptado de: SIRAJUNNISA; SURENHIRAN, 2016).

2.1.1 Etanol de primeira geração

A fermentação dos açúcares de cana, beterraba, trigo, cevada e milho é o processo mais simples de produção de etanol. Entretanto, o que preocupa na primeira geração é que conforme a capacidade e necessidade de produção aumentar, a competição por terras agricultáveis crescerá na mesma proporção. Esse aumento representa uma mudança no uso da terra e leva a um dilema entre alimentação da humanidade *versus* retorno financeiro aos agricultores através da incorporação das terras para produção de energia (SINGH; NIGAM; MURPHY, 2011). A troca do cultivo de alimentos para o de energia leva a um aumento no preço e diminuição nos estoques de alimentos principalmente em países subdesenvolvidos. Além disso, as culturas de "energia" aumentam a preocupação com a poluição do solo com o uso de fertilizantes e pesticidas, redução da biodiversidade da plantação, contaminação das águas superficiais levando a eutrofização e eco-toxicidade (JOHN, R. P. *et al.*, 2011).

2.1.2 Etanol de segunda geração

No etanol de segunda geração, o dilema combustível *versus* alimentos deixa de existir pois para sua produção não são utilizados alimentos. A matéria-prima passa a ser alguns tipos de biomassa lignocelulósica como palha, bagaço de cana, madeira, resíduos agrícolas e industriais. Os principais constituintes dos materiais lignocelulósicos são celulose, hemicelulose, lignina, extratos e cinzas.

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polissacarídeo linear de alta massa molar, formada por monômeros de glicose $(C_6H_{12}O_6)$ unidos por ligações $\beta(1-4)$. É um polímero compacto, ordenado e resistente a ataques químicos. Sua hidrólise é uma etapa importante na produção de etanol sendo mais difícil que a do amido devido à alta cristalinidade da celulose (CHIARAMONTI, 2007; JOHN, R. P. *et al.*, 2011).

Hemicelulose é um polímero ramificado semelhante a celulose, porém é formada por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (galactose, glicose e manose) e ácido urônico. Ela é um material amorfo formada por diferentes monômeros, portanto é relativamente fácil de hidrolisar (CHIARAMONTI, 2007; JOHN, R. P. *et al.*, 2011).

Lignina é um polímero tridimensional que possui natureza hidrofóbica e reveste a celulose, sendo necessário um pré-tratamento para removê-la. Ela é difícil de ser degradada quimicamente ou biologicamente e não pode ser fermentada (CHIARAMONTI, 2007; JOHN, R. P. *et al.*, 2011).

Os baixos rendimentos e o alto custo do processo de pré-tratamento e hidrólise desses substratos impactam negativamente na viabilidade da produção em escala industrial com as tecnologias atuais (CHIARAMONTI, 2007; JOHN, R. P. *et al.*, 2011).

2.1.3 Etanol de terceira geração

A maioria dos cultivos para produção de combustíveis de primeira e segunda geração não só afetam a cadeia alimentar como utilizam, direta ou indiretamente, terras cultiváveis. Algas são consideradas uma alternativa ao cultivo de alimentos na produção de combustíveis renováveis por elas serem ricas em lipídios - produção de biodiesel - e carboidratos - produção de etanol.

As algas apresentam diversas vantagens com relação a outras biomassas. Elas não afetam o fornecimento de alimento; não competem por terras agricultáveis; consomem menos água que outros cultivos; podem crescer em diferentes ambientes, impróprios para outras espécies; podem ser cultivadas usando águas residuais liberadas por diferentes indústrias; tem o potencial de produzir coprodutos de alto valor (SIRAJUNNISA; SURENDHIRAN, 2016). Somando-se a essas vantagens, algas possuem maiores rendimentos por área na produção de etanol que outras matérias-primas como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento da produção de etanol a partir de diferentes fontes.

Matéria-prima	Rendimento de etanol (L ha⁻¹)
Trigo	2590
Milho	3460 - 4020
Beterraba	5010 - 6680
Cana-de-açúcar	6190 - 7500
Switchgrass	10760
Microalgas	46760 - 140290

(MINH; HANH, 2012; MUSSATTO *et al.*, 2010)

2.2 Algas

Esses seres são reconhecidos como as formas de vida mais antigas existente. Elas são plantas primitivas (talófitas), ou seja, não possuem raízes, caule e folhas e tem como principal pigmento fotossintetizante clorofila α . Por serem formas de vida simples suas estruturas celulares funcionam majoritariamente para conversão de energia sem qualquer desenvolvimento além das células. Graças a isso elas se adaptam a condições ambientais diversas.

Algas representam uma grande variedade de espécies fotossintetizantes. Elas podem ser autotróficas ou heterotróficas. As autotróficas, através da fotossíntese, aproveitam a

luz solar e fixam o carbono do CO₂ atmosférico o qual é assimilado como material de reserva tal como carboidratos. Há muitas espécies heterotróficas as quais são capazes de utilizar pequenas moléculas orgânicas do ambiente e transformá-las em substâncias como lipídeos e proteínas. Existem ainda algumas algas que são capazes de realizar a fotossíntese e aproveitar nutrientes orgânicos exógenos, esses seres, em particular, são denominados mixotróficos (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Usualmente, algas são agrupadas em duas categorias - microalgas e macroalgas - baseado em sua morfologia e tamanho. Macroalgas são organismos multicelulares que possuem estruturas semelhantes a raízes, caules e folhas de plantas superiores. Já as microalgas, como o nome indica, são organismos microscópicos que em grande parte são unicelulares (JOHN, R. P. *et al.*, 2011).

As microalgas possuem vantagens quando comparadas com as macroalgas. Elas possuem maior produtividade de açúcar devido, principalmente, ao rápido crescimento celular. Além disso, o principal monossacarídeo derivado dos carboidratos dos seres microscópicos é a glicose. Já nas macroalgas encontram-se alginato e manitol, os quais, são mais difíceis de fermentar, sendo mais desafiador converter macroalgas em etanol (HO, S. H. *et al.*, 2013).

2.2.1 *Microalgas*

Microalgas são microrganismos procarióticos ou eucarióticos fotossintetizantes que podem crescer rapidamente e viver em condições adversas devido sua estrutura unicelular ou multicelular simples. Exemplos de microrganismos procarióticos são as cianobactérias (*Cyanophyceae*), já os eucarióticos estão classificados - principalmente pelo critério de pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica. As classes principais são: algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*). Células procarióticas (cianobactérias) são caracterizadas pela ausência de algumas organelas (plastídeos, mitocôndria, núcleo, complexo de Golgi e flagelos) e estão mais próximas das bactérias do que algas. Células eucarióticas, que compreendem muitos tipos diferentes de algas, possuem todas as organelas que controlam as funções celulares, permitindo sua sobrevivência e reprodução (A. RICHMOND; EMERITUS; QIANG, 2013; KIM, S.-K., 2015).

Estima-se que existam mais de 100.000 espécies diferentes que estão presentes em todos os ecossistemas, não só aquáticos, mas também terrestres. Enquanto plantas terrestres em climas temperados podem atingir uma eficiência na foto conversão de no máximo 1 % as microalgas podem converter até 5 % da energia solar em energia química (RÖSCH; SKARKA; WEGERER, 2012). Somando-se a isso, esses organismos são uma fonte promissora de diversos compostos bioativos como polímeros, peptídeos, ácidos graxos, carotenoides, toxinas e esteroides. Devido a essa grande variedade de compostos elas possuem uma ampla gama de aplicações como nutrição animal e humana, cosméticos, produtos farmacêuticos, captura de CO₂, biocombustíveis, tratamento de águas residuais (KIM, S.-K., 2015; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

As espécies escolhidas, no presente trabalho, foram as microalgas unicelulares *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta* que pertencem ao filo das algas verdes (*Chlorophyta*). As *Chlorophytas* podem ser encontrados em água doce, salgada ou ambiente terrestre e incluem seres unicelulares e multicelulares possuindo clorofila *a* e *b* em um cloroplasto simples rodeados por membranas (KIM, S.-K., 2015).

A estrutura celular é uma informação importante sobre cada microalga. Enquanto, a *Heterochlorella luteoviridis* apresenta parede celular (possivelmente composta por celulose, hemicelulose, pectina e glicoproteínas) a *Dunaliella tertiolecta* não possui parede celular rígida apenas uma fina membrana (semelhante a um glicocálix) envolvendo a célula. Apesar da distância filogenética os dois microrganismos apresentam amido como carboidrato de reserva (A. RICHMOND; EMERITUS; QIANG, 2013; NEUSTUPA *et al.*, 2009; PREETHA *et al.*, 2012).

2.2.2 Características para produção de etanol

A avaliação e seleção da alga é o parâmetro mais importante na produção de etanol. Existem mais de 100.000 espécies (ULLAH *et al.*, 2015), todavia nem toda alga pode ser usada na produção de etanol. Os fatores envolvidos como taxa de crescimento, rendimento fotossintético, produção de biomassa, lipídios, carboidratos e adaptações a diferentes condições ambientais fazem essa escolha ser complexa. Além desses fatores outras vantagens incluem resistência ao cisalhamento em fotobiorreatores (sistema fechado), resistência a organismos exógenos nos cultivos em lagoa *raceway* (sistema aberto), alta capacidade de absorção de CO₂, quantidade limitada de nutrientes requeridos, tolerância a ampla faixa de temperaturas, fornecimento de coprodutos com valor agregado e possuir característica de auto floculação (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Nenhuma espécie selvagem apresenta todas essas características por isso a engenharia genética pode ser usada para se otimizar o rendimento da produção de biocombustíveis para obter-se maior quantidade e qualidade (BRENNAN; OWENDE, 2010).

2.2.3 Cultivo

Existem dois sistemas de cultivo de microalgas os abertos - lagoas *raceway* - e os fechados - fotobiorreatores. Fotobiorreator (FBR) é um biorreator usado para o cultivo em um ambiente controlado. Ao contrário das lagoas *raceway*, o FBR permite um crescimento da espécie desejada por longa duração sem mudanças nas características físicas e biológicas. As lagoas *raceway* são onde comumente são cultivadas microalgas, água e nutrientes circulam por canais com uma profundidade de 15-20 cm e um rotor com pás fornece agitação e circulação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Um comparativo das vantagens e desvantagens entre os dois sistemas pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação das vantagens e desvantagens dos métodos de cultivo.

Características	Sistema aberto	Sistema fechado
Cultivo	Múltiplas espécies	Uma espécie
Contaminação	Alta	Baixa/nenhuma
Controle Crescimento	Difícil	Fácil
Controle Temperatura	Muito variável	Controlado
Qualidade da Biomassa	Variável	Reproduzível
Produção de Biomassa	Baixa	Alta
Espaço utilizado	Grande	Pequeno
Investimento	Baixo	Alto
Custo Operacional	Baixo	Alto
Escalonamento	Fácil	Difícil

Adaptado de: (SIRAJUNNISA; SURENHIRAN, 2016)

2.2.4 Aprimoramento do conteúdo de carboidratos

A composição (carboidratos, lipídeos, proteínas e pigmentos) das microalgas pode diferir de acordo com as condições de cultivo. Fatores ambientais, particularmente luz, temperatura, quantidade de nutrientes, salinidade e pH, não só afetam a fotossíntese e a produção de biomassa, mas também influenciam o metabolismo celular, conseqüentemente, a composição. A Figura 4 apresenta os fatores que auxiliam no aumento de carboidrato nas células através da regulação das rotas bioquímicas (A. RICHMOND; EMERITUS; QIANG, 2013; CHENG, D.; HE, 2014; CHIARAMONTI, 2007).

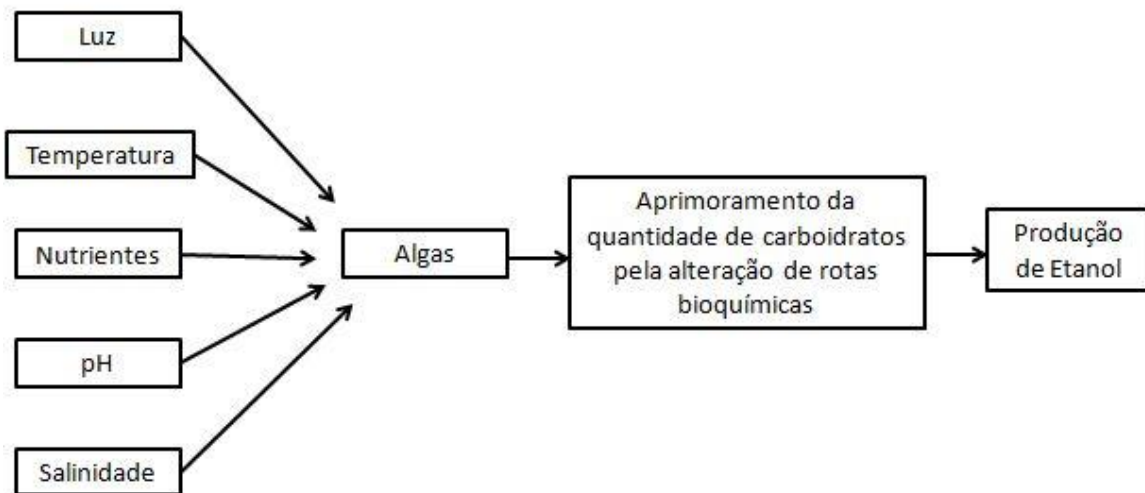


Figura 4. Fatores ambientais que influenciam na acumulação de carboidratos em algas pela alteração das rotas bioquímicas (Adaptado de: CHENG; HE, 2014).

O efeito da luz é controlado por um processo denominado foto aclimação no qual as células algais sofrem mudanças na composição celular, junto com alterações biofísicas e fisiológicas para aumentar a fotossíntese e o crescimento algal. Em ambientes com alta intensidade luminosa as quantidades de clorofila e outros pigmentos diminui enquanto a de carboidratos e lipídeos aumenta (A. RICHMOND; EMERITUS; QIANG, 2013; CHENG, D.; HE, 2014; CHIARAMONTI, 2007).

Temperatura é o fator mais importante, depois da luz, no cultivo de algas em ambos sistemas de cultivo, aberto e fechado. Geralmente, em uma faixa ótima de temperatura, um aumento na temperatura leva a um aumento na produção de biomassa. Similarmente, muitos estudos descrevem que um estresse de temperatura pode influenciar também o aumento da quantidade de carboidratos. O efeito da temperatura sobre a composição bioquímica acontece através de dois mecanismos distintos: a dependência que as taxas de reações químicas e bioquímicas possuem e na transformação do carbono fixado fotossinteticamente em vários tipos de macromoléculas (proteínas, carboidratos e lipídeos) (A. RICHMOND; EMERITUS; QIANG, 2013; CHENG, D.; HE, 2014; CHIARAMONTI, 2007).

Variações de nutrientes provocam mudanças consideráveis nas rotas metabólicas e na composição bioquímica das algas. Nitrogênio e fósforo são os nutrientes mais importantes para o crescimento e metabolismo das microalgas. Nitrogênio tem a habilidade de alterar as rotas metabólicas das microalgas sob condições restritas. Similarmente ao nitrogênio a

deficiência em fósforo - componente envolvido em diversos processos metabólicos celulares - reduz as quantidades de clorofila *a* e proteínas, assim sendo, aumenta a quantidade relativa de carboidratos nas células da alga. Outros fatores como carbono, concentração de sais e metais traço também podem afetar o crescimento e a composição das células nos dois sistemas de cultivo (A. RICHMOND; EMERITUS; QIANG, 2013; CHENG, D.; HE, 2014; CHIARAMONTI, 2007).

George et al. (2014) descrevem que a produção econômica de biocombustível de microalgas pode ser otimizado através de uma abordagem de engenharia genética. Através dela é possível alterar e melhorar a quantidade de biomassa e de produtos específicos como lipídeos e carboidratos. Além do mais, a alteração gênica permite um controle direto sobre o funcionamento celular através de mutações ou introdução de transgenes (CHENG, D.; HE, 2014; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; SIRAJUNNISA; SURENDHIRAN, 2016).

2.3 Hidrólise

Para a produção de etanol de terceira geração é crucial expor os componentes intracelulares da alga e para isso utiliza-se a hidrólise. A parede celular nas algas é a principal estrutura que deve ser despolimerizada de modo que se possa extrair os polissacarídeos. Ao longo da conversão, os polissacarídeos serão divididos em monômeros que possam ser fermentados a etanol (AZMAH *et al.*, 2016). Usualmente, utilizam-se métodos químicos e enzimáticos para hidrolisar polissacarídeos (biomassa) em monossacarídeos. Quando se tem uma matéria-prima heterogênea, ou seja, composta de celulose e hemicelulose é comum a combinação dos métodos químicos e enzimáticos, além de rompimentos físicos. Existem duas abordagens possíveis, a mais comum, é a hidrólise química mais especificamente ácida, enquanto a hidrólise enzimática é uma escolha mais recente que vem ganhando força entre pesquisadores (ABD-RAHIM *et al.*, 2014).

A Tabela 3 mostra um comparativo entre os principais pontos da hidrólise ácida e enzimática.

Tabela 3. Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida.

Parâmetros	Ácida	Enzimática
Tempo	Curto	Alto
Custo	Baixo	Alto
Temperatura	Alta	Moderada
Produção de açúcares	Baixa	Alta
Coprodutos indesejados	Sim	Não

Adaptado de: (AZMAH *et al.*, 2016)

2.3.1 Hidrólise ácida

Nesse tipo de hidrólise diversas opções de ácidos podem ser empregadas, sendo o ácido sulfúrico (H₂SO₄) o preferido. De maneira simples, o papel do ácido na hidrólise é quebrar as ligações que formam as longas cadeias de polissacarídeos.

Inicialmente ele irá romper a rede de ligações de hidrogênio intra e intercadeia e diminuir o grau de cristalinidade da celulose transformando-a em um estado amorfo. A partir desse momento tanto a celulose como outros polissacarídeos, por exemplo, amido; estão suscetíveis à hidrólise. Na sequência o ácido irá funcionar como um catalisador onde irão ser clivadas as ligações glicosídicas das moléculas. No fim do processo qualquer adição

ou diluição com água provocará a ruptura rápida do hidrolisado nos seus monossacarídeos constituintes (A. PANDEY *et al.*, 2011; ABD-RAHIM *et al.*, 2014).

2.3.2 Hidrólise enzimática

Hidrólise enzimática da celulose ocorre pela ação de enzimas denominadas celulases que são altamente específicas e produzem usualmente açúcares redutores como a glicose. A conversão de açúcares complexos em mais simples utilizando-se hidrólise enzimática é uma boa forma de reduzir os impactos negativos da utilização de ácidos no método químico. A capacidade de atingir mais de 80 % de taxa de conversão também faz da abordagem enzimática um meio mais atrativo para produção de etanol.

Celulase é um complexo enzimático capaz de hidrolisar a celulose. Esse polissacarídeo é degradado pela ação sinérgica de três classes de enzimas: *endoglucanases*; *exoglucanases (celbio-hidrolases)* e β -*glucosidase*.

Segundo Carere *et al.* (2008) as endoglucanases possuem a habilidade de hidrolisar açúcares complexos da matéria-prima pelo ataque às partes amorfas no interior da celulose hidrolisando as ligações β -1,4-glicosídicas. Já as exoglucanases, degradam a celulose clivando unidades de celobiose a partir das extremidades de uma fibra de celulose. Com os efeitos combinados da β -glucosidase, os resíduos de celobiose são divididos em duas unidades de glicose (A. PANDEY *et al.*, 2011; CARERE *et al.*, 2008). Um diagrama esquemático do mecanismo de ação da celulase é mostrado na Figura 5.

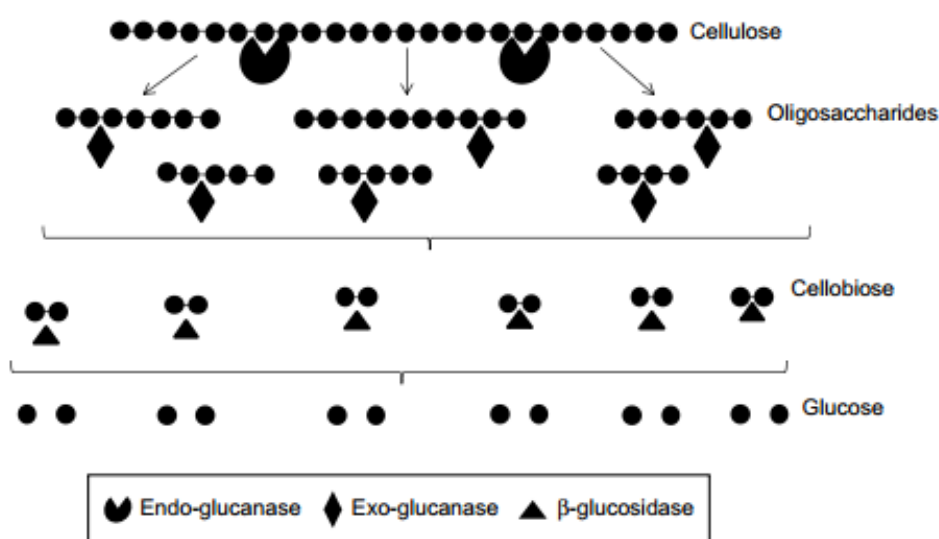


Figura 5. Mecanismo de ação da celulase. (Retirado de: A. PANDEY *et al.*, 2011))

2.4 Conversão de biomassa à açúcares fermentescíveis

Choi *et al.* (2010) estudaram o efeito de duas enzimas comerciais diferentes (amilase de *B. licheniformis* e glucoamilase de *Aspergillus niger*) na eficiência da conversão de carboidratos da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* a qual contém aproximadamente 60 % de açúcares em peso seco. A hidrólise foi realizada com 0,2 % (volume por massa) de concentração enzimática, a pH de 4,5 e 55 °C por 30 min. O resultado mostrou que mesmo com a ausência de pré-tratamentos aproximadamente 94 % dos carboidratos foram

hidrolisados em glicose reiterando a possibilidade a produção de etanol a partir de biomassa microalgal (CHOI; NGUYEN; SIM, 2010).

Em outro estudo, *Chlorococum humicola* foi hidrolisada por celulasas provenientes de *Trichoderma reesei* sob diferentes condições de pH, temperatura e quantidades de substrato. O maior rendimento na sacarificação foi de 68,2 % (base mássica) nas condições de 40 °C, pH 4,5 e concentração microalgal de 10 g L⁻¹ (HARUN; DANQUAH, 2011).

Ho et al, (2013) utilizaram enzimas celulose-hidrolisantes obtidas da bactéria *Pseudomonas* sp. CL3. No experimento foram utilizadas microalgas (moída, seca e pré-tratada por sonicação) da espécie *Chlorella vulgaris*, as quais foram colocadas em um tampão de acetato (pH 6) de concentração 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. Na sequência, a amostra foi autoclavada a 121 °C por 20 min e então uma quantidade fixa de uma mistura de enzima foi adicionada a biomassa pré-tratada. A hidrólise foi conduzida sob agitação de 200 rpm e temperatura de 45 °C. Foram testadas duas misturas enzimáticas: a primeira consistiu de endoglucanase (0,65 U mL⁻¹), β-glucosidase (1,50 U mL⁻¹) e amilases (0,09 U mL⁻¹). Com essa mistura depois de um dia de reação o rendimento de açúcares redutores totais foi de aproximadamente 69,8 %, enquanto o de glicose foi de apenas 30,5 % indicando uma baixa eficiência. Isso pode ser explicado devido a quantidade das amilases não ser suficiente, já que, a maioria dos carboidratos dessa espécie é amido (aproximadamente 62 % do total de carboidratos). Portanto, para aumentar o rendimento no segundo experimento foi utilizada a seguinte composição: endoglucanase (0,65 U mL⁻¹), β-glucosidase (0,3 U mL⁻¹) e amilases (0,75 U mL⁻¹) - numa razão de 1,00:0,46:1,15 para as três enzimas respectivamente. Depois de 24 h de hidrólise enzimática, o rendimento de glicose alcançado foi 79,1 %. Sendo assim, uma maior concentração de glicose foi obtida nas condições do segundo experimento com um máximo de rendimento de 90 % alcançado depois de 72 h de hidrólise (HO, S. H. et al., 2013).

Um estudo feito por Kyung et al. (2013) investigou a possibilidade da sacarificação e produção de etanol a partir da microalga *Dunaliella tertiolecta* após extração lipídica. Os lipídeos foram extraídos, da biomassa seca e congelada, utilizando-se clorofórmio e metanol. Diferentes enzimas, temperaturas, pH e pré-tratamentos (HCl e H₂SO₄ diluídos) foram testados. O máximo de açúcares liberados ocorreu quando a sacarificação foi catalisada pela enzima AMG 300L (amiloglucosidase) com uma relação de 0,4 mL enzima por grama de biomassa, na temperatura de 55 °C, com pH igual a 5,5 durante 12 h. Foram obtidos 21 mg mL⁻¹, uma parcela que correspondeu a 42 % da massa de biomassa residual (sem a presença de lipídeos) e 80,9 % da quantidade de carboidratos. Além disso, o estudo dos diferentes pré-tratamentos não trouxe benefícios significativos indicando que a biomassa residual após a extração lipídica poderia ser sacarificada sem prejudicar o rendimento.

3 Materiais e Métodos

3.1 Microalgas

As espécies utilizadas neste estudo foram as microalgas unicelulares *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta*, cedidas pela Prof^a. Dr^a. Rosane Rech da UFRGS. As amostras estavam liofilizadas e armazenadas a -18 °C.

3.2 Métodos analíticos

As análises realizadas para caracterização da biomassa microalgal foram feitas em triplicata.

3.2.1 Sacarificação quantitativa

A análise foi realizada de acordo com metodologia descrita por Sluiter et al. (2012), do National Renewable Energy Laboratory (NREL), a qual se fundamenta na sacarificação quantitativa (SQ). Esse método é largamente empregado para determinar a composição de carboidratos em materiais lignocelulósicos. Por falta de métodos específicos para microalgas optou-se por utilizar um método com alto grau de confiabilidade. Como mostrado na Figura 6, a SQ envolve uma primeira hidrólise, na qual são convertidos polissacarídeos em oligossacarídeos, utilizando-se ácido sulfúrico (72 %, base mássica) a 30 °C durante 30 min e uma segunda hidrólise, conduzida com ácido diluído (2 %) a 121 °C por 1 h, que converte oligossacarídeos até açúcares monoméricos.

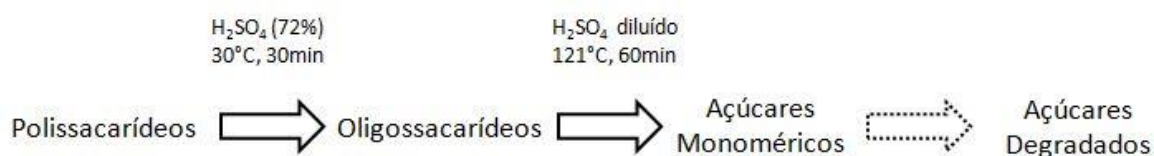


Figura 6. Diagrama simplificado do método da sacarificação quantitativa. (Adaptado de: MOXLEY; ZHANG, 2007)

Cerca de 300 mg das amostras de algas liofilizadas foram pesadas e colocadas em tubos de ensaio. Adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico 72 % (base mássica) às algas e, em seguida, foram colocadas em banho termostático a 30 °C por 60 min. As partículas sólidas foram bem misturadas em intervalos regulares de 3 min com bastão de vidro. Essa mistura é fundamental para assegurar um contato completo do ácido com as partículas de microalgas para se obter uma hidrólise uniforme. O hidrolisado foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL usando 80 mL de água destilada (i.e., a solução ácida foi diluída para 2 % de ácido sulfúrico). Após uma lavagem rigorosa dos tubos, os erlenmeyers foram autoclavados a 121 °C por 60 min. Depois de autoclavadas, as misturas foram colocadas em um banho de gelo para extinguir a reação.

As soluções de hidrolisado foram filtradas utilizando-se cadinhos de vidro com filtro, os quais permaneceram por 24 h em estufa a 72 °C e colocados em dessecador 30 min antes de tarados. Depois de pesados os filtros, as amostras foram filtradas em bomba de vácuo transferindo o filtrado para balões de 100 mL. O líquido resultante foi novamente filtrado,

mas agora em holder com membrana de 0,22 µm para posterior análise de açúcares em CLAE.

O resíduo sólido remanescente, após várias lavagens, foi seco em estufa a 105 °C e pesado até massa constante. A diferença entre a massa seca inicial da amostra e a do resíduo foi utilizada para estimar a porcentagem de lignina insolúvel presente nas microalgas. O restante da lignina, que é solúvel em meio ácido, é medido por espectroscopia UV/VIS.

3.2.2 Umidade

A determinação da umidade foi obtida através da secagem direta das amostras em estufa a 105 °C. Foram pesados 2 g de microalgas em cadinho de inox previamente tarado. As algas foram, então, colocadas em estufa a 105 °C por 3 h. Após sair da estufa as cápsulas de metal foram colocadas em dessecador para resfriar. Na sequência, após atingir a temperatura ambiente, as amostras foram pesadas. O cálculo para determinar a umidade foi realizado conforme a Equação 1.

$$\%_{\text{UMIDADE}} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

onde m_i (g) é a massa inicial e m_f (g) é a massa final da amostra.

3.2.3 Teor de lignina

Conforme descrito por Rocha (2000) apud Rech et al. (2009) o cálculo da porcentagem de lignina foi realizado como o demonstrado pela Equação 2.

$$\%_{\text{LIGNINA}} = \frac{m_L - m_C}{m_S} \times 100 \quad (2)$$

onde m_L (g) é a massa de lignina, m_C (g) é a massa de cinzas e m_S é a massa seca da amostra (g).

3.2.4 Análise de açúcares - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para determinar as concentrações de açúcares presentes nas microalgas foi utilizado CLAE em equipamento Shimadzu e detector por índice de refração. O volume de injeção foi de 20 µL. Para quantificação dos açúcares empregou-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H, a fase móvel adotada foi solução de ácido sulfúrico 0,005 M, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ a 45 °C. As amostras foram filtradas em membrana de acetato e celulose de 0,22 µm (Millipore).

3.2.5 Análise lipídeos

Os lipídeos foram recuperados por extração a frio segundo a metodologia de Bligh and Dyer (1959), a qual baseia-se na solubilidade seletiva dos lipídios em uma mistura formada por clorofórmio, metanol e água. A diluição do clorofórmio com a água separa o sistema em duas fases, a do clorofórmio (fase orgânica) a qual contém os lipídios e a fase aquosa onde estão o metanol a água e todo o resto das substâncias. Lipídeos são obtidos purificados isolando-se a fase orgânica do sistema (DYER, 1959).

Foram pesadas 300 mg de cada espécie de microalga liofilizada triturada e colocada em agitação magnética com 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL água destilada

durante 30 min a temperatura ambiente. Na sequência foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de Na_2SO_4 10 % (base mássica). Após a adição, deixou-se em funil de separação até as fases separarem-se. Cerca de 25 mL da camada inferior (clorofórmio) foi filtrada com papel filtro e cerca de 1 g de Na_2SO_4 para um bquer de 50 mL. Pipetou-se 10 mL do líquido filtrado em bquer de 50 mL com tara prévia. Os bqueres foram colocados em estufa a 110 °C até completa evaporação do solvente. Após o resfriamento, em dessecador, eles foram pesados em balança analítica e o percentual de lipídeos foi calculado através da Equação 3.

$$\%_{\text{LIPÍDEOS}} = \frac{m_{\text{LP}} \times 2}{m_{\text{A}}} \times 100 \quad (3)$$

onde m_{LP} (g) é a massa de lipídeos em 10 mL de amostra e m_{A} (g) é a massa da amostra.

3.2.6 Análise de proteínas

A primeira proposta do método de Lowry foi feita por Wu em 1922, desde então é o mais utilizado para determinação de proteínas. O método utiliza o reagente Folin Ciocalteu (mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico) que é reduzido quando reage com proteínas, na presença do catalisador Cu^{+2} produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm (RANDALL; LEWIS, 1951; ZAIA, 1998).

Foram pesados 20 mg de ambas espécies de microalgas em tubos de ensaio, adicionou-se 1 mL de água destilada para hidratação. Depois de 24 h na geladeira a mistura foi centrifugada a 6000 rpm por 15 min para retirada do sobrenadante. Após, ressuspendeu-se o sólido com 5 mL de solução 1 M de NaOH para a mistura ficar em banho por 30 min a temperatura de ebulição. A mistura foi resfriada em banho de gelo para posterior retirada de 100 μL do líquido. Nesse momento foi adicionado 2,5 mL de solução alcalina (Na_2CO_3 a 2 % em NaOH 0,1 M com 1 mL de solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 % e citrato de sódio 1 %) e colocado em banho-maria a 37 °C durante 10 min. Foi acrescentado 300 μL de solução de Folin e deixado no escuro por 30 min para posterior leitura da absorbância a 750 nm. A Equação 4 foi usada para o cálculo do teor de proteínas com base na curva-padrão da Figura 7:

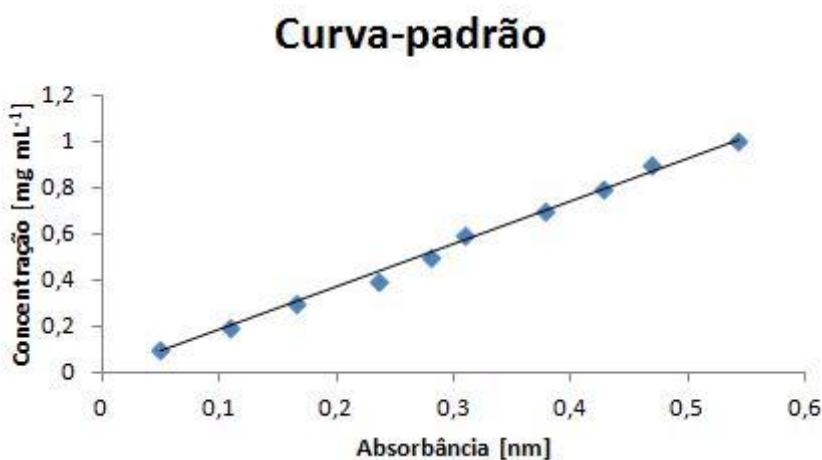


Figura 7. Curva-padrão para análise de proteínas.

$$y_p = 1,861 x_p \quad (4)$$

onde y_P (mg mL⁻¹) é a concentração de proteínas e x_P (nm) é a absorvância medida.

3.2.7 Análise de carboidratos

O método de Dubois (1956) é um processo extremamente versátil para determinação de carboidratos totais. Ele se baseia primeiramente na conversão de açúcares em derivados de furfural sob aquecimento em contato com ácidos fortes, seguido da formação de um complexo colorido com fenol. Esse método colorimétrico, também chamado de método fenol-sulfúrico, é usado para determinar os açúcares, glicosídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (DUBOIS *et al.*, 1956).

Para essa análise foram utilizados os filtrados da sacarificação quantitativa que estavam em balões volumétricos de 100 mL. Pipetou-se 2 mL desse líquido em balão volumétrico de 100 mL para obter uma diluição de cinquenta vezes.

Foram separados 0,5 mL da solução diluída em tubo de ensaio. Foram adicionados 0,5 mL de fenol 5 % (v/v); 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Os tubos foram colocados em banho termostático a 30 °C durante 20 min para posterior leitura das absorvâncias a 490 nm. A concentração de carboidratos foi determinada através da Equação 5 obtida por meio de uma curva padrão.

$$y_C = 0,0001024 x_C \quad (5)$$

onde y_C (mg mL⁻¹) é a concentração de carboidratos e x_C (nm) é a absorvância medida.

3.2.8 Determinação do teor de cinzas

O conteúdo inorgânico presente nas microalgas foi determinado através da incineração das amostras. O cálculo do teor de cinzas foi realizado, segundo a Equação 4, com base no método descrito por Silva e Queiroz (2005) apud Lilian (2010):

$$\%_{\text{CINZAS}} = \frac{m_C}{m_S} \times 100 \quad (6)$$

onde m_C (g) é a massa de cinzas e m_S (g) é a massa seca da amostra.

3.3 Hidrólise enzimática

A enzima utilizada para hidrolisar os carboidratos presentes nas microalgas foi um complexo denominado Celluclast 1.5 L (65 FPU g⁻¹ e 17-glicosidase IU g⁻¹). Para o experimento, foi pesado 1,1 g de microalga em erlenmeyer de 125 mL previamente tarado e adicionado 20 mL de solução tampão de ácido cítrico e citrato de sódio (pH 4,8). O experimento foi realizado em duplicata devido a quantidade limitada de microalgas. Para cada espécie foram testadas três cargas enzimáticas de 10, 15 e 20 FPU. O complexo enzimático possui 65 FPU mL⁻¹, sendo assim, as quantidades adicionadas foram 0,16; 0,23; 0,31 mL do complexo enzimático. A hidrólise foi conduzida sob agitação com velocidade de 120 rpm à temperatura constante de 50°C.

Para a análise dos açúcares foram retiradas 10 amostras (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 24 h, 48 h e 72 h). Em cada ponto pipetou-se 0,5 mL da solução em eppendorf para posterior filtração em filtro sepak. O filtrado era então diluído dez vezes e filtrado em holder com membrana de 0,22 µm para análise em CLAE.

4 Resultados e Discussões

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os resultados dos experimentos realizados. As porcentagens serão expressas com base no peso seco das amostras. Para tanto, foi determinado o teor de umidade de ambas espécies. A umidade encontrada, após 3 h a 105 °C em estufa, para as microalgas foram 2,94 % para a *D. tertiolecta* e 8,46 % para *H. luteoviridis*.

A Tabela 4 sumariza a composição da biomassa microalgal de *D. tertiolecta* e *H. luteoviridis*. Carboidratos são responsáveis por 49,67 % e 51,77 % do peso seco da *Dunaliella* e da *Heterochlorella* respectivamente. Outra parcela da composição inclui proteínas, lipídeos e cinzas que somadas são aproximadamente 32 % em ambas espécies. A considerável quantidade de carboidratos pressupõe que os dois microrganismos possuem alto potencial como matéria-prima para produção de etanol.

Tabela 4. Composição das espécies de microalgas baseada na massa seca de microalgas.

	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	Desvio Padrão	
			<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Heterochlorella luteoviridis</i>
Lipídeos	11,65%	10,00%	0,30%	0,35%
Proteínas	13,06%	13,99%	0,11%	0,47%
Cinzas	7,02%	8,08%	-	-
Carboidratos Totais	49,67 %	51,77 %	3,87%	1,44%

O método descrito por Sluiter et al. (2012), do National Renewable Energy Laboratory (NREL), por ser empregado para determinar a composição de materiais lignocelulósicos prevê o cálculo da porcentagem de lignina presente na amostra. Entretanto, uma das vantagens na utilização de microalgas como fonte para produção de etanol está no fato de não apresentarem lignina (HO, S. H. et al., 2013). Apesar de, provavelmente, não apresentar lignina as porcentagens foram calculadas encontrando-se valores de cerca de 20 % para *Dunaliella* e 13 % para *Heterochlorella*. Acredita-se que os valores encontrados podem estar correlacionados com a decomposição de algum componente presente na composição das microalgas, provavelmente lipídios.

A Tabela 5 mostra a porcentagem de açúcares presentes com base na quantidade de carboidratos totais. Percebe-se que a glicose é responsável por aproximadamente 50 % da quantidade de açúcares nas duas microalgas. A presença de xilose e arabinose, pode ser explicada pelas características da parede celular das algas verdes. A composição bioquímica da parede varia de espécie para espécie, entretanto, ela é composta, usualmente, por pectina, celulose, hemicelulose e glicoproteínas (CHEN et al., 2013).

Tabela 5. Composição das espécies de microalgas baseada no total de carboidratos presentes nas microalgas.

	Desvio Padrão			
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Heterochlorella luteoviridis</i>
Glicose	51,51%	54,62%	2,13%	0,62%
Xilose	2,44%	2,74%	0,09%	0,00%
Arabinose	4,57%	4,02%	0,15%	0,00%

Conforme observado na Tabela 6 a quantidade de carboidratos da espécie *D. tertiolecta* neste trabalho (49,67 %) é superior à encontrada por Brown (1991) (12,2 %) e maior que os 37,8 % relatados por Kyung et al. (2013). Já para a quantidade de proteínas ambos trabalhos encontrados na literatura obtiveram valores superiores aos encontrados no presente estudo.

Tabela 6. Composição química da biomassa de *Dunaliella tertiolecta*.

Microalga	Carboidratos	Proteínas	Lipídeos	Referência Bibliográfica
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	49,67 %	13,06 %	11,65 %	Este trabalho
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	12,2 %	20 %	15 %	Brown (1991)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	37,8 %	25,2 %	20,6 %	Kyung et al. (2013)

O acúmulo de carboidratos na microalga é consequência da fixação do CO₂ durante o processo de fotossíntese. Alguns estudos demonstraram que as rotas metabólicas das moléculas de carboidratos e lipídeos estão intimamente relacionadas, apontando uma competição entre a síntese de lipídeos e amido (CHEN *et al.*, 2013). Dessa forma, a diferença nas quantidades de carboidratos, lipídeos e proteínas pode estar associada as diferentes condições de cultivo as quais as amostras foram submetidas. A variedade de fatores (luz, temperatura, nutrientes, pH e CO₂) que impactam nas rotas metabólicas da alga provocam diferenças nas composições. Para a alga *H. luteoviridis*, os valores não puderam ser comparados pois não foi encontrado na literatura nenhum estudo sobre sua composição.

4.1 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é um entre os possíveis processos para sacarificação de biomassa algal. A reserva intracelular de carboidratos nas microalgas é principalmente sob a forma de celulose, localizada no interior das paredes celulares, e amido. Com a ausência de lignina não são necessárias enzimas especiais. Além disso, pré-tratamentos rigorosos, ácido, básico ou explosão a vapor não são necessários o que facilita e diminui o custo da sacarificação de celulose proveniente de microalgas quando comparadas a materiais lignocelulósicos.

Neste trabalho, a hidrólise foi realizada em erlenmeyer de 125 mL sob agitação de 120 rpm a temperatura constante de 50 °C. Foram testadas 3 cargas enzimáticas (10, 15 e 20 FPU g⁻¹) com o objetivo de avaliar as concentrações finais de açúcares (glicose, xilose e arabinose) obtidas após a hidrólise enzimática ocorrer por 72 h. As concentrações dos açúcares obtidos com cada uma das cargas enzimáticas após 72 h para a microalga *Dunaliella tertiolecta* podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7. Composição de açúcares após 72 h de hidrólise para a alga *D. tertiolecta*.

Carga Enzimática	Glicose		Xilose		Arabinose	
	g L ⁻¹	% ^a	g L ⁻¹	% ^a	g L ⁻¹	% ^a
10 FPU	7,825	14,67	6,16	11,55	6,32	11,84
15 FPU	9,07	17,00	7,75	14,53	8,59	16,10
20 FPU	11,95	22,40	9,8	18,37	11,51	21,57

^aPorcentagens estão baseadas no peso seco total da amostra.

Analogamente é possível observar as concentrações para a alga *Heterochlorella luteoviridis* na Tabela 8.

Tabela 8. Composição de açúcares após 72 h de hidrólise para a alga *H. luteoviridis*.

Carga Enzimática	Glicose		Xilose		Arabinose	
	g L ⁻¹	% ^a	g L ⁻¹	% ^a	g L ⁻¹	% ^a
10 FPU	15,8	28,73	7,1	12,91	7,65	13,91
15 FPU	13,08	23,73	7,51	13,65	8,24	14,98
20 FPU	10,62	19,31	7,3	13,27	7,95	14,45

^aPorcentagens estão baseadas no peso seco total da amostra.

Por apresentar parede celular, a alga *H. luteoviridis* apresentou porcentagem de glicose maiores que a *D. tertiolecta*. Contudo, quando empregado 20 FPU g⁻¹ a hidrólise da *Heterchlorella* apresentou valores menores. Teoricamente, essa diferença ocorreu pelo aumento da viscosidade do substrato (parede celular) ao utilizar uma relação enzima biomassa maior (ROSGAARD *et al.*, 2007).

Como demonstrado por Kyung *et al.* (2013), quando comparadas as enzimas Celluclast 1.5L (celulases) e AMG 300L (amiloglucosidasas) os rendimentos foram consideravelmente diferentes (0,2 % e 21,9 % respectivamente) na sacarificação da espécie *Dunaliella tertiolecta*. Portanto, são necessários mais estudos diversificando o complexo enzimático - incluindo amiloglucosidade - para aumentar o rendimento.

Para as quantidades de pentoses (xilose e arabinose) na hidrólise enzimática foram encontradas porcentagens maiores do que na sacarificação quantitativa (hidrólise ácida). Essa diferença, possivelmente, é devido a incompleta hidrólise no método químico. Outra hipótese está no fato de se aplicar ácido sulfúrico no método químico para determinar a composição da alga. Em contato com o ácido as pentoses podem ser convertidas a furfural - composto orgânico heterocíclico aromático. Além dele, outros compostos, podem ser formados como o hidroximetilfurfural (HMF) o qual é produto da degradação das hexoses. A produção desses compostos significa perda de açúcares fermentescíveis. Além disso, são substâncias problemáticas pois inibem as leveduras conduzindo a menores taxas de crescimento e, diminuindo o rendimento na produção de etanol (A. PANDEY *et al.*, 2011). Contudo, essa possibilidade não pode ser confirmada, visto que, não foram medidas as concentrações de furfural e HMF.

4.1.1 Cinéticas da hidrólise

As cinéticas de liberação dos açúcares (glicose, celobiose, xilose e arabinose) das duas espécies de microalgas para cada carga enzimática ao longo do tempo (72 h) encontram-se na Figura 8 e na Figura 9.

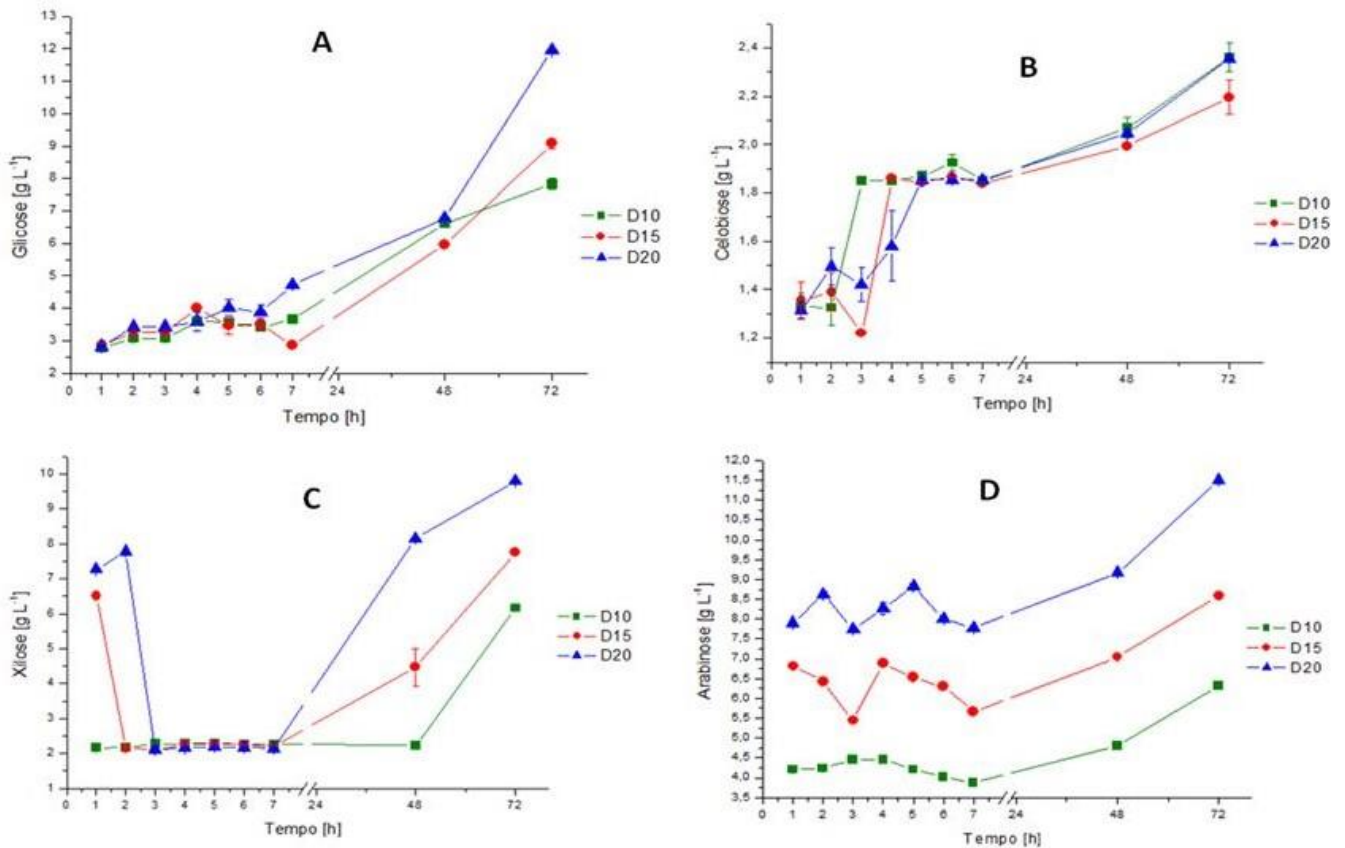


Figura 8. Cinéticas de liberação de: (A) glicose; (B) celobiose; (C) xilose e (D) arabinose, a partir da hidrólise enzimática da microalga *Dunaliella tertiolecta* durante 72 h. Cargas enzimáticas: D10 10 FPU g⁻¹; D15 15 FPU g⁻¹ e D20 20 FPU g⁻¹.

Para liberação de glicose (Figura 8-A), pode-se verificar que entre as cargas enzimáticas, 20 FPU g⁻¹, mostrou-se mais eficaz em 72 h de reação liberando 11,95 g L⁻¹ de glicose da microalga representando um rendimento de 22,4 % na sacarificação (baseado na biomassa total) e 43,48 % com base no total de carboidratos. Em um dos poucos estudos realizados sobre hidrolisados da espécie *D. tertiolecta*, Kyung et al. (2013) obtiveram concentrações de 21 g L⁻¹ de açúcares redutores, com rendimento na sacarificação de 42 % (baseado na biomassa total) e de 80,9 % baseado no total de carboidratos da amostra após extração lipídica. A enzima utilizada foi uma amiloglucosidase (AMG 300L) e o tempo de reação foi de 12 h.

As diferenças entre os rendimentos deste trabalho e os valores encontrados na literatura provavelmente estão relacionadas com os diferentes complexos enzimáticos utilizados. Nas algas verdes o armazenamento de carboidratos se dá principalmente como amido. Assim como a celulose, o amido também é um homopolímero de glicose, todavia, os monômeros estão ligados por ligações $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ glicosídicas (A. RICHMOND;

EMERITUS; QIANG, 2013). Dessa forma, a composição de enzimas do complexo Celluclast 1.5 L não apresentava as enzimas necessárias para hidrolisar os carboidratos sob a forma de amido de maneira eficiente.

A celobiose é formada ao longo do tempo a medida que as endo e exoglucanases atacam o substrato. Assim como na glicose as três condições apresentaram comportamentos semelhantes na liberação de celobiose (Figura 8-B). Entretanto, ao final das 72 h a diferença entre as concentrações nas condições de 10 e 20 FPU g⁻¹ não apresentaram diferença significativa. Espera-se que ao longo da hidrólise a concentração de celobiose fique constante diminuindo ao final da reação quando passa a ser degradada pela ação da β -glucosidase.

Quanto à liberação de xilose (Figura 8-C) e arabinose (Figura 8-D) as maiores concentrações foram obtidas com a maior relação enzima-substrato (20 FPU g⁻¹) atingindo-se 9,80 g L⁻¹ e 11,51 g L⁻¹ respectivamente. Essas concentrações equivalem a 18,37 % e 21,57 % de rendimento na sacarificação da microalga com base na massa total. Mesmo utilizando celulasas obtiveram-se concentrações de açúcares provenientes de hemicelulose. Eventualmente, as enzimas - apesar de serem muito específicas - podem ter interagido com as ligações da hemicelulose em algum ponto da cadeia que estava exposto quebrando a estrutura. Além disso, não é possível saber ao certo se o complexo enzimático não continha alguma outra enzima que não era sabido.

Analisando-se a forma dos gráficos das cinéticas de liberação dos açúcares provavelmente o tempo empregado para essas condições de hidrólise e conjunto enzimático foi curto. Sendo a glicose o principal monômero de interesse, para obter-se maiores rendimentos seria possível usar algum tipo de pré-tratamento, alterar as condições de temperatura, pH e agitação. Entretanto, teoricamente, maiores taxas só seriam atingidas caso fossem utilizadas enzimas capazes de degradar o amido, provavelmente presente nessa espécie de microalga.

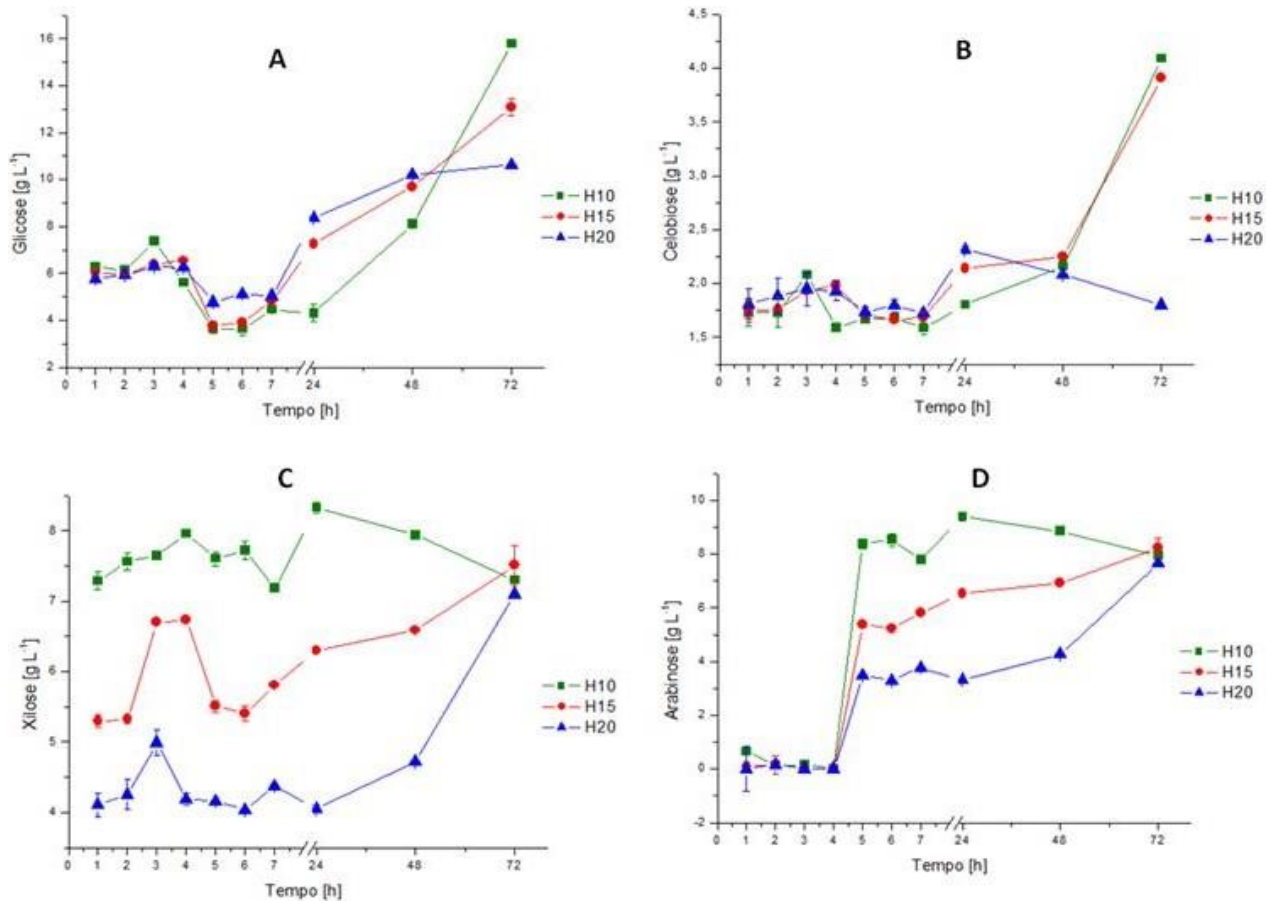


Figura 9. Cinéticas de liberação de: (A) glicose; (B) celobiose; (C) xilose e (D) arabinose, a partir da hidrólise enzimática da microalga *Heterochlorella luteoviridis* durante 72 h. Cargas enzimáticas: H10 10 FPU g⁻¹; H15 15 FPU g⁻¹ e H20 20 FPU g⁻¹.

Para a alga *Heterochlorella luteoviridis* não foi encontrado nenhum estudo na literatura o qual pudesse servir de base para comparação dos valores obtidos.

A maior liberação de glicose (Figura 9-A) foi de 15,8 g L⁻¹ para 10 FPU g⁻¹ de enzima, ou seja, ao contrário da *Dunaliella*, foi observado maior rendimento na hidrólise na menor relação enzima biomassa. De acordo com Rosgaard et al. (2007) a etapa de hidrólise se torna ineficiente quando a quantidade de enzimas excede 10 % (base mássica) do peso seco do substrato devido ao aumento da viscosidade dos substratos. Alta viscosidade aumenta a quantidade de materiais insolúveis dificultando a eficiência da enzima em hidrolisar o substrato. Apesar de todas as relações enzima substrato excederem esse valor isso pode ser uma explicação para que a menor quantidade de enzima tenha liberado a maior quantidade de glicose.

Para a celobiose observou-se um comportamento semelhante, mas com uma diferença muito menor entre os valores de 10 e 15 FPU g⁻¹. É interessante notar que ao fim das 72 h a concentração de celobiose diminuiu quando utilizado 20 FPU g⁻¹ mas manteve-se alta para as outras condições. Isso indica que ainda há celobiose a ser degradada, ou seja, caso a hidrólise continue maiores concentrações de glicose poderiam ser obtidas.

Na liberação de xilose (Figura 9-C) e arabinose (Figura 9-D) houve uma queda em ambas concentrações após 72 h utilizando-se 10 FPU g⁻¹. Devido a essa queda as concentrações finais desses açúcares ficaram próximas e os rendimentos da hidrólise ficaram próximos de

13 %. Não foi encontrado na literatura algo que pudesse explicar esse decréscimo na concentração das pentoses. Portanto, seriam necessários mais testes que permitissem conclusões precisas.

Outro decréscimo intrigante ocorre entre 5 e 7 h na concentração de glicose e de celobiose para as diferentes cargas enzimáticas. A hipótese de erro de diluição nesses pontos foi descartada, visto que, os pontos eram lidos a partir da mesma amostra e, nos outros gráficos não se observou tal comportamento. Foram pesquisadas alternativas para explicar essa queda, todavia, as explicações encontradas não se sustentaram.

Por ser uma espécie classificada recentemente (NEUSTUPA *et al.*, 2009), não foram encontrados estudos sobre a composição da *Heterochlorella luteoviridis*. Mas a partir desses experimentos já é possível inferir algumas partes da composição. Por exemplo, a presença de xilose e arabinose levam a crer que na parede celular da alga há hemicelulose e/ou pectina.

Devido aos maiores rendimentos na liberação de glicose quando comparado a *Dunaliella tertiolecta* possivelmente o conteúdo de celulose presente na *Heterochlorella* seja maior. Entretanto, ainda são necessários mais experimentos não só para explicar as quedas nas concentrações, mas também para atingir rendimentos maiores.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Amostras de microalgas podem acumular acima de 50 % de carboidratos intracelularmente (celulose ou amido) sob condições de cultivo apropriadas. As microalgas com essas características possuem vantagens de fácil sacarificação e necessitam menos pré-tratamentos, dessa forma, são altamente competitivos contra materiais lignocelulósicos como matéria-prima para produção de biocombustíveis. Entender os fundamentos do metabolismo de carboidratos da microalga é um pré-requisito para desenvolver estratégias mais efetivas para aumentar a produtividade de carboidratos, a qual deve ser otimizada via manipulação dos fatores externos (como fornecimento de luz, nutrientes, temperatura e suplemento de CO₂). Além disso, uma sacarificação mais efetiva deverá ser desenvolvida para aprimorar a eficiência da produção de etanol através de biomassa microalgal.

Após a realização desse trabalho, pode-se concluir que:

Tanto a *Dunaliella tertiolecta* como a *Heterochlorella luteoviridis* apresentam-se como fontes potenciais para produção de etanol de terceira geração, já que, foram liberadas quantidades promissoras de glicose.

Apesar das diferentes composições encontradas na literatura variações ocorrem, visto que, diferenças no cultivo afetam as rotas metabólicas com consequências significativas na composição do microrganismo.

A longo prazo é importante o estudo e entendimento dos diferentes ciclos, reações e rotas metabólicas que envolvem as células pois dessa forma será possível aumentar a quantidade de carboidratos presentes na alga.

São necessários mais testes para elucidar algumas dúvidas que permaneceram. Além disso, como próximo passo, estudar diferentes condições para a hidrólise. Testar diferentes temperaturas, pH, agitações, tipos e concentrações de enzima e tempo de hidrólise para aumentar sua eficiência e liberar maiores quantidades de glicose.

6 Referências

- A. PANDEY *et al.* **Biofuels alternative feedstock and conversion process**. [S.l.]: [s.n.], 2011.
- A. RICHMOND; EMERITUS; QIANG, H. **Handbook of microalgal culture**. [S.l.]: [s.n.], 2013.
- ABD-RAHIM, F. *et al.* Food hydrocolloids production of high yield sugars from *kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical and enzymatic hydrolysis. 2014. v. 42, p. 309–315.
- AZMAH, S. *et al.* A review on third generation bioethanol feedstock. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2016. v. 65, p. 756–769. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>>.
- BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied energy**, 2010. v. 87, n. 6, p. 1815–1835. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.01.012>>.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2010. v. 14, n. 2, p. 557–577.
- CARERE, C. R. *et al.* Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. **International journal of molecular sciences**, 2008. v. 9, n. 7, p. 1342–1360.
- CHEN, C. Y. *et al.* Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical engineering journal**, 2013. v. 78, p. 1–10. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>>.
- CHENG, D.; HE, Q. Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production – an overview. **Frontiers in energy research**, 2014. v. 2, n. July, p. 1–8. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fenrg.2014.00026/abstract>>.
- CHIARAMONTI, D. Bioethanol: role and production technologies. **Improvement of crop plants for industrial end uses**, 2007. v. 371, p. 209–251.
- CHOI, S. P.; NGUYEN, M. T.; SIM, S. J. Bioresource technology enzymatic pretreatment of *chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource technology**, 2010. v. 101, n. 14, p. 5330–5336. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.026>>.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. 1956. p. 350.
- DYER, E. G. B. And W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. 1959. v. 37.
- HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chemical engineering journal**, 2011. v. 168, n. 3, p. 1079–1084. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.088>>.
- HO, S. H. *et al.* Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as

feedstock. Hidrólise Ácida! **Bioresource technology**, 2013. v. 135, p. 191–198. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>>.

IEA STATISTICS. Co2 emissions from fuel combustion. 2015.

JOHN, R. P. *et al.* Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. Info importantes! **Bioresource technology**, 2011. v. 102, n. 1, p. 186–193.

KIM, S.-K. **Handbook of marine microalgae biotechnology advances**. [S.l.]: [s.n.], 2015. V. 1.

KYUNG, O. *et al.* Bioresource technology chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *dunaliella tertiolecta*. 2013. v. 132, p. 197–201.

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

MINH, T. H.; HANH, V. Bioethanol production from marine algae biomass : prospect and troubles. **Journal of vietnamise environment**, 2012. v. 3, n. 1, p. 55–29. Disponível em: <<http://www.openaccess.tu-dresden.de/ojs/index.php/jve/>>.

MUSSATTO, S. I. *et al.* Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, 2010. v. 28, n. 6, p. 817–830. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>>.

NEUSTUPA, J. *et al.* *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (trebouxiophyceae, chlorophyta), a novel coccoid chlorella-like subaerial alga from southeast asia. **Phycological research**, 2009. v. 57, n. 3, p. 159–169.

PREETHA, K. *et al.* Phenotypic and genetic characterization of *dunaliella* (chlorophyta) from indian salinas and their diversity. 2012. p. 10–12.

RANDALL, R. J.; LEWIS, A. The folin by oliver. 1951.

RÖSCH, C.; SKARKA, J.; WEGERER, N. Materials flow modeling of nutrient recycling in biodiesel production from microalgae. **Bioresource technology**, 2012. v. 107, p. 191–199.

ROSGAARD, L. *et al.* Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, 2007. v. 143, n. 1, p. 27–40.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. **Bioresource technology**, 2011. v. 102, n. 1, p. 10–16. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.032>>.

SIRAJUNNISA, A. R.; SURENDRHIRAN, D. Algae ??? a quintessential and positive resource of bioethanol production: a comprehensive review. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2016. v. 66, p. 248–267.

ULLAH, K. *et al.* Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy

industry: a review. **Fuel**, 2015. v. 143, p. 414–423. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.064>>.

ZAIA, C. T. B. V. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. 1998. p. 787–793.