



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANTONIO ALVES DA SILVA NETO

**ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* (WULFEN) COMO FONTE
POTENCIAL DE CARBOIDRATOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

FORTALEZA
2013

ANTONIO ALVES DA SILVA NETO

**ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* (WULFEN) COMO FONTE
POTENCIAL DE CARBOIDRATOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Norma Maria Barros Benevides

Coorientadora: Prof.^a Dra. Márjory Lima Holanda

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S582a Silva Neto, Antonio Alves da.
Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) como fonte potencial de carboidratos para a produção de etanol/ Antonio Alves da Silva Neto. – 2013.
71 f. : il. color., enc. : 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de concentração: Bioquímica.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
Coorientação: Profa. Dra. Májory Lima Holanda.
1. Biocombustível. 2. Hidrólise. 3. Alga. 4. Levedura I. Título.

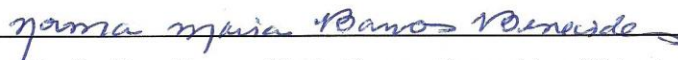
ANTONIO ALVES DA SILVA NETO

**ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* (WULFEN) COMO FONTE
POTENCIAL DE CARBOIDRATOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

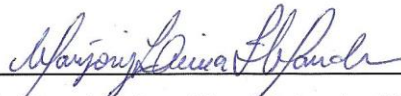
Aprovada em: 25/07/2013

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Márcjory Lima Holanda (Coorientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Luana Maria Castelo Melo Silva

Faculdade Nordeste (Fanor)

***Ao grande incentivador dos meus estudos, meu amado pai, Francisco Alves da
Silva (in memoriam)
A minha mãe Francisca Suzete Barbosa da Silva, minhas irmãs Íris, Cálita,
Edgláucia, Edleuza, Plácida, Laís e a minha linda sobrinha Maria Clara.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, fortaleza e suporte, em todos os momentos da minha vida.

À Prof^a. Dra. Norma Maria Barros Benevides pela oportunidade de aprendizagem, confiança e orientação, contribuindo para o meu crescimento profissional.

À Prof^a Dra. Márjory Lima Holanda pelos grandes ensinamentos na elaboração desse trabalho, apoio e amizade.

À Profa. Dra. Luana Maria Castelo Melo Silva, por aceitar, gentilmente, a participação na Banca examinadora.

À Prof^a. Dra. Maria Valderéz Ponte Rocha, pelas valiosas contribuições e por ter cedido, gentilmente, a utilização do HPLC para as análises desse trabalho.

Ao amigo Tiago Albuquerque pela grande ajuda nas análises no HPLC desse trabalho.

A minha grande amiga Ticianá de Brito Lima, por ser uma das incentivadoras que me ajudou a conquistar mais esse passo na minha vida, também pela amizade mais do que valiosa e ajuda nesse trabalho. Muito obrigado, Tici!

Ao amigo George Meredite, por partilhar comigo a realização desse trabalho e pela amizade a mim concedida.

As minhas *best*: Alexandra da Silva Lopes, Ana Cláudia Castro Silva, Ana Karine Sombra de Alencar Araripe, Débora Brasileiro, Sônia Zeferino (em ordem alfabética para não causar intrigas), pelo carinho, amizade verdadeira, risos, choros, 'ciúmes'... Amo muito vocês!

Ao amigo Antonio Borges de Aguiar Neto, pelo incentivo, amizade e ajuda nesse trabalho. Tony, obrigado pela água deionizada!

À Cláudia Cinthia pela amizade e por ter me ajudado nas análises de composição química.

A todas as amigadas que conquistei no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (Carbolec): Ana Luíza Quinderé, Ariévilo Rodrigues, Bruno, Chistiane Oliveira, Edfranck Vanderlei, Fabíula Moura, Felipe Barros, Gabriela de Paula, Gardênia Mendonça, Gerardo Carneiro, Ianna de Araújo, Ismael de Queiroz, Jane de Fátima, Luana Silva, Renata Rivanor, Natássia Ribeiro, Ricardo Basto, Ticiane Abreu, Trycia Magalhães, Willame Silva, Ygor Eloy, Valdécio Monteiro.

A minha família (tias, primos) que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por terem contribuído com o meu crescimento estudantil, profissional e pessoal. Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À Universidade Federal do Ceará (UFC); ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo custeio de bolsa de pesquisa no desenvolvido desse projeto.

RESUMO

Alta demanda de energia e mudanças climáticas globais têm gerado interesse dos governantes mundiais para investir em pesquisas de fontes alternativas e renováveis de combustíveis. Nessa perspectiva, as macroalgas vêm ganhando ampla atenção por parte de pesquisadores do mundo inteiro como fonte alternativa renovável de biomassa para a produção de bioetanol, o qual é denominado atualmente de combustível de “terceira geração”. A utilização das algas marinhas como matéria-prima para produção de bioetanol apresenta vantagens, tais como (1) não competição com a produção de alimentos, (2) alto conteúdo de carboidratos, (3) baixo conteúdo de lignina e (4) alta produtividade. O potencial da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* em fornecer carboidratos fermentescíveis para a produção de bioetanol foi avaliado no presente trabalho. A alga foi obtida de cultivo comercial, localizado na praia de Flecheiras, município de Trairi, Ceará e após lavagem, secagem e trituração, 5 g foram adicionados a 100 mL de HCl (0,2; 0,5 e 1,0 M) em erlenmeyers, autoclavados a 121 °C (10, 20 e 30 min). Foi observada a presença de galactose (7,4 – 10,8 g.L⁻¹) e glucose (3,4 – 4,7 g.L⁻¹) em todos os hidrolisados e a condição de hidrólise 0,5/20, apresentando uma concentração de glicose + galactose de 14,8 g.L⁻¹, foi selecionada para os ensaios de fermentação dos monossacarídeos por *Saccharomyces cerevisiae* a 30°C. Os resultados mostraram que a glicose e a galactose, foram consumidas simultaneamente, no entanto esse consumo só foi iniciado após 7 h de fermentação e após 52 h, 82,5 % da glicose e 72% da galactose tinham sido consumidas, com uma produção máxima de 5,3 g.L⁻¹ de bioetanol, representando uma eficiência fermentativa de 50% do teórico e evidenciando a habilidade da *S. cerevisiae* em fermentar a galactose proveniente de matéria-prima algácea com um rendimento de 0,1 g de bioetanol/g de alga seca. Observou-se, na condição de hidrólise selecionada, uma maior velocidade específica de consumo de substrato acompanhado da velocidade de produção de etanol. Os rendimentos de etanol baseados no consumo de substrato (glucose + galactose) e biomassa foram 0,315 e 0,08 (g/g), respectivamente. As produtividades de biomassa e etanol foram 0,008 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,100 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Com os dados obtidos pode-se concluir que a alga marinha *H. musciformis* se mostrou uma potencial fonte renovável de biomassa para a produção

de etanol. No entanto, são necessários mais estudos para otimizar o processo produtivo de bioetanol a partir desses organismos.

Palavras-chave: alga, biocombustível, hidrólise ácida, *Hypnea musciformis*, levedura

ABSTRACT

High energy demand and global climate changes have generated interest in world leaders to invest in research on alternative and renewable fuels. In this perspective, the macroalgae are gaining wide attention from researchers around the world as an alternative source of renewable biomass for bioethanol production, which is currently called fuel "third generation". The use of seaweed as a feedstock for bioethanol production has advantages such as (1) no competition with food production, (2) high carbohydrates content, (3) low lignin content and (4) high productivity. The potential of the red seaweed *Hypnea musciformis* to provide fermentable carbohydrates for bioethanol production was evaluated in this study. The algae was obtained from a commercial cultivation, located on the Flecheiras beach, Trairi, Ceará and after washing, drying and grinding 5 g were added to 100 mL HCl (0.2, 0.5 and 1.0 M) in Erlenmeyer flasks, autoclaved at 121 °C (10, 20 and 30 min). It was observed the presence of galactose (7.4 to 10.8 g.L⁻¹) and glucose (3.4 to 4.7 g.L⁻¹) in all hydrolyzed and the hydrolysis condition 0.5/20, with a concentration of glucose + galactose 14.8 g.L⁻¹, was selected for testing fermentation of monosaccharides by *Saccharomyces cerevisiae* at 30 ° C. The results showed that glucose and galactose were consumed simultaneously, however this consumption only started after 7 h of fermentation and after 52 h, 82.5% of glucose and 72% galactose had been consumed, with a maximum yield of 5.3 g.L⁻¹ of ethanol, it represents a fermentation efficiency of 50% theory and showing the ability of *S. cerevisiae* ferment galactose from algal feedstock with a yield of 0.1 g ethanol/g dry seaweed. It was observed in the hydrolysis condition selected, a higher specific rate of the substrate consumption accompanied by the rate of ethanol production. The ethanol yields based on consumption of substrates (glucose + galactose) and biomass were 0.315 and 0.08 (g/g) respectively. The biomass and ethanol productivity were 0.008 g.L⁻¹.h⁻¹ and 0.100 g.L⁻¹.h⁻¹, respectively. With the data obtained it can be conclude that the red seaweed *H. musciformis* showed be a potential renewable source of biomass for the production of bioethanol. However, other studies are needed to optimize the production process of bioethanol from these organisms.

Keywords: algae, biofuel, acid hydrolysis, *Hypnea musciformis*, yeast

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Perspectiva da produção de biocombustível	17
Figura 2 -	Esquema da estrutura da parede celular da maioria dos vegetais.	20
Figura 3 -	Estrutura da molécula da celulose.	20
Figura 4 -	Estrutura básica da carragenana com unidades D-alternantes	24
Figura 5 -	Estruturas das carragenanas comerciais: (a) kappa-carragenana, (b) iota-carragenana e (c) lambda-carragenana	24
Figura 6 -	Representação da ação do pré-tratamento aplicado a um material lignocelulósico.	28
Figura 7 -	Esquema do processo de produção de etanol por meio da hidrólise da biomassa.	31
Figura 8 -	Via da fermentação alcoólica, onde a glicose é convertida em piruvato e este convertido a etanol e CO ₂ .	33
Figura 9 -	Localização da área de cultivo de algas, praia de Flecheiras – Ceará – Brasil.	36
Figura 10 -	Esquema da hidrólise ácida da alga <i>H. musciformis</i>	39
Figura 11 -	Hidrolisado ácido da alga <i>H. musciformis</i> , autoclavada a 121 °C por 10, 20 e 30 min na concentração 0,5 M de HCl.	40
Figura 12 -	Eficiência de hidrólise da alga <i>H. musciformis</i> com base na massa seca em função da concentração de HCl e tempo de reação.	48
Figura 13 -	Teores de açúcares redutores do hidrolisado da alga <i>H. musciformis</i> .	51
Figura 14 -	Teores de carboidratos (dissacarídeos e monossacarídeos) dos hidrolisados da alga <i>H. musciformis</i> .	52
Figura 15 -	Gelificação da solução da alga <i>H. musciformis</i> submetida à autoclavagem a 121 °C por 10, 20 e 30 min na	53

	ausência de ácido	
Figura 16	Gráfico de Pareto para a concentração de glucose como variável resposta.	55
Figura 17 -	Gráfico de Pareto para a concentração de galactose como variável resposta.	56
Figura 18 -	Concentrações de ácido acético formado durante a hidrólise ácida da alga <i>H. musciformis</i> .	59
Figura 19 -	Cinética fermentativa do hidrolisado (0,5/20) da alga <i>H. musciformis</i> pela levedura <i>S. cerevisiae</i> .	60
Figura 20 -	Velocidades específicas de crescimento (μX), do substrato (μS) e da produção de etanol (μP) durante a fermentação do hidrolisado da alga <i>H. musciformis</i> (0,5/20) por <i>S. cerevisiae</i> .	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Esquema comparativo entre as condições e o desempenho dos três processos básicos de hidrólise	31
Tabela 2 -	Denominações das condições de hidrólise da alga marinha vermelha <i>H. musciformis</i> em função da concentração de HCl e tempo de reação	39
Tabela 3 -	Valores e níveis das variáveis do Planejamento fatorial 2 ² levando em consideração a concentração do ácido e o tempo, dos hidrolisados da alga <i>H. musciformis</i> , na concentração dos açúcares (glucose e galactose) obtidos.	45
Tabela 4 -	Composição centesimal da alga <i>H. musciformis</i>	46
Tabela 5 -	Teores de açúcares redutores obtidos nos hidrolisados e perdidos nos resíduos úmidos da alga <i>H. musciformis</i>	50
Tabela 6 -	Concentrações e tempos de reação de glucose e galactose dos hidrolisados da alga <i>H. musciformis</i> obtidos através da CLAE e de acordo com o planejamento experimental.	54
Tabela 7 -	ANOVA para a concentração de glucose como variável resposta.	57
Tabela 8 -	ANOVA para a concentração de galactose como variável resposta.	58
Tabela 9 -	Fatores de conversão (Y) e produtividade (P) obtidos nos ensaio fermentativo do hidrolisado (0,5/20) da alga <i>H. musciformis</i> .	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCl	Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D. O	Densidade ótica
g	Grama
°C	Grau centigrado
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
h	Hora
L	Litro
g.L ⁻¹	Gramas por litro
g.L ⁻¹ .h ⁻¹	Gramas por litro por hora
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
M	Molar
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1. 1.	Mudanças climáticas e a crise de energia	14
1. 2.	Biocombustíveis	14
1. 2. 1.	Biocombustíveis de primeira geração	15
1. 2. 2.	Biocombustíveis de segunda geração	15
1. 2. 3.	Biocombustíveis de terceira geração	16
1. 3	Etanol	16
1. 4.	Biomassa	19
1. 4. 1	Biomassa de material lignocelulósico	19
1. 4. 2.	Biomassa algácea como matéria-prima para bioetanol	21
1. 5.	A alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	25
1. 6.	Pré-tratamento de matéria-prima para a produção de etanol	27
1. 7.	Hidrólise de matéria-prima para a produção de biocombustíveis	30
1. 7. 1.	Hidrólise de biomassa	31
1. 7. 1. 1.	Hidrólise com ácido concentrado	31
1. 7. 1. 2	Hidrólise com ácido diluído	32
1. 7. 1. 3	Hidrólise enzimática	32
1. 8.	Fermentação	32
2.	OBJETIVOS	35
2. 1.	Geral	35
2. 2.	Específicos	35
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1.	Coleta das algas marinhas	36
3. 2.	Análise centesimal da alga marinha <i>H. musciformis</i>	37
3. 2. 1.	Umidade	37
3. 2. 2.	Proteínas totais	37
3. 2. 3.	Lipídeos totais	37
3. 2. 4.	Cinzas totais	37
3. 2. 5.	Carboidratos totais	38
3. 2. 6.	Celulose	38

3. 3.	Hidrólise ácida da alga marinha vermelha <i>H. musciformis</i>	38
3. 4.	Ajuste do pH do hidrolisado da alga marinha vermelha <i>H. musciformis</i>	40
3. 5.	Análise de açúcar redutor	40
3. 6.	Eficiência da hidrólise ácida	40
3. 7.	Microrganismos e manutenção das culturas de células	41
3. 8.	Preparo do inóculo	41
3. 9.	Fermentação do hidrolisado ácido	41
3. 10.	Determinação da composição em monossacarídeos e em etanol nos hidrolisados	42
3. 11.	Parâmetros cinéticos	43
3. 12.	Planejamento experimental e análise estatística	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4. 1.	Composição centesimal da alga <i>H. musciformis</i>	46
4. 2.	Eficiência de hidrólise da alga <i>H. musciformis</i> em função da concentração de HCl e tempo de reação	48
4.3.	Açúcares redutores dos hidrolisados da alga <i>H. musciformis</i>	49
4. 4.	Teores de carboidratos (dissacarídeos e monossacarídeos) dos hidrolisados da alga <i>H. musciformis</i>	51
4. 5.	Influência da concentração do ácido e do tempo de reação na obtenção de glucose e galactose nos hidrolisados da alga <i>H. musciformis</i>	53
4. 6.	Teores de ácido acético (inibidor de fermentação)	58
4. 7.	Cinética fermentativa e produção de etanol a partir do hidrolisado (0,5/20) da alga <i>H. musciformis</i>	60
5.	CONCLUSÃO	64
6.	REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mudanças climáticas e a crise de energia

Atualmente, diversas discussões referentes às mudanças climáticas têm sido um dos alvos das pesquisas científicas. Segundo estudos, verificou-se que, nas últimas décadas, houve um significativo aumento da temperatura mundial, fenômeno conhecido como aquecimento global, sendo a poluição do ar uma das causas desse fenômeno.

No ano de 1997, realizou-se na cidade de Quioto, no Japão, uma Conferência, onde foi concretizado um documento denominado Protocolo de Quioto. Nessa Conferência, critérios e normas foram estabelecidos para se reduzir os Gases de Efeito Estufa pelos países mais poluidores (LEITE, 2007; MIKHAILOVA; BASTIANI, 2007). O Protocolo de Quioto tornou-se Tratado no ano de 2004, entrando em vigor em 16 de fevereiro de 2005, cujo objetivo era obrigar os países industrializados a diminuir, durante o período de 2008 e 2012, a emissão de gases que vem agravando o efeito estufa, resultantes da queima de combustíveis fósseis, para um nível de 5,2% em relação aos níveis registrados no ano de 1990.

É desafiador para a sociedade do século XXI prevê a demanda para energia de transporte, aquecimento, processos industriais e fornecimento de matéria-prima para a indústria de modo sustentável. Uma preocupação crescente para a segurança de provisão de óleo foi comprovada com o aumento do seu preço, o qual aproximou-se de US\$ 100,00 por barril, durante o ano de 2008 (ROCHA, 2010). Contudo, a provisão de energia futura deve ser cumprida com uma redução simultânea e significativa de emissões de gases (MARTINS *et al.*, 2002).

Alta demanda de energia e mudanças climáticas globais têm gerado o interesse dos governantes mundiais para investir em pesquisas de fontes alternativas e renováveis de combustíveis.

1.2. Biocombustíveis

Alta demanda de energia, mudanças climáticas globais, melhoria na qualidade do ar das grandes cidades têm gerado o interesse dos governantes

mundiais para investir e incentivar pesquisas de fontes alternativas e renováveis de combustíveis.

Biocombustíveis são fontes de energia renováveis e englobam uma grande variedade de matérias-primas, tecnologias de conversão e usos finais. Podem ser líquidos ou gasosos feitos a partir de plantas ou resíduos, tais como, culturas agrícolas, resíduos urbanos e agrícolas ou subprodutos florestais (BALAT, 2009).

No aspecto ambiental, o uso de biocombustível é vantajoso, pois não contribui para o acúmulo de gases do efeito estufa e permite a reciclagem do gás carbônico na atmosfera.

1. 2. 1. Biocombustíveis de primeira geração

São aqueles produzidos a partir de matéria-prima contendo açúcar e amido. Esses tipos de biocombustíveis, quando produzidos de grãos, como o milho, por exemplo, impactam negativamente nos preços dos alimentos. Quando são gerados de materiais com grande conteúdo lipídico, comprometem a biodiversidade, pois o seu balanço de carbono e o balanço energético global são ineficientes, uma vez que não conseguem reduzir os gases de efeito estufa.

Os biocombustíveis de primeira geração baseiam-se em tecnologias de conversão ditas ineficazes, como fermentação a partir de leveduras ou transesterificação por catalisadores de base alcalina.

1. 2. 2. Biocombustíveis de segunda geração

São aqueles produzidos a partir de matéria-prima de resíduos celulósicos. Devido à abundância relativa desses resíduos e seu baixo custo, fica excluído o problema relacionado à produção de alimentos versus produção de combustíveis. A matéria-prima constituída de resíduos celulósicos possui um balanço de carbono excelente, levando uma redução da emissão de gás carbônico em até 90% quando comparado aos combustíveis fósseis. Devido a isso, são considerados “combustíveis limpos”, uma vez que reduzem, também, a emissão de outros poluentes importantes, como os óxidos de nitrogênio e enxofre.

1. 2. 3. Biocombustíveis de terceira geração

São aqueles originados a partir de avanços feitos no aumento da produção de biomassa, ou seja, na própria fonte. Esses biocombustíveis baseiam-se em colheitas de energias projetadas, onde a matéria-prima provém de avançados estudos nos campos de procriação molecular, genômica e transgenia, gerando plantas com excelentes propriedades para a conversão em bioprodutos.

1. 3. Etanol

A história do álcool é datada de muitos séculos atrás. Muitos cientistas da antiguidade já tinham certo conhecimento da presença de um ingrediente combustível no vinho. Apesar dessa suposição, não há relatos ou indicações que esse ingrediente tenha sido separado por meio fermentado (SIQUEIRA, 1997).

A partir do fim do século XV, o processo de destilação de meios fermentados tornou-se importante. A adição de 5% de etanol anidro (em volume) à gasolina tornou-se obrigatória desde a década de 1930.

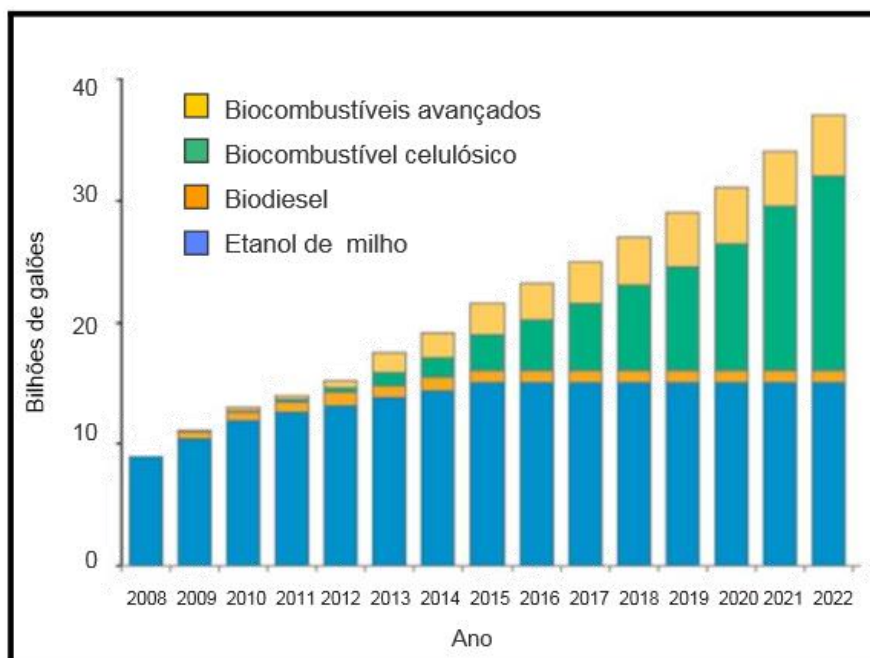
Com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), pelo governo brasileiro, no ano de 1975, a produção do etanol foi implantada em larga escala para uso em motores a álcool. No decorrente ano, foi lançado o primeiro carro movido a álcool e, com este feito, o teor de etanol na gasolina aumentou de 5 para uma faixa de 20 a 25%. No fim dos anos 80, com a queda do preço do petróleo, a produção de etanol teve um aumento significativo, vindo a sofrer uma grande queda no fim dos anos 90 e recuperando a sua crescente produção a partir do ano de 2003 quando foram lançados os veículos biocombustíveis (PIACENTE, 2006).

Recentemente, a demanda mundial por etanol combustível tem se expandido de forma muito rápida, e esta deverá aumentar ainda mais no futuro próximo, principalmente nos países mais desenvolvidos e de maior consumo de combustíveis automotivos. Isto se deve a combinação dos seguintes fatores: substituição do MTBE (Éter Metil Terc-Butílico) como aditivo da gasolina (para aumento da octanagem do combustível e como aditivo oxigenado) devido ao impacto ambiental associado ao uso daquele produto; adoção de estratégias para a redução/limitação das emissões dos gases precursores do efeito estufa, conforme demandado para

alguns países pelo Protocolo de Quioto; redução da dependência de derivados de petróleo na matriz energética; incentivos à agricultura e às indústrias locais (PIACENTE, 2006).

Estima-se que a produção de biocombustível deva ultrapassar os 30 bilhões até ano de 2022 (Figura 1). Atualmente, o Brasil produz 25 bilhões de etanol por ano a partir da cana-de-açúcar. O plantio dessa matéria-prima, realizado em terras aráveis de boa qualidade, deverá ser expandido devido à crescente demanda nacional e internacional de álcool (MAPA, 2010).

Figura 1 - Perspectiva da produção de biocombustíveis.



Fonte: Verenum, 2008

A produção de etanol no Brasil era realizada por batelada simples (processo descontínuo), mas quando o Proálcool foi implantado, as destilarias tiveram que ser reestruturadas para processo de batelada alimentada, o qual apresentou-se eficiente no quesito de conversão de açúcar a álcool. Entretanto, a fermentação alcoólica, por processo contínuo, mostrou-se ser um processo bastante atrativo.

Processo Batelada simples: É um processo lento e que desperdiça tempo na preparação do reator (MAIORELLA *et al.*, 1981). Para esse processo prepara-se um meio de cultura adequado à nutrição e ao desenvolvimento do microrganismo e também ao acúmulo do produto desejado; coloca-se este meio de cultura em um

biorreator; adiciona-se o microrganismo responsável pelo processo biológico e se aguarda que o processo ocorra. Após um determinado tempo de fermentação, retira-se o caldo fermentado do reator e executam-se as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto (SCHIMIDELL E FACCIOTTI, 2001). Além do menor risco de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação pela possibilidade de utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos e por permitir uma melhor condição de controle com relação à estabilidade genética do microrganismo (CARVALHO E SATO, 2001). Assim, o processo batelada é sempre utilizado como base para as comparações de eficiências atingidas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas (SCHIMIDELL E FACCIOTTI, 2001).

Processo Batelada alimentada: é considerado mais eficiente e versátil dentre os processos de fermentação; é também conhecido como *Melle-Boicot*. Esse processo define-se como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador, sob condições controladas, durante o cultivo e os produtos permanecem nesse fermentador até o final da fermentação. É considerado um processo satisfatório quanto à eficiência da conversão de açúcar em álcool (ZARPELON E ANDRIETTA, 1992; CARVALHO E SATO, 2001). Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento de dornas com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (SCHIMIDELL *et al.*, 2001).

Processo Contínuo: como o próprio nome já diz, é um processo sem interrupções. A alimentação do meio de cultura é contínua a uma determinada vazão e o volume de reação é mantido constante. Esse processo pode ser dividido em três partes: (1) unidade de tratamento ácido; (2) fermentadores e (3) unidade de separação de células. As vantagens desse processo em relação aos outros processos citados anteriormente estão embasadas na otimização das condições de processo para uma maior produtividade; período longo de produtividade contínua; maior produtividade volumétrica; maior uniformidade do produto; redução dos custos laboratoriais uma vez alcançado o estado desejado; redução do tempo de limpeza e sanitização das dornas e maior facilidade de controle automático. A maior

desvantagem é que as fermentações contínuas são mais propícias à contaminação bacteriana por longos prazos de exposição (CYSEWSKI e WILKIE, 1978; FACCIOTTI, 2001).

Os novos projetos de fermentação que vêm sendo desenvolvidos consideram a cinética do processo e utilizam ferramentas matemáticas e computacionais. Com isto obtêm-se processos que reduzem gastos com mão-de-obra; aumentam a produtividade; reduzem o tempo não produtivo como, carga, descarga e limpeza e reduzem a utilização de insumos (TOSETTO, 2002).

1. 4. Biomassa

Os substratos comuns utilizados para a produção de etanol são açúcar e amido provenientes de cultivos agrícolas, principalmente da cana-de-açúcar e milho, respectivamente. No entanto, essas matérias-primas não são suficientes para suprir a demanda internacional.

Nos últimos anos, a busca por novas fontes de biomassas renováveis para a produção de biocombustíveis se intensificou diante da grande produção de matéria-prima alimentícia destinada à produção de energia, gerando uma questão polêmica frente a crescente demanda por alimentos. Além desse aspecto, ressalta-se a ocupação de áreas agricultáveis para a produção de biomassa destinada à produção de bioetanol e a vulnerabilidade desse processo relacionada às oscilações dos custos da produção do açúcar podendo causar, em situações extremas, o desabastecimento de biocombustível no país.

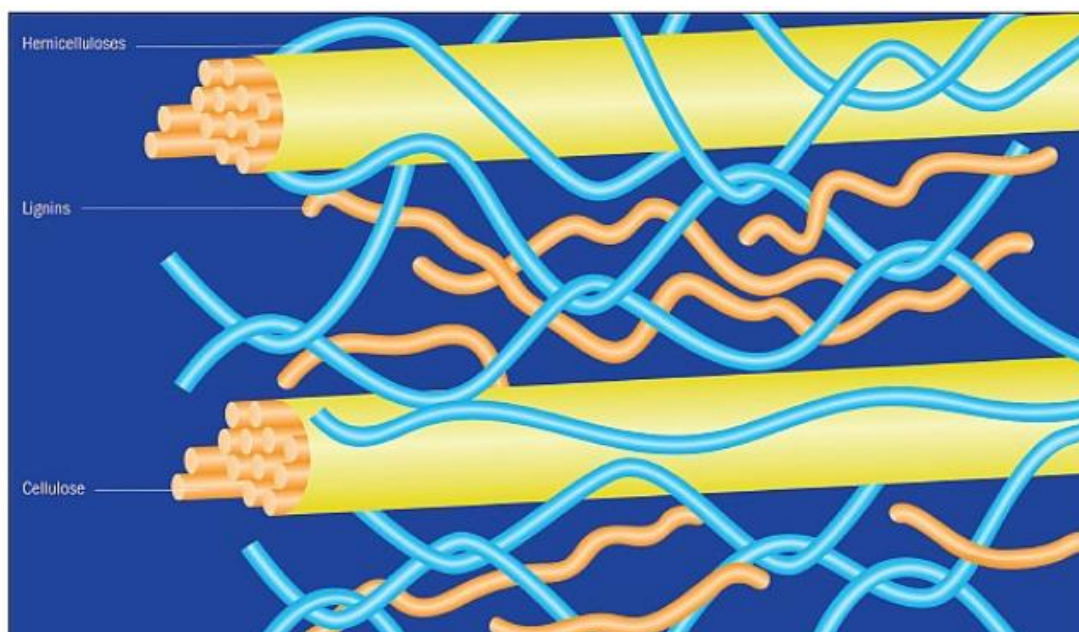
O bioetanol é o principal biocombustível utilizado no mundo e seu uso é cada vez mais difundido. Quase toda a sua produção é feita pela fermentação de carboidratos originados de beterraba, milho ou cana-de-açúcar, os quais representam fonte de alimento humano (KHAMBHATY *et al.*, 2012).

1. 4. 1. Biomassa de material lignocelulósico

Celulose, hemicelulose e lignina são os constituintes de materiais lignocelulósicos. Esses componentes encontram-se complexamente associados os quais definem a estrutura da parede celular da maioria dos vegetais. A composição

desses componentes varia de acordo com a natureza do vegetal, Em geral, o maior componente é a celulose (35–50%), seguido da hemicelulose (20–35%) e lignina (10–25%). Outros componentes como proteínas, gorduras e cinzas fazem parte de uma fração do material lignocelulósico (ROCHA, 2010). As grandes interações entre celulose, hemicelulose, lignina e a barreira natural de lignina (Figura 2) minimizam o acesso das enzimas hidrolíticas à fração de carboidrato (KESHWANI, 2009).

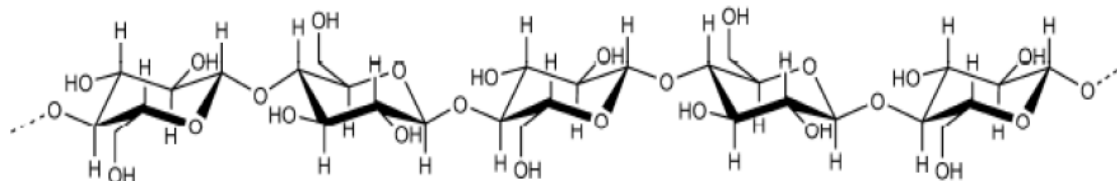
Figura 2 – Esquema da estrutura da parede celular da maioria dos vegetais.



Fonte: www.scidacreview.org

O principal componente da fibra vegetal é a celulose, um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de D-glicose unidas por ligações β -1,4- glicosídica (Figura 3), com grau de polimerização que varia de 1000 até 50000 unidades, dependendo da origem da planta (ROCHA, 2010). Na natureza, a celulose existe na forma cristalina, sendo essa característica uma barreira para sua hidrólise enzimática.

Figura 3 – Estrutura molecular da celulose.



O segundo polissacarídeo mais abundante na natureza é a hemicelulose, um heteropolímero constituído de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, galactose e manose) e ácidos (acético, glicurônico e galacturônico) (SAHA, 2003). Possui função de reserva e de sustentação e o seu grau de polimerização é geralmente inferior a 200 unidades (TSAO, 1986). Diferentemente da estrutura da celulose que é constante, a hemicelulose pode variar na composição e na sua organização estrutural. Devido à interação entre os diferentes açúcares, a hemicelulose apresenta baixa cristalinidade em relação à celulose sendo mais facilmente hidrolisada (SAHA, 2003).

Em contraste com a celulose e a hemicelulose, a lignina é um polímero complexo formado de compostos fenólicos, que são também chamados de monolignóis. As ligações aleatórias carbono-carbono entre os monolignóis resultam na formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros que definem a estrutura complexa da lignina (ROCHA, 2010). Essas ligações carbono-carbono são responsáveis pela grande dificuldade de romper a cadeia de lignina.

Encontram-se ainda, nos materiais lignocelulósicos, compostos extrativos (gorduras, gomas, alcaloides, resinas e óleos essenciais e outros constituintes do citoplasma) e os compostos não extrativos (sílica, carbonato e oxalato) os quais conferem características como cor, sabor, resistência ao apodrecimento e propriedades abrasivas.

A associação das frações constituintes dos lignocelulósicos confere a estes, grande resistência ao ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos. Desta forma, é necessária a separação seletiva de cada uma das frações por técnicas de pré-tratamento, hidrólise e deslignificação para que estas sejam aproveitadas (ROCHA, 2010).

1. 4. 2. Biomassa algácea como matéria-prima para bioetanol

O desenvolvimento de combustíveis a partir de biomassa continua crescendo em ritmo acelerado. Os biocombustíveis de primeira geração com base em culturas alimentares levantam questões éticas e morais, uma vez que há pessoas ao redor do mundo que ainda sofrem de desnutrição e fome (KARUNAKARAN E GURUSAMY, 2011). Nesse contexto, micro e macroalgas têm sido investigadas por

pesquisadores do mundo inteiro como potenciais fontes alternativas e renováveis de biomassa para a produção de bioetanol, o qual é denominado “combustível de terceira geração” (NIGAM E SINGH, 2010). Certas espécies de algas possuem a capacidade de produzir altos níveis de carboidratos em vez de lipídeos como polímeros de reserva. As macroalgas podem ser cultivadas em cordas. Como a eficiência fotossintética das algas é maior do que as das plantas terrestres, em média 6-8% e 1,8-2,2% respectivamente, essas são capazes de acumular biomassa em taxas mais rápidas (KARUNAKARAN E GURUSAMY, 2011).

As algas marinhas são matérias-primas promissoras para a produção de bioetanol devido a sua taxa de crescimento rápida e a sua grande produção de biomassa, com produtividade superior a muitas plantas terrestres, além de apresentar vantagens, tais como: não competitividade com fontes alimentares; apresentam alto conteúdo de açúcar, apresentam baixo conteúdo de lignina e possuem alta produtividade (MEINITA E HONG, 2012).

O elevado rendimento em biomassa das macroalgas está atribuído a sua menor exigência de energia para produção de tecidos de suporte comparado às plantas terrestres. Além disso, possuem a capacidade de absorver nutrientes ao longo de toda a sua área de superfície e não necessitam de energia para o transporte de nutrientes internos. Muitas espécies de algas exibem uma maior produtividade em massa (13,1 Kg de peso seco.m⁻²) ao longo de um período de sete meses, quando comparadas as plantas terrestres que produzem 0,5 - 4,4 Kg de peso seco.m⁻² em um período de um ano (BORINES *et al.*, 2011).

As macroalgas são divididas em três principais grupos com base em seus pigmentos fotossintéticos: Chlorophyta. Rhodophyta e Phaeophyta que são as algas verdes, vermelhas e pardas, respectivamente. Os pigmentos das algas são clorofilas a e b. O principal produto fotossintético em algas verdes é o amido e as camadas externa e interna da sua parede celular são constituídas de pectina e celulose, respectivamente (TRONO JR E GANZON-FORTES, 1988). O pigmento das algas vermelhas é r-ficoeritrina e sua parede celular contém pequenas quantidades de celulose, enquanto a maioria é formada por um polímero gelatinoso ou amorfo de galactana sulfatada, tais como ágar, carragenana, funorana, etc. Já a coloração das algas pardas é devido a predominância do pigmento xantofila (fucoxantina) e sua

parede celular é composta de ácido algínico, celulose e outros polissacarídeos (BORINES *et al.*, 2011).

Além da alta produtividade em biomassa, as algas têm outras características benéficas quando comparadas às plantas terrestres. A mais notável dessas características é a ausência de materiais lignocelulósicos na parede celular das algas, tornando-se, portanto, necessária a remoção desses materiais somente em plantas terrestres. A estrutura das algas é, geralmente, muito mais uniforme e consistente comparada com a das plantas terrestres, porque as algas apresentam ausência de partes funcionais específicas, tais como raízes e folhas (KARUNAKARAN E GURUSAMY, 2011).

As algas marinhas possuem altos níveis de compostos hidrocolóides, tais como ágar, carragenana e alginato (MEINITA E HONG, 2012). Um hidrocolóide, também conhecido como molécula, é uma substância não cristalina de estrutura muito grande que se dissolve em água formando uma solução viscosa.

As algas marinhas vermelhas (Rodofíceas) são consideradas como a fonte mais importante de muitos metabólitos biologicamente ativos, em comparação com as outras classes de algas (GAMAL *et al.*, 2010) e biossintetizam moléculas de alta massa molecular, na sua maioria polissacarídeos contendo galactose (galactanas) e denominados ficocolóides, que desempenham funções tecnológicas importantes para diferentes indústrias como farmacêutica, química, alimentícia, etc. (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

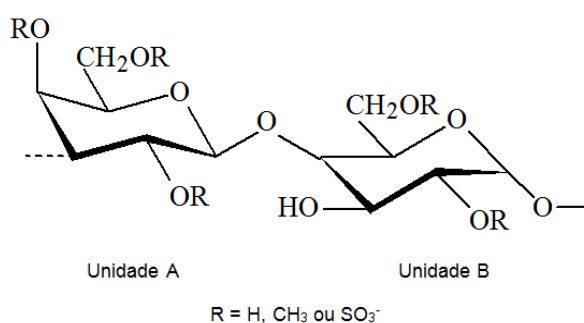
As rodofíceas estão agrupadas em duas categorias: as Agarófitas, que são as algas vermelhas que contêm ágar e as Carrageófitas, que são as algas vermelhas que contêm carragenana. Esses compostos são amplamente empregados nas indústrias alimentícias (fabricação de gelatinas, queijo, enlatados, doces e outros); farmacêutica (laxativo, emulsificante e estabilizante para medicamentos); em pesquisas laboratoriais (meio de cultura para plantas e microrganismos diversos, e como meio de inclusão para cortes histológicos). Possuem também várias outras aplicações, como na fabricação de moldes dentários, produtos cosméticos e papel.

O ágar e a carragenana são galactanas extraídas de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelha da classe Rodophyta. Os principais gêneros utilizados comercialmente para extração dessas galactanas são *Gelidium*, *Pterocladia*, *Gracilaria*, *Gigartina*, *Hypnea*, *Eucheama*, *Chondrus* e *Iridacea*. O teor

desses polissacarídeos varia com as condições do mar (temperatura da água, concentração de gás carbônico, intensidade de radiação solar) e com o ciclo de vida desses organismos.

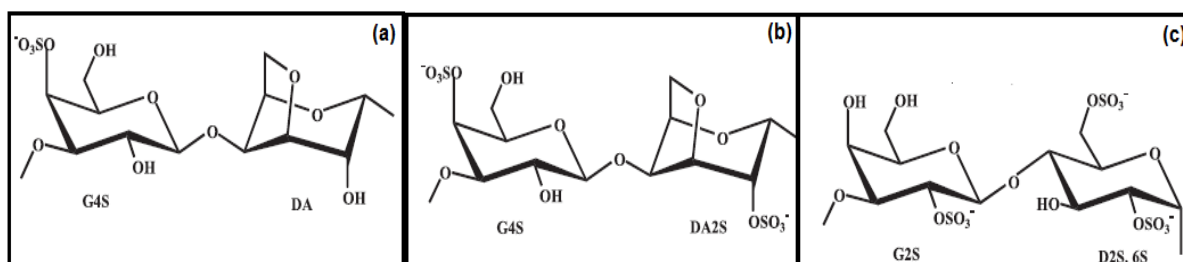
Segundo Meinita e Hong (2012), as carragenanas tornaram-se o nome genérico para denominar os polissacarídeos extraídos de algas marinhas vermelhas os quais contêm galactanas sulfatadas com interações alternadas consistindo de $\alpha(1-4)$ -3,6-anidro-D-galactose e $\beta(1-3)$ -D-galactose (Figura 4).

Figura 4 – Estrutura básica da carragenana com unidades D-alternantes.



Segundo Van de Velde *et al.* (2002); FURTADO (2004), a extração e comercialização, a nível mundial, de carragenanas chegaram a movimentar cerca de US\$ 310 milhões no ano de 2000 com um crescimento anual de 3 a 4%. As carragenanas mais comercializadas são κ (kappa), ι (iota) e λ (lambda). A diferença estrutural entre a κ , ι e λ -carragenana está na quantidade e posicionamento de grupos sulfatos que esterificam os carbonos das unidades A e B da cadeia principal (Figura 5), de modo que a κ -carragenana possui 1 (C-4 da unidade A), a ι -carragenana 2 (C-4 da unidade A e C-2 da unidade B) e a λ -carragenana 3 (C-2 da unidade A e nos C-2 e 6 da unidade B) grupos sulfato (HOLANDA, 2007).

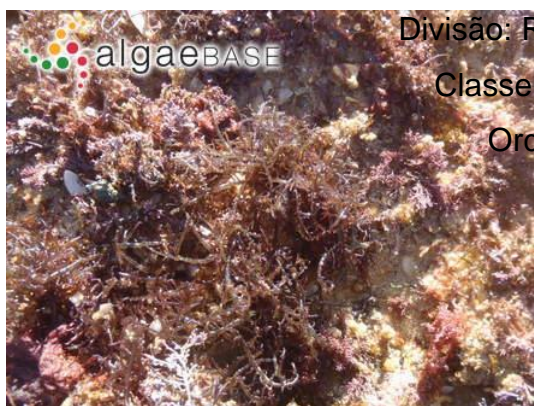
Figura 5 – Estruturas das carragenanas comerciais: (a) κ -carragenana, (b) ι -carragenana e (c) λ -carragenana.



1. 5. Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*

O gênero *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) inclui cerca de 50 espécies distribuídas em regiões de águas quentes (MASUDA *et al.* 1997). Para o Brasil, são citadas seis espécies desse gênero: *H. cenomyce* J. Agardh; *H. cornuta* J. V. Lamour.; *H. musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour.; *H. nigrescens* Greville ex J. Agardh; *H. spinella* (C. Agardh) Kuetzing; e *H. valentiae* (Turner) Montagne (SCHENKMAN 1986, NUNES 2005).

Dentre as espécies desse gênero, encontra-se a *H. musciformis* e segundo Nunes (2005), a referida espécie possui ampla distribuição geográfica ao longo do litoral brasileiro, ocorrendo desde o litoral do Rio Grande do Sul até o litoral do Maranhão, podendo ser encontradas em áreas de infra e meso litoral, em rochas ou como epífitas sobre outras espécies de algas. É uma espécie que suporta grandes variações ambientais, apresentando tolerância à temperatura – 18 a 30 °C e salinidade – 20 a 50 ppt. (YOKOYA E OLIVEIRA 1992 a,b).



Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: *Hypneaceae*

Gênero: *Hypnea*

Espécie: *Hypnea musciformis*

Fonte: algaebase

As algas marinhas do gênero *Hypnea* possuem grande importância econômica e devido a esse fato, diversos estudos, laboratoriais e em campo, foram realizados a fim de estabelecer as melhores condições bioquímicas, fisiológicas e de cultivo para as espécies de algas desse gênero. Estudos com a espécie de *H. musciformis* foram realizados, em laboratório e no mar, para verificar as influências de nitrogênio e fósforo, da profundidade e da sazonalidade no crescimento e no conteúdo de carragenana presente na referida espécie de alga (SCHENKMAN, 1980). Relação entre o crescimento e os efeitos do nitrato, sazonalidade e oscilação

de temperatura para a referida espécie de alga foram investigados por Berchez e Oliveira (1989). Reis *et al.* (2003) realizando estudos com a mesma espécie de alga avaliaram os efeitos dos fatores bióticos no crescimento da referida alga.

Alga marinha vermelha *H. musciformis* é um importante recurso marinho possuindo como constituinte preponderante da parede celular a κ -carragenana (STANLEY, 1987), um polissacarídeo sulfatado muito utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica como agente gelificante, espessante e estabilizante.

Estudos com κ -carragenana extraído de *H. musciformis* mostraram que esse polissacarídeo apresenta atividades antivirais (Neushul, 1990). Nagano *et al* (2002) mostraram que lectinas extraídas de *H. musciformis* apresentaram atividades pró e anti-inflamatórias. Macroalgas do gênero *Hypnea* também foram investigadas para a produção de bioetanol como biocombustível de fonte renovável (KARUNAKARAN e GURUSAMY, 2001).

Estudos para a produção de bioetanol a partir de outras espécies e gêneros de macroalgas ainda encontram-se em grande fase de desenvolvimento. Adams e Gallagher (2009) investigaram a macroalga *Saccharina latissima* para a produção de bioetanol utilizando pré-tratamentos variáveis. A produção de bioetanol usando a macroalga *Euchema cottonii* foi realizada por Candra *et al.* (2011). A macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* como uma fonte de bioetanol foi utilizada nos estudos de Kambhaty *et al.* (2012). Ge *et al.* (2011) produziram etanol a partir de resíduos da alga marinha parda *Laminaria japonica* provenientes da indústria de extração de alginato.

A crescente demanda do mercado nacional de ficocolóides é suprida pela importação de macroalgas, pela colheita em bancos naturais ou de algas arribadas (OLIVEIRA, 1998; FURTADO, 1999). Em comunidades do litoral do nordeste brasileiro, projetos estão sendo desenvolvidos a fim de orientá-las para o uso racional desse recurso marinho, substituindo a atividade extrativista pela sustentável – maricultura (CARVALHO FILHO, 2004; MIRANDA *et al.*, 2004).

O cultivo de algas marinhas no litoral brasileiro vem sendo desenvolvido na busca de suprir a grande demanda da indústria de carragenana. Um exemplo disso é o desenvolvimento de um método de cultivo e colheita da alga marinha vermelha exótica *Kappaphycus alvarezii* pela Empresa Produtora de Carragenana (Sete Ondas Biomar), no estado do Rio de Janeiro. Essa espécie tem apresentado uma

grande fonte potencial de matéria-prima para a produção de produtos tanto de altos valores agregados (Química fina) quanto os de baixos valores agregados (biocombustíveis), isso se deve aos seus altos conteúdos de carragenanas e baixos conteúdos de celulose na sua parede celular. Além disso, essa macroalga apresenta uma elevada taxa de crescimento por hectare comparada com a da biomassa terrestre (HARGREAVES *et al.*, 2013). Apesar da Instrução Normativa do IBAMA, nº 185, que permite o cultivo comercial desta espécie entre a Baía de Sepetiba (RJ) e na Ilha Bela (SP), ainda existem questionamentos sobre o impacto ambiental ocasionado pelo cultivo de algas exóticas no litoral brasileiro.

1. 6. Pré-tratamento de matéria-prima para produção de etanol

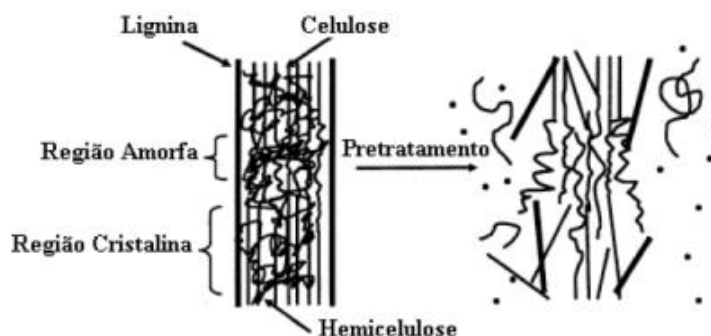
A produção de biocombustíveis envolve a fermentação de açúcares por microrganismos para produzir etanol. Como muitos açúcares não estão livremente disponíveis, mas formam parte dos carboidratos estruturais e de armazenamento há exigências por tratamentos, tais como: alteração na temperatura, pH e adição de enzimas para hidrólise prévia dos açúcares antes da fermentação (Adam *et al.*, 2009).

O objetivo do pré-tratamento da matéria-prima para a produção de biocombustíveis é a redução da cristalinidade da celulose e solubilização das estruturas recalcitrantes da parede do vegetal. Diante disso, para que o processo de obtenção de etanol seja um processo economicamente viável, torna-se necessária uma seleção rigorosa do tipo de pré-tratamento a ser aplicado, uma vez que esta etapa irá influenciar diretamente sobre os rendimentos de glicose durante a hidrólise enzimática do material (ROCHA, 2010). Um eficiente pré-tratamento minimizará os custos envolvidos na aquisição de enzimas, viabilizando o processo (ALZATE E TORO, 2006; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

O pré-tratamento propriamente dito deve ser muito eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade (garantindo acessibilidade da celulose aos agentes hidrolíticos), simplicidade operacional, segurança e higiene industrial e atributos ambientais, levando assim a reduzidos consumos de insumos químicos e energia (ROCHA, 2010).

A figura 6 representa o esquema da ação do pré-tratamento aplicado a um material lignocelulósico. Há uma desorganização na estrutura da biomassa celulósica, beneficiando a ação das enzimas ou ácidos.

Figura 6 – Representação da ação do pré-tratamento aplicado a um material lignocelulósico.



Fonte: (Moiser *et al.*, 2005)

Atualmente, buscas por processos eficientes de hidrólise da biomassa de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol têm sido investigadas. Vários métodos de pré-tratamentos de biomassa têm sido estudados e que podem ser mecânicos, físicos, químicos, biológicos ou combinados.

O pré-tratamento mecânico da matéria-prima consiste na limpeza e na desorganização do material, a fim de causar a destruição da sua estrutura celular e torná-la mais acessíveis aos posteriores tratamentos químicos, físicos ou biológicos (SILVA, 2010).

Explosão a vapor é um tipo de pré-tratamento físico sendo utilizado para hidrolisar materiais lignocelulósicos. A biomassa é triturada e submetida ao vapor de alta pressão e alta temperatura (160 – 240 °C) por 20 minutos. Retirando-se a pressão do sistema ocorre uma mudança brusca na temperatura com a finalidade de causar uma ruptura nas ligações dos constituintes da parede celular dos vegetais (celulose, hemicelulose e lignina). Para aumentar a eficiência do tratamento e recuperação da hemicelulose pode-se adicionar SO₂ ao sistema (TENGBORD *et al.*, 2001).

Termo-Hidrólise é também um pré-tratamento físico em que assemelha-se ao tratamento de explosão a vapor. Enquanto na explosão a vapor utiliza-se vapor, no termo-hidrólise é utilizada água quente pressurizada. Uma maior injeção de água

umenta a solubilização do sistema. O grande consumo de água para a produção dos hidrolisados torna esse pré-tratamento desvantajoso.

O pré-tratamento químico ácido-diluído tem por finalidade solubilizar a hemicelulose dos materiais celulósicos e lignocelulósicos minimizando os custos com a utilização de hemicelulases, além de promover a liberação de parte da glicose presente na cadeia de celulose. É importante ressaltar a importância das variáveis mais influentes nesse tipo de tratamento para atingir uma condição ótima no que diz respeito à concentração do ácido, concentração do sólido e o tempo de pré-tratamento. Os reagentes ácidos mais utilizados são os ácidos sulfúricos, clorídrico e nítrico (diluídos ou concentrados). Variações na temperatura podem ocasionar diferenciações nesse processo. A correção do pH faz-se necessária antes da hidrólise e fermentação.

Outro tipo de pré-tratamento químico é o tratamento alcalino e seu uso baseia-se na solubilização da lignina dos lignocelulósicos, entretanto a utilização de álcalis como o hidróxido de sódio e outras bases apresentam desvantagens para aplicação em potencial (ROCHA, 2010). Utilizando hidróxido de cálcio, nesse processo, tem-se a elevação do pH o qual promove a solubilização da lignina, sendo assim, uma alternativa de baixo custo. Esse tratamento pode ser realizado numa ampla faixa de temperatura entre 25 – 130 °C, durante horas ou até dias. Dependendo da temperatura de trabalho, esse pré-tratamento remove aproximadamente 33% da lignina (Rocha, 2010). Esse nível de remoção de lignina em materiais que apresentam baixo conteúdo de lignina (gramas, algas) proporciona elevada digestibilidade durante a hidrólise enzimática.

Segundo Rocha (2010), outra importante função dos álcalis após o pré-tratamento dos lignocelulósicos é a possibilidade de remoção de inibidores formados da degradação dos açúcares. Estes subprodutos incluem ácidos alifáticos, furaldeídos e compostos fenólicos (furfural e hidroximetilfurfural) que estão contidos no hidrolisado que posteriormente inibiriam o crescimento microbiano e a formação de etanol durante a fermentação.

O pré-tratamento biológico resulta em parcial deslignificação da lignocelulose usando microrganismos semelhantes a fungos e bactérias para degradar a lignina. Durante o processo, estes microrganismos secretam enzimas extracelulares como peroxidases e lacases que ajudam a remover uma quantidade considerável de

lignina da biomassa. O pré-tratamento biológico também pode ser usado combinado com outros processos. Este pré-tratamento é bem menos severo não requerendo ácidos, altas temperaturas e nem grandes tempos (36 horas) (SILVA, 2010).

O pré-tratamento organosolvente consiste na mistura aquosa de solvente orgânico com catalisador ácido (HCl ou H₂SO₄), essa mistura tem a função de quebrar a estrutura da lignina e hemicelulose. Os solventes orgânicos mais usados são: metanol, etanol, acetona, etileno, glicerol, entre outros. Para reduzir os custos esses solventes devem ser drenados do reator, evaporados, condensados e reciclados. Essa remoção se faz necessária, pois os mesmos podem ser inibitórios ao crescimento dos microrganismos na posterior fermentação (SILVA, 2010).

AFEX (Ammonia Fiber Explosion) é um pré-tratamento combinado onde utiliza amônia para promover uma maior exposição da celulose pela modificação da lignina, o qual facilita o ataque enzimático. Além disso, a amônia pode ser recuperada e reciclada devido a sua elevada volatilidade. Uma desvantagem desse processo está relacionada ao elevado custo da amônia.

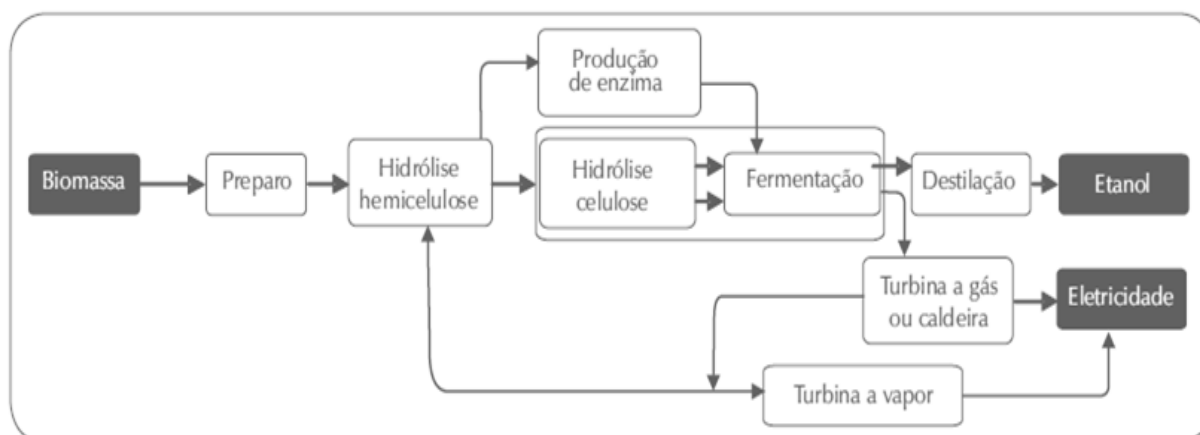
O pré-tratamento explosão de CO₂ assemelha-se ao AFEX, diferindo na utilização do fluido. Enquanto o pré-tratamento AFEX utiliza amônia para promover a exposição da celulose, a explosão de CO₂ utiliza o CO₂ ocorrendo a formação de ácidos e ocasionando a hidrólise da celulose. O ponto positivo desse processo é o baixo custo comparado ao AFEX.

1. 7. Hidrólise de matéria-prima para a produção de biocombustível

O bioetanol vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis.

As tecnologias para a obtenção de bioetanol com base em materiais lignocelulósicos envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação para a produção do bioetanol. Para executar essa tarefa, a hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina. Uma configuração genérica e simplificada do processo é apresentada na Figura 7 (BNDES; CGEE, 2008).

Figura 7 – Esquema do processo de produção de etanol por meio da hidrólise da biomassa.



Fonte: BNDES; CGEE, 2008

1. 7. 1. Hidrólise da biomassa

Há basicamente três técnicas empregadas para a obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol, tais como: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácido diluído e hidrólise enzimática. A Tabela 1 apresenta uma comparação entre as condições e o desempenho dos três processos básicos de hidrólise.

Tabela 1 – Esquema comparativo entre as condições e o desempenho dos três processos básicos de hidrólise.

Processo	Insumos	Temperatura	Tempo	Sacarificação
Ácido diluído	< 1% H ₂ SO ₄	215 °C	3 min	50-70%
Ácido concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40 °C	2-6 h	90%
Enzimático	Celulase	70 °C	1,5 dia	75-95%

1. 7. 1. 1. Hidrólise com ácido concentrado

Esse processo envolve a hidrólise da hemicelulose. Soluções aquosas de ácidos fortes (sulfúrico, clorídrico e fosfórico) atuam na quebra da celulose e da hemicelulose presentes na biomassa, em baixas temperaturas.

Tipicamente, a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose, e os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos

no meio reacional por muito tempo, o que leva à degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais (RABELO, 2010).

1. 7. 1. 2. Hidrólise com ácido diluído

A celulose e a hemicelulose são hidrolisadas separadamente. A hemicelulose hidrolisada pode ser removida após o primeiro passo da hidrólise. Desta forma, as condições de hidrólise tanto para a hemicelulose quanto para a celulose podem ser otimizadas. Porém, devido às altas temperaturas aplicadas no segundo passo (aproximadamente 200°C), uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel é degradada, levando a uma inibição durante o processo de fermentação (RABELO, 2010).

1. 7. 1. 3. Hidrólise enzimática

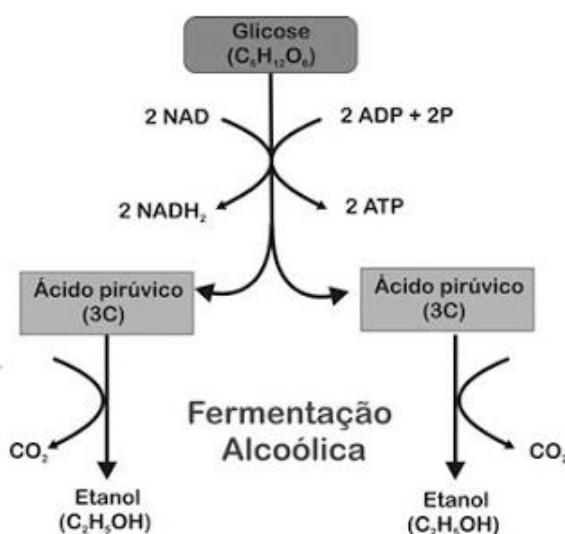
Nesse processo, a biomassa é pré-tratada a fim de favorecer o ataque da enzima utilizada. Inicialmente, a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao que ocorre na hidrólise com ácido diluído. Já na etapa da hidrólise, propriamente dita, as enzimas (celulases) promovem a quebra da celulose. Como as condições são mais brandas, a quantidade de subprodutos liberada é menor e isso acarreta um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Para uma maior conversão da celulose, faz-se necessária altas concentrações de enzima aumentando o custo da produção.

1. 8. Fermentação

No aspecto bioquímico, a fermentação alcoólica é realizada por leveduras e outros microrganismos que fermentam a glicose para etanol e CO₂. A glicose é convertida a piruvato pela glicólise e o piruvato é convertido em etanol e CO₂ em um processo de duas etapas. Na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Esta reação é uma descarboxilação simples e não envolvem a oxidação do piruvato. A enzima

descarboxilase piruvato requer Mg^{2+} e tem como coenzima pirofosfato de tiamina. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol através da ação da enzima álcool desidrogenase, com o poder redutor fornecidos pelo NADH derivados da desidrogenação do gliceraldeído 3-fosfato (ROCHA, 2010).

Figura 8 – Via da fermentação alcoólica, onde a glicose é convertida a piruvato e este convertido a etanol e CO_2 .



Fonte: www.sobiologia.com

Segundo Tosetto (2002), as leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. As células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por brotamento, onde a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula.

A levedura realiza a fermentação do açúcar objetivando obter energia necessária para a sua sobrevivência, resultando, desse processo metabólico, um subproduto, o etanol. Pesquisadores têm buscado novas técnicas para aumentar a eficiência das leveduras na produção do etanol.

Durante o pré-tratamento empregado na hidrólise, há formação de uma série de compostos que podem atuar como interferentes tanto no processo de hidrólise quanto no processo de fermentação. Esses compostos e suas concentrações nos hidrolisados vão depender do tipo de matéria-prima e das condições empregadas no pré-tratamento. Os inibidores potenciais da fermentação encontram-se agrupados

em três categorias que são (1) os derivados fenólicos; (2) os ácidos orgânicos fracos, como o ácido acético e (3) os derivados furânicos que são o Furfural e o 5-Hidroximetilfurfural - HMF (SANTOS E GOUVEIA, 2009).

2. OBJETIVOS

2. 1. Geral

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial fermentativo dos polissacarídeos da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* visando a produção de bioetanol.

2. 2. Específicos

- ✓ Realizar hidrólise da alga marinha vermelha *H. musciformis* em condições ácidas;
- ✓ Determinar o rendimento de hidrólise ácida;
- ✓ Determinar a composição monossacarídica dos hidrolisados da alga *H. musciformis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- ✓ Determinar o teor de açúcares redutores dos hidrolisados da alga *H. musciformis*;
- ✓ Avaliar o potencial fermentescível dos hidrolisados da alga *H. musciformis*;
- ✓ Produzir etanol a partir dos hidrolisados da alga *H. musciformis* por *Saccharomyces cerevisiae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta das algas marinhas

As algas marinhas vermelhas da espécie *H. musciformis* (Wulfen) J. V Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales, Hypneacea) foram colhidas em cordas de cultivo localizadas a aproximadamente 200 metros da costa, na praia de Flecheiras (03°13'06''S - 39°16'47''W), município de Trairi, estado do Ceará, Brasil. A coleta foi realizada com ajuda de um membro da Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG), a qual mantém parceria com o Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará.

Após coletadas, as algas foram lavadas, secas ao sol e transportadas ao laboratório, onde foram trituradas com auxílio de liquidificador.

Figura 9 – Localização da área de cultivo de algas, praia de Flecheiras – Ceará – Brasil.



3.2. Análise centesimal da alga *H. musciformis*

3. 2. 1. Umidade

O teor de umidade foi determinado em estufa a 105 °C por 24h. Sendo calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, valor expresso em percentagem (NAGAKURA, 1972).

3. 2. 2. Proteínas totais

Para determinação da proteína total a análise foi realizada através do método semi-micro Kjeldahl (PEARSON, 1973), utilizando-se o fator de 6,25 para conversão do nitrogênio total em proteína bruta.

3. 2. 3. Lipídeos totais

O teor de lipídeos foi quantificado pelo método de Soxhlet, por um período de quatro horas, utilizando etanol como solvente de extração. Para o cálculo do teor de lipídeos totais foi baseado na equação 01.

$$\text{Lipídeos totais} = \frac{\text{Reboiler com amostra (g)} - \text{Reboiler seco (g)}}{\text{Peso da amostra (g)}} \times 100 \quad (01)$$

3. 2. 4. Cinzas totais

A determinação de cinzas corresponde ao teor de minerais contidos na amostra. 0,5 g de alga seca foi colocada em estufa a 60 °C por 24 h. As amostras foram pesadas em cadinhos de porcelana seco, limpos e em seguida armazenadas em dessecador. Em seguida, as amostras foram incineradas em mufla a 550 °C por 4 h.

3. 2. 5. Carboidratos totais

O conteúdo de carboidratos totais foi determinado por diferença entre, somando-se os teores de umidade, proteínas totais, lipídeos totais e cinzas totais.

3. 2. 6. Celulose

De acordo com o que foi descrito por Ge *et al.* (2011), o conteúdo de celulose foi determinado através de duas etapas de hidrólise ácida. A primeira etapa foi realizada a 4 °C por 120 min contendo 3 mL de H₂SO₄ (72%) em 0,3g de alga seca. Após esse tempo, adicionou-se 84 mL de deionizada e a segunda etapa foi realizada a 121 °C por 60 min. A solução foi filtrada, e o hidrolisado líquido foi analisado, por CLAE, para o seu conteúdo monossacarídico. O cálculo para o teor de celulose foi baseado na equação 02.

$$\text{g/celulose} = \frac{\text{Concentração de glucose} \times 0,087}{0,9} \quad (02)$$

3. 3. Hidrólise ácida da alga *H. musciformis*

Pesou-se 5 g da alga seca de *H. musciformis* em balança analítica modelo AND – HR – 200 (max 210 g; d = 0,1 mg), os quais foram colocados em erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, foram adicionados 100 mL de HCl nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,5 e 1,0 M. As soluções foram autoclavadas a temperatura de 121 °C por 10, 20 e 30 minutos (Figura 10), gerando, portanto, 12 condições de hidrólise denominadas segundo a Tabela 2.

Figura 10 – Esquema da hidrólise ácida da alga marinha *H. musciformis*

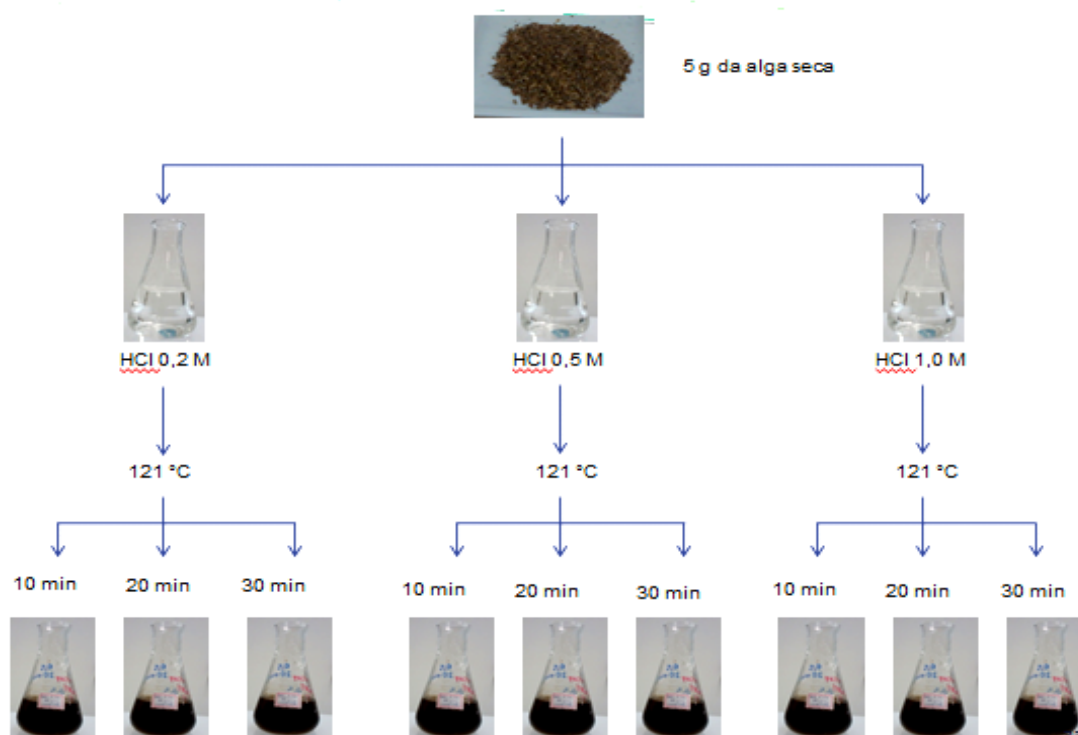


Tabela 2 - Denominações das condições de hidrólise da alga *H. musciformis* em função da concentração de HCl e tempo de reação.

Tempo de reação (min) \ HCl (M)	10	20	30
0,0	0,0/10	0,0/20	0,0/30
0,2	0,2/10	0,2/20	0,2/30
0,5	0,5/10	0,5/20	0,5/30
1,0	1,0/10	1,0/20	1,0/30

Após resfriamento a temperatura ambiente, os homogenatos foram filtrados em tecido *nylon*. Os resíduos foram secos em estufa a 40 °C e as fases líquidas, denominadas hidrolisados (Figura 11), foram armazenadas a 4 °C para posteriores dosagens dos teores dos açúcares redutores, glicose, galactose e fermentação para a produção de bioetanol.

Figura 11 - Hidrolisado ácido da alga *H. musciformis* autoclavada a 121 °C por 10; 20 e 30 min, na concentração 0,5M de HCl.



Fonte: autoria própria

3. 4. Ajuste do pH dos hidrolisados da alga *H. musciformis*

O pH dos hidrolisados foi ajustado para 5,0 com a adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Hidróxido de cálcio) sob agitação constante, utilizando-se um pHmetro Tecnal (Tec - 3MP). Após o ajuste do pH, as soluções foram filtradas em duas etapas: a primeira em tecido *nylon* e a segunda em papel de filtro.

3. 5. Análise de açúcar redutor

Os teores de açúcares redutores dos hidrolisados foram determinados pelo método de Somogy-Nelson (1944), tendo a galactose como curva-padrão. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro a 540 nm.

3. 6. Eficiência da hidrólise ácida

Os resíduos obtidos após a filtração dos hidrolisados ácidos da alga foram mantidos em estufa de secagem a 105 ± 1 °C, em cadinhos de porcelana até a obtenção de peso constante dos mesmos. A eficiência da hidrólise ácida foi

determinada com base nas massas inicial e residual da alga seca antes e depois da hidrólise, respectivamente, segundo a Equação 03.

$$E_H = \frac{m_i - m_R}{m_i} \times 100 \quad (03)$$

Onde:

E_H = Rendimento de hidrólise

m_i = Massa inicial de alga seca

m_R = Massa do resíduo de alga após hidrólise

3. 7. *Microrganismos e manutenção das culturas de células*

Para os testes fermentativos foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de uma levedura comercial de panificação. As cepas foram mantidas em meio sólido de crescimento Saboraud, da marca HIMEDIA, à temperatura ambiente.

3. 8. *Preparo do inóculo*

O inóculo foi preparado através da transferência de três colônias da levedura *S. cerevisiae* cultivada em meio Ágar-Saboraud para erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo Saboraud estéril composto por glicose (40 g.L^{-1}) e peptona (10 g.L^{-1}). Os erlenmeyers foram incubados por 24 horas à temperatura e agitação constantes ($30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 130 rpm, respectivamente) até a obtenção de uma leitura de densidade ótica (D.O) de 1,0 a 630 nm.

3. 9. *Fermentação do hidrolisado ácido*

Com base nos teores de açúcar redutor e no rendimento de hidrólise das condições testadas, a condição 0,5/20 reuniu os maiores teores de galactose e glicose. Assim, ela foi selecionada para o ensaio de fermentação alcoólica utilizando a levedura *S. cerevisiae*.

Para o ensaio fermentativo, 10 mL do inóculo foram transferidos, assepticamente, para erlenmeyers (250 mL) contendo 90 mL do hidrolisado ácido 0,5/20 da alga marinha *H. musciformis*, com pH previamente ajustado para 5,0 com Ca(OH)_2 . O experimento foi realizado em triplicata e a fermentação conduzida sob temperatura e agitação constantes à 30 °C e 130 rpm, respectivamente, por 52 horas. Alíquotas de 2 mL foram coletadas, assepticamente, em intervalos de 2 horas para determinação da D.O. a 630 nm. Em seguida, elas foram centrifugadas à 4 °C, 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi reservado para determinação dos teores de glucose, galactose e etanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com a finalidade de acompanhar a cinética do processo fermentativo.

3. 10. Determinação da composição em monossacarídeos e em etanol nos hidrolisados

As análises dos teores de galactose, glicose e etanol foram realizadas na Central Analítica do Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

Os carboidratos (glucose e galactose) gerados pelos processos de hidrólise e o etanol proveniente da fermentação foram determinados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando o sistema Waters CLAE (Waters, Milford, MA, USA) equipado com detector de índice refrativo Waters 2414 e coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). O eluente utilizado foi ácido sulfúrico em água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) 5 mM a uma taxa de fluxo 0,5 mL min^{-1} a 65 °C e tempo de corrida de 30 minutos. Os interferentes (ou inibidores) da fermentação formados durante a hidrólise ácida também foram analisados por CLAE com um tempo de corrida de 55 min.

Os açúcares e etanol foram identificados comparando-se os seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos padrões: glucose e etanol, ressaltando que a coluna utilizada nesse experimento não é capaz de separar os monossacarídeos galactose, xilose e arabinose. No entanto, como já é sabido que a alga marinha *H. musciformis*, utilizada nesse trabalho, possui como polissacarídeo majoritário galactana sulfatada considerou-se as concentrações de arabinose e xilose desprezíveis. Com relação a determinação dos inibidores a comparação com

os tempos de retenção padrão foram para furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e ácido fórmico.

3. 11. Parâmetros cinéticos

As cinéticas das utilizações dos substratos (glicose e galactose), produção de biomassa e etanol formado foram analisadas durante a fermentação alcoólica do hidrolisado 0,5/20. Os parâmetros cinéticos velocidades específicas de crescimento celular (μ_X); do consumo de substratos (μ_{S1} para glicose e μ_{S2} para galactose), formação de etanol (μ_P) foram calculados segundo as equações de 04 – 07, respectivamente:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (04)$$

$$\mu_{S1} = - \frac{1}{X} \cdot \frac{dS1}{dt} \quad (05)$$

$$\mu_{S2} = - \frac{1}{X} \cdot \frac{dS2}{dt} \quad (06)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (07)$$

Onde:

X = concentração de célula (g.L^{-1});

S1 = concentração de glicose (g.L^{-1});

S2 = concentração de galactose (g.L^{-1});

P = concentração de etanol (g.L^{-1}).

Já os fatores de conversão de substrato (glicose + galactose) em biomassa ($Y_{X/S}$) e em etanol ($Y_{P/S}$) e formação de etanol por biomassa ($Y_{P/X}$) foram estimados segundo as equações 8 – 10, respectivamente:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (08)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (09)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (10)$$

As produtividades em biomassa e etanol foram estimadas segundo as equações 11 e 12, respectivamente.

$$P_X = \frac{x_m - x_0}{t_f} \quad (11)$$

$$P_P = \frac{P_m - P_0}{t_f} \quad (12)$$

Onde:

X_m = concentração de célula máxima ($g.L^{-1}$).

X_0 = concentração de célula inicial ($g.L^{-1}$).

X = concentração de célula final ($g.L^{-1}$).

P_m = concentração de etanol máxima ($g.L^{-1}$).

P_0 = concentração de etanol inicial ($g.L^{-1}$).

S = concentração de substrato final ($g.L^{-1}$).

S_0 = concentração de substrato inicial ($g.L^{-1}$).

t_f = tempo final (h).

3. 12. Planejamento experimental e análise estatística

Os resultados obtidos na hidrólise da alga marinha *H. musciformis* foram analisados no *software* STATISTICA versão 7.0, a fim de estimar os efeitos das variáveis e suas interações sobre a resposta analisada em relação aos açúcares (glucose e galactose) gerados nos hidrolisados. A Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para verificar a diferença significativa ao nível de 85%.

Um Planejamento Fatorial de 2^2 , com dois pontos centrais, foi realizado a fim de avaliar se a concentração do ácido clorídrico (0,2; 0,5 e 1,0 M) e o tempo (10, 20 e 30 min) de hidrólise influenciaram nas concentrações dos açúcares glucose e galactose (variáveis respostas) segundo os níveis apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores e níveis das variáveis do Planejamento fatorial 2^2 levando em consideração a concentração do ácido e o tempo, dos hidrolisados da alga *H. musciformis*, na concentração dos açúcares (glucose e galactose) obtidos.

Variáveis	Níveis		
	+1	0	-1
Concentração do ácido (M)	0,2	0,5	1,0
Tempo (min)	10	20	30

Outro *software*, Prisma versão 4.0, foi utilizado para avaliar se a concentração do ácido, no mesmo intervalo de tempo, influenciou de forma significativa na eficiência da hidrólise e nos teores de açúcares redutores. E para verificar se houve diferença significativa foi aplicado o teste estatístico de Bonferroni ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. Composição centesimal da alga *H. musciformis*

Os teores de umidade, proteínas, cinzas, lipídeos, carboidratos totais e carragenana da alga utilizada nesse experimento estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição centesimal da alga *H. musciformis*.

Referências	Espécie estudada	Umidade	Proteínas	Cinzas	Lipídeos	Carboidratos totais		Sulfato
						Celulose/ amido	Galactana	
Presente trabalho	<i>Hypnea musciformis</i>	12,1	14,6	12,6	1,3	11,4	48,0	20,2
KIM <i>et al.</i> 2011	<i>Gelidium amansii</i>	-	13,1	8,6	1,1	77,2		
KHAMBHATY <i>et al.</i> 2012	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	13,4	-	-	-	12,66	51,0	11,75
SAITO e OLIVEIRA, 1990	<i>Hypnea musciformis</i>	-	-	-	-	-	28,3	18,85
PARK <i>et al.</i> 2012	<i>Gelidium amansii</i>	-	-	-	-	14,9	52,4	-
ARMAN E QUADER, 2012	<i>Hypnea musciformis</i>	10,8	-	15,3	-	-	-	-
WI <i>et al.</i> 2009	<i>Gelidium amansii</i>	-	-	-	-	53,4		-

A alga seca ao sol apresentou um teor de umidade de 12,1 %, proteínas 14,6%, cinzas 12,6%, lipídeos 1,3% e carboidratos totais de 59,4%, sendo 11,4% de amido/celulose e 48% de carragenana. Tais resultados se mostraram semelhantes aos obtidos por Kim *et al.* (2011), quando analisaram a composição química de uma outra espécie de alga marinha vermelha (*Gelidium amansii*) a qual apresentou 13,1% de proteínas, 8,6 % de cinzas 1,1% de lipídeos e 77,2% de carboidratos.

Diante desses resultados foi possível observar que os carboidratos totais representaram a maior porção dos componentes químicos dessas espécies de algas marinhas vermelhas e que dentre esses carboidratos totais, que incluem

polissacarídeos de reserva (amido) e estruturais (celulose e galactanas sulfatadas), a maior porção se refere às galactanas sulfatadas (agaranas e/ou carragenanas) como também observado por Khambhaty *et al.*, (2012) para a alga *Kappaphycus alvarezii*, cujos teores foram 51,0% de κ -carragenana e 12,6% de fibras. Resultados semelhantes também foram obtidos por Park *et al.* (2012) em seus estudos sobre a hidrólise ácida (H_2SO_4 2,0%) de 190 kg da alga *G. amansii* com o objetivo de avaliar seu potencial como fonte promissora de carboidratos para produção de bioetanol obtiveram 67,3% de carboidratos totais sendo 14,9% de celulose e 52,4% de ágar. Já o teor de sulfato obtido no presente estudo está de acordo com Saito e Oliveira (1990) que avaliando a composição química dos carboidratos sintetizados por espécies de algas marinhas abundantes no litoral brasileiro, através da análise do espectro de Infra-Vermelho, sugeriram que a espécie *H. musciformis* coletada nos litorais de Itamaracá (PE), João Pessoa (PB), Recife (PE), Santa Cruz (ES) e Ubatuba (SP) sintetizava provavelmente κ -carragenana, apresentando teores de 3,6-anidro-galactose e sulfato que variaram de 25,2 - 31,4 % e 17,6 - 20,1%, respectivamente. De acordo com Arman e Quader (2012), analisando as galactanas presentes no extrato bruto de *H. musciformis* sugeriram que as estruturas químicas desses polissacarídeos correspondiam a κ -carragenana como carboidrato majoritário, porém com pequenas porções de ι e λ -carragenanas. Uma análise mais cuidadosa através do espectro de Infra-vermelho desse extrato mostraram fortes bandas características de galactose-4-sulfato a $846,95\text{ cm}^{-1}$; 3,6-anidrogalactose a $928,92\text{ cm}^{-1}$ e sulfato a $1221,25\text{ cm}^{-1}$. Tais resultados corroboram para um teor mais elevado de sulfato para o carboidrato de *H. musciformis* quando comparado com o carboidrato de *K. alvarezii*, espécie de alga que também sintetiza κ -carragenana e que mostrou um teor de sulfato de 11,75% (KHAMBHATY *et al.*, 2012).

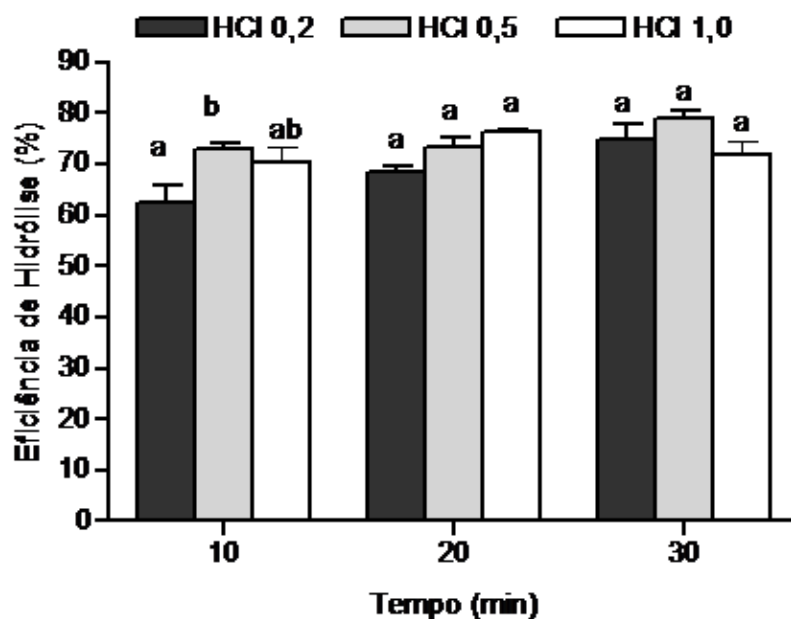
Vale ressaltar que o elevado teor de carboidrato determinado para *H. musciformis* também foi observado por Wi *et al.* (2009) que analisando a composição química da alga marinha vermelha *G. amansii* obtiveram 53,4% de carboidrato total, salientando-se o fato das algas marinhas possuírem quantidades muito pequenas de lignina solúvel e não solúvel em ácido ($3,2\pm 0,3\%$ e $1,5\pm 0,6\%$, respectivamente), o que torna o processo de obtenção de bioetanol mais simples por não promover a formação de carboidratos não fermentescíveis, além de compostos furânicos que são inibidores do processo fermentativo.

Ge *et al.* (2011) analisando o resíduo celulósico obtido a partir da extração de alginato da alga *Laminaria japonica*, como fonte de carboidratos fermentescíveis para produção de bioetanol, não encontraram teores de hemicelulose e lignina.

4. 2. Eficiência de hidrólise da alga *H. musciformis* em função da concentração de HCl e tempo de reação.

As eficiências das diferentes condições de hidrólise da alga marinha *H. musciformis* são mostrados na Figura 12. Foi possível observar que a menor concentração de HCl utilizada associada ao menor tempo de hidrólise foi capaz de solubilizar a estrutura algal, apresentando eficiência de 62,5%. Aumentos na concentração do ácido, bem como no tempo não resultaram em aumentos proporcionais no rendimento de hidrólise, no entanto a condição mais drástica de hidrólise (1,0/30) mostrou eficiência de 71,9%. Já a média geral de eficiência foi de 72,2%.

Figura 12 - Eficiência de hidrólise da alga *H. musciformis* com base na massa seca em função da concentração de HCl e tempo de reação.



De acordo com o teste estatístico de Bonferroni foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas nas condições 0,2/10 e 0,5/10, sugerindo que o tempo

e as concentrações de HCl testadas não mostraram influência na eficiência de hidrólise, porém a condição 0,5/30 foi capaz de solubilizar 78,7% da estrutura algal.

4. 3. Açúcares redutores dos hidrolisados da alga *H. musciformis*

A Tabela 5 mostra os teores totais de açúcares redutores determinados nos hidrolisados da alga marinha *H. musciformis*, bem como a quantidade de açúcares redutores perdidos nos resíduos úmidos obtidos após filtração dos hidrolisados. O menor e o maior teores de açúcares redutores totais obtidos nos hidrolisados da alga *H. musciformis* foram 1,33 e 2,31 g para 0,2/10 e 1,0/30, respectivamente. Observou-se ainda que as maiores concentrações de açúcares redutores (1,60; 2,00 e 2,31 g) e os maiores volumes recuperados (74, 78 e 84 mL) foram gerados nos hidrolisados com 1,0 M de HCl (1,0/10; 1,0/20 e 1,0/30). Já as maiores perdas de açúcares redutores (0,67; 0,79 e 0,81 g) foram observadas para os hidrolisados submetidos a um maior tempo de reação (0,2/30; 0,5/30 e 1,0/30) chegando a representar (26,07; 27,00; 25,97%) dos açúcares redutores totais. Esses resultados sugerem a necessidade de uma metodologia de filtração mais eficiente que reduza as perdas de açúcares redutores no resíduo úmido.

Khambhaty *et al.* (2012) analisando a produção de bioetanol a partir do resíduo da alga *K. alvarezii*, obtido após extração do extrato algal (biofertilizante), verificaram um rendimento de sacarificação de 26,2% em escala laboratorial utilizando H₂SO₄ 0,9 M. Verificaram ainda perdas de 16,1% de açúcares redutores no resíduo úmido para escala laboratorial.

Tabela 5 – Teores de açúcares redutores obtidos nos hidrolisados e perdidos nos resíduos úmidos da alga *H. musciformis*

Hidrolisados	Volumes totais dos hidrolisados recuperados (mL)	Concentrações de açúcares redutores (g.L ⁻¹) e quantidade absoluta (g)	Açúcares redutores perdidos no resíduo (g)	Açúcares redutores perdidos no resíduo úmido (%)
0,2/10	72	1,85(1,33)	0,52	28,11
0,5/10	74	2,25(1,67)	0,58	25,78
1,0/10	78	2,05(1,60)	0,45	21,95
0,2/20	73	2,15(1,57)	0,58	26,98
0,5/20	72	2,44(1,76)	0,68	27,87
1,0/20	84	2,38(2,00)	0,38	15,97
0,2/30	74	2,57(1,90)	0,67	26,07
0,5/30	72	2,83(2,04)	0,79	27,92
1,0/30	74	3,12(2,31)	0,81	25,97

Os teores de açúcares redutores dos nove hidrolisados da alga marinha *H. musciformis* são apresentados na Figura 13. Foi possível observar que dentre as condições de hidrólise testadas a maior concentração do ácido (1,0 M) foi capaz de gerar teores de açúcares redutores variando de 20,5 a 31,3 g.L⁻¹. A condição de hidrólise ácida mais branda (0,2 M), gerou teores de açúcares redutores variando de 18,5 a 25,7 g.L⁻¹. Já a condição de hidrólise ácida intermediária (0,5 M) apresentou teores de açúcares redutores variando de 22,5 a 28,4 g.L⁻¹. O tempo de hidrólise não influenciou na formação desses açúcares redutores não apresentando diferença significativa entre as médias dos teores de açúcares redutores ($p < 0,05$) dos hidrolisados em diferentes concentrações de ácido no mesmo tempo de reação. Porém, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) entre os teores de açúcares redutores dos hidrolisados 0,2/10 - 0,5/30; 0,5/10 - 1,0/30; 1,0/10 - 0,5/30 e 0,2/10 - 1,0/30; 1,0/10 - 1,0/30, respectivamente.

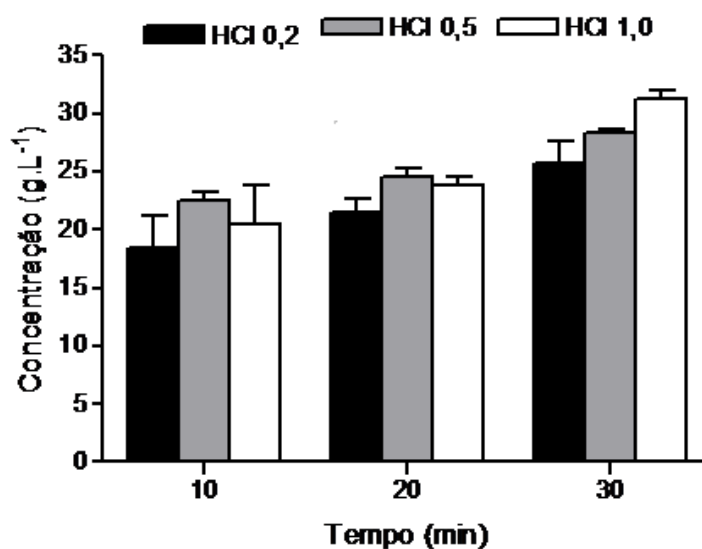
No presente trabalho, o rendimento médio dos açúcares redutores nos hidrolisados com base na alga seca foi de 54,8%. Resultado inferior de rendimento de açúcares redutores (21,1%) foi observado por Meinita *et al.* (2012) quando

avaliaram o efeito da concentração de *K. alvarezii* sobre a produção de açúcares redutores utilizando HCl como catalisador da hidrólise, onde foi verificado a formação máxima de 25,32 g.L⁻¹ de açúcares redutores a uma concentração de 12% de alga, a 0,2 M de HCl a 130 °C por 15 min.

Khambhaty *et al.* (2012) obtiveram, no final do quinto ciclo de re-extração da alga *K. alvarezii*, 65,6 g de açúcares redutores, isso levando em consideração a perda de açúcares redutores total no resíduo (11,6 g).

Estes resultados sugerem que as condições mais drásticas de hidrólise promoveram uma diminuição nos teores de açúcares redutores através da desidratação dos monossacarídeos e consequente formação de compostos furânicos (SANCHEZ, 1988).

Figura 13 – Teores de açúcares redutores dos hidrolisados da alga *H. musciformis*.



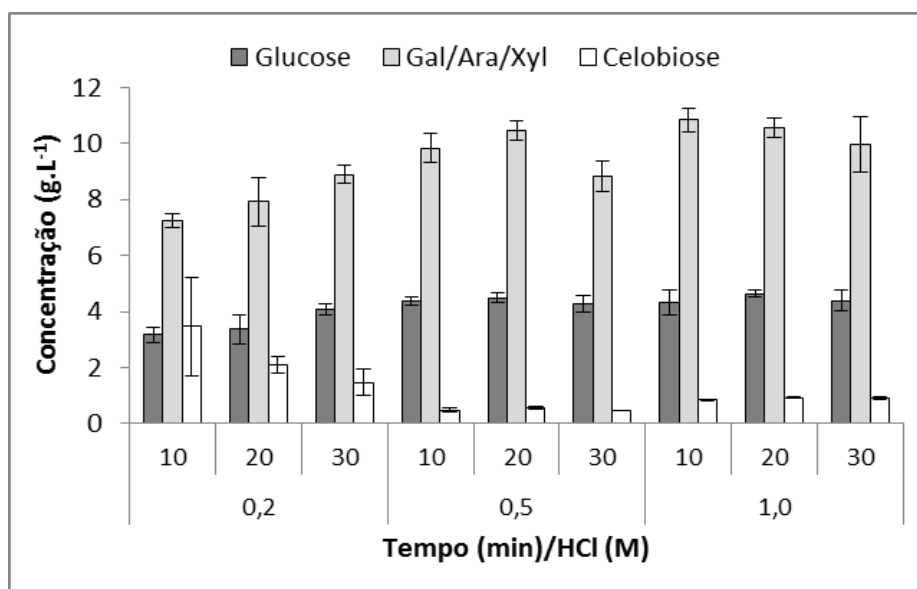
4. 4. Teores de carboidratos (dissacarídeos e monossacarídeos) dos hidrolisados da alga *H. musciformis*.

Os teores dos monossacarídeos (glucose e galactose) dos hidrolisados estão apresentados na Figura 14. Foi possível observar em todos os hidrolisados a presença de glucose e galactose em concentrações que variaram de 3,4 – 4,7 e 7,4 – 10,8 g.L⁻¹, respectivamente. A condição de hidrólise 1,0/20 apresentou os maiores teores de glucose e galactose (15,5 g.L⁻¹) representando um rendimento de 31%

com base na massa seca da alga. No entanto, a condição selecionada para o experimento de fermentação (0,5/20) apresentou um teor de monossacarídeos (glicose e galactose) de $14,8 \text{ g.L}^{-1}$, que apesar das condições de hidrólise mais brandas, apresentou um rendimento (29,6%,) semelhante ao obtido para o hidrolisado 1,0/20. Já os maiores rendimentos de monossacarídeos solúveis obtidos por Kim *et al.* (2011) para a alga *G. amansii* hidrolisada em concentrações molares de ácido HCl 0,1 M e H_2SO_4 0,2 M foram de 11,6 e 9,8%, respectivamente.

Os resultados obtidos nesse trabalho também foram superiores aos relatados por Meinita *et al.* (2012) quando realizaram a hidrólise ácida de 10% (m/v) da alga *Kappaphycus alvarezii* em solução ácida de HCl 0,2 M a $130 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min e obtiveram teores de monossacarídeos de $13,5 \text{ g.L}^{-1}$, representando um rendimento de 13,5%. Ge *et al.* (2011), utilizando pré-tratamento ácido do resíduo celulósico de *L. japonica* proveniente da extração de alginato, obtiveram o rendimento máximo de 27,8% de glicose com base na massa do resíduo para a condição de hidrólise H_2SO_4 0,1%; $121 \text{ }^\circ\text{C}$; 1 h.

Figura 14 – Teores de carboidratos (dissacarídeos e monossacarídeos) dos hidrolisados ácidos da alga *H. musciformis*.



Vale ressaltar que quando a alga *H. musciformis* foi submetida as mesmas condições de hidrólise ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10, 20 e 30 min) na ausência do HCl foi verificada gelificação do meio (Figura 15), resultado característico da solubilização da

carragenana e evidente manutenção da integridade molecular desse polissacarídeo, inviabilizando a determinação dos teores de carboidratos.

Figura 15 – Gelificação da solução da alga *H. musciformis* submetida a autoclavagem a 121 °C por 10, 20 e 30 min na ausência de HCl.



Fonte: autoria própria

4. 5. Influência da concentração do ácido e do tempo de reação na obtenção de glucose e galactose nos hidrolisados da alga *H. musciformis*

A metodologia de análise de superfícies de respostas pode ser executada para otimização do experimento. Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis (concentração do ácido e tempo de reação) que irão produzir a melhor resposta desejada (maior concentração de glucose e galactose), isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores. A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até a sua otimização. Um planejamento experimental construído para estimar coeficientes, segundo algum modelo aproximado, reúne certos critérios desejáveis, sendo os principais: proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos além de fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste.

Planejamentos fatoriais de dois níveis, completos ou fracionários, podem estimar apenas efeitos principais e interações (TEÓFILO E FERREIRA, 2006).

A Tabela 6 apresenta as concentrações de glucose e galactose obtidas nos hidrolisados da alga *H. musciformis*, considerando as variáveis concentração do ácido clorídrico e tempo de reação.

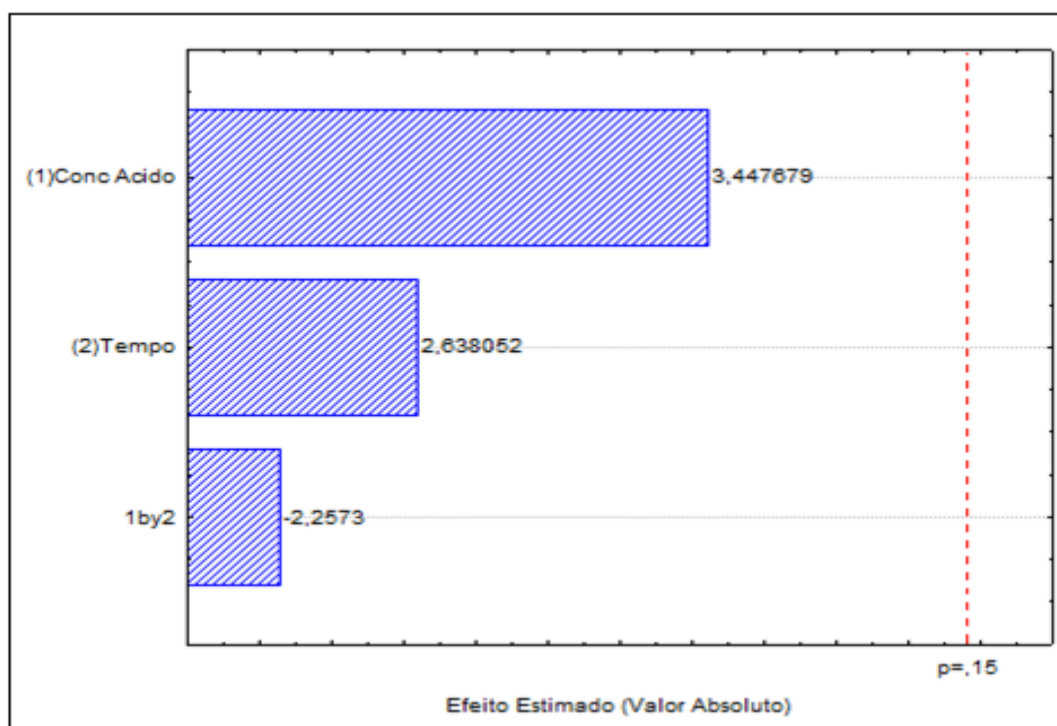
Tabela 6 – Concentrações e tempos de reação de glucose e galactose dos hidrolisados da alga *H. musciformis* obtidos através da CLAE e de acordo com o planejamento experimental.

GLUCOSE			GALACTOSE		
Concentração do ácido (M)	Tempo (min)	Concentração (g.L ⁻¹)	Concentração do ácido (M)	Tempo (min)	Concentração (g.L ⁻¹)
0,2	10	3,17	0,2	10	7,25
1	10	4,31	1	10	10,84
0,2	30	4,07	0,2	30	8,89
1	30	4,38	1	30	9,98
0,5	20	4,36	0,5	20	10,23
0,5	20	4,62	0,5	20	10,72

Os gráficos de Pareto (Figuras 16 e 17) mostram os efeitos padronizados de cada variável independente (concentração de HCl e tempo de reação), bem como os de suas interações sobre a variável dependente (concentração de glucose e galactose) nos hidrolisados de *H. musciformis* permitindo visualizá-los grafica e numericamente. Nestes gráficos, os efeitos são representados por barras e quando elas ultrapassam o valor de $p = 0,15$ conclui-se que as variáveis independentes apresentaram efeito significativo estatisticamente com um nível de confiança de 85% sobre a variável resposta analisada.

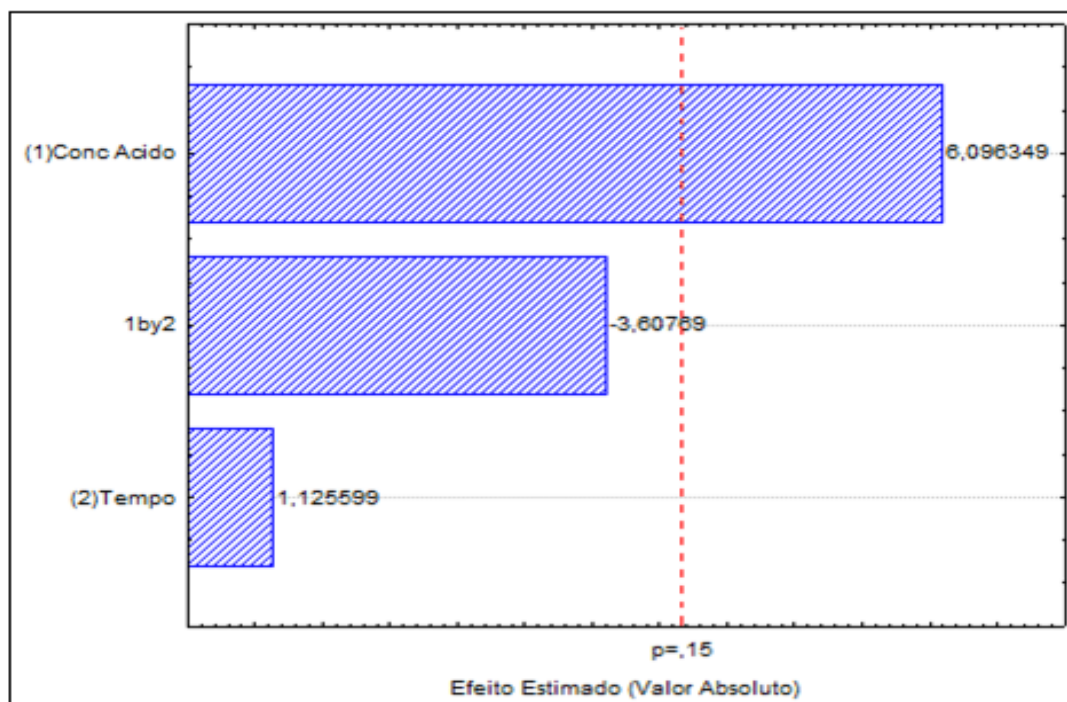
De acordo com a Figura 15 observou-se que nenhuma das variáveis independentes (concentração de HCl e tempo de reação) foi significativa ($p > 0,15$), na faixa de valores estudados, para incrementar a concentração de glucose formada nos hidrolisados da alga *H. musciformis*. No entanto, essas variáveis apresentaram efeitos positivos (3,448 e 2,638, respectivamente) na formação de glucose, exceto a interação entre elas (concentração do ácido:tempo) que apresentou um efeito negativo (-2,257).

Figura 16 – Gráfico de Pareto para a concentração de glucose como variável resposta.



Já a concentração de galactose foi influenciada pela concentração do ácido, apresentando um efeito significativo ($p < 0,15$) e positivo (6,096) na faixa estudada, ou seja, quanto maior a concentração de HCl maior foi a concentração de galactose formada nos hidrolisados da alga *H. musciformis*. Semelhante ao observado para glucose, o tempo de reação também não apresentou influência sobre a formação de galactose (1,126), bem como a interação entre as variáveis independentes a qual mostrou efeito negativo (-3,607) sobre a formação desse monossacarídeo.

Figura 17 – Gráfico de Pareto para a concentração galactose como variável resposta.



Segundo Teófilo e Ferreira (2006) o modelo obtido a partir desse planejamento experimental pode não ser exatamente aquele que descreve a região estudada do sistema e, neste caso, não pode ser usado para fazer estimativas para deslocamento e muito menos para extrair conclusões sobre a região ótima. A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste do modelo é empregando a Análise de variância (ANOVA). Através das Análises de variância (ANOVA) é possível observar os valores dos desvios quadráticos provocados em cada variável (Soma quadrática – SQ) e seus graus de liberdade correspondentes (GL). A partir desses parâmetros são calculadas as médias quadráticas (MQ), que divididas pelos erros puros experimentais, permitem a determinação dos parâmetros F e, subsequentemente, do p -valores, utilizados na verificação da hipótese nula. Altos valores dos parâmetros SQ, MQ e F, geradores dos p -valores $<0,15$, indicam uma influência significativa das variáveis independentes sobre a variável resposta.

As Tabelas 7 e 8 de ANOVA apresentam os valores de F_{cal} para as formações de glucose e galactose, respectivamente, nos hidrolisados de *H. musciformis* frente as concentrações de HCl e tempos de reação estudados. O valor do F_{cal} (13,82) para a concentração de glucose como variável resposta, foi menor que o F_{tab}

(24,58), logo o modelo não se ajustou significativamente. Já para a concentração de galactose como variável resposta, o valor de F_{cal} (25,38) foi superior ao F_{tab} (24,58), porém aproximado, sugerindo que o modelo não foi significativo.

Portanto, estes resultados sugerem que novos parâmetros devem ser considerados como variáveis independentes (temperatura de hidrólise e faixas mais amplas de concentração de ácido) para gerar dados que possam ser mais significativos na formação de glucose e galactose nos hidrolisados da alga *H. musciformis*, bem como na construção de um modelo matemático capaz de representar e extrair uma condição ótima de hidrólise.

Tabela 7 – ANOVA para a concentração de glucose como variável resposta.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{cal}
Regressão	1,276483	4	0,31912083	13,82
Resíduo	0,50107	2	0,25053	
Falta de ajuste (FA)	0,46727	1	0,46727	
Erro puro (EP)	0,03380	1	0,0380	
Total	1,31028	5		
R^2	0,6176			
F_{tab} (85% de confiança)				${}^aF_{(4,1)}=24,58$

^a F_{calc} para a falta de ajuste = MQ_{FA}/MQ_{EP}

Tabela 8 – ANOVA para concentração de galactose como variável resposta.

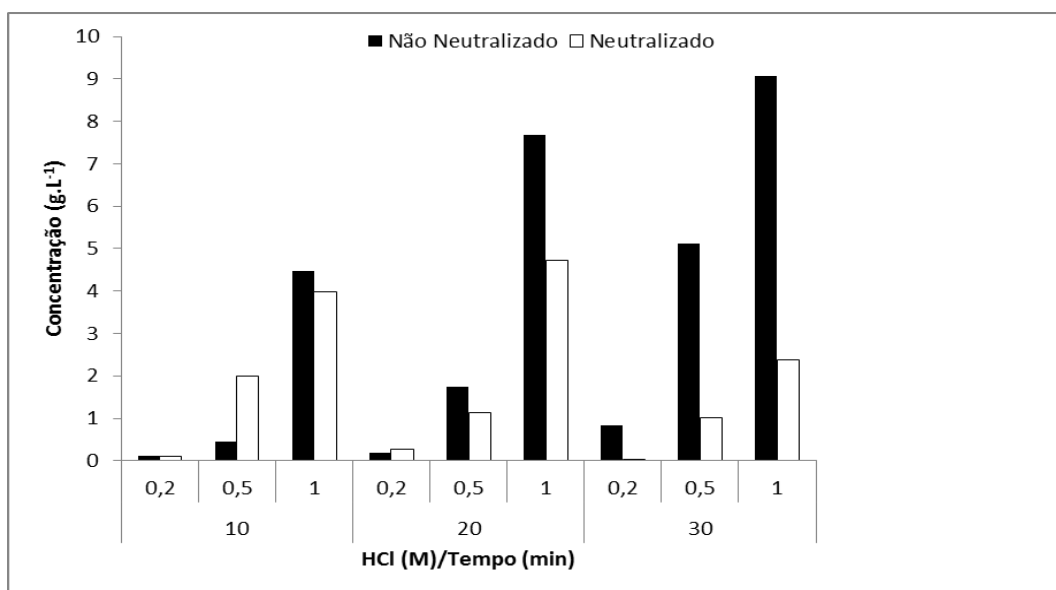
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{cal}
Regressão	9,22383333	4	2,30595833	25,38
Resíduo	3,167568	2	1,583784	
Falta de ajuste (FA)	3,047518	1	3,047518	
Erro puro (EP)	0,120050	1	0,120050	
Total	1,31028	5		
R ²	0,66			
F _{tab} (85% de confiança)				^a F _(4,1) =24,58

^a F_{calc} para a falta de ajuste = MQ_{FA}/MQ_{EP}

4. 6. Teores de ácido acético (inibidor de fermentação)

No presente estudo analisou-se, por CLAE, a formação dos inibidores da fermentação gerados na hidrólise ácida da alga *H. musciformis*. Em todos os hidrolisados foram observados a presença dos inibidores furfural e ácido acético. A Figura 18 apresenta os teores de ácido acético nos hidrolisados da alga *H. musciformis*, neutralizados e não-neutralizados com Ca(OH)₂.

Figura 18 - Concentrações do ácido acético formado durante a hidrólise ácida da alga *H. musciformis*.



A concentração de ácido acético variou de 0,02 a 4,71 g.L⁻¹ e de 0,45 a 9,07; nos hidrolisados neutralizados e não-neutralizados, respectivamente, mostrando uma diminuição na concentração desse inibidor quando os hidrolisados foram neutralizados com Ca(OH)₂ (Figura 19). Yazdani *et al.* (2011) avaliando a conversão de celulose e hemicelulose em açúcares monoméricos da alga *Nizimuddiniana zanardini* observaram a presença de inibidores durante a hidrólise (7% H₂SO₄; 60 min), onde a concentração máxima de ácido acético foi de 31,8 g/Kg. Nos estudos de Rocha *et al.* (2011), a hidrólise do bagaço de caju com ácido sulfúrico diluído formou uma concentração de ácido acético de 2,73 g.L⁻¹.

A condição de hidrólise (0,5/20) não-neutralizada da alga *H. musciformis* apresentou uma baixa concentração de ácido acético, a qual ainda sofreu diminuição quando neutralizada com Ca(OH)₂. Por esse fato, aliado a uma boa eficiência de hidrólise e ao alto teor de açúcar redutor essa condição foi selecionada para ser fermentada por *S. cerevisiae* para a obtenção de etanol.

Com relação aos compostos furânicos, o furfural apresentou concentração média, nos hidrolisados da alga *H. musciformis*, de 1,75 g.L⁻¹ e concentrações de HMF não foram observadas. Nos estudos de Yazdani *et al.* (2011), mencionado anteriormente, a concentração de furfural foi de, aproximadamente, 0,83 g/kg e concentrações de HMF não foram detectadas em todo o experimento.

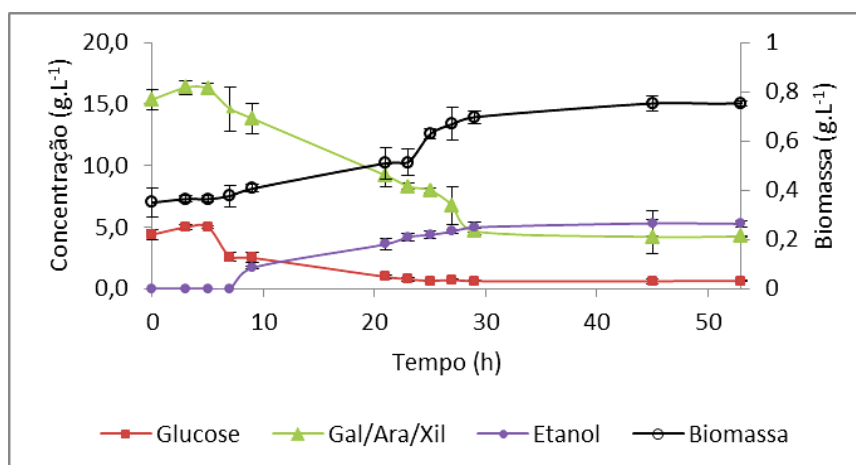
Hargreaves *et al.* (2013) avaliaram a remoção de HMF nos hidrolisados de *K. alvarezii* para a produção de etanol utilizando carvão ativado, onde obtiveram a diminuição na concentração de HMF de 35 para 1,5 g.L⁻¹.

4. 7. Cinética fermentativa e produção de etanol a partir do hidrolisado (0,5/20) da alga *H. musciformis*

A cinética fermentativa do hidrolisado 0,5/20 de *H. musciformis* está mostrada na Figura 19. Diante dos resultados obtidos foi possível observar que ambos os monossacarídeos (glicose e galactose) foram consumidos simultaneamente, no entanto esse consumo só foi iniciado após 7 horas de fermentação, sendo que após 52 h de experimento 82,5% da glicose e 72% da galactose já tinham sido consumidas. Vale ressaltar ainda que não foi verificado crescimento acentuado da biomassa (*S. cerevisiae*), uma vez que a diferença entre as concentrações inicial e final foi de 0,4 g.L⁻¹.

Rocha *et al.* (2011) em seus estudos sobre a produção de etanol a partir do bagaço de caju (biocombustível de 2ª geração) produziram 8,0 g.L⁻¹ de etanol após 24 h de fermentação quando a levedura *Kluyveromyces marxianus* consumiu completamente a glicose presente no meio. Resultado semelhante foi observado no presente estudo quando a levedura *S. cerevisiae*, após 29 h de fermentação, já havia consumido a glicose presente no meio, obtendo uma produção de 5,3 g.L⁻¹ de etanol.

Figura 19 – Cinética fermentativa do hidrolisado (0,5/20) da alga *H. musciformis* pela levedura *S. cerevisiae*.



Já a produção máxima de etanol, no presente estudo, foi de $5,3 \text{ g.L}^{-1}$ após 52 h de fermentação, representando uma eficiência fermentativa de 50% do volume de produção teórico do etanol, evidenciando assim a habilidade da *S. cerevisiae* em fermentar a galactose proveniente da matéria-prima algácea com um rendimento de 0,1 g de bioetanol/g de alga seca. Esses resultados permitiram calcular as produtividades em biomassa e etanol, bem como os fatores de conversão de substrato em biomassa e etanol e etanol por biomassa, os quais estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Fatores de conversão (Y) e produtividade (P) obtidos nos ensaios fermentativos do hidrolisado (0,5/20) da alga *H. musciformis*.

$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$P_X (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$	$P_P (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$
0,030	0,315	0,08	0,008	0,100

Os resultados obtidos mostraram que a conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) foi de 0,03, isto é, 0,03 g de célula foi produzida por grama de substrato. Já a conversão de etanol por biomassa ($Y_{P/X}$) apresentou um valor de 0,08, ou seja, 0,08 g de etanol foi produzido por grama de célula e a conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) foi de 0,315, significando dizer que 0,315 g de etanol foi produzido por grama de substrato.

Quanto às produtividades em biomassa e em etanol, foram verificados valores de $0,008 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,100 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Hargreaves *et al.* (2013) avaliaram duas estratégias para a produção de etanol de 3ª geração a partir de *K. alvarezii*. A primeira tratou da produção de etanol em uma única etapa: sacarificação ácida seguida de enzimática de 33,3% (m/m) de alga seca e co-fermentação (*S. cerevisiae* CBS1782) da fração líquida e do resíduo do pré-tratamento. Já a segunda tratou da produção de etanol em duas etapas: fermentação da fração líquida rica em galactose ($81,5 \text{ g.L}^{-1}$) e sacarificação e co-fermentação do resíduo do pré-tratamento. Os resultados mostraram produções máximas de 64 g.L^{-1} de etanol para a primeira estratégia e 38 e 53 g.L^{-1} para a segunda estratégia totalizando 91 g.L^{-1} . Obtiveram ainda uma taxa de conversão de 0,457 g de etanol/g de substrato consumido. Diante dos resultados foi possível calcular a possibilidade de obtenção de 105 L de etanol por tonelada de alga seca.

Ge *et al.* (2011) em seus estudos sobre a sacarificação do resíduo da extração de alginato da alga *L. japonica* verificaram que a 0,1% de H₂SO₄ a 121 °C por 1,0 h seguido de hidrólise enzimática (celulase e celobiase) a concentração de glicose alcançou seu valor máximo (277,5 mg/g de resíduo) e uma taxa de conversão de celulose de 92,5%. Após rotaevaporação e a concentração de glucose no hidrolisado foi para 34 g.L⁻¹ e após fermentação por *S. cerevisiae* foi observado um rendimento máximo de 14,0 g.L⁻¹ de etanol representando uma taxa de conversão de 41,2% e um rendimento teórico de 80,8%. Esse resultado demonstrou que 0,143 L de etanol poderia ser produzido a partir da utilização de 1 Kg de resíduo de alga processada.

Em um outro estudo sobre a sacarificação da alga *L. japonica*, Kim *et al.* (2011) observaram que a bactéria *Escherichia coli* KO11 recombinante era capaz de produzir etanol 25,8 g.L⁻¹ após 116 h de fermentação a partir de um hidrolisado de 180 g da alga com HCl 0,1 N, a 121°C por 15 min, rico em manitol (90 g.L⁻¹), representando uma taxa de conversão de 0,41 g de etanol/g de manitol.

Lee e Lee (2012) avaliando a fermentação do manitol por diferentes leveduras observaram que a *S. cerevisiae* (KCCM50550) foi hábil em produzir 2,7 g.L⁻¹ de etanol a partir de 10 g.L⁻¹ de manitol.

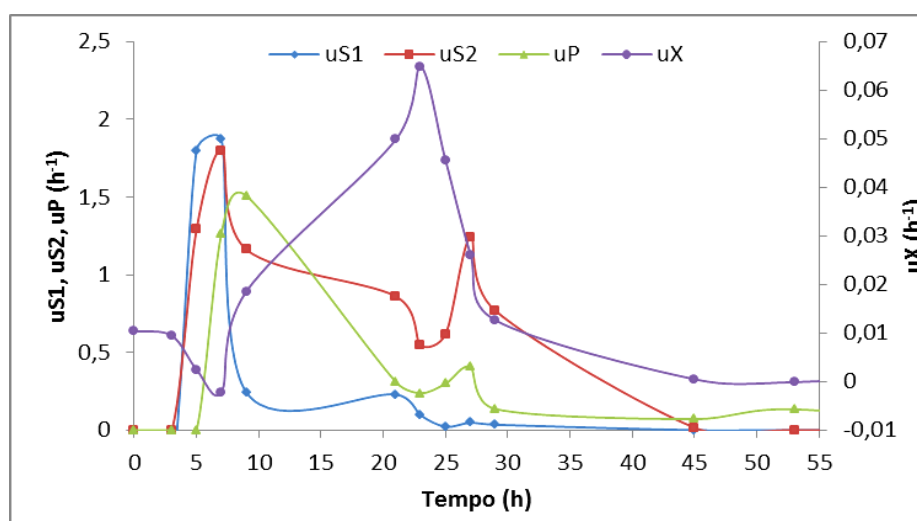
Estudos de parâmetros cinéticos na produção de etanol a partir de biomassa algácea (biocombustível de 3ª geração) ainda são escassos na literatura o que levou a comparações com bioetanol de 2ª geração produzido a partir de bagaço de caju por *K. marxianus* onde foi observado produtividade de etanol de 0,13 g.L⁻¹.h⁻¹.e uma taxa de conversão de 0,231 g de etanol/g de substrato (ROCHA *et al.*, 2011).

A Figura 19 apresenta as velocidades de crescimento (μ_X), consumo do substrato - μ_{S1} (glucose); μ_{S2} (galactose) , e produção de etanol (μ_P) durante a fermentação por *S. cerevisiae* do hidrolisado 0,5/20 da alga *H. musciformis*. As velocidades específicas de consumo de substrato e formação de etanol apresentaram comportamento típico de uma fermentação alcoólica.

As velocidades específicas de consumo do substrato (μ_S) e produção de etanol (μ_P) apresentaram perfis similares, uma vez que esses parâmetros possuem uma correlação direta. Nos resultados expostos na Figura 18, a formação de etanol não mostrou-se associada ao crescimento da levedura, mas ao consumo do substrato.

O perfil da Figura 20 apresenta certa similaridade com o obtido por Rocha *et al.* (2011) quando estudaram os mesmos parâmetros cinéticos na fermentação do bagaço de caju por *Kluyveromyces marxianus* CE025.

Figura 20 – Velocidades específicas de crescimento (μ_X), dos substratos μ_{S1} (glucose) e μ_{S2} (galactose) e da produção de etanol (μ_P) durante a fermentação do hidrolisado da alga marinha vermelha *H. musciformis* (0,5/20) por *S. cerevisiae*.



Nas primeiras horas de fermentação, foi observado uma maior velocidade de consumo dos substratos acompanhado da velocidade de produção de etanol. Próximo a 10^a hora de fermentação a velocidade de consumo do substrato μ_{S1} (glucose) diminuiu em virtude da diminuição da sua concentração, diferente do que foi observado para o substrato μ_{S2} (galactose). Nessa fase, enquanto a galactose está sendo consumida devagar, há um aumento na velocidade de crescimento celular. Isso sugere que, com a diminuição de glucose no meio fermentativo, o microrganismo adaptou-se ao meio contendo galactose, utilizando esse monossacarídeo não mais para produzir etanol, mas sim para o seu crescimento celular.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que a alga marinha vermelha *H. musciformis*, abundante no litoral cearense, mostrou-se uma potencial fonte renovável de biomassa para a produção de bioetanol. No entanto, demais estudos são necessários para otimizar e aperfeiçoar o processo produtivo de bioetanol a partir desses organismos.

6. REFERÊNCIAS

- ADAM, J. M.; GALLAGHER, J. A.; DONNISON, I. S. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatment. **J. Appl. Phycool.** 21: 569-574, 2009.
- ALZATE, C. A. C.; TORO, O. J. S. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. **Energy.** v.31, p.2447-2459, 2006.
- ARMAN, M.; QUADER, S. A. U. Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism. **Carbohydrate Polymers.** 88:1264-1271, 2012.
- BALAT M.; BALAT H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Appl Energ.** 86(11): 2273 – 82, 2009
- BERCHEZ, F. A. S.; OLIVEIRA, E. C. Maricultural essays with the carrageenophyte *Hypnea musciformis* in São Paulo, Brazil. In: E.C. Oliveira & N. Kautsky (eds.). **Cultivation of Seaweeds in Latin America.** Universidade de São Paulo, São Paulo, pp.89-94, 1989
- BNDES, CGEE. Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.** Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- BORINES, M. G.; DE LEON, R. L.; MCHENRY, M. P. Bioethanol production from farming non-food macroalgae in Pacific island nations: Chemical constituents, bioethanol yields, and prospective species in the Philippines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** 2011.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: Schmidell, Willibaldo et al.(Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** São Paulo: Edgar Blücher, p. 205-222 (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.
- CARVALHO FILHO, J. Algas uma alternativa para as comunidades costeiras? **Panorama da Aquicultura,** 14(84): 53-56, 2004
- CYSEWSKI, G. R.; WILKIE, C. W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering.** v. 20, p.1421-1430, 1978.
- FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Schmidell et al.(Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** São Paulo: Edgar Blücher, 223-246, 2001.
- FURTADO, M.R.. Alta lucratividade atrai investimentos em hidrocolóides. **Química e Derivados:** 21-29, 1999.

HAHN-HÄGERDAL; et al. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology**, v.24, n.12, p.549-556, 2006.

HARGREAVES, P. I; *et al.*, Production of Ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of Different Process Strategies, **Bioresource Technology**, p.257-253, 2013.

HOLANDA, M. L. Iota carragenanas da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* versus iota carragenanas comercial: Propriedades estruturais e reológicas. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Ceará, 2007.

KESHWANI, D. R. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual da Carolina do Norte, Carolina do Norte, Estados Unidos da América, 2009.

KIM, NAG-JONG; *et al.* Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* K011. **Bioresource Technology**, p.7466-7469, 2011.

KURUNAKARAN, S.; GURUSAMY, R. Bioethanol production as renewable biofuel from Rhodophytes feedstock. **International Journal of Biological Technology**.2(2): 94-99, 2011.

KHAMBHATY, Y. *et al.* *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol, **Bioresour. Technol.** 103: 180–185, 2012.

LEE, S., LEE, J. Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. p.16-18, 2012

LEITE, A. D. **A energia do Brasil**. 2.ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Alcohol production and recovery. In: Fechter, A. **Advances in biochemical engineering**. **Herdelberg Spring Verlag**, v.20, p.41-73, 1981.

MARTINS D. B. The - galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. **Curr Microbiol** v.44, p.379–382, 2002.

MASUDA, M. Overview of *Hypnea* (Rhodophyta, Hypneaceae). In: I.A. Abbott (ed.). **Taxonomy of Economic Seaweeds**. California Sea Grant College System, La Jolla, v. 6, pp. 127-133, 1997.

MEINITA, M. D. N., HONG, Y. K. Comparison of sulfuric and hydrochloric acids as catalysts in hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, p, 123–128, 2012.

MIRANDA, G. E. C.; BEZERRA, C. A. B.; TEIXEIRA, D. I. A. **Cultivo de algas marinhas. Noções básicas**. Brasília, Ed. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Abastecimento – FAO, 2004.

MIKHAILOVA, I; BASTIANI, N. Mercado de carbono: a inserção da economia brasileira. In: **VII Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**. Fortaleza, 2007.

NAGANO, C.S, *et al.* Purification and characterization of lectins from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide Letters** 9: 159-165, 2002.

NEUSHUL, M.. Antiviral carbohydrates from marine red algae. **Hidrobiologia**, 204/205: 99-104, 1990

NIGAM, P.S., SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Prog. Energy Combust. Sci.** doi:10.1016/j.pecs.2010.01.003, 2010

NUNES, J. M. C. Rodófitas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 410p, 2005

OLIVEIRA, E.C. The seaweeds resources of Brazil. Pp. 366-371. In: A.T. Critchley & O. Masao (eds.). **Seaweeds resources of the world**. Japan International Cooperation Agency, Pp. 366-371, 1998

PARK, J-H; *et al.* Use of *Gelidium amansii* as a promising resource for bioethanol: A practical approach for continuous dilute-acid hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, 2012.

PIACENTE, E. A. Perspectivas do Brasil no mercado internacional de etanol..189f. **Dissertação de Mestrado** em Engenharia Mecânica - Faculdade de Engenharia Mecânica, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 189p, 2006.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. **Tese Doutorado** em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

REIS, R.P; *et al.* Efeito de fatores bióticos no crescimento de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta Gigartinales). **Acta Botanica Brasilica** 17: 279-286, 2003

ROCHA, M. V. P. Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa. **Tese de Doutorado** em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

ROCHA, M. V. P; *et al.* Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025, **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p.1099–1107, 2011.

RODRIGUES, M. I.; ANDRIETTA, S. R.; MAUREGI FILHO, F. Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores operando em condições ideais e não-ideais de mistura. **STAB, açúcar, álcool e subprodutos**, v.10, n.5, p.35-47, 1992.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal Industry Microbiology Biotechnology**, v.30, p.279–291, 2003.

SANTOS, J. R.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.11, n. 1, p. 27-33. Campina Grande, 2009.

SCHENKMAN, R.P.F. Biomassa, crescimento, reprodução e ficocolóide de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 73p. 1980

SCHENKMAN, R.P.F. Cultura de *Hypnea* (Rhodophyta) *in vitro* como subsídio para estudos morfológicos, reprodutivos e taxonômicos. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 81p. 1986.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI , M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al.(Coord.). **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, v. 2, p. 179-192, 2001.

SILVA, O. G. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar. **Trabalho de Graduação** apresentado ao Curso de Tecnologia de Biocombustíveis da Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010.

SIQUEIRA, E. P. F. Efeito da temperatura na cinética da fermentação alcóolica contínua com alta densidade celular. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campina – UNICAMP) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 89p 1997

SJORJ VAN IERSEL. Algae-based biofuels. **Ecofys**, 39-53, 2008.

STANLEY, N. Production, properties and uses of carrageenan. In: MCHUGH, D. J. (Ed.) Production and utilization of products from commercial seaweeds. Roma: FAO **Fisheries technical paper**, v. 288, p. 116-146, 1987.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Resuce inhibition of enzymatic hydrolysis of steam – pretreated softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 835-844, 2001.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, vol. 29, n. 2, p.338-350, 2006.

TOSSETO, G. M. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. **Dissertação de Mestrado** em Engenharia

Química. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 95p, 2002.

TRONO JR. G. C.; GANZON-FORTES. E. Philippine seaweeds. Philippines: **National Bookstore Inc.**; 1988.

TSAO, G. T. Conversion of cellulose. In: Alani, D. I.; Moo-Young, M. Perspectives in biotechnology and applied microbiology. London: **Elsevier Applied Science Publishers**, p.203-222, 1986.

VAN DE VELDE, F. *et al.* ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Food Science & Technology**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VERENIUM – The nature of energy. (2008). Energy independence and security act of 2007 (EISA). Disponível em www.verenium.com. Acesso em 13 de julho de 2013.

WI, S. G; *et al.* The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. **Bioresour Technol.** 100: 6658–6660, 2009.

YAZDANI, P.; KORIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. Improvement of enzymatic hydrolysis of a marine macro-alga by dilute acid hydrolysis pretreatment. **Bioenergy Technology**, p.186-191, 2011.

YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. **Journal of Applied Phycology** 4: 339-345, 1992a.

YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. **Ciencias Marina**, 18: 49-64, 1992b.

ZARPELLON, F.; ANDRIETTA, S. R. Fermentação Contínua para Produção de Alcool. **STAB Açúcar e Alcool e Subprodutos**, p. 23-28, 1992.