



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA EM PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL – PEI

JULIANA MARIA ANDRADE DE CARVALHO

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO A
PARTIR DE *EUGLENA GRACILIS***

Salvador
2018

JULIANA MARIA ANDRADE DE CARVALHO

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO A
PARTIR DE *EUGLENA GRACILIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Engenharia Industrial, Faculdade Politécnica, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Andrade Sales

Salvador
2018

Andrade de Carvalho, Juliana Maria
PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO A PARTIR
DE EUGLENA GRACILIS / Juliana Maria Andrade de
Carvalho. -- Salvador, 2018.
69 f. : il

Orientador: Emerson Andrade Sales.
Coorientadora: Alice Costa Kiperstok.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós graduação em
Engenharia Industrial (PEI)) -- Universidade Federal
da Bahia, Escola Politécnica da UFBA, 2018.

1. Bioetanol. 2. Microalga. 3. Biotecnologia. I.
Sales, Emerson Andrade. II. Kiperstok, Alice Costa.
III. Título.

**“PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO A PARTIR DE
EUGLENA GRACILIS”.**

JULIANA MARIA ANDRADE DE CARVALHO

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Industrial.

Examinada por:

Prof. Dr. Emerson Andrade Sales

Doutor em Ciências/Engenharia Química pela Universidade Paris7, França, 1996

Prof. Dr. Alice Costa Kiperstok

Doutora em Biotecnologia pela Universidade de Köln, Alemanha, 2016

Prof. Dr. Carlos Joulbert Alves de Souza

Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil, 2014

Prof. Dr. Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque

Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Brasil, 2005

Salvador, BA - BRASIL
Junho/2018

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço à minha mãe e a meu irmão pelo amor, pelo apoio e compreensão.

Agradeço a meu namorado, Vitor, por me levantar todas as vezes que precisei de ajuda e por me mostrar que eu sempre sou capaz de realizar os meus sonhos.

Agradeço a meu pai científico, Emerson Andrade Sales, que além de professor desempenhou de forma ímpar o papel de amigo ao me mostrar sempre o lado bom das situações.

Agradeço a toda equipe do LABEC (Laboratório de Bioenergia e Catálise), pelas risadas e momentos de colaboração.

Agradeço às pessoas que conheci durante essa caminhada: Carlos Levedura, Roberta Euglena e Alice. Vocês foram fundamentais.

Ao Museu Nacional de História Natural (MNHM – Paris) por ceder a cepa de *Euglena gracilis* para a confecção deste trabalho.

E por fim, mas não menos importante, eu agradeço a meus amigos. Sem vocês eu não seria nada.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

CARVALHO, JULIANA MARIA ANDRADE. PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO A PARTIR DE EUGLENA GRACILIS. 69 P. IL. 2018. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – PROGRAMA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL, ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, SALVADOR 2018.

RESUMO

Atualmente, as microalgas são consideradas uma fonte promissora de energia para a produção de biocombustíveis pelo fato de apresentarem rápido crescimento, não necessitarem de terras aráveis para seu cultivo e não contribuírem para o aquecimento global ou a emissão de gases de efeito estufa. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é desenvolver uma metodologia para a produção de bioetanol a partir de biomassa da microalga *Euglena gracilis* (espécie ainda não estudada). Alguns parâmetros foram avaliados com intuito de aumentar a produção de paramylon como, meio de cultivo (mineral e lactato), métodos de separação da biomassa (centrífuga e rotaevaporador) e estresse com FeCl₂. Além disso, tipos de hidrólise (ácida e enzimática) foram avaliadas visando o aumento da produção de bioetanol. A etapa de hidrólise foi importante para a produção de açúcares redutores. Ácido sulfúrico diluído (0,06% (v/v)) foi utilizado na hidrólise ácida e a mesma aconteceu em uma autoclave vertical a 127 °C e 10 minutos. Já a hidrólise enzimática foi realizada pela Cellulase (50 mL/L) por 72 h. As amostras hidrolisadas foram fermentadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e avaliou-se a produção de bioetanol em diferentes tempos de fermentação (3h, 1h e 30 min). O bioetanol foi caracterizado e quantificado por cromatografia gasosa (CG-FID). A centrifugação como método de separação de biomassa resultou em maiores concentrações de açúcar redutor. O tempo de fermentação de 30 minutos gerou maiores concentrações de etanol e, o maior rendimento da fermentação (50%) foi obtido partindo-se de um cultivo mixotrófico e hidrólise enzimática a partir de uma concentração inicial cerca de 15g/L de biomassa seca. Estes resultados podem tornar *E. gracilis* uma matéria-prima potencial para a produção de bioetanol.

Palavras-chave: Bioetanol, *Euglena gracilis*, microalga

CARVALHO, JULIANA MARIA ANDRADE. THIRD GENERATION BIOETHANOL PRODUCTION FROM EUGLENA GRACILIS. 69 P. IL. 2018. MASTER DISSERTATION – PROGRAMA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL, ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, SALVADOR 2018

ABSTRACT

Microalgae are considered a promising source of energy for the production of biofuels because they are fast growing, do not require arable land for their cultivation and do not contribute to global warming or the emission of greenhouse gases. In this context, the objective of the present work is to develop a methodology for the production of bioethanol from biomass of the microalga *E. gracilis* (species not yet studied). Some parameters were evaluated in order to increase the production of paramylon as a culture medium (mineral and lactate), methods of separation of biomass (centrifuge and rotavaporator) and stress with FeCl₂. In addition, types of hydrolysis (acid and enzymatic) were evaluated aiming at increasing the production of bioethanol. The hydrolysis step was important for the production of reducing sugars. Dilute sulfuric acid (0.06% (v / v)) was used in the acid hydrolysis and it was performed in a vertical autoclave at 127 ° C and 10 minutes. The enzymatic hydrolysis was performed by Cellulase (50 mL / L) for 72 h. The hydrolyzed samples were fermented by *Saccharomyces cerevisiae* yeast and the bioethanol production was evaluated at different fermentation times (3h, 1 h and 30 minutes). Bioethanol was characterized and quantified by gas chromatography (GC-FID). Centrifugation method for biomass separation resulted in higher concentrations of reducing sugar. The fermentation time of 30 minutes generated higher concentrations of ethanol and the highest yield of the fermentation (50%) was obtained starting from a mixotrophic culture and enzymatic hydrolysis from an initial concentration of about 15 g/L of dry biomass. These results may become *E. gracilis* one potential feedstock for the production of bioethanol.

Keywords: Bioethanol, *Euglena gracilis*, microalgae

LISTA DE ABREVIações

MSRA – Amostras cultivadas em meio mineral, com adição de cloreto de ferro (II), biomassa separada por meio do rotaevaporador e hidrolisadas com ácido sulfúrico

MSCA - Amostras cultivadas em meio mineral, com adição de cloreto de ferro (II), biomassa separada por meio de centrífuga e hidrolisadas com ácido sulfúrico

LSCA - Amostras cultivadas em meio lactato, com adição de cloreto de ferro (II), biomassa separada por meio de centrífuga e hidrolisadas com ácido sulfúrico

LNsCA - Amostras cultivadas em meio lactato, sem adição de cloreto de ferro (II), biomassa separada por meio de centrífuga e hidrolisadas com ácido sulfúrico

LSCE - Amostras cultivadas em meio lactato, com adição de cloreto de ferro (II), biomassa separada por meio de centrífuga e hidrolisadas com enzima

LNsCE - Amostras cultivadas em meio lactato, sem adição de cloreto de ferro (II), biomassa separada por meio de centrífuga e hidrolisadas enzima

MNsCE - Amostras cultivadas em meio mineral, sem adição de cloreto de ferro (II), biomassa separada por meio de centrífuga e hidrolisadas enzima

Paramylon – (2S, 3R, 4S, 5R, 6R)-2-[2R,3R,4R,5S)-3,5-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-4-il]oxi-4-[(2S,3R,5S,6R)-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-6-(hidroximetil)oxano-3,5-diol

HMF – 5-hidroximetilfurfural

ANOVA – Análise de Variância

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução da Matriz Energética Brasileira no período de 2012 a 2021 por fonte energética	14
Figura 2 - Fluxograma de produção de bioetanol de terceira geração.....	20
Figura 3 - Fotografia de células da espécie <i>Euglena gracilis</i> cultivada em meio líquido arsênico.....	23
Figura 4 - Reação de oxidação do grupo aldeído com o ácido DNS	26
Figura 5 - Fluxograma do Experimento 01	32
Figura 6 - Fluxograma do Experimento 02	32
Figura 7 - Fluxograma do Experimento 03.....	33
Figura 8 - Curva de crescimento da <i>E. gracilis</i> no meio Mineral e Lactato	37
Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados ($\alpha = 0,1$).....	39
Figura 10 - Micrografias amostras MSCA (a) antes da separação da biomassa e (b) em condições de estresse com aumento de 400x.....	42
Figura 11 - Influência da adição do FeCl_2 na produção de biomassa a partir de cultivos mixotróficos (L). Às amostras LS foram adicionados o reagente e às amostras LNs não foram adicionados	43
Figura 12 - Rendimento de açúcar redutor das amostras cultivadas em meio mixotrófico que diferiram em relação à adição de FeCl_2 e hidrólise, ácida (A) e enzimática (E)	45
Figura 13 - Concentrações de HMF (g/L) das amostras dos Experimentos 01 e 02 hidrolisadas com ácido sulfúrico (0,06% v/v)	47
Figura 14 - Concentração de etanol (g/L) das amostras do Experimento 02 cujas alíquotas de fermentação foram retiradas em um intervalo de tempo de 1h	49
Figura 15 - Estruturas químicas do (a) amido e (b) paramylon	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os rendimentos de bioetanol de primeira, segunda e terceira gerações encontrados experimentalmente	19
Tabela 2 - Percentual de composição química de fontes de alimento humano comparado a diferentes espécies de microalgas.....	21
Tabela 3 - Fatores e seus valores associados para realização do planejamento experimental da hidrólise ácida	30
Tabela 4 - Resultados da variável resposta (açúcares redutores) em g/L gerados a partir do planejamento experimental realizado neste trabalho	38
Tabela 5 - Análise de variância dos dados a 90% de confiança.....	39
Tabela 6 - Concentração de açúcar redutor, biomassa seca e rendimento para as amostras cultivadas em meio mineral e hidrolisadas com ácido sulfúrico, diferindo no método de separação, centrífuga (C) e rotaevaporador (R).....	40
Tabela 7 - Concentração de açúcares redutores das amostras cultivadas em meio lactato (L). As amostras diferiram em relação à adição de FeCl ₂ e hidrólise, ácida (A) e enzimática (E)	44
Tabela 8 - Concentração de açúcares redutores obtidos pelas amostras cultivadas em diferentes meios (lactato e mineral) através da hidrólise enzimática (E)	46
Tabela 9 - Concentração de etanol (g/L) das amostras do Experimento 01.....	48
Tabela 10- Rendimentos da fermentação das amostras do Experimento 02.....	50
Tabela 11 - Concentração de etanol (g/L) das amostras do Experimento 03.....	51
Tabela 12 - Rendimentos da fermentação das amostras do Experimento 03....	51
Tabela 13 - Rendimento (%) da fermentação alcoólica com base na biomassa seca	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS	14
3.2 BIOETANOL.....	15
3.2.1. Bioetanol de primeira geração	16
3.2.2. Bioetanol de segunda geração	16
3.3 PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO	19
3.3.1 As Microalgas	20
3.3.2 Ruptura Celular	23
3.3.3 Sacarificação ou Hidrólise	25
3.3.4 Fermentação Alcoólica	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MANUTENÇÃO DE CULTIVO	30
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA HIDRÓLISE ÁCIDA DE AMIDO COMERCIAL	30
4.3 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE <i>E. GRACILIS</i>	31
4.3.1 Cultivo da microalga <i>E. gracilis</i>	31
4.3.2 Desenhos experimentais para a produção de etanol a partir de <i>E. gracilis</i>	31
4.3.3 Separação da biomassa e adição do FeCl₂	33
4.3.4 Hidrólise ácida do <i>paramylon</i>	33
4.3.5 Hidrólise enzimática do <i>paramylon</i>	33
4.3.6 Análise do 5-hidroximetilfurfural (HMF)	34
4.3.7 Análise dos açúcares redutores	34
4.3.8 Fermentação alcóolica	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. CURVA DE CRESCIMENTO	37
5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
5.3 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA E <i>PARAMYLON</i> , UTILIZANDO MEIO MINERAL.....	40
5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA E AÇÚCARES REDUTORES EM CULTIVOS MIXOTRÓFICOS SOB EFEITO DO FECL ₂	42
5.5 ANÁLISE DE HMF	47
5.6 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO E DA ADIÇÃO DE FECL ₂ NA PRODUÇÃO DE ETANOL	48
6 CONCLUSÕES	56
7 TRABALHOS FUTUROS	58
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Devido a comportamentos estáveis dos preços no mercado internacional e das reservas distribuídas pelo mundo, os combustíveis fósseis ainda são largamente utilizados (STAVELA, TÁSSIA; ARAÚJO, THAIS; PORTO, 2014). O carvão mineral continua sendo a principal fonte de produção de energia termoelétrica e energia térmica. Nos EUA, por exemplo, indústrias utilizam carvão nos processos de produção, e na fabricação de aço (MATTOZO, 2002; KELMAN, 2008). A descoberta do petróleo, combustível fóssil constituído majoritariamente por uma mistura de hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) e pequenas parcelas de compostos sulfurados, nitrogenados, oxigenados, resinas e asfaltenos (THOMAS, 2004), foi de suma importância para alavancar a produção, em 1876, de motores a combustão, consolidando a Revolução Industrial (PEREIRA, 2008). Já o gás natural, constituído de hidrocarboneto pode ser utilizado tanto como combustível industrial e doméstico, como matéria-prima para sínteses químicas (DIONYSIO, RENATA BARBOSA; MEIRELLES, 2015) e, assim como os combustíveis fósseis citados, também é utilizado intensamente em diversos países no mundo (CNI, 2014).

O crescimento acelerado do uso de combustíveis fósseis como fonte de energia traz consequências de ordem econômica e ambiental, a exemplo do aumento do preço dos combustíveis à base de petróleo (crise do petróleo), a devastação ambiental, o aquecimento global e as emissões de dióxidos de carbono e de enxofre que contribuem para o aumento dos índices de gases de efeito estufa, material particulado e chuva ácida na atmosfera (JOHN et al., 2011; SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012). Em 2006, os estudos mostraram que, no mundo, as emissões de dióxido de carbono (CO₂), derivados da queima de combustíveis fósseis, aumentaram mais de 20%, atingindo um valor de 8,38 bilhões de toneladas quando comparado ao ano de 2000 (ECODEBATE, 2008).

Diante disso, buscam-se fontes de energia que não sejam apenas renováveis, mas sustentáveis no sentido mais amplo do termo, isto é, fontes que apresentem reduzido impacto ao meio ambiente, com emissões mais baixas de gases de efeito estufa considerando o ciclo total, menor degradação ao solo, mínimo consumo de água e energia no processo de produção. Além disso, elas devem levar em conta a saúde das pessoas e serem economicamente rentáveis.

Dentre os biocombustíveis disponíveis no mercado, o bioetanol destaca-se por apresentar menor toxicidade, ser facilmente biodegradável e emitir menos poluentes (JOHN et al., 2011). Ele pode ser produzido a partir de matérias primas como cana-de-açúcar e beterraba (primeira geração), lignocelulósica (segunda geração) e, recentemente, microalgal (terceira geração), que vem se destacando por se desenvolver em menor extensão de terra, não comprometer as áreas produtivas, nem florestas tropicais e por ter maior produtividade por área quando comparadas às matérias primas utilizadas na produção dos biocombustíveis de primeira e segunda geração (SUBHADRA; EDWARDS, 2010; KLEIN, 2013).

Atualmente, alguns trabalhos envolvendo produção de bioetanol a partir de *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorococcum humicola*, *Chlorococcum infusionum* e *Scenedesmus obliquus* apresentam altos rendimentos de etanol (NGUYEN et al., 2009; HARUN et al., 2011; HARUN; DANQUAH, 2011; MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012a; LEE et al., 2013). No entanto, as espécies utilizadas apresentam parede celular rígida e, dessa forma, a liberação de polissacarídeo para a produção de bioetanol podem demandar alto consumo de energia, compostos químicos corrosivos, resultando em altos custos de processo (HARUN et al., 2014; GÜNERKEN et al., 2015; PASSOS; CARRETERO; FERRER, 2015).

Neste trabalho, utilizou-se a *Euglena gracilis*, uma espécie de microalga que não apresenta parede celular rígida, para a produção de bioetanol a partir do polissacarídeo *paramylon* produzido pela mesma. A microalga foi cultivada em meio mineral (cultivo autotrófico) e lactato (cultivo mixotrófico) e, nesse sentido, foram avaliados protocolos de fermentação do açúcar microalgal por *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de encontrar uma metodologia que propicie os maiores rendimentos totais de etanol.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir bioetanol de terceira geração a partir de *Euglena gracilis* através de fermentação alcoólica utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

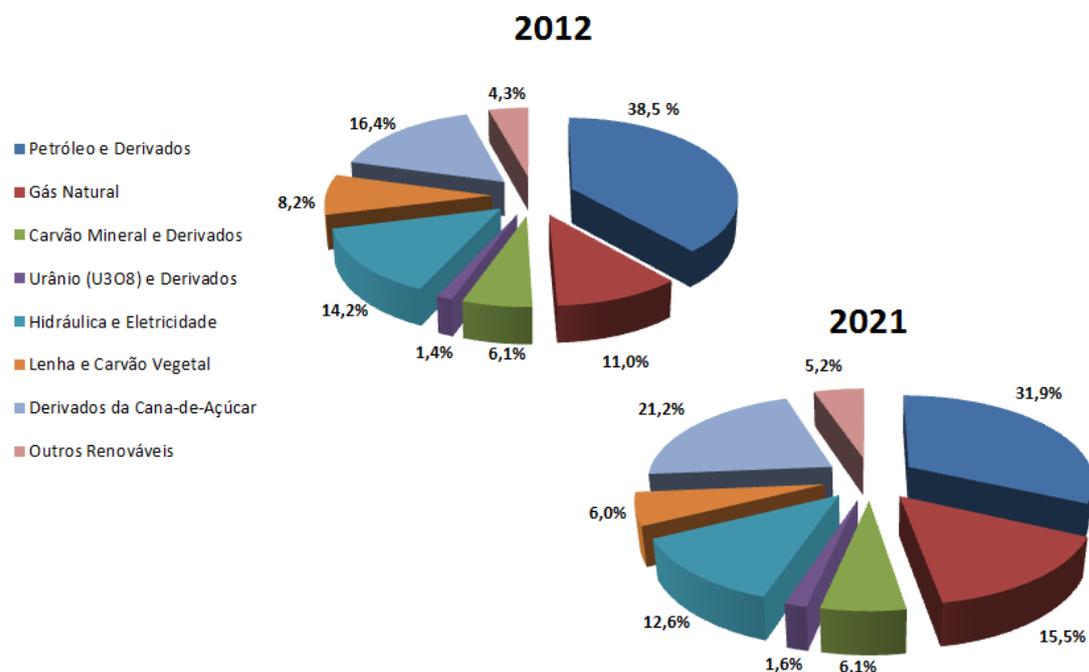
- Comparar o crescimento e produção de *paramylon* da espécie microalgal nos meios mineral e lactato;
- Avaliar a influência do FeCl_2 como fator de estresse no acúmulo de *paramylon* pela *E. gracilis*;
- Comparar a eficiência dos métodos de hidrólise ácida e enzimática na produção de açúcares redutores a partir da biomassa de *E. gracilis*;
- Comparar o rendimento global (g de bioetanol/g biomassa seca) para o processo estudado em função das principais variáveis: meio de cultivo e método de hidrólise

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Diante das agressões ambientais associadas aos combustíveis de origem fóssil, vários países começaram a investir em fontes alternativas, principalmente por fatores de segurança energética. Há uma crescente preocupação por fontes que sejam sustentáveis, renováveis, eficientes e de baixo custo. Isto é, com menores emissões de gases de efeito estufa, alinhando desenvolvimento econômico com a proteção ambiental a partir da geração de novos produtos (NIGAM; SINGH, 2011). Assim, há uma tendência significativa ao crescimento das fontes renováveis de energia, como também existe uma previsão de que haja um volume de combustível fóssil poupado em 2021, equivalente a 410 mil barris por dia (Fig. 1).

Figura 1 - Evolução da Matriz Energética Brasileira no período de 2012 a 2021 por fonte energética



Fonte: Adaptado de (BUENO, 2013)

Nesse contexto surge o termo biocombustível, referindo-se a qualquer combustível, no estado líquido ou gasoso, produzido predominantemente a partir de biomassa.

Dentre os biocombustíveis líquidos, pode-se citar o biodiesel e bioetanol como os mais utilizados no mundo (DEMIRBAS, 2008). Atualmente, o biodiesel, ésteres

monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa derivados de matérias-primas renováveis (PETROU et al., 2009), é produzido a partir de plantas oleaginosas como soja, girassol, mamona, dendê, entre outras. Porém, um estudo apresentado por Crutzen e colaboradores (2008) mostrou que o óxido nitroso (N_2O) emitido no ciclo de produção deste agro-biocombustível pode anular o efeito, a princípio benéfico do uso de biocombustíveis, na redução do aquecimento global. Isso porque, a emissão acelerada de N_2O no modo de produção usado pelo agronegócio pode apresentar um agravamento no aquecimento global, já que esta molécula tem um potencial de efeito estufa 296 vezes maior que uma molécula do dióxido de carbono.

Já na produção de bioetanol em larga escala, atualmente a partir de materiais fotossintetizantes (cana-de-açúcar, beterraba e milho) o CO_2 liberado é utilizado no crescimento das matérias-primas, fechando um ciclo sustentável. Além do uso como biocombustível, o etanol produzido pode ser utilizado nas indústrias sucroalcooleiras, tintas, solventes, aerossóis, bebidas, alimentos, cosméticos, aromatizantes, produtos de limpeza, remédio, vacinas e polímeros (PARAIZO, 2012)

3.2 BIOETANOL

Dentre os biocombustíveis líquidos e gasosos, presume-se que o bioetanol seja futuramente considerado como o mais promissor por ser facilmente biodegradável, menos tóxico, emitir menos poluentes com seu uso (JOHN et al., 2011), reduzir emissões de óxidos de nitrogênio, de material particulado (DEMİRBAŞ, 2005), de CO_2 e eliminar emissão de dióxido de enxofre, responsável pela chuva ácida (LASHINSKY, 2006). Além disso, apresenta índices elevados de octano, maior velocidade de ignição e calor de vaporização mais alto do que a gasolina, levando a uma maior taxa de compressão e menor tempo de queima (SOUZA et al., 2012).

Dessa forma, na década de 70, após vários estudos com o intuito de diminuir a dependência das importações do petróleo, surgiu no Brasil o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Este programa visou a substituição de derivados de petróleo por etanol produzido a partir da cana de açúcar (CARVALHO, SIMONE PEREIRA; CARRIJO, 2007). Já em 2004, foi implementado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) para inclusão do biodiesel à matriz energética brasileira (FINCO; DOPPLER, 2010).

3.2.1. Bioetanol de primeira geração

O bioetanol de primeira geração pode ser produzido por beterraba, batata, milho, cana-de-açúcar, sorgo e trigo (PETROU et al., 2009). No Brasil atualmente é produzido em escala industrial a partir de cana-de-açúcar (NIGAM; SINGH, 2011). A produção de bioetanol é dada através da fermentação da glicose, açúcar simples formado nas plantas pelo processo de fotossíntese. A glicose pode ser armazenada na forma de sacarose, encontrada na beterraba sacarina, sorgo sacarino e na cana-de-açúcar (OGBONNA; MASHIMA; TANAKA, 2001; WU et al., 2010; RAZMOVSKI.; VUČUROVIĆ, 2011). Nesse caso, ela é facilmente hidrolisada aos monômeros constituintes, evitando a etapa de pré-tratamento e prosseguindo com a fermentação dos monômeros (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

A glicose também pode ser armazenada sob a forma de amido, polissacarídeo formado pela amilose e a amilopectina em proporções variáveis, como ocorre no milho, trigo e batata. Para a produção de bioetanol a partir dessas espécies, é necessário transformar o amido em hexoses através da hidrólise enzimática ou ácida, (TESTER; QI; KARKALAS, 2006; TASIĆ et al., 2009).

A produção de bioetanol de primeira geração é um processo renovável, simples e já implementado industrialmente. Porém, não é uma fonte de energia limpa devido ao seu processo de produção. O cultivo extensivo destas culturas traz preocupação em relação à poluição das terras agrícolas com fertilizantes e pesticidas, a erosão do solo, redução da biodiversidade de culturas, perdas de serviços de controle biológico dos ecossistemas e das emissões de gases de efeito estufa (SUBHADRA; EDWARDS, 2010).

3.2.2. Bioetanol de segunda geração

Tendo em vista as desvantagens do bioetanol de primeira geração, em 2014 o Brasil iniciou a produção de bioetanol de segunda geração através de materiais lignocelulósicos (STAVELA, TÁSSIA; ARAÚJO, THAIS; PORTO, 2014), como madeiras e ervas (GUO et al., 2008; SORENSEN et al., 2008), resíduos das indústrias agro-pecuárias (NEUREITER et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2010) e da madeira (XAVIER et al., 2010) e resíduos sólidos municipais (inclui resíduos alimentares vegetais, relva e papel usado (LI; ANTIZAR-LADISLAO; KHRAISHEH, 2007; PARK et

al., 2010).

A biomassa lignocelulósica é composta em diferentes proporções por celulose, formada por resíduos de glicose unidos por uma ligação β -1,4-glicosídica adquirindo um alinhamento de 180° das unidades glicosídicas; hemicelulose, composta majoritariamente por xilose (BURANOV; MAZZA, 2010); e lignina, contendo em sua estrutura substâncias como álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Dentre esses componentes, o único que não pode ser transformado em etanol é a lignina. Entretanto, seguindo tratamentos complexos, ela pode ser utilizada como matéria-prima para gerar energia nas indústrias produtoras de papel ou sucroalcooleiras, bem como na produção de biocompósitos, polímeros e outros produtos como os fenóis, benzeno, dispersantes, vanilina, agentes emulsificantes, antioxidantes, pesticidas, fertilizantes, carvão vegetal, aditivos para concreto, entre outros (LORA; GLASSER, 2002; VISHTAL; KRASLAWSKI, 2011). Como se trata de um material complexo, a biomassa lignocelulósica necessita de pré-tratamentos em que há quebra da estrutura cristalina da celulose, solubilização da hemicelulose e degradação da lignina (MIRANDA, 2011).

O bioetanol de segunda geração é gerado, em micro escala, com baixo custo em relação ao de primeira geração, por serem resíduos ou materiais abundantes na natureza e que se situam fora da cadeia alimentar (DEMİRBAŞ, 2005). Entretanto, em escala industrial, o custo energético envolvido com as técnicas usuais de pré-tratamento da biomassa é elevado e o rendimento é baixo, o que torna a produção de bioetanol de segunda geração, até o presente momento, inviável (DEMİRBAŞ, 2005; SUMMARY, 2008).

Os materiais celulósicos são constituídos de lignina (substância hidrofóbica, com estrutura tridimensional e amorfa, altamente ramificada), hemiceluloses (heteropolissacarídeos formados por vários resíduos de açúcares como pentose, hexose, ácidos urônicos e grupos acetila ligados entre si principalmente por ligações do tipo β -1,4 glicosídicas) e celulose (monômeros ligados a partir de ligações do tipo β -1,4 glicosídicas) (SPIRIDON; POPA, 2008; FARINAS, 2011). As principais etapas de produção do etanol de segunda geração são: pré-tratamento, hidrólise,

fermentação e destilação do álcool (SARKAR et al., 2012). A primeira etapa consiste na separação da matriz de lignina, solubilização da hemicelulose e redução da cristalinidade da celulose, para que facilite a etapa posterior de hidrólise (GROSSI, 2015). A segunda etapa refere-se à produção de glicose. Devido à configuração estrutural somado ao encapsulamento da lignina, os materiais celulósicos são mais difíceis de hidrolisar frente aos materiais ricos em amido (DEMİRBAŞ, 2005). E, por fim, a última etapa é constituída pela fermentação alcoólica.

3.2.3. Bioetanol de terceira geração

Como uma alternativa viável aos materiais de primeira e segunda gerações, é possível citar o uso de matéria-prima microalgal, por apresentarem uma menor demanda de extensão de terra, fornecerem um rendimento elevado de biocombustíveis, sem comprometer o abastecimento de alimentos, florestas tropicais ou terras aráveis (SUBHADRA; EDWARDS, 2010).

Dentre os materiais biológicos, destaca-se o uso das algas, que vem se diversificando e, atualmente, mais de 150 espécies são comercializadas para fins de alimento para os animais e seres humanos, agentes espessantes em sorventes, além do uso nas indústrias de cosméticos, suplementos e farmacêutica (LIRA, RAFAEL DE ARAÚJO; MARTINS, MARCIO ARÊDES; MACHADO, MARIANA FONSECA; CORRÊDO, LUCAS DE PAULA; MATOS, 2012).

As microalgas se destacam por serem mais promissoras do que as macroalgas para a produção de biocombustíveis por apresentarem estruturas menos complexas, maior taxa de crescimento e maior capacidade de remoção de CO₂ (UEDA, RYOHEI; HIRAYAMA, SHIN; SUGATA, KIYOSHI; NAKAYAMA, 1996; PAULO, 2011).

A produção de bioetanol a partir de microalgas, o bioetanol de terceira geração, pode ser feita através de processos bioquímicos (SOUZA et al., 2012) que se resumem em fermentações sem a utilização de oxigênio (fermentação direta) através do consumo do açúcar armazenado dentro da célula (PAULO, 2011). Apesar de implicar em gastos reduzidos de energia, por não necessitar de processamento prévio da biomassa microalgal, o método direto não apresenta resultados promissores publicados (PAULO, 2011), indicando a sua baixa viabilidade para a escala industrial. Sendo assim, o processo mais utilizado parte-se da hidrólise, levando à produção de

hexoses para serem fermentadas (MIRANDA, 2011).

As pesquisas demonstram que o bioetanol de terceira geração apresenta maior produtividade quando comparado aos de primeira e segunda geração, conforme mostra a Tabela 1:

Tabela 1 - Comparação entre os rendimentos de bioetanol de primeira, segunda e terceira gerações encontrados experimentalmente

Geração	Fonte de Biomassa	Rendimento de bioetanol (L ha ⁻¹ ano ⁻¹)
1 ^a	Beterraba	5010-6680
	Cana-de-açúcar	6190-7500
2 ^a	Palha de milho	1050-1400
	Trigo	2590
	Mandioca	3310
	Sorgo doce	3050-4070
	Milho	3460-4020
	<i>Panicum virgatum</i> (switchgrass)	10760
3 ^a	Microalgas	46760-140290

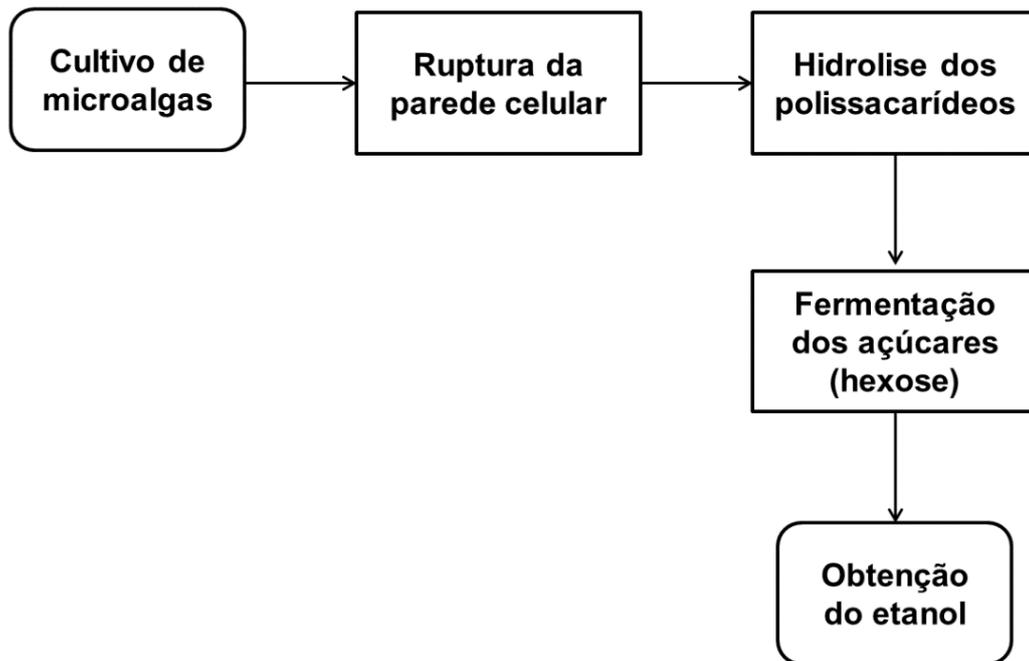
Fonte: Mussatto et al. (2010)

Embora a tecnologia de produção e processamento de microalgas venha mostrando ser a mais adequada devido às vantagens acima citadas, em escala industrial esta ainda se encontra em um estágio incipiente para se tornar disponível no mercado (ALAM et al., 2012; LAM; LEE, 2012).

3.3 PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO

A produção de bioetanol de terceira geração (Fig. 2) consiste em etapas semelhantes à produção do de segunda geração.

Figura 2 - Fluxograma de produção de bioetanol de terceira geração



Fonte: Adaptado de Singh; Gu, (2010) e Günerken et al (2015)

Cada etapa do fluxograma possui características importantes que auxiliam no aumento da produção de polissacarídeo e será descrita nos subitens da seção 3.3.

3.3.1 As Microalgas

As microalgas fazem parte de um grupo heterogêneo de micro-organismos, primariamente fotossintetizantes, que podem viver isoladas ou em colônias nos mais diversos ambientes: mar, água doce, solo, rochas e até mesmo na neve (CHISTI, 2007).

Como seres primariamente fotossintetizantes, as microalgas apresentam requerimentos nutricionais simples, como luz, água e nutrientes inorgânicos. Algumas espécies, entretanto, são capazes de fazer mixotrofia, isto é, utilizar tanto o CO₂ na fotossíntese, quanto o carbono orgânico em processo de respiração, usualmente aumentando o seu crescimento (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013). Ao utilizar compostos orgânicos, a microalga libera CO₂, que é absorvido e utilizado posteriormente na fotossíntese (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

A biomassa de microalgas é composta basicamente por proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos e lipídeos (Tab. 2) em concentrações que variam de acordo com a espécie e o estágio metabólico (BECKER, 1994). As espécies distinguem-se,

principalmente, pela sua pigmentação, estrutura celular e ciclo de vida (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012).

Tabela 2 - Percentual de composição química de fontes de alimento humano comparado a diferentes espécies de microalgas

Fonte	Proteína (%)	Carboidratos (%)	Lipídeos (%)	Ácidos Nucléicos (%)
Arroz	8	77	2	-
Ovo	47	4	41	-
Leite	26	38	28	-
Soja	37	30	20	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6

A variação da composição e concentração dessas substâncias resulta em biomassa de microalgas com diferentes propriedades adequadas a diferentes mercados, sendo estas influenciadas pela natureza desses micro-organismos e pelas condições e estado fisiológico da cultura (DÍAZ-PALMA et al., 2012). É sabido que, quando submetidas a condições ambientais adversas, muitas microalgas tendem a reduzir a divisão celular e acumular substâncias de reserva como lipídeos e/ou carboidratos, podendo também produzir pigmentos (DÍAZ-PALMA et al., 2012).

Alguns parâmetros apresentam forte influência na produção de biomassa de microalgas: intensidade da luz e comprimento de onda adequado, a temperatura, a concentração de CO₂, a quantidade de nutrientes, condições de mistura e contaminação (SINGH; DHAR, 2011). Dessa forma, para viabilizar a produção do biocombustível de interesse, deve-se interferir no processo e sistema de cultivo desses micro-organismos com o intuito de aumentar o acúmulo de lipídeos (biodiesel)

ou amido (bioetanol) (POSSATTO, 2009). Entretanto, como mencionado anteriormente, tal acúmulo ocorre quando o crescimento da microalga é reduzido. Sendo assim, é fundamental se equilibrar a quantidade de células e o teor de lipídeo e/ou carboidratos para aumentar a produção de biocombustíveis (ANASTAS; ZIMMERMAN, 2003).

Segundo Borowitzka (1999), para cultivar microalgas em larga escala, é possível usar sistemas pouco sofisticados, uma vez que muitas empresas desenvolvem cultivos até a céu aberto, reproduzindo ou modificando o habitat natural de acordo com características físico-químicas como luz, aeração, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes.

O grande problema desses cultivos é a probabilidade de contaminação por bactérias, fungos ou outras espécies de microalgas, além da baixa produtividade. Para superar estas limitações, têm sido desenvolvidos sistemas de cultura fotoautotrófica fechada com paredes transparentes, chamados fotobiorreatores, possibilitando um maior controle da cultura, porém ainda existe um custo relativamente elevado para isto (BOROWITZKA, 1999).

3.3.1.1 *Euglena gracilis*

Euglena gracilis (Fig.3) é uma espécie de microalga, sendo um protozoário unicelular e flagelado. É encontrada em água doce e é caracterizada por acumular elevadas quantidades de *paramylon* (cerca de 95% da massa celular) quando cultivada na presença de fontes adequadas de carbono (BARSANTI et al., 2000; YAMADA et al., 2016). *Paramylon* é um polissacarídeo linear com alto peso molecular que apresenta ligações β -1,3-glicosídicas (RUSSO et al., 2016) e, ao passar por tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos, pode produzir hexoses, matéria-prima para a produção de bioetanol.

Figura 3 - Fotografia de células da espécie *Euglena gracilis* cultivada em meio líquido arsênico



Fonte: THE UNIVERSITY OF TEXAS AT AUSTRIA (UTEX), 2018

E. gracilis se enquadra no grupo das euglenófitas e, diferentemente dos demais grupos de microalgas, não possuem parede celular rígida ao redor das suas células (KIRK; JUNIPER, 1964), facilitando a fagocitose. Ela é uma espécie interessante, no que diz respeito a seu crescimento, sendo capaz de crescer na ausência de luz, mas apresentando maior produtividade em condições mixotróficas (KORN, 1964).

A produção de bioetanol de terceira geração deve seguir algumas etapas: obtenção da biomassa de microalgas, ruptura da parede celular, hidrólise dos polissacarídeos e fermentação alcoólica. A segunda etapa é uma das mais importantes e difíceis de alcançar e, normalmente, é necessário aplicar elevadas temperaturas ou pressões ao sistema (SINGH; GU, 2010; GÜNERKEN et al., 2015). Dessa maneira, o fato da *E. gracilis* não apresentar parede celular rígida a torna uma matéria-prima interessante, do ponto de vista ambiental e econômico, para a produção desse biocombustível, pois reduz os gastos com reagentes químicos e energia aplicada, além de ser uma etapa a menos a ser cumprida no processo.

3.3.2 Ruptura Celular

Uma vez obtida a biomassa microalgal, é necessário romper as células para liberar os componentes de interesse, seja lipídeos para biodiesel ou carboidratos para bioetanol. Atualmente, os métodos de ruptura celular são subdivididos em mecânicos (moagem, ultrassom, homogeneização de alta pressão e a secagem por pulverização), térmicos (micro-ondas, autoclavagem e congelamento), químicos (solventes orgânicos, choque osmótico e reações ácido-base) e biológicos (degradação microbiológica e reações enzimáticas) (GÜNERKEN et al., 2015). Os

critérios de seleção para a utilização do método de ruptura celular são a eficiência qualitativa e quantitativa, simplicidade na operação do procedimento e baixo custo (GÜNERKEN et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2015).

O método de pré-tratamento mecânico atua na quebra da parede celular através de uma força física. Apesar do alto consumo de eletricidade, muitos estudos continuam utilizando este método para aperfeiçoar a extração do componente de interesse da parede celular devido ao fato dele ser menos propenso à contaminação e independe da espécie de microalga a ser utilizada (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2012).

Zhao e colaboradores (2013) estudaram diferentes métodos de liberação de carboidratos no meio através de extração assistida por ultrassom (extração por solvente, leite fluidizado e ultrassom). Os autores obtiveram um rendimento máximo de glicose de $36,94 \pm 2,46\text{g} / 100\text{g}$ de biomassa seca a partir de uma concentração celular de $0,3\text{ g/L}$ da espécie *Chlorella* sp.

O método térmico também está associado ao elevado consumo de energia, consistindo da solubilização da biomassa através de elevadas temperaturas (PASSOS et al., 2014; PASSOS; CARRETERO; FERRER, 2015). Ele vem sendo muito utilizado em ruptura celular de microalgas para a produção de biogás e digestão anaeróbia (PASSOS et al., 2014; PASSOS; CARRETERO; FERRER, 2015).

Alguns estudos mostraram que o pré-tratamento químico associado a altas temperaturas, resultam na obtenção de concentrações elevadas de bioetanol (MENDEZ et al., 2014). Entretanto, ainda que o tratamento químico com ácido seja rápido, fácil de operar e pouco custoso, quando comparado a outros tratamentos de ruptura, como o tratamento alcalino, pode gerar contaminações do sistema através de corrosão e de reações indesejadas (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

Por fim, o pré-tratamento enzimático, apesar de ser um método lento e custoso, vem mostrando ser uma ferramenta eficiente para a ruptura da parede celular de algumas microalgas (CHOI; NGUYEN; SIM, 2010), pois é possível obter altas concentrações de açúcar (glicose) sem liberação de produtos inibidores (HO et al., 2013). Ele envolve a degradação da biomassa de microalgas através da adição externa de enzimas purificadas (CHOI; NGUYEN; SIM, 2010), extrato enzimático a partir de outro micro-organismo (HO et al., 2013), ou mistura de enzimas (CHOI;

NGUYEN; SIM, 2010).

Diferentemente das metodologias de ruptura da membrana celular, citadas acima, Polonini e colaboradores (2014) estudaram o comportamento de uma cianobactéria, *Anabaena flos-aquae*, e uma microalga, *E. gracilis*, em titanato de bário e observaram que este reagente apresentou um efeito tóxico significativo, na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, sobre o crescimento celular da microalga, levando à ruptura de sua membrana celular.

Em estudos de biossíntese intracelular utilizado na *E. gracilis* com concentrações equimolares de íons Fe (II) /Fe (III), Brayner e colaboradores, (2012) mostraram que, de forma similar, houve uma absorção dos íons na membrana celular desta microalga, o que sugere haver uma ruptura da mesma.

3.3.3 Sacarificação ou Hidrólise

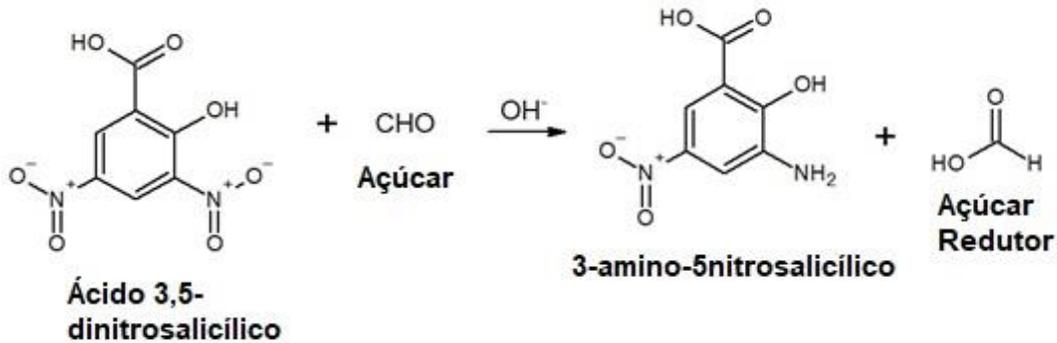
A conversão dos carboidratos liberados na etapa de ruptura celular em seus monômeros constituintes é feita através da sacarificação química ou enzimática, e, posteriormente, a hexose produzida passará pelo processo de fermentação alcoólica (SIMAS-RODRIGUES et al., 2015).

Uma dos métodos de análise dos açúcares redutores foi desenvolvida por Gail Lorenz Miller (1959). Este método baseia-se na oxidação destes açúcares pelo ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS). Os açúcares redutores são caracterizados por apresentarem, em sua extremidade, hidroxila (OH) livre.

A

Figura 44 mostra a reação de oxidação que ocorre no carbono carbonílico de açúcares redutores através do ácido 3,5-dinitrosalicílico sob condições alcalinas, sendo este reagente reduzido ao ácido 3-amino-5nitrosalicílico, um composto de cor alaranjada que absorve no comprimento de onda de 540 nm (GONÇALVES et al., 2010).

Figura 4 - Reação de oxidação do grupo aldeído com o ácido DNS



Fonte: Adaptado por (TAVARES, 1994)

A hidrólise química é subdividida em ácida e alcalina, porém os estudos mostram que a hidrólise ácida é mais eficiente na reação de degradação de ligações glicosídicas (CHOI; NGUYEN; SIM, 2010; BAJPAI, 2016). Este método é caracterizado pela rapidez, baixo custo com reagentes, porém alto custo com o tratamento dos resíduos gerados, quando comparado ao processo enzimático (SIMAS-RODRIGUES et al., 2015).

Lee e colaboradores (2013), a partir de 5% (p/v) de biomassa residual de *Dunaliella tertiolecta*, realizaram processos de hidrólise ácida em uma autoclave em amostras contendo diferentes concentrações de ácidos clorídrico e sulfúrico. A título de comparação da hidrólise, eles realizaram hidrólise enzimática, a partir da mesma concentração de biomassa residual, usando as enzimas celulase comercial, amiloglucosidase e Viscozima L, variando a temperatura e pH (Quadro 1).

Ho e colaboradores (2012) estudaram a hidrólise físico-química, com ácido sulfúrico e autoclave e a hidrólise enzimática usando *Pseudomonas* sp. CL3. Os autores verificaram que ambos métodos foram eficazes na produção de açúcares a partir de *Chlorella vulgaris* FSP-E. por obterem um rendimento de 93,6 % a partir de 50 g/L de biomassa e 90,4 % (7,86 g/L) de glicose a partir de 20 g/L de biomassa, respectivamente (Quadro 1).

De acordo com o trabalho desenvolvido por Miranda e colaboradores (2012), a

concentração de ácido sulfúrico é um parâmetro importante para a condução da hidrólise ácida em autoclave, uma vez que concentrações muito elevadas resultam na degradação dos monossacarídeos em produtos de degradação de açúcares (5-hidroximetilfurfural, furfural, ácido propiônico, ácido acético, ácido lático e ácido fórmico).

Harun e Danquah (2011) estudaram a influência do pré-tratamento ácido na produção de bioetanol em um forno. Eles realizaram a hidrólise ácida com H_2SO_4 em concentrações variando de 1-10% (v/v) e concluíram que a menor concentração resultava em uma hidrólise ácida mais eficaz (Quadro 1).

3.3.4 Fermentação Alcoólica

Após o processo de sacarificação, a fermentação dos açúcares livres no meio pode ocorrer com a ação de bactérias, leveduras ou fungos filamentosos (SIMAS-RODRIGUES et al., 2015). Esta etapa pode ser realizada de duas formas: em hidrólise separada da fermentação (SHF) e sacarificação simultânea à fermentação (SSF). Ambas metodologias apresentam vantagens e desvantagens que devem ser consideradas de acordo com cada objetivo. A SHF, por ser realizada em etapas separadas, proporciona condições ideais para cada processo e, conseqüentemente, exige produtos químicos menos custosos e equipamentos menos complexos (NGUYEN et al., 2009). Porém, a SSF produz maiores rendimentos de bioetanol, além de requerer condições menos estéreis, pequenas quantidades de enzimas e menores tempo e custo (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

Ho e colaboradores (2013) prosseguiram seus estudos verificando a influência dos processos SSF e SHF utilizando a bactéria *Z. mobilis* ATCC 29191 e concluíram que os processos realizados simultaneamente resultaram em maiores concentrações de etanol com 50 h de reação (4,27 g de etanol/L) do que os processos realizados separados (3,55 g/L) com 18 h de reação. Para a hidrólise ácida, a fermentação ocorreu após a hidrólise e resultou nas primeiras 13 h de fermentação uma concentração de 11,6 g/L de etanol (Quadro 1).

A seleção do micro-organismo a ser utilizado na etapa de fermentação alcoólica leva em consideração alguns parâmetros como faixa de temperatura e pH, taxa de crescimento, produtividade, especificidade e rendimento (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

Algumas bactérias apresentam propriedades específicas em relação a suas enzimas hidrolíticas e devem ser selecionadas, principalmente, pela sua ação em sistemas hipersalinos (DOAN et al., 2012). Muitos estudos mostram que a levedura *S. cerevisiae* vem apresentando resultados relevantes para a produção de bioetanol de terceira geração, pois ela é capaz de utilizar uma larga variedade de açúcares no processo de fermentação (SIMAS-RODRIGUES et al., 2015).

Harun e Danquah (2011), Wang e colaboradores (2014) e Choi e colaboradores (2010) utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para fermentar os açúcares redutores obtidos a partir, respectivamente, das espécies *Chlorococcum humicola*, *Tribonema* sp e *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 resultando em concentrações de etanol promissoras (Quadro 1).

Lee e colaboradores (2013) a partir das amostras que obtiveram maiores resultados de glicose, sem adição de pré-tratamento, prosseguiram a fermentação alcoólica usando *S. cerevisiae* YPH500 e mostraram viável a produção de etanol partir de biomassa residual de *Dunaliella tertiolecta*, após a extração de lipídeos para a produção de biodiesel (Quadro 1).

Harun, Danquah e Forde (2009) estudaram a produção de bioetanol a partir de *Chlorococum* sp. A fermentação alcóolica ocorreu via *Saccharomyces bayanus* e os resultados do estudo confirmaram que esta espécie pode ser utilizada como substrato para a produção de etanol por gerarem, a partir dos detritos celulares e a uma temperatura de 30 °C, uma concentração de etanol de 3,58 g/L (Quadro 1).

Quadro 1 - Síntese de parâmetros para a produção de bioetanol a partir de microalgas de acordo com a literatura

Microalga	Biomassa	Hidrólise	T (°C) hidrólise	Açúcar (g L ⁻¹)	Fermentação	EtOH (g L ⁻¹)	Rendimento (g etOH/ g biomassa seca)	Autor
<i>Chlorococum sp</i>	10 g/L	N.D.	N.D.	N.D.	<i>Saccharomyces bayanus</i> 60 h	3,58	0,358	Harun, Danquah e Forde (2009)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5% (p/v)	Amiloglucosidade (<i>Aspergillus niger</i>) 30 min	55	N.D.	<i>S. cerevisiae</i> 40 h	11,73	0,235	Choi et al (2010)
<i>Chlorococum humicola</i>	15 g/L	Forno 30 min	140	N.D.	<i>S. cerevisiae</i> 24 h	7,2	0,48	Harun e Danquah (2011)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	5% (p/v)	Amiloglucosidase (AMG 300L) 12 h	55	21	<i>S. cerevisiae</i> 17 h	7	0,14	Lee et al (2013)
<i>C. vulgaris</i> FSP-E	20 g/L	<i>Pseudomonas sp.</i> CL3 (sobrenadante) 48 h	45	N.D.	<i>Z. mobilis</i> 50 h	4,27	0,214	Ho et al (2013)
<i>C. vulgaris</i> FSP-E	20 g/L	<i>Pseudomonas sp.</i> CL3 isolada 48 h	45	7,78	<i>Z. mobilis</i> 18 h	3,55	0,178	Ho et al (2013)
<i>C. vulgaris</i> FSP-E	50 g/L	[H ₂ SO ₄] = 1% (v/v) 20 min	121	23,6	<i>Z. mobilis</i> 13 h	11,6	0,233	Ho et al (2013)
<i>Tribonema sp</i>	50 g/L	[H ₂ SO ₄] = 3% (v/v) 20 min	121	14,5	<i>S. cerevisiae</i> 16 h	5,11	0,1022	Wang et al (2014)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO DE CULTIVO

A *E. gracilis* foi doada pelo MNHM (*Museum National de Histoire Naturelle* – Paris) e seus cultivos de manutenção foram realizados em volumes crescentes, em erlenmeyers de 250 mL até 2 L, utilizando uma intensidade luminosa de cerca de 70 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Toda a manipula\u00e7\u00e3o foi realizada em condi\u00e7\u00f5es est\u00e9reis a fim de manter um cultivo ax\u00eanico.

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA HIDR\u00d3LISE \u00c1CIDA DE AMIDO COMERCIAL

Devido \u00e0 dificuldade de obten\u00e7\u00e3o de grandes quantidades de biomassa em escala laboratorial, foi necess\u00e1rio realizar um experimento preliminar de hidr\u00f3lise \u00e1cida a partir de uma solu\u00e7\u00e3o 5% (p/p) de amido comercial (Maizena\u2122). Para isto, realizou-se um planejamento fatorial completo (Tab. 3) numa autoclave vertical (AV Plus Phoenix) com intuito de entender a influ\u00eancia dos fatores independentes (concentra\u00e7\u00e3o de H_2SO_4 , temperatura e tempo) na vari\u00e1vel resposta (concentra\u00e7\u00e3o de a\u00e7\u00facar redutor).

Tabela 3 - Fatores e seus valores associados para realiza\u00e7\u00e3o do planejamento experimental da hidr\u00f3lise \u00e1cida

Ensaio	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)	Concentra\u00e7\u00e3o (%) de H_2SO_4 (Synth)
1	111	5	0,04
2	111	5	0,08
3	127	5	0,04
4	127	5	0,08
5	111	15	0,04
6	111	15	0,08
7	127	15	0,04
8	127	15	0,08
9	119	10	0,06
10	119	10	0,06
11	119	10	0,06

Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5702, Eppendorf) a 4400 rpm por 10 minutos, coletou-se o sobrenadante para ajuste do pH para 4,5, usando solução 0,1 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH). Coletou-se 2 mL do sobrenadante para análise dos açúcares redutores (a variável resposta é a concentração destes em g/L).

Os resultados foram analisados através do *software* Statistica 7.0 usando os módulos de planejamento fatorial, gráfico de pareto e Análise de Variância.

4.3 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE *E. GRACILIS*

4.3.1 Cultivo da microalga *E. gracilis*

Para a realização dos experimentos de indução da produção de *paramylon* e posterior produção de etanol, *E. gracilis* foi cultivada, em triplicata, em meio mineral e lactato, conforme metodologia de Brayner et al. (2012). Foram utilizadas culturas de 1 a 2 L, com densidade inicial de 5×10^4 células, com aeração. A densidade celular (células/mL) foi determinada periodicamente para acompanhamento da curva de crescimento através da contagem celular na câmara de Neubauer em um microscópio óptico (Zeiss, Axiostar Plus). Cultivos na fase estacionária foram utilizados para a produção do etanol.

4.3.2 Desenhos experimentais para a produção de etanol a partir de *E. gracilis*

Todos os experimentos foram realizados de maneira a estabelecer uma metodologia de obtenção de etanol a partir da *E. gracilis*. Dessa maneira, foram necessárias diferentes bateladas (Experimentos 01, 02 e 03) de produção do mesmo com o intuito de maximizá-la, de forma que as conclusões dos experimentos anteriores foram de suma importância para a realização dos experimentos seguintes.

Para identificação das amostras utilizou-se caracteres que dizem respeito aos processos de tratamento das mesmas. O primeiro dígito corresponde ao tipo de meio de cultivo, mineral (M) e lactato (L), o segundo à presença de FeCl₂ como fonte (S) ou não (Ns) de estresse, o terceiro ao método de separação da amostra utilizado, rotaevaporador (R) e centrifuga (C), e, por fim, o tipo de hidrólise, ácida (A) e enzimática (E).

Os desenhos experimentais estão ilustrados nas Figuras 5-7 abaixo e serão

posteriormente detalhados nas etapas de produção de etanol.

Figura 5 - Fluxograma do Experimento 01

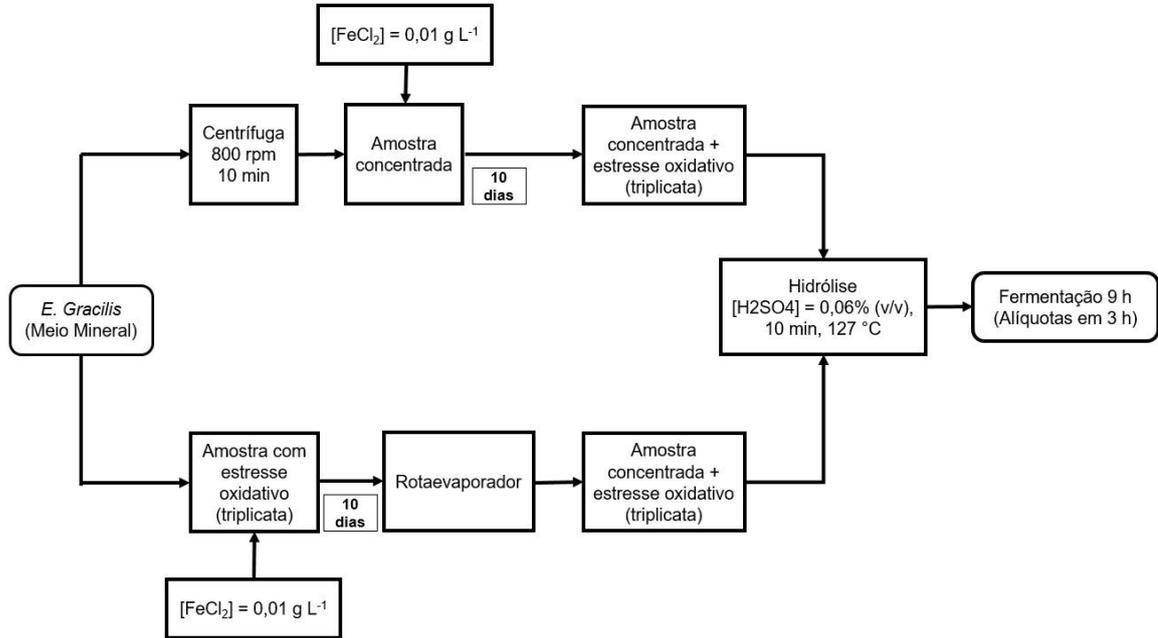


Figura 6 - Fluxograma do Experimento 02

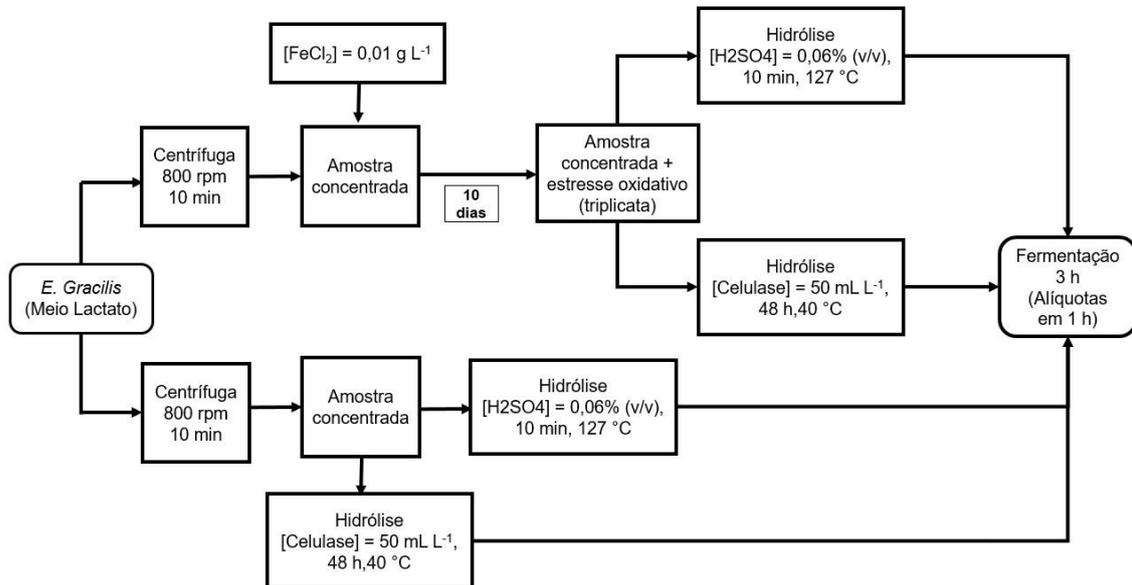
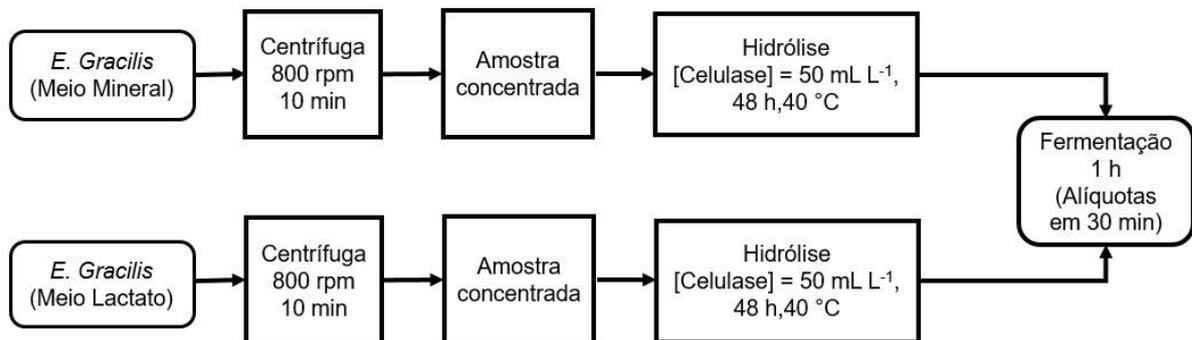


Figura 7 - Fluxograma do Experimento 03



4.3.3 Separação da biomassa e adição do FeCl₂

Os cultivos foram mantidos sob as condições descritas no item 4.3.1 até que as células atingissem a fase estacionária de crescimento. Posteriormente, foram utilizados dois métodos de separação da biomassa: centrifugação (C) e rotaevaporação (R). No primeiro método os cultivos foram transferidos a tubos falcon de 50 mL e centrifugados a 800 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi recolhido e transferido para erlenmeyers de 250 mL. Foram adicionados às amostras 0,1 g/L de FeCl₂ e manteve-se o cultivo por 10 dias. No segundo método, adicionou-se aos cultivos a mesma concentração de FeCl₂ e os manteve no mesmo intervalo de tempo (10 dias). Após este período, as amostras passaram por rotaevaporador (IKA, HB 10). O destilado foi descartado e o que ficou no balão foi utilizado para a realização das etapas posteriores.

4.3.4 Hidrólise ácida do *paramylon*

A etapa de hidrólise ácida foi desenvolvida de acordo com os resultados do planejamento experimental, considerando os parâmetros temperatura, concentração de ácido sulfúrico e tempo de reação. Sendo assim, adicionou-se em cada erlenmeyer, contendo biomassa concentrada, 0,06 % (v/v) de ácido sulfúrico. A hidrólise ácida foi realizada em uma autoclave vertical a 127 °C e 10 minutos. Após atingir o tempo de reação, as amostras foram centrifugadas a 4400 rpm por 10 minutos, ajustou-se o pH para 4,5 e coletou-se 2 mL do sobrenadante para análise dos açúcares redutores.

4.3.5 Hidrólise enzimática do *paramylon*

Em erlenmeyers contendo biomassa de microalga, concentrada após

separação na centrífuga, foram adicionados 50mL/L de Celulase (*Trichoderma reesei* ATCC 26921). A mistura foi acoplada em uma incubadora shaker a 50 °C, 180 rpm por 48 h. Após o tempo final da hidrólise enzimática, alíquotas de 2 mL foram coletadas para análise de açúcar redutor.

4.3.6 Análise do 5-hidroximetilfurfural (HMF)

A fim de se detectar possíveis agentes inibidores da fermentação, que são comumente gerados na hidrólise ácida, foi realizada a análise do HMF. A curva padrão (Anexo A) foi obtida através da leitura de diferentes concentrações de HMF em um espectrofotômetro UV-Vis (Agilent Technologies, Cary 60 G6860A) com comprimento de onda (λ) de 284 nm.

A retirada do HMF se fez necessária nos experimentos em que foram realizados a hidrólise ácida. Para tanto, adicionou-se 1 g/L de carvão ativado às amostras e estas foram acopladas a uma incubadora shaker por 1 h, 30 °C e 180 rpm. Após atingir o tempo proposto, coletou-se 1 mL das amostras, procedendo a leitura da absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 284 nm.

4.3.7 Análise dos açúcares redutores

O reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi preparado e armazenado em um recipiente âmbar para aumentar a durabilidade do mesmo (MENDONÇA; CONCÓRDIA; PANIZZI, 2013). Para a obtenção da curva de calibração (Anexo B), prepararam-se, em diferentes balões volumétricos, padrões com as seguintes concentrações em g/L de dextrose (Vetec): 0,03; 0,06; 0,12; 0,24; 0,3; 0,36; 0,42; 0,48; 0,54 e 0,6. Foram transferidos 2 mL destas soluções e o mesmo volume de DNS para tubos de ensaio e agitou a mistura vigorosamente. Em um banho de água em ebulição, os tubos de ensaio foram acondicionados por 15 minutos. As soluções foram resfriadas a temperatura ambiente e a elas foram adicionados 16 mL de água destilada. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-vis (Agilent Technologies, Cary 60 G6860A) a um comprimento de onda 540 nm.

4.3.8 Fermentação alcoólica

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtida do Laboratório de Biotecnologia Molecular (Viçosa-MG), foi cultivada em meio sólido YPD (1% de extrato de levedura,

2% de açúcar, 2% de peptona, 2% ágar-ágar) em placas de Petri, previamente autoclavadas (AV Plus, Phoenix), por 24 h em estufa (Nova Ética) a 30 °C. A preparação do cultivo em meio sólido se deu pelo método de estrias através de alça de platina esterilizada em uma câmara de fluxo laminar vertical (Pa-320, Pachane). Após a verificação do crescimento da levedura nas placas de Petri, estas foram armazenadas na geladeira a fim de cessar o crescimento do organismo.

Para realização da fermentação, preparou-se o meio YPD líquido (1% de extrato de levedura, 2% de açúcar, 2% de peptona) em um erlenmeyer de 250 mL, previamente autoclavado. Um inóculo da placa refrigerada foi transferido para esse meio e o crescimento da levedura ocorreu em uma incubadora shaker (TE-420, Tecnal) a 30 °C, 180 rpm por 24 h. Após esse período, os cultivos foram diluídos em meio YPD para a obtenção de uma densidade óptica inicial igual a 2 (medição realizada no espectrofotômetro, com $\lambda = 600\text{nm}$) para a fermentação. Esta etapa foi realizada em um shaker, a uma temperatura de 30 °C, sendo coletadas alíquotas em diferentes tempos, para análise de produção de etanol por cromatografia gasosa. Para os Experimentos 01, 02 e 03 os intervalos de tempo foram, respectivamente, 3 h, 1 h e 30 minutos.

4.4 ANÁLISE DE ETANOL

A concentração de etanol foi determinada através da cromatografia gasosa (Varian, CP-3800). Os parâmetros do método de análise estão listados no Quadro 2:

Quadro 2 - Parâmetros do método de análise de etanol

Coluna	CP-Wax 52 CB
Temperatura do injetor (°C)	200
Temperatura do forno (°C)	T ₀ = 50 T ₁ = 70 (8°C/min) T _f = 200 (8 °C/min)
Temperatura do detector (°C)	250
Fluxo (mL/min)	1,0
Tempo de corrida (min)	18
Pressão constante (psi)	11
Split	25
Fluxo de gases (mL/min)	H ₂ = 30 Ar = 300 N ₂ = 29

A reação química característica da fermentação alcoólica (VOLPE, 1997),

representa um estado totalmente fermentativo onde não haja respiração celular da levedura e nenhum co-produto formado. Neste caso, o rendimento máximo teórico da conversão mássica de glicose para etanol pode ser calculado pela equação da reação química a seguir, e apresenta um valor de 51,1%.



O cálculo do rendimento de fermentação das amostras no presente trabalho foi feito de maneira similar, com base na equação 3 a seguir (BORTOLINI; SANT'ANNA; TORRES, 2001):

$$\text{Rendimento da fermentação} = \frac{\text{Concentração de etanol produzido}}{\text{Concentração de açúcar redutor inicial}} \times 100 \qquad (3)$$

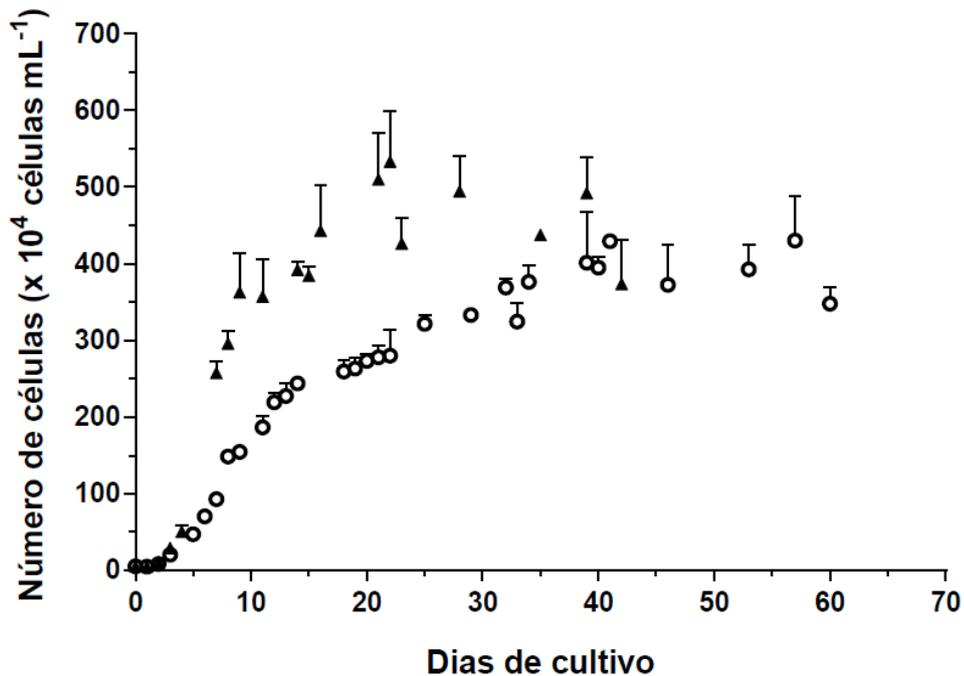
Obs.: Concentração em massa/volume.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CURVA DE CRESCIMENTO

Inicialmente, por se tratar de uma espécie pouco estudada para fins biotecnológicos, foi necessário conhecer o perfil de crescimento da mesma nos meios de cultivo mineral e lactato. Para isso, a microalga foi cultivada, em triplicata, nos diferentes meios e, através de uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico (Zeiss, Axiostar Plus), foi realizada a contagem celular gerando as curvas mostradas na Figura 8 - Curva de crescimento da *E. gracilis* no meio Mineral e Lactato⁸.

Figura 8 - Curva de crescimento da *E. gracilis* no meio Mineral e Lactato



A partir da análise do gráfico acima é possível notar que a *E. gracilis* cresceu mais rapidamente no meio lactato, atingindo uma densidade celular máxima de cerca de $5,30 \times 10^6$ células/mL e entrando em fase estacionária em 15 dias. No meio mineral, a espécie cresceu de maneira mais gradual atingindo uma densidade máxima de $4,00 \times 10^6$ células/mL, entrando em fase estacionária em 35 dias.

A composição do meio lactato possibilita que a *E. gracilis*, micro-organismo mixotrófico, realize fotossíntese e adquira componentes orgânicos como meios de crescimento, possibilitando que a espécie atinja uma densidade celular maior (LEE, 2001; BRENNAN; OWENDE, 2010; LI et al., 2014).

Para a produção de bioetanol em larga escala é importante avaliar o custo-benefício da produção. Apesar de culturas mixotróficas propiciarem um crescimento celular mais rápido, o meio é mais susceptível à contaminação por bactérias sendo necessária a utilização de cultivos fechados, o que implica no maior custo de produção da biomassa (POSTEN, 2016).

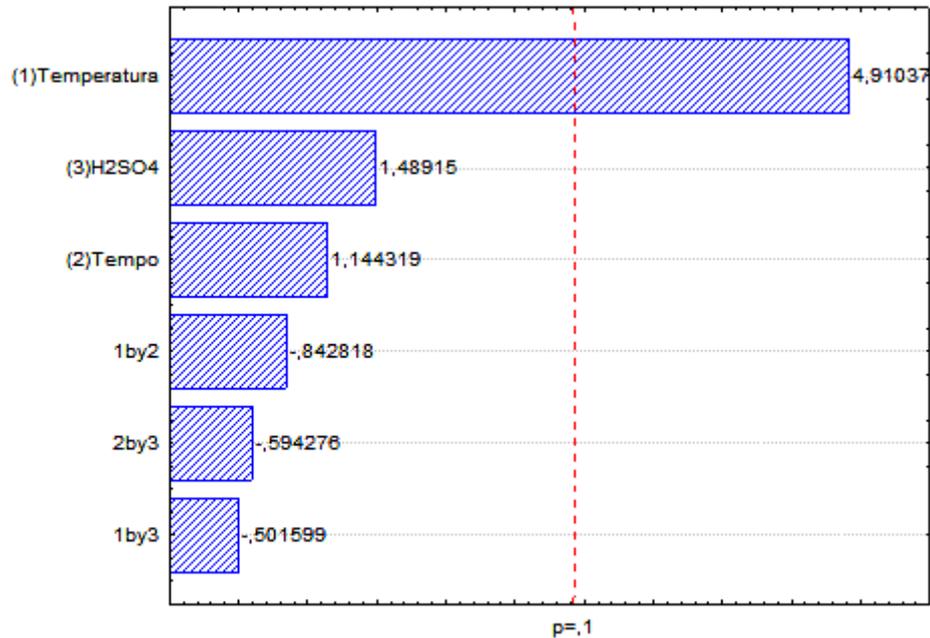
5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental, como experimento preliminar deste estudo, teve como objetivo avaliar o efeito dos fatores concentração de ácido sulfúrico, temperatura de hidrólise e tempo de reação, na etapa de hidrólise ácida de amido, visando a máxima concentração em g/L dos açúcares redutores (variável resposta), e dessa forma replicar as condições para as amostras de *E. gracilis*. A Tabela 4 mostra os resultados da variável resposta obtidos a partir deste planejamento fatorial completo.

Tabela 4 - Resultados da variável resposta (açúcares redutores) em g/L gerados a partir do planejamento experimental realizado neste trabalho

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%) de H₂SO₄ (Synth)	Concentração (g/L) de açúcares redutores (resposta)
1	111	5	0,04	1,701
2	111	5	0,08	2,803
3	127	5	0,04	5,852
4	127	5	0,08	8,212
5	111	15	0,04	2,8
6	111	15	0,08	5,006
7	127	15	0,04	7,642
8	127	15	0,08	6,923
9	119	10	0,06	4,495
10	119	10	0,06	6,393
11	119	10	0,06	4,244

A Figura 9, gerada através do *software* Statistica 7.0, mostra a influência de cada variável de forma independente e correlacionadas duas a duas.

Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados ($\alpha = 0,1$)

Estimativa padronizada dos efeitos(Valor Absoluto)

Conclui-se, a partir da Figura 9, que o único efeito significativo para a produção de açúcares redutores, nas condições utilizadas, é a temperatura de hidrólise (fator 1). A Tabela 5 apresenta os principais resultados da Análise de Variância (ANOVA) realizada para verificar a significância estatística destes resultados.

Tabela 5 - Análise de variância dos dados a 90% de confiança

ANOVA					
	Soma Quadrática da Variância	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	39,97379	6	6,66230	5,37268	4,009749
Resíduo	4,96013	4	1,24003		
Total	44,93392	10	7,90233		
Erro puro	2,76120	2	1,38060		
Falta de ajuste	2,19893	2	1,09947	0,79637	9

$$R^2 = 0,88961$$

Como observado na Tabela 5, os requisitos que tornam os resultados significativos foram atendidos, uma vez que F calculado (regressão) foi maior que o F tabelado; o F calculado para a falta de ajuste foi menor que o F tabelado; e o coeficiente de correlação R^2 foi aceitável. Dessa forma, é possível gerar os gráficos de superfície plana de resposta e avaliar a maneira como esta se comporta nos

intervalos escolhidos para os fatores independentes.

A partir desses resultados da hidrólise do amido, foram selecionados os parâmetros para a realização da hidrólise ácida da biomassa da espécie de microalga escolhida (*E. gracilis*), visando o aumento da produtividade e minimizando a geração de resíduos. Dessa maneira, a temperatura escolhida foi de 127 °C, não sendo mais elevada devido à limitação existente no equipamento. Como a concentração de ácido sulfúrico e o tempo não foram significativos, escolheu-se trabalhar com os valores intermediários das duas variáveis (0,06%(v/v) de ácido sulfúrico e tempo de 10 minutos). Evitou-se utilizar o maior valor de concentração de ácido sulfúrico visando a redução da produção de HMF, um inibidor da fermentação.

5.3 INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA E *PARAMYLON*, UTILIZANDO MEIO MINERAL

O crescimento microalgal é derivado de reações metabólicas da espécie de interesse e essas reações estão intrinsecamente ligadas a variáveis como intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes (DUARTE et al., 2001). Dessa maneira, estudou-se a influência do método de separação da biomassa no cultivo de *E. gracilis* na produção de *paramylon*, matéria-prima utilizada na fermentação alcoólica.

Os experimentos foram realizados de acordo com o desenho experimental descrito para o Experimento 01 (Fig. 5). A Tabela 6 sintetiza os resultados de açúcares redutores referentes às concentrações de biomassa seca obtidas após a separação da biomassa.

Tabela 6 - Concentração de açúcar redutor, biomassa seca e rendimento para as amostras cultivadas em meio mineral e hidrolisadas com ácido sulfúrico, diferindo no método de separação, centrifuga (C) e rotaevaporador (R).

Exp.	Amostras	Açúcares Redutores (g/L)	Peso seco (g/L)	Rendimento (g de açúcar/g de biomassa)
01	MSRA	0,48 ± 0,08	15,62	0,031
	MSCA	0,89 ± 0,05	22,92	0,040

As amostras separadas pelo processo de centrifugação apresentaram, após hidrólise com ácido sulfúrico diluído, cerca do dobro de concentração de açúcar redutor quando comparadas com as amostras que foram concentradas no

rotaevaporador (Tab. 6).

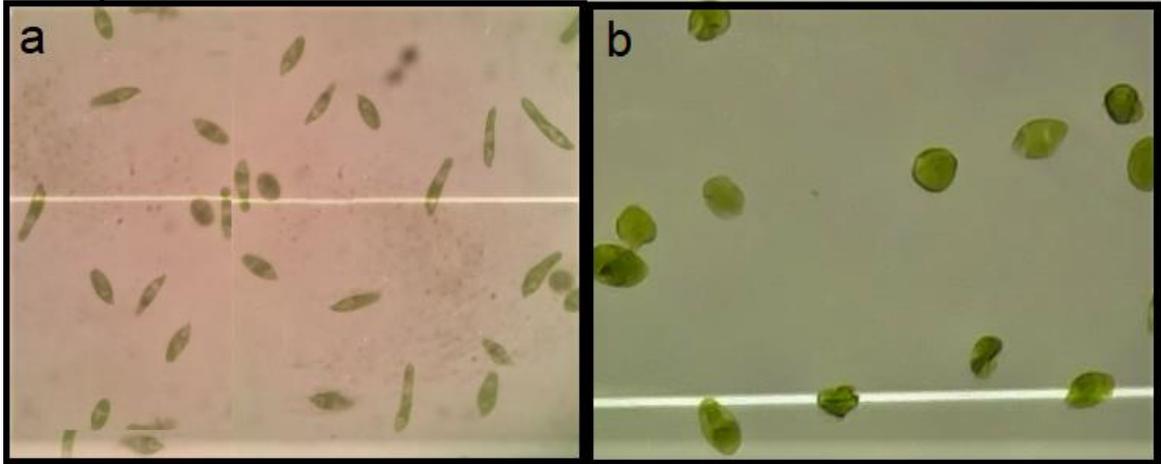
É importante ressaltar que embora as fases de estresse tenham sido realizadas no mesmo intervalo de tempo e com a mesma concentração de cloreto de ferro (II), a separação da biomassa foi feita em momentos distintos. Enquanto as amostras MSCA foram previamente separadas na centrífuga e a estas foi adicionado o ferro, as amostras MSRA foram previamente estressadas com este reagente para apenas em seguida ter a sua biomassa separada. Isto foi feito porque o processo de rotaevaporação, mesmo à vácuo, eleva a temperatura a cerca de 70 °C, acarretando morte celular.

Dessa forma, acredita-se que as amostras previamente concentradas na centrífuga, devido ao menor volume de meio existente, e conseqüentemente maior densidade celular, menor quantidade de nutrientes e acúmulo de produtos metabólicos, tenham sofrido um maior estresse celular. Sendo assim, houve um maior acúmulo de *paramylon*, ou seja, maior potencial de formação de açúcar redutor. Devido a isto a centrifugação foi adotada como processo padrão para a separação da biomassa nos demais experimentos.

No presente trabalho, o rendimento de açúcar redutor obtido foi de 0,040 g de açúcar redutor/g de biomassa seca (Tab. 6). Hernández et al. (2015) obtiveram cerca do dobro do rendimento (0,084 g de açúcar redutor/g de biomassa seca) a partir da espécie *Chlorella sorokiniana* cultivada em meio mineral. Porém, os autores realizaram a etapa de hidrólise com ácido sulfúrico em uma concentração do reagente cerca de 100 vezes maior.

A Figura 10 apresenta micrografias de amostra MSCA antes e depois da separação da biomassa e estresse com ferro. Pode-se visualizar células no formato agulha característico da espécie precedendo a concentração (Fig. 10a) e a mudança no formato para arredondado típico de células estressadas, já ao final do experimento (Fig. 10b).

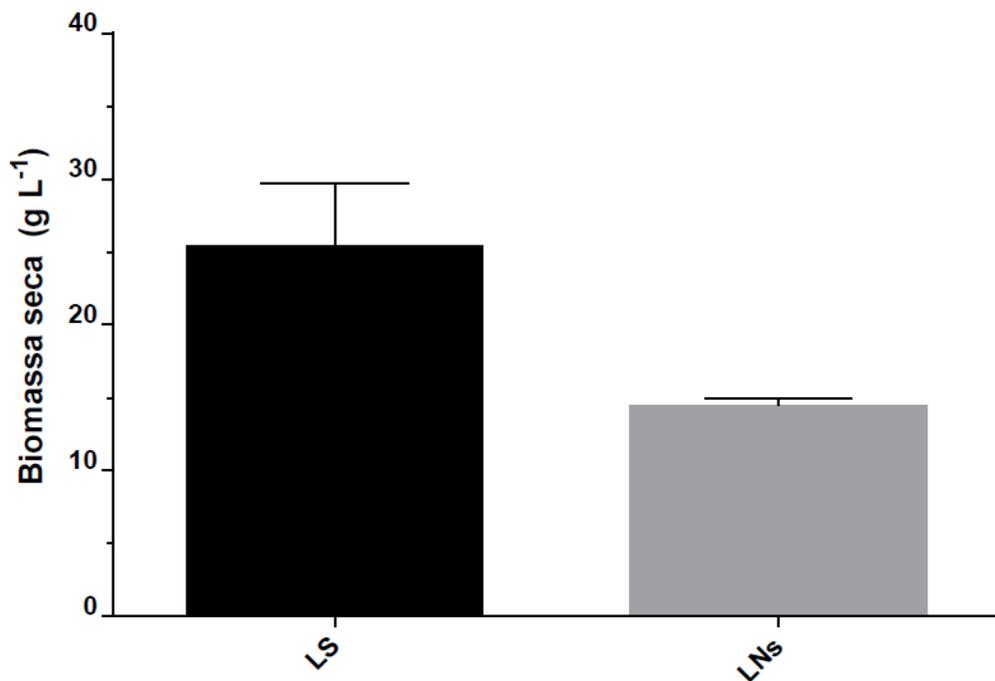
Figura 10 - Micrografias amostras MSCA (a) antes da separação da biomassa e (b) em condições de estresse com aumento de 400x



5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA E AÇÚCARES REDUTORES EM CULTIVOS MIXOTRÓFICOS SOB EFEITO DO FeCl_2

Compostos de ferro são frequentemente utilizados para induzir estresse oxidativo em células de microalgas visando a produção de moléculas de interesse biotecnológico, como por exemplo carboidratos, lipídeos e pigmentos (LIU, WANG e ZHOU, 2008; CAI, LI e QI, 2009; WAN et al., 2014). Para avaliar o seu efeito na *E. gracilis* foi realizado o Experimento 02 (Fig. 6). Os resultados em termo de produção de biomassa estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Influência da adição do FeCl_2 na produção de biomassa a partir de cultivos mixotróficos (L). Às amostras LS foram adicionados o reagente e às amostras LNs não foram adicionados



A adição do FeCl_2 influenciou positivamente a produção de biomassa, uma vez que as amostras que não passaram pelo tratamento com o reagente (LNs) obtiveram cerca da metade de densidade celular.

Alguns trabalhos envolvendo diferentes concentrações de micro e macronutrientes foram desenvolvidos com intuito de aumentar a biomassa microalgal. Mata, Almeida e Caetano (2013) observaram que o aumento de micro e macronutrientes favoreceu o aumento da biomassa seca de *Dunaliella tertiolecta* até uma determinada concentração. A adição de 10 vezes a concentração de FeCl_3 , por exemplo, resultou em maiores concentrações de biomassa do que a adição de 20 vezes. Já Liu, Wang e Zhou (2008) avaliaram que em relação a diferentes concentrações de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{EDTA}$ a densidade celular obtida de *Chlorella vulgaris* foi menor para a menor concentração de Fe^{3+} , porém maior do que a cultura sem a adição do reagente.

Cai, Li e Qi (2009) verificaram que a utilização de compostos contendo Fe^{2+} em cultivos de *Haematococcus pluvialis*, apesar de não resultarem na maior densidade celular, influenciaram de maneira mais efetiva na produção de astaxantina, quando

comparado com Fe^{3+} . Neste trabalho, será verificada a influência do FeCl_2 na produção de *paramylon* e potencial produção de açúcares redutores utilizando hidrólises ácida (A) e enzimática (E) (Tab. 7).

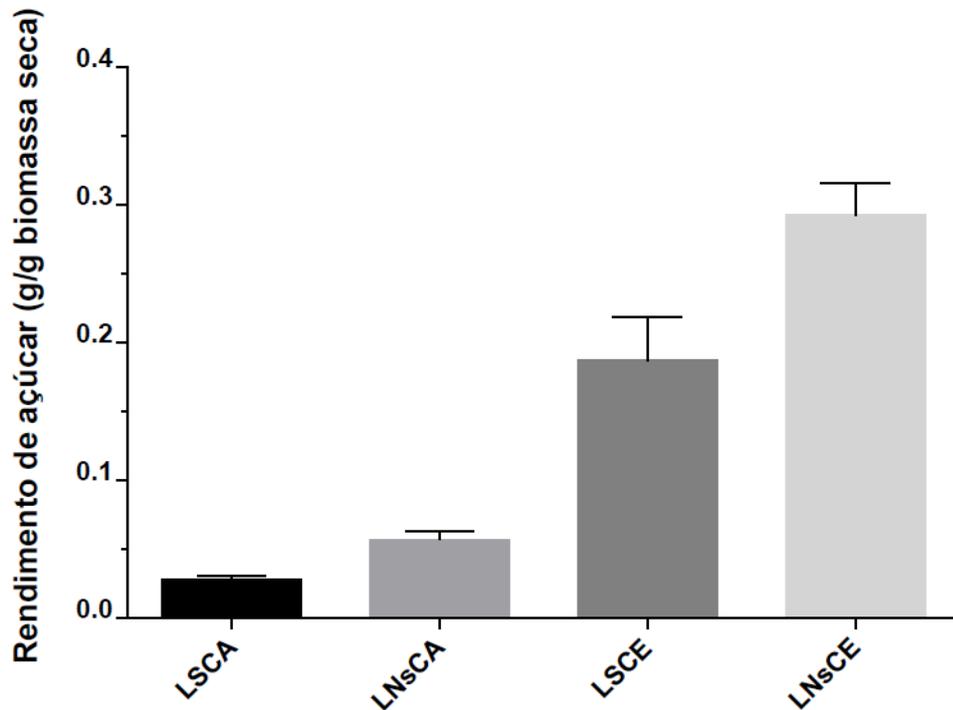
Tabela 7 - Concentração de açúcares redutores das amostras cultivadas em meio lactato (L). As amostras diferiram em relação à adição de FeCl_2 e hidrólise, ácida (A) e enzimática (E)

Exp.	Amostras	Açúcares Redutores (g/L)
02	LSCA	$0,71 \pm 0,06$
	LSCE	$4,75 \pm 0,80$
	LNsCE	$4,23 \pm 0,34$
	LNsCA	$0,82 \pm 0,09$

É possível notar que a presença do FeCl_2 não aumentou na mesma proporção a concentração de açúcares redutores em relação ao aumento da biomassa seca (Tab. 7). Dessa maneira, o uso deste reagente para a produção de bioetanol a partir de *E. gracilis* não é a melhor opção, sendo mais viável a não utilização do mesmo uma vez que economiza tempo, recursos e minimiza a geração de efluentes para o meio ambiente. As amostras hidrolisadas com enzima resultaram em concentração de açúcares redutores cerca de 5 vezes maior do que as amostras hidrolisadas com ácido sulfúrico diluído.

O uso da enzima sob as condições experimentais utilizadas no presente trabalho apresentou resultados mais promissores (Fig. 12) do que o uso ácido sulfúrico. O ácido como catalisador das reações de hidrólise resulta na degradação dos açúcares em HMF, furfural e ácido levulínico, diferentemente da enzima que atua apenas na quebra de ligações glicosídicas. Isto pode explicar o melhor desempenho desta em relação ao ácido sulfúrico (DONATELLA BARISANO, ISABELLA DE BARI, EGIDIO VIOLA, MARIA CANTARELLA, 2001).

Figura 12 - Rendimento de açúcar redutor das amostras cultivadas em meio mixotrófico que diferiram em relação à adição de FeCl_2 e hidrólise, ácida (A) e enzimática (E)



Chen, Chang e Chang (2016) estudaram a produção de carboidrato na *Chlorella vulgaris* FSP- E cultivada em meio mixotrófico. Estes autores obtiveram, aproximadamente, 11g/L de açúcar redutor realizando uma hidrólise enzimática com Acelerase 1500 (complexo enzimático especificamente destinado à biomassa utilizada) num sistema de produção equipado com intensidade luminosa uniforme em todos os pontos do fotobiorreator, agitação e concentrações ajustadas de uma mistura de CO_2 e ar continuamente alimentando o cultivo durante todo o período determinado. Estes fatores podem explicar a alta produção de açúcar redutor obtida.

Lee et al. (2013) obtiveram a partir da *Dunaliella tertiolecta*, microalga de água salgada, rendimentos de açúcares redutores de, aproximadamente, 0,03; 0,04; 0,15; 0,2 e 0,13 g/g de biomassa seca a partir de, respectivamente, 0,5; 1,6; 2,7; 3,7 e 5,3 % (v/v) de ácido sulfúrico em uma autoclave a 121 °C e 15 minutos. A cultura da *Dunaliella tertiolecta* utilizada por estes autores não passou por estresse oxidativo e o meio foi baseado na concentração de nutrientes contida na água do mar e, portanto, o mesmo foi confeccionado para que houvesse concentrações de nutrientes suficientes para o favorecimento do crescimento celular da espécie. No presente trabalho, a *E. gracilis* apresentou, no pior cenário (LSCA), um rendimento de 14%

comparado com o melhor rendimento obtido pelos autores a partir da *Dunaliella tertiolecta*. No melhor cenário (LNsCA) este valor corresponde a 27%. Além disso, é importante salientar que no presente trabalho foi utilizada uma concentração de ácido sulfúrico cerca de 8 vezes menor que a menor concentração utilizada pelos autores citados.

Hernández et al., (2015) obtiveram cerca de 0,075 g/g de biomassa a partir da *Chlorella sorokiniana* utilizando a Celuclast 1,5L e Novozyma 188 a 55°C, pH 4,5 por 72 h, uma concentração relativamente próxima a amostra LNsCE. Apesar dos parâmetros de processo serem semelhantes aos do presente trabalho, as enzimas utilizadas são mais específicas para catalisar a quebra da celulose em glicose, celobiose e polímeros de glicose com peso molecular mais elevado (SIGMA-ALDRICH, 2018). A enzima utilizada no presente trabalho é específica para quebrar as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (o *paramylon* apresenta ligações do tipo β -1,3). Dessa forma, é de se esperar que o rendimento da hidrólise enzimática tenha sido menor do que o encontrado pelos autores.

O uso de meio de cultura contendo carbono orgânico é susceptível à contaminação por bactérias (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Portanto, é necessário a avaliação de produção de açúcares redutores em meio mineral, mantendo a hidrólise enzimática, a concentração da amostra por meio de centrifuga e a não adição de FeCl_2 devido aos fatores já discutidos anteriormente (Tabela 88)

Tabela 8 - Concentração de açúcares redutores obtidos pelas amostras cultivadas em diferentes meios (lactato e mineral) através da hidrólise enzimática (E)

Exp.	Amostras	Açúcar redutor (g/L)	Peso seco (g/L)
03	LNsCE	3,8 ± 0,1	53,960 ± 0,005
	MNsCE	3,2 ± 0,1	27,030 ± 0,001

Apesar das amostras cultivadas no meio lactato resultarem em maior quantidade de biomassa microalgal, a produção de açúcares redutores é semelhante, resultando no rendimento de hidrólise menos eficiente. Dragone e colaboradores (2011) verificaram que o aumento da densidade celular da espécie *Chlorella vulgaris* P12 não resultou no aumento do acúmulo de carboidratos. A limitação de nutrientes pode propiciar a síntese de enzimas e estruturas celulares essenciais às células e,

por isso, o CO₂ fixado pode ser convertido em carboidrato ou lipídeo (RICHARDSON et al., 1969; DRAGONE et al., 2011).

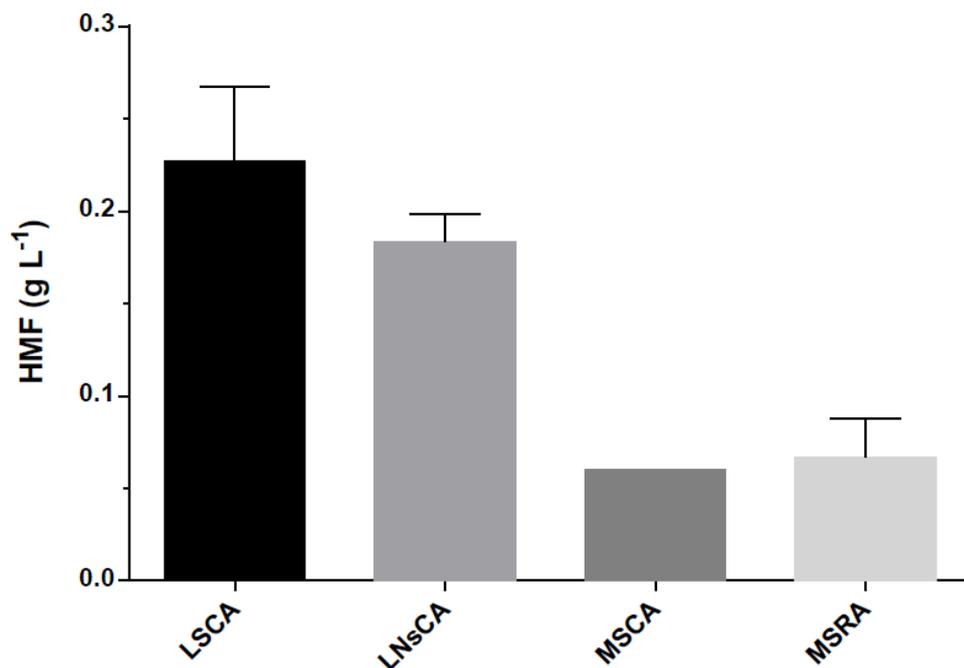
5.5 ANÁLISE DE HMF

A hidrólise de glicoses (pentoses e hexoses) a elevadas temperaturas em meio ácido é acompanhada da formação de 2-furanocarboxialdeído (furfural), 5-hidroximetilfurfural (HMF) e ácido levulínico (CORMA CANOS; IBORRA; VELTY, 2007). Essas substâncias são prejudiciais para o processo posterior de produção de etanol, pois inibem a fermentação dos açúcares produzidos na etapa de hidrólise (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Alguns trabalhos mostraram que a química da formação do HMF durante o processo de hidrólise é muito complexa. Além da desidratação, inclui processos de isomerização, fragmentação e condensação, influenciando de maneira direta no rendimento do processo (ANTAL; MOK; RICHARDS, 1990, *apud* CORMA CANOS; IBORRA; VELTY, 2007).

A concentração de HMF foi analisada em todas as amostras que passaram por tratamento ácido no processo de hidrólise e os resultados estão exibidos no gráfico a seguir (Figura 133).

Figura 13 - Concentrações de HMF (g/L) das amostras dos Experimentos 01 e 02 hidrolisadas com ácido sulfúrico (0,06% v/v)



Os resultados obtidos através da análise espectrofotométrica de HMF estão condizentes com o esperado, pois comparando as amostras cultivadas em meio lactato, nota-se que a concentração de HMF foi maior para a amostra que apresentou maiores concentrações de açúcares redutores. Estes resultados estão de acordo com o trabalho publicado por Corma Canos, Iborra e Velty (2007), cuja conclusão foi de que quanto maior a produção de açúcares redutores, a uma mesma temperatura, mais reações de degradação dos mesmos podem ser desencadeadas.

5.6 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO E DA ADIÇÃO DE FeCl_2 NA PRODUÇÃO DE ETANOL

Diferentes alíquotas foram coletadas durante a etapa de fermentação dos açúcares, em todos os experimentos realizados, para avaliação da interferência do tempo de reação na concentração de etanol. A Tabela 99 mostra as concentrações em g/L de etanol em função do tempo, para o Experimento 01.

Tabela 9 - Concentração de etanol (g/L) das amostras do Experimento 01

Concentração de etanol (g/L)			
Amostras	3 h	6 h	9 h
MSRA	0,21 ± 0,05	0,00	0,00
MSCA	0,14 ± 0,02	0,00	0,00

As amostras concentradas com o rotaevaporador (MSRA), iniciadas com uma concentração de biomassa microalgal de aproximadamente 15 g/L, resultaram em maiores concentrações de etanol, em relação às amostras concentradas na centrífuga (MSCA), que partiram de, aproximadamente, 23 g/L.

Embora seja esperado que concentrações mais elevadas de biomassa resultem em maiores concentrações de etanol, a separação da biomassa nas amostras que passaram pelo rotaevaporador apresentaram menores concentrações de HMF do que as que passaram na centrífuga, levado a uma diminuição na produção de etanol nesta em relação àquela. De acordo com a Equação 3, os rendimentos da fermentação das amostras do Experimento 01 foram 1,4 e 0,56% (p/p) para as amostras concentradas no rotaevaporador e na centrífuga, respectivamente.

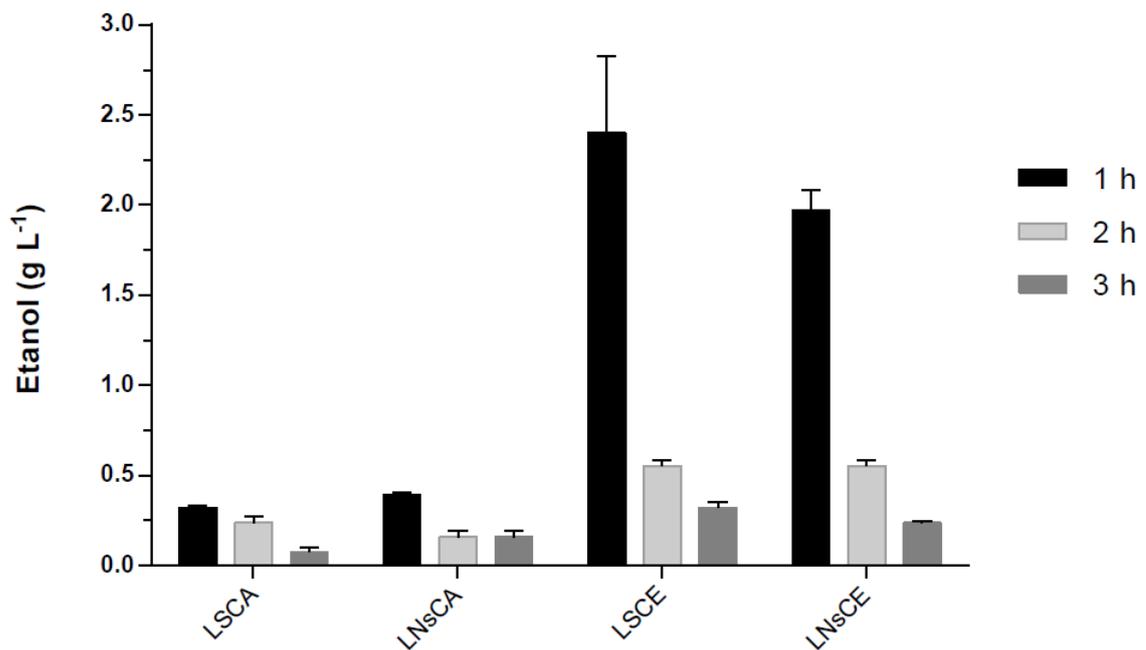
O baixo rendimento de fermentação encontrado pode ser justificado por duas

hipóteses. Na primeira, a baixa concentração de açúcar disponível na biomassa resulta no desvio metabólico da levedura, que passa a priorizar a respiração celular, em detrimento da fermentação (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

A segunda hipótese diz respeito ao tempo de fermentação. Nota-se que após 6 e 9 h de reação não houve produção de etanol. Sendo assim, é possível que, com o passar do tempo, a concentração de etanol tenda a reduzir, devido ao seu consumo pela levedura (PIŠKUR et al., 2006). Conseqüentemente, o intervalo de tempo de 3 h pode não ter sido o mais adequado para realização deste experimento, levando a um rendimento baixo.

Para verificar esta hipótese, no Experimento 02 foram retiradas três alíquotas em intervalos de tempo de 1 h e os resultados encontram-se dispostos na Figura 144.

Figura 14 - Concentração de etanol (g/L) das amostras do Experimento 02 cujas alíquotas de fermentação foram retiradas em um intervalo de tempo de 1h



É possível observar que o tempo é realmente um fator determinante na produção de etanol, pois ao longo dos intervalos de 1 h a concentração do biocombustível reduziu de forma considerável (Fig. 14). Durante o processo de fermentação, os açúcares são rapidamente consumidos produzindo etanol. A diminuição deste ao longo do tempo sugere que houve uma diminuição da fonte de açúcar no caldo fermentado, pois o etanol formado torna-se fonte de carbono e a levedura utiliza do mesmo para continuar a se reproduzir, diminuindo a concentração

do biocombustível (DEL CAMPO et al., 2006).

Verifica-se que as amostras hidrolisadas com enzima (LSCE e LNsCE), por produzirem maiores concentrações de açúcares redutores e não produzirem inibidores da fermentação alcoólica, resultaram em maiores concentrações de etanol.

Além disso, como visto na seção 5.5 (Tabela 67), a adição do cloreto de Fe (II) não influenciou na produção de açúcares; agora observa-se o mesmo comportamento em relação à produção de bioetanol, pois não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras estressadas (S) e não estressadas (Ns) (Fig. 14). Serna, Isaza e Betancur (2010) verificaram que a fermentação a partir de três cepas de *S. cerevisiae* do meio YPD modificado, com concentrações de ferro (III) variando de 0 a 150 μ M, resultou na diminuição progressiva da produção de etanol. Gutierrez (1993) verificou que a ausência de ferro no cultivo da *S. cerevisiae* não inibiu a produção de bioetanol. Já Gaensly et al. (2014) verificaram que diferentes concentrações de ferro podem influenciar na absorção do mesmo pela levedura. Neste trabalho foi utilizado 0,1 g/L (788 μ M) do reagente cloreto de ferro (II) e foi verificado que não houve influência na produção de bioetanol. Desta maneira, é possível concluir que a utilização de diferentes compostos de ferro no cultivo da levedura depende da cepa que está sendo utilizada e do estado de valência do ferro.

Utilizando a Equação 3, descrita na metodologia, foram calculados os rendimentos da etapa de fermentação, para cada amostra (Tab. 10).

Tabela 10- Rendimentos da fermentação das amostras do Experimento 02

Amostras	Rendimento da fermentação (g/ g
	biomassa seca)
LSCA	0,45 \pm 0,06
LSCE	0,50 \pm 0,02
LNsCE	0,47 \pm 0,03
LNsCA	0,48 \pm 0,03

No presente trabalho, o rendimento máximo de etanol produzido a partir de açúcares redutores provenientes de hidrólise ácida, foi de 48% (Tab. 10). Nguyen e colaboradores (2009) estudaram a produção de bioetanol a partir da *Chlamydomonas*

reinhardtii. Os autores realizaram a hidrólise com uma quantidade de ácido sulfúrico 50 vezes menor e uma temperatura cerca de 15% maior e obtiveram um rendimento mássico de fermentação de 51% (máximo teórico) a partir de 28,5 g/L de glicose. Isso mostra que, a depender da espécie estudada, maiores concentrações de ácido sulfúrico e menor temperatura de hidrólise podem desencadear uma combinação de fatores favorável à produção de bioetanol.

Com base nos resultados obtidos nos Experimentos 01 e 02, foi planejado e realizado o Experimento 03 com o objetivo de comparar a produção de etanol a partir da *E. gracilis* cultivada em meio lactato e mineral, sem adição de cloreto de Fe (II) e utilizando a hidrólise enzimática a qual mostrou maior desempenho. A Tabela 11 mostra as concentrações em g/L de etanol produzido.

Tabela 11 - Concentração de etanol (g/L) das amostras do Experimento 03

Concentração de etanol (g/L)		
Amostras	30 min	1 h
LNsCE	1,10 ± 0,08	0,81 ± 0,01
MNsCE	1,04 ± 0,08	1,06 ± 0,11

Conclui-se que o meio de cultivo não resultou em concentrações de bioetanol estatisticamente muito diferentes.

Os rendimentos da fermentação do Experimento 03 foram calculados com base na equação 3 (Tab. 12).

Tabela 12 - Rendimentos da fermentação das amostras do Experimento 03

Amostras	Rendimento da fermentação (%)
LNsCE	28,9 ± 2,2
MNsCE	32,5 ± 1,8

Tanto as concentrações de bioetanol (Tab. 11), quanto os rendimentos de fermentação não são estatisticamente diferentes (Tab. 12). O que implica que, para a *E. gracilis*, a produção de bioetanol em 1 h de fermentação não depende dos meios de cultivos utilizados neste trabalho.

O rendimento global (g de etanol/g biomassa seca) do processo de cada experimento está disposto na Tabela 13.

Tabela 13 - Rendimento (%) da fermentação alcoólica com base na biomassa seca

Experimentos	Amostras	Rendimento global (g etanol/g biomassa seca)
01	MSRA	0,013 ± 0,001
	MSCA	0,006 ± 0,002
02	LSCA	0,012 ± 0,002
	LSCE	0,097 ± 0,030
	LN _s CE	0,139 ± 0,003
	LN _s CA	0,027 ± 0,002
03	LN _s CE	0,020 ± 0,001
	MN _s CE	0,040 ± 0,005

O maior rendimento em bioetanol foi 13,9% (g de etanol/g biomassa seca), a partir da microalga *E. gracilis* cultivada em meio lactato, sem adição de cloreto de ferro (II), a partir de hidrólise enzimática por 72 h e pH aproximadamente 4,5. O menor rendimento em bioetanol foi de 0,6% (g de etanol/g biomassa seca) quando houve hidrólise com ácido sulfúrico 0,06% (v/v) em uma autoclave vertical a 127 °C e 10 min.

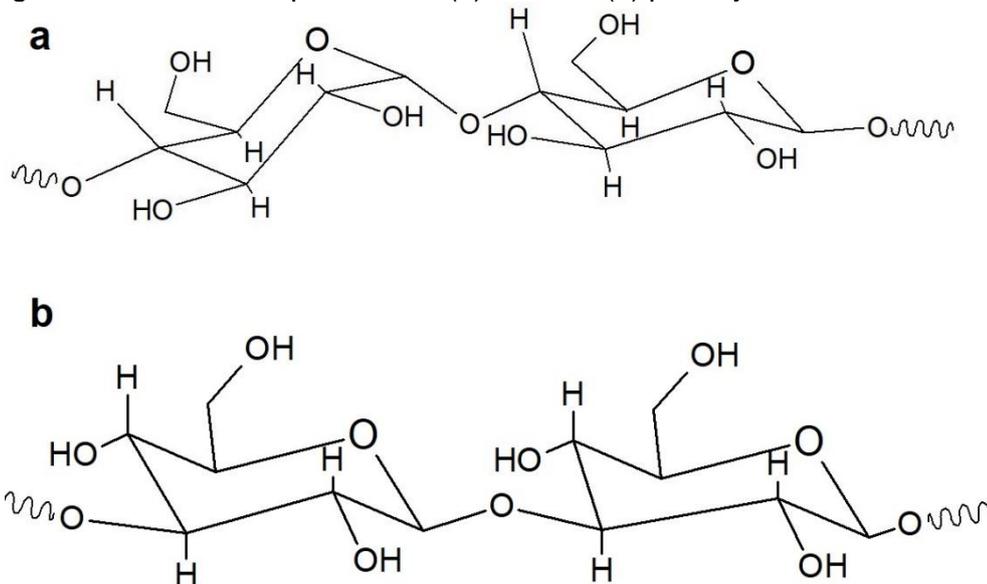
Harun e Danquah (2011) obtiveram rendimento de 52% (p/p de biomassa seca) de bioetanol usando uma concentração de 3% de ácido sulfúrico, em uma autoclave a 160 °C e 15 minutos. Segundo o planejamento experimental desenvolvido pelos autores, as amostras apresentaram uma tendência a aumentar a concentração de etanol quando a hidrólise ácida ocorreu entre 140 °C e 160 °C. O pré-tratamento realizado fora desse intervalo resultou em menores rendimentos de etanol.

Grohmann e colaboradores (1981) relataram que temperaturas de hidrólise ácida entre 140 °C e 160 °C produzem celulose altamente digerível. Porém, temperaturas muito elevadas tendem a diminuir a concentração de açúcares fermentáveis porque ocorre uma solubilização direta dos açúcares complexos em detrimento à formação de açúcares simples.

Ho e colaboradores (2013) utilizaram a *Chlorella vulgaris* FSP-E para a produção de bioetanol. Os autores realizaram a etapa da hidrólise ácida (1% (v/v)) separada da fermentação e obtiveram a partir da *Zymomonas mobilis* e após 50 h de fermentação um rendimento de, aproximadamente, 0,175 (g/g de biomassa seca).

De acordo com os resultados da literatura, conclui-se que a temperatura de hidrólise ácida é um parâmetro importante na conversão de polissacarídeos em açúcares simples. A temperatura de 127 °C utilizada nos experimentos de hidrólise ácida deste trabalho pode não ter sido suficiente para a obtenção de maiores quantidades de açúcares redutores. Além disso, observa-se também a partir da literatura que a concentração de H₂SO₄ utilizada na etapa de hidrólise, no caso do *paramylon* da *E. gracilis*, deveria ter sido um pouco mais elevada quando comparada à hidrólise de amido simples utilizado na primeira etapa deste trabalho, visando construir o planejamento dos experimentos. Esta hipótese se deve ao analisar-se a conformação da ligação glicosídica existente no amido simples (α -1,4) e no *paramylon* (β -1,3), a qual é mais forte (Fig. 15 a e b).

Figura 15 - Estruturas químicas do (a) amido e (b) paramylon



Fonte: (a) Adaptado de Denardin e Silva (2009) e (b) Adaptado de Stone (2009)

A molécula de amido apresenta hélices orientadas radialmente e o crescimento da mesma se dá de maneira perpendicular. Devido ao elevado peso dos constituintes do amido (amilase e amilopectina) a molécula tende a gerar ligações curvas, tornando as ligações glicosídicas no amido mais fáceis de serem rompidas (SARKO, WU e CHUAH, 1983). Segundo Deslandes (1979) (apud SARKO, WU e CHUAH, 1983), no *paramylon* a orientação das ligações são tangenciais, o que facilita o empacotamento e, conseqüentemente, a estabilização da ligação glicosídica.

Porém, mesmo com baixas concentrações de ácido sulfúrico e uma

temperatura de reação menor do que a recomendada por Grohmann (1981), no presente trabalho atingiu-se um rendimento de fermentação de 48% (g de etanol/ g açúcares redutores) obtido nas amostras cultivadas em meio lactato e hidrolisadas a 127 °C, com ácido sulfúrico diluído (0,06% (v/v)) por 10 min. Como visto anteriormente, este rendimento é bem próximo do máximo rendimento teórico da fermentação (51,1% (p/p)). Apesar deste alto rendimento, a hidrólise ácida apresentou uma menor produção de açúcares redutores, o que implicou num baixo rendimento global do processo. O uso da hidrólise enzimática, no entanto, apresentou um rendimento em açúcares redutores 5 vezes maior e não comprometeu a etapa de fermentação, resultando num alto rendimento global do processo como um todo (13,9% (p/p)), indicando que a *E. gracilis* pode se tornar uma matéria-prima viável para a produção de bioetanol.

Para a utilização desta espécie como matéria-prima para a produção de bioetanol em larga escala, se faz necessário um estudo detalhado da viabilidade econômica, financeira e ambiental do processo, uma vez que o resultado obtido neste trabalho indicou a viabilidade técnica de sua utilização.

Uma síntese de todos os resultados deste estudo está disposta no Quadro 3. Estes resultados foram adicionados ao Quadro 1 como uma forma de compará-los com os parâmetros utilizados em outros trabalhos da literatura.

Quadro 3 - Comparação entre os parâmetros da literatura e os obtidos neste estudo para a produção de bioetanol de terceira geração

Microalga	Biomassa	Hidrólise	T (°C) hidrólise	Açúcar (g L ⁻¹)	Fermentação	EtOH (g L ⁻¹)	Rendimento (g etOH/ g biomassa seca)	Autor
<i>Chlorococum sp</i>	10 g L ⁻¹	N.D.	N.D.	N.D.	<i>Saccharomyces bayanus</i> 60 h	3,58	0,358	Harun, Danquah e Forde (2009)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5% (p/v)	Amiloglucosidade (<i>Aspergillus niger</i>) 30 min	55	N.D.	<i>S. cerevisiae</i> 40 h	11,73	0,235	Choi et al (2010)
<i>Chlorococcum humicola</i>	15 g L ⁻¹	Forno 30 min	140	N.D.	<i>S. cerevisiae</i> 24 h	7,2	0,48	Harun e Danquah (2011)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	5% (p/v)	Amiloglucosidase (AMG 300L) 12 h	55	21	<i>S. cerevisiae</i> 17 h	7	0,14	Lee et al (2013)
<i>C. vulgaris</i> FSP-E	20 g L ⁻¹	<i>Pseudomonas sp.</i> CL3 (sobrenadante) 48 h	45	N.D.	<i>Z. mobilis</i> 50 h	4,27	0,214	Ho et al (2013)
<i>C. vulgaris</i> FSP-E	20 g L ⁻¹	<i>Pseudomonas sp.</i> CL3 isolada 48 h	45	7,78	<i>Z. mobilis</i> 18 h	3,55	0,178	Ho et al (2013)
<i>C. vulgaris</i> FSP-E	50 g L ⁻¹	[H ₂ SO ₄] = 1% (v/v) 20 min	121	23,6	<i>Z. mobilis</i> 13 h	11,6	0,233	Ho et al (2013)
<i>Tribonema sp</i>	50 g L ⁻¹	[H ₂ SO ₄] = 3% (v/v) 20 min	121	14,5	<i>S. cerevisiae</i> 16 h	5,11	0,1022	Wang et al (2014)
<i>E. gracilis</i>	14,48 g L ⁻¹	[H ₂ SO ₄] = 0,06% (v/v) 10 min	127	0,82	<i>S. cerevisiae</i> 3 h	0,39	0,027	Este estudo
<i>E. gracilis</i>	14,48 g L ⁻¹	Celulase 48 h	50	4,23	<i>S. cerevisiae</i> 1 h	1,97	0,1360	Este estudo

6 CONCLUSÕES

A *E. gracilis* apresentou um crescimento significativamente superior quando cultivado no meio orgânico (lactato) em relação ao meio mineral.

A utilização do cloreto de Fe (II) como fonte de estresse da microalga não afetou de forma estatisticamente significativa a produção de *paramylon*, açúcares redutores tanto em hidrólise ácida, quanto utilizando a enzimática, nem a produção de bioetanol, ao utilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A adição do FeCl_2 influenciou positivamente a produção de biomassa, uma vez que as amostras que não passaram pelo tratamento com o reagente (LNs) obtiveram cerca da metade de densidade celular. Porém, como não foi visto um efeito proporcional na produção de *paramylon* e de açúcares redutores, acredita-se que este composto tenha influenciado o metabolismo de outras frações celulares tais como glicerídeos, que não são objetos do presente estudo e, portanto, não foram analisados.

As amostras hidrolisadas com a enzima Celulase resultaram em concentração de açúcares redutores cerca de 5 vezes maior do que as amostras hidrolisadas com ácido sulfúrico diluído, partindo de condições iniciais de biomassa idênticas.

É possível observar que o tempo de fermentação é um fator determinante na produção do bioetanol, pois ao longo dos intervalos de 1 h a concentração do biocombustível reduziu de forma considerável, devido ao seu consumo pela própria levedura. Experimentos com tempos menores que 3 h confirmaram esta hipótese e permitiram um alto rendimento global do processo, atingindo-se no presente trabalho o valor máximo de 13,9% (g de etanol/g biomassa seca), a partir da microalga *E. gracilis* cultivada em meio lactato, sem adição de cloreto de ferro (II), a partir de hidrólise enzimática por 72 h e pH aproximadamente 4,5.

A produção de etanol a partir da espécie *E. gracilis* mostra que, no âmbito técnico, esta pode ser uma matéria-prima viável para a produção do biocombustível. Uma das vantagens da utilização da espécie se deve à não necessidade de uma etapa de pré-tratamento, uma vez que a mesma não apresenta parede celular rígida e,

portanto, demanda menos gastos de energia e reagentes no processo como um todo. Além disso, é importante salientar que, a partir da hidrólise ácida o rendimento da fermentação foi 48% (máximo 51,1%). Apesar deste alto rendimento, a hidrólise ácida apresentou uma menor produção de açúcares redutores, o que implicou num baixo rendimento global do processo. O uso da hidrólise enzimática, no entanto, apresentou um rendimento em açúcares redutores 5 vezes maior e não comprometeu a etapa de fermentação, resultando num alto rendimento global do processo como um todo (13,9% (p/p)), indicando que a *E. gracilis* pode se tornar uma matéria-prima viável para a produção de bioetanol, indicando que a *E. gracilis* pode ser uma espécie com potencial para a produção de bioetanol.

7 TRABALHOS FUTUROS

De acordo com os resultados gerais do trabalho, observou-se que o uso do FeCl_2 para o aumento da produção de *paramylon* não obteve sucesso. Dessa maneira, é importante conhecer os parâmetros do cultivo de *E. gracilis* que interferem no aumento da produção de *paramylon* e, conseqüentemente, aumentar a produção de etanol.

Além disso, surge a necessidade de realizar um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) envolvendo amostras de *Euglena gracilis* para avaliar se os parâmetros da hidrólise do *paramylon* interferem com a mesma significância dos parâmetros da hidrólise do amido. Como os equipamentos disponíveis no laboratório apresentam uma limitação de temperatura de trabalho, é importante realizar outros experimentos de hidrólise ácida a temperaturas mais elevadas, assim como avaliar o efeito de concentrações maiores do que 0,06% (v/v) de ácido sulfúrico na etapa de hidrólise do *paramylon*.

Sugere-se ainda a realização da etapa de fermentação em um reator fechado para que não haja entrada de oxigênio no sistema e, o mesmo, não interfira no rendimento global do processo.

Realizar a fermentação simultânea à hidrólise enzimática e comparar os resultados com estas etapas realizadas separadamente.

Fazer um estudo de viabilidade econômica, financeira e ambiental do processo de produção de bioetanol a partir de *E. gracilis*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, F.; DATE, A.; RASJIDIN, R.; MOBIN, S.; MORIA, H.; BAQUI, A. Biofuel from algae-Is it a viable alternative? **Procedia Engineering**, v. 49, p. 221–227, 2012.
- ANASTAS, P. T.; ZIMMERMAN, J. B. Design of through the Twelve Principles of Green Engineering. **Environmental Science & Technology**, v. 1, p. 95A–101A, 2003.
- BAJPAI, P. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-0687-6>>.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.
- BARSANTI, L.; VISMARA, R.; PASSARELLI, V.; GUALTIERI, P. Paramylon (β -1, 3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis* . Effects of growth conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 59–65, 2000. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t47413837j58641x/>>.
- BECKER, E. W. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. In: [s.l: s.n.]p. 293.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>>.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 313–321, 1999.
- BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. COMPORTAMENTO DAS FERMENTAÇÕES ALCOÓLICA E ACÉTICA DE SUCOS DE KIWI (*Actinidia deliciosa*): COMPOSIÇÃO DOS MOSTOS E MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO ACÉTICA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 236–243, 2001.
- BRAYNER, R.; CORADIN, T.; BEAUNIER, P.; GRENÈCHE, J. M.; DJEDIAT, C.; YÉPRÉMIAN, C.; COUTÉ, A.; FIÉVET, F. Intracellular biosynthesis of superparamagnetic 2-lines ferri-hydrate nanoparticles using *Euglena gracilis* microalgae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 20–23, 2012.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BUENO, J. **A Matriz Energética Brasileira : Situação Atual e Perspectivas**, 2013.
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Extraction and characterization of hemicelluloses from flax shives by different methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 17–25, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.014>>.
- CAI, M.; LI, Z.; QI, A. Effects of iron electrovalence and species on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 2, p. 370–375, 2009.
- CARVALHO, SIMONE PEREIRA; CARRIJO, E. L. de O. POLÍTICAS SETORIAIS E MACROECONÔMICAS A produção de álcool : do PROÁLCOOL ao contexto atual. In: Sober, XLV Congresso da Sober, Conhecimentos para agricultura do futuro, Londrina. **Anais...** Londrina: 2007.

- CHEN, C. Y.; CHANG, H. Y.; CHANG, J. S. Producing carbohydrate-rich microalgal biomass grown under mixotrophic conditions as feedstock for biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4413–4420, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.163>>.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2007.
- CHOI, S. P.; NGUYEN, M. T.; SIM, S. J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5330–5336, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.026>>.
- CORMA CANOS, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2411–2502, 2007.
- CRUTZEN, P. J.; MOSIER, A. R.; SMITH, K. A.; WINIWARTER, W. N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. **Atmospheric Chemistry and Physics Discussions**, v. 7, n. 4, p. 11191–11205, 2008. Disponível em: <<http://www.atmos-chem-phys-discuss.net/7/11191/2007/>>.
- DEL CAMPO, I.; ALEGRÍA, I.; ZAZPE, M.; ECHEVERRÍA, M.; ECHEVERRÍA, I. Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 3, p. 214–221, 2006.
- DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 8, p. 2106–2116, 2008.
- DEMİRBAŞ, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. **Energy Sources**, v. 27, n. 4, p. 327–337, 2005. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00908310390266643>>.
- DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. da. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000300052&lng=pt&tlng=pt>.
- DÍAZ-PALMA, P.; STEGEN, S.; QUEIROLO, F.; ARIAS, D.; ARAYA, S. Biochemical profile of halophilous microalgae strains from high-andean extreme ecosystems (NE-Chile) using methodological validation approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 6, p. 730–736, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.01.015>>.
- DIONYSIO, RENATA BARBOSA; MEIRELLES, F. V. P. **A química que move o mundo** Rio de Janeiro, 2015. . Disponível em: <[http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala de Leitura/conteudos/SL_combustiveis.pdf](http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_combustiveis.pdf)>.
- DOAN, Q. C.; MOHEIMANI, N. R.; MASTRANGELO, A. J.; LEWIS, D. M. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 79–88, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.08.022>>.
- DONATELLA BARISANO, ISABELLA DE BARI, EGIDIO VIOLA, MARIA CANTARELLA, A. G. State of the Art in Bioethanol Production. p. 85, 2001.
- DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; ABREU, A. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae.

Applied Energy, v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.012>>.

DUARTE, M. M. M. B.; DA SILVA, J. E.; PASSAVANTE, J. Z. D. O.; FERNANDA PIMENTEL, M.; DE BARROS NETO, B.; DA SILVA, V. L. Macroalgae as Lead Trapping Agents in Industrial Effluents - A Factorial Design Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 499–506, 2001.

ECODEBATE, R. **Queima de combustíveis fósseis no mundo cresce e eleva risco de aquecimento**. Disponível em:

<<https://www.ecodebate.com.br/2008/04/11/queima-de-combustiveis-fosseis-no-mundo-cresce-e-eleva-risco-de-aquecimento/#>>. Acesso em: 24 jun. 2017.

FARINAS, C. S. **A Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação** Embrapa Instrumentação São Carlos, 2011. .

FINCO, M. V. A.; DOPPLER, W. The Brazilian biodiesel program and family farmers: What is the social inclusion reality in the Brazilian savanah? **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 40, n. 4, p. 430–438, 2010.

GAENSLY, F.; PICHETH, G.; BRAND, D.; BONFIM, T. M. B. The uptake of different iron salts by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 491–494, 2014.

GAIL LORENZ MILLER. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. III, p. 426–428, 1959.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 2046, 2010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0ay00525h>>.

GROSSI, E. C. **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose** Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose. 2015. Universidade de Brasília (UNB), 2015.

GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M. H. M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R. H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243–260, 2015.

GUO, G. L.; CHEN, W. H.; CHEN, W. H.; MEN, L. C.; HWANG, W. S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6046–6053, 2008.

GUTIERREZ, L. E. Effect of some vitamins and micronutrient deficiencies on the production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 3, p. 484–489, 1993. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161993000300024&lng=en&tlng=en>.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 304–309, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.027>>.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 199–203, 2009.

- HARUN, R.; JASON, W. S. Y.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M. K. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3464–3467, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.10.048>>.
- HARUN, R.; YIP, J. W. S.; THIRUVENKADAM, S.; GHANI, W. A. W. A. K.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M. K. Algal biomass conversion to bioethanol-a step-by-step assessment. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 1, p. 73–86, 2014.
- HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; COCA, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939–945, 2015.
- HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>>.
- JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>>.
- KELMAN, J. **Atlas de Energia Elétrica do Brasil (ANEEL)**. [s.l: s.n.]
- KIRK, B. J. T.; JUNIPER, B. E. The fine structure of the pellicle of euglena gracilis. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 82, n. 1957, p. 205–210, 1964.
- KLEIN, B. C. **Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração**. 2013. Universidade de Campinas, 2013.
- KORN, E. D. The fatty acids of Euglena gracilis. **Journal of lipid research**, v. 5, p. 352–362, 1964.
- LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673–690, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.008>>.
- LASHINSKY, A. **How to beat the high cost of gasoline. Forever: Ethanol is the answer to the energy dilemma. It's clean and green and runs in today's cars**. Disponível em: <http://money.cnn.com/2006/01/24/news/economy/biofuel_fortune_020606/>. Acesso em: 25 jun. 2017.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 89–101, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>>.
- LEE, O. K.; KIM, A. L.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; JUNG, Y. T.; LEE, J. W.; LEE, E. Y. Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 197–201, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.007>>.
- LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 307–315, 2001.

- LI, A.; ANTIZAR-LADISLAO, B.; KHRAISHEH, M. Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 3, p. 189–196, 2007.
- LI, Y. R.; TSAI, W. T.; HSU, Y. C.; XIE, M. Z.; CHEN, J. J. Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. **Energy Procedia**, v. 52, p. 371–376, 2014.
- LIRA, RAFAEL DE ARAÚJO; MARTINS, MARCIO ARÊDES; MACHADO, MARIANA FONSECA; CORRÊDO, LUCAS DE PAULA; MATOS, A. T. As microalgas como alternativa à produção de biocombustíveis. **Reveng**, v. 20, p. 389–403, 2012.
- LIU, Z. Y.; WANG, G. C.; ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4717–4722, 2008.
- LORA, J. H.; GLASSER, W. G. Recent Industrial Applications of Lignin: A Sustainable Alternative to Norenewable Materials. **J. Polym. Environ.**, v. 10, n. 1/2, p. 39–48, 2002.
- MATA, T. M.; ALMEIDA, R.; CAETANO, N. S. Effect of the culture nutrients on the biomass and lipid productivities of microalgae *dunaliella tertiolecta*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, n. April, p. 973–978, 2013.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.
- MATTOZO, V. A. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MÍDIA DIGITAL DE INFORMAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA**. 2002. 2002.
- MENDEZ, L.; MAHDY, A.; DEMUEZ, M.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: Organic matter solubilisation and biochemical methane potential. **Fuel**, v. 117, n. PART A, p. 674–679, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.032>>.
- MENDONÇA, J. L. de; CONCÓRDIA, M.; PANIZZI, C. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS.Comunicado Técnico (CNPq)**BrasíliaEMBRAPA, , 2013. .
- MIRANDA, J. R. P. de C. **Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. 2011.
- MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: The influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 2, p. 555–564, 2012a.
- MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 342–348, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.059>>.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>>.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98–100, p. 49–58, 2002.

NGUYEN, M. T.; CHOI, S. P.; LEE, J.; LEE, J. H.; SIM, S. J. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 161–166, 2009.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>>.

OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 1–8, 2001.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312–331, 1996.

PARAIZO, D. **Aplicações e usos do etanol**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/aplicacoes/>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

PARK, I.; KIM, I.; KANG, K.; SOHN, H.; RHEE, I.; JIN, I.; JANG, H. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 487–492, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.006>>.

PASSOS, F.; CARRETERO, J.; FERRER, I. Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, n. May, p. 667–672, 2015.

PASSOS, F.; UGGETTI, E.; CARRERE, H.; FERRER, I. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. **Bioresource Technology**, v. 172, n. September, p. 403–412, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.114>>.

PAULO, V. P. F. **Optimização da produção de açúcares por microalgas para a produção de bioetanol**. 2011. Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

PEREIRA, E. M. O Ouro Negro: Petróleo e suas crises políticas, econômicas, sociais e ambientais na 2ª metade do século XX. **Outros Tempos**, v. 5, p. 54–72, 2008.

PETROU, E. C.; PAPPIS, C. P.; PETROU, E. C.; PAPPIS, C. P. Biofuels : A Survey on Pros and Cons Biofuels : A Survey on Pros and Cons. **Energy & Fuels**, v. 23, n. January, p. 1055–1066, 2009.

PIŠKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICCO, A.; COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v. 22, n. 4, p. 183–186, 2006.

POLONINI, H. C.; BRANDÃO, H. M.; RAPOSO, N. R. B.; MOUTON, L.; YÉPRÉMIAN, C.; COUTÉ, A.; BRAYNER, R. Ecotoxicological studies of micro- and nanosized barium titanate on aquatic photosynthetic microorganisms. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 58–70, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.005>>.

POSSATTO, A. R. **MICROALGAS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL : UMA REVISÃO**. 2009. 2009.

POSTEN, C. **Microalgae Biotechnology**. [s.l.: s.n.]v. 153

RAZMOVSKI ., R.; VUČUROVIĆ, V. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 4–5, p. 378–385, 2011.

RICHARDSON, B.; ORCUTT, D. M.; SCHWERTNER, H. A.; MARTINEZ, C. L.; WICKLINE, H. E. Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. **Applied microbiology**, v. 18, n. 2, p. 245–50, 1969. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16349857%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC377951>>.

RODRIGUEZ, L. A.; TORO, M. E.; VAZQUEZ, F.; CORREA-DANERI, M. L.; GOUIRIC, S. C.; VALLEJO, M. D. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 11, p. 5914–5917, 2010.

RUSSO, R.; BARSANTI, L.; EVANGELISTA, V.; FRASSANITO, A. M.; LONGO, V.; PUCCI, L.; PENNO, G.; GUALTIERI, P. *Euglena gracilis* paramylon activates human lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors. **Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 205–214, 2016.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>>.

SARKO, A.; WU, H. C.; CHUAH, C. T. Multiple-helical glucans. **Biochemical society transactions**, v. 11, n. 1980, p. 139–142, 1983.

SARRIS, D.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 4, p. 307–329, 2016.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C.; COLLA, L. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48–60, 2012.

SERNA, C. P.; ISAZA, R. A.; BETANCUR, L. F. R. Efecto de adición de iones hierro y zinc sobre la producción de etanol de dos cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 12, n. 1, p. 158–168, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15581/38077>>.

SIGMA-ALDRICH. **Cellulase from *Trichoderma reesei* aqueous solution, ≥700 units/g | Sigma-Aldrich**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2730?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 25 maio. 2018.

SIMAS-RODRIGUES, C.; VILLELA, H. D. M.; MARTINS, A. P.; MARQUES, L. G.; COLEPICOLA, P.; TONON, A. P. Microalgae for economic applications: Advantages

and perspectives for bioethanol. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4097–4108, 2015.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 2596–2610, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.06.014>>.

SINGH, N. K.; DHAR, D. W. Microalgae as second generation biofuel. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, n. 4, p. 605–629, 2011.

SORENSEN, A.; TELLER, P. J.; HILSTROM, T.; AHRING, B. K. Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6602–6607, 2008.

SOUZA, M. P. De; BJERK, T. R.; GRESSLER, P. D.; CASSIA, R. De; SCHNEIDER, D. S.; CORBELLINI, A.; SILVANA, M.; MORAES, A. As Microalgas Como Uma Alternativa Para a Produção De Biocombustíveis Parte I: Bioetanol. **Tecno-Lógica**, v. 16, n. 2, p. 108–116, 2012.

SPIRIDON, I.; POPA, V. I. Hemicelluloses: Major sources, properties and applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 289–304, 2008.

STAVELA, TÁSSIA; ARAÚJO, THAIS; PORTO, E. **GranBio inicia produção de etanol de segunda geração**. Disponível em: <http://www.granbio.com.br/wp-content/uploads/2014/09/partida_portugues.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2017.

STONE, B. A. **Chemistry of β -glucans**. [s.l.] Elsevier Inc., 2009.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. **Environment International**, v. 51, p. 59–72, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2012.10.007>>.

SUBHADRA, B.; EDWARDS, M. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. **Energy Policy**, v. 38, n. 9, p. 4897–4902, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2010.04.036>>.

SUMMARY, E. E. **Biofuel Technologies**. [s.l.: s.n.].

TASIĆ, M. B.; KONSTANTINOVIĆ, B. V.; LAZIĆ, M. L.; VELJKOVIĆ, V. B. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 2, p. 208–211, 2009.

TAVARES, D. T. O. B. B. **Uso do método do ácido dinitrossalicílico (DNS) na determinação de carboidratos nos alimentos dietéticos**. 1994. 12 Universidade Regional de Blumenau, 1994.

TESTER, R. F.; QI, X.; KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. **Animal Feed Science and Technology**, v. 130, n. 1–2, p. 39–54, 2006.

THE UNIVERSITY OF TEXAS AT AUSTRIA (UTEX). **UTEX B 367 Euglena gracilis | UTEX Culture Collection of Algae**. Disponível em: <<https://utex.org/products/utex-b-0367>>. Acesso em: 26 maio. 2018.

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

VISHTAL, A.; KRASLAWSKI, A. Challenges in industrial applications of technical lignins. **BioResources**, v. 6, n. 3, p. 3547–3568, 2011.

VOLPE, P. L. O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 528–534, 1997.

WAN, M.; JIN, X.; XIA, J.; ROSENBERG, J. N.; YU, G.; NIE, Z.; OYLER, G. A.; BETENBAUGH, M. J. The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 22, p. 9473–9481, 2014.

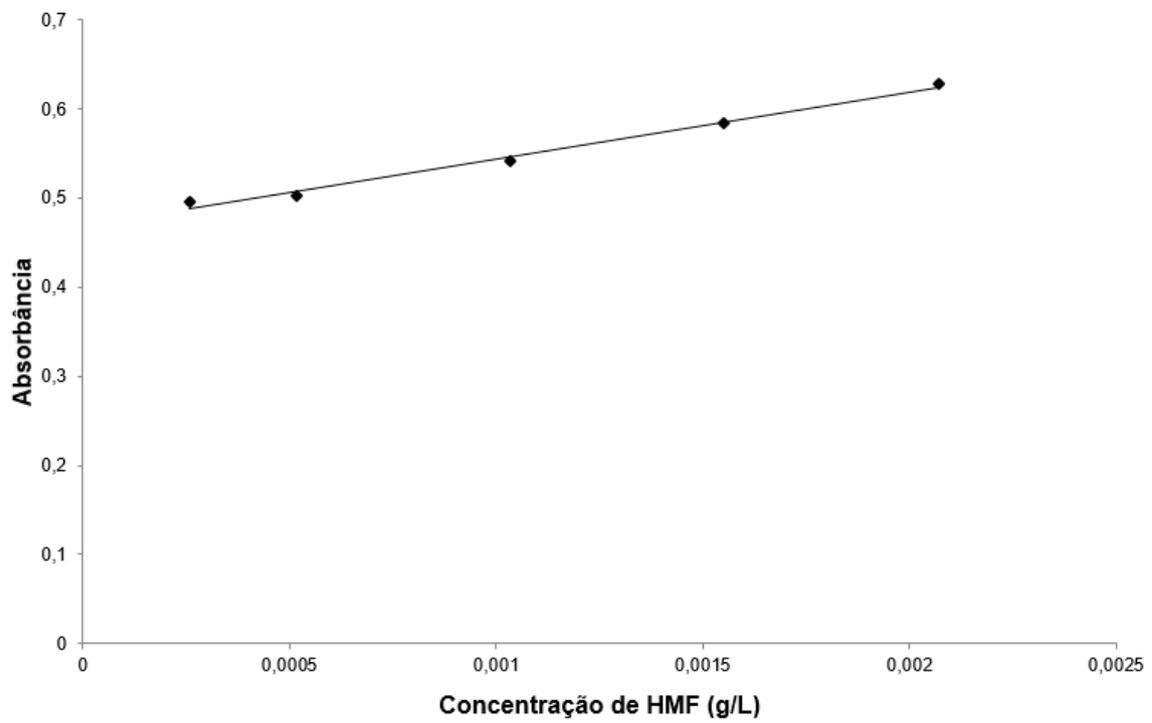
WANG, H.; JI, C.; BI, S.; ZHOU, P.; CHEN, L.; LIU, T. Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 169–173, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.032>>.

WU, X.; STAGGENBORG, S.; PROPHETER, J. L.; ROONEY, W. L.; YU, J.; WANG, D. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 164–170, 2010.

XAVIER, A. M. R. B.; CORREIA, M. F.; PEREIRA, S. R.; EVTUGUIN, D. V. Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2755–2761, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.092>>.

YAMADA, K.; SUZUKI, H.; TAKEUCHI, T.; KAZAMA, Y.; MITRA, S.; ABE, T.; GODA, K.; SUZUKI, K.; IWATA, O. Efficient selective breeding of live oil-rich *Euglena gracilis* with fluorescence-activated cell sorting. **Scientific Reports**, v. 6, p. 2–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep26327>>.

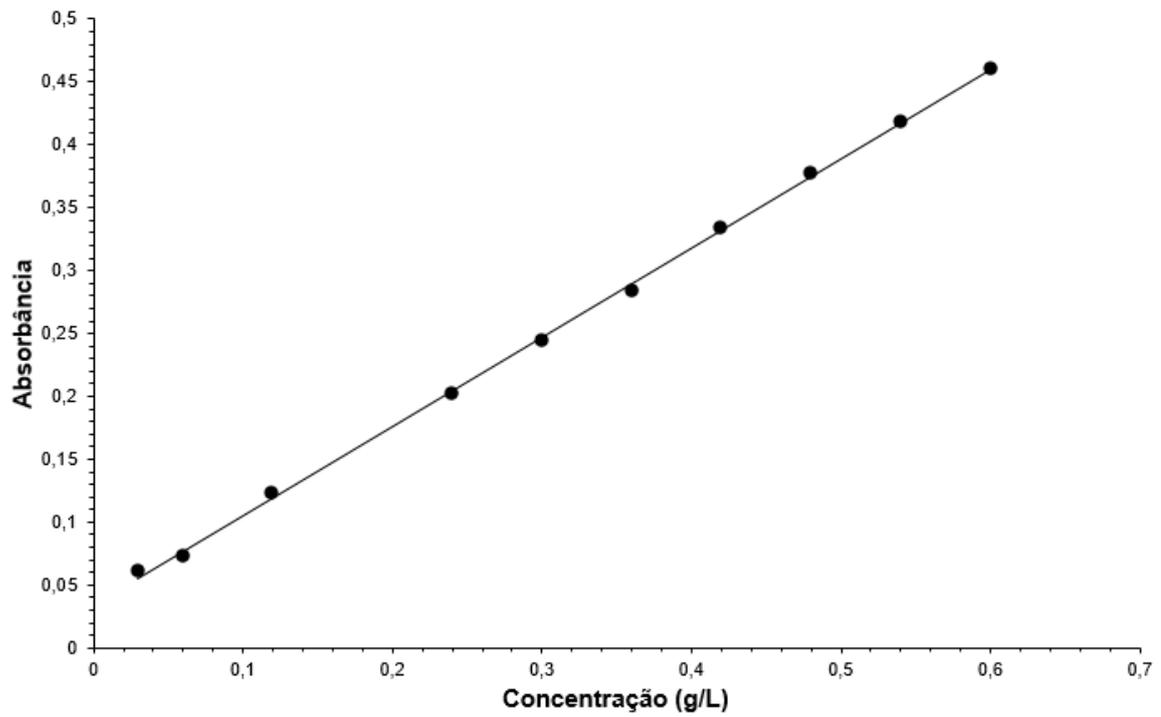
ZHAO, G.; CHEN, X.; WANG, L.; ZHOU, S.; FENG, H.; CHEN, W. N.; LAU, R. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 337–344, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.038>>.

ANEXO A - Curva padrão (n = 1) para análise de HMF

R^2 (coeficiente de correlação) = 0,9904

$$Y = 75,068x + 0,4688$$

ANEXO B - Curva padrão (n = 1) para análise açúcar redutor a partir do método DNS descrito na seção 4.3.6



$$R^2 = 0,9994$$

$$Y = 0,7092x + 0,0343$$