UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de

Processos Químicos e Bioquímicos

AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DE UMA LINHAGEM DE *Saccharomyces cerevisiae* EM MEIOS CONTENDO GALACTOSE ORIUNDA DO HIDROLISADO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* VISANDO À PRODUÇÃO DE ETANOL 3G.

Camylle Guimarães Scheliga

Orientador: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*

Coorientador: Roberto Nobuyuki Maeda., *DSc*

Rio de Janeiro

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Escola de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos

CAMYLLE GUIMARÃES SCHELIGA

AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DE UMA LINHAGEM DE *Saccharomyces cerevisiae* EM MEIOS CONTENDO GALACTOSE ORIUNDA DO HIDROLISADO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* VISANDO À PRODUÇÃO DE ETANOL 3G.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*).

Orientador: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)
Coorientador: Roberto Nobuyuki Maeda., *DSc*

Rio de Janeiro
2013

AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DE UMA LINHAGEM DE *Saccharomyces cerevisiae* EM MEIOS CONTENDO GALACTOSE ORIUNDA DO HIDROLISADO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* VISANDO À PRODUÇÃO DE ETANOL 3G.

Camylle Guimarães Scheliga

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*).

Aprovada por:

_____

Nei Pereira Jr., *PhD* (DEB/EQ/UFRJ) - Orientador/Presidente

_____

Roberto Nobuyuki Maeda, *DSc* (LADEBIO/COPPETEC) - Orientador

_____

Antônio Carlos Augusto da Costa, *DSc* (IQ/UERJ)

_____

Verônica Ferreira Melo, *DSc* (IFRJ)

_____

Rodrigo Pires do Nascimento, *DSc* (DEB/EQ/UFRJ)

Ficha Catalográfica

Scheliga, Camylle Guimarães.

Avaliação de crescimento de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* em meios contendo galactose oriunda do hidrolisado da macroalga *Kappaphycus alvarezii* visando à produção de etanol 3G./ Camylle Guimarães Scheliga. 2012.
xv, 107 f.: il

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

Orientador: Nei Pereira Jr.
Coorientador: Roberto Nobuyuki Maeda

1. *Kappaphycus alvarezii*. 2. Etanol de terceira geração. 3. Hidroximetilfurfural. 4. Carragenana - Teses. I. Pereira Jr., Nei (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. III. Título

Ao meu querido irmão,

Burt G. Scheliga

e ao meu grande amigo,

Roberto N. Maeda

Dedico

"I have been trying to point out that in our lives chance may have an astonishing influence and, if I may offer advice to the young laboratory worker, it would be this - never to neglect an extraordinary appearance or happening. It may be - usually is, in fact - a false alarm that leads to nothing, but it may on the other hand be the clue provided by fate to lead you to some important advance"

Sir Alexander Fleming.

Agradecimentos

À Deus, por sempre me amparar com amor, ter me conduzido até este momento, pela inspiração e por minha essência;

Ao professor Nei, pela dedicada orientação e oportunidade de iniciar minha jornada como pesquisadora no LADEBIO, por ter absorvido de seus ensinamentos a importância de ser "transdisciplinar", pela atenciosa avaliação durante os seminários, que muito me ajudou a definir a trajetória deste estudo onde também aprendi que o olhar analítico deve ser equilibrado pelo foco, por meu amadurecimento pessoal, pelo apoio nos momentos mais delicados e por ser exemplo de que sua arte pode se manifestar em cada exercício da pesquisa e inspirar seus alunos à constante busca por extrair o melhor de si;

Aos meus queridos "Scheligas": meus pais Lúcia e Ernesto e meu irmão Burt, por todo amor que potencializou a persistência pelas minhas metas diante das adversidades e pelos seus valiosos ensinamentos que construíram meus princípios;

Aos meus tios Antônio e Helena e primos Fernanda e Vinícius por todo amor, carinho e apoio;

Ao Roberto pela coorientação atenciosa e dedicada, por ser um pesquisador que me orgulho, pela confiança em mim depositada, pelo crescimento adquirido que me proporcionou aliar a teoria ao experimental, pela amizade despretensiosa que construímos e pelo exercício da mesma nos momentos em que mais precisei;

Às alunas de iniciação científica Lys Mangia e Bruna Oliveira e à pesquisadora Carolina Fioravante pela dedicação, pró-atividade, que muito contribuíram para este trabalho, e pelo gratificante aprendizado de trabalhar em equipe;

Ao Paulo por todos os estudos prévios realizados com a *Kappaphycus alvarezii*, pelas informações que me ajudaram, pelo apoio e pelos animados momentos de descontração;

Aos meus queridos amigos Ana, Nádia, Nathália, Lysianne, Bruna, Aline, Mônica, Alessandra, Bruno, Felipe, Gabriel, Anderson Guimarães, Pedro, Sônia, Erick, Rodrigo e Anderson Castelo que também tem sido meus alicerces;

À Thaís, pela competência e amizade que proporcionaram minha recuperação;

Aos alunos de iniciação científica, estagiários, pesquisadores e funcionários do LADEBIO que adicionaram leveza, amizade e momentos descontraídos e alegres à esta experiência, em especial, Mônica, Daiane, Carolina Barcelos, Vanessa Rocha, Bia, Mariana Faber, Mariana Mello, Carolina Lázaro, Liliana, Fernando, Túlio, Patrycia, Danielle, Vilma, Jorge, Elton, Áurea, Vanessa Canuto, Renata, Márcio, Guilherme e Carla;

Ao Luiz pela ajuda e recepção atenciosa assim que cheguei ao LADEBIO;

À Escola de Química pela oportunidade, especialmente aos professores que contribuíram com a minha formação;

À Universidade Federal do Rio de Janeiro pela oportunidade;

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

Sumário

CAPÍTULO 1 1
APRESENTAÇÃO DO TEMA DA DISSERTAÇÃO 1
CAPÍTULO 2 4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
2.1. O Panorama mundial da matriz energética e suas implicações 4
2.2. Biomassas e Biocombustíveis 7
2.3. Perspectivas brasileiras para produção de biocombustíveis 9
2.4. Tecnologias para produção do bioetanol - Primeira e Segunda Geração 10
2.5. Etanol de Terceira Geração – Tecnologia portadora de Futuro 12
2.6. Macroalgas - Kappaphycus alvarezii 15
2.7. Cultivo de Kappaphycus alvarezii 18
2.8. Principais características da carragenana 20
2.9. Pré-tratamento da biomassa algal e hidrólise ácida da carragenana 21
2.10. Principais estratégias visando diminuir a toxicidade de compostos inibidores no hidrolisado ácido da biomassa algal 23
2.11. Microrganismos produtores de carragenases – perspectivas para hidrólise enzimática da carragenana 25
2.12. A estrutura celulósica 27
2.13. O aproveitamento da biomassa algal dentro do contexto de biorrefinaria 29
2.14. Fermentação alcoólica – Principais aspectos do metabolismo da levedura Saccharomyces cerevisiae 31
2.15. Condução de Bioprocessos 36
2.16. Considerações gerais 37
CAPÍTULO 3 40
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 40
CAPÍTULO 4 43
MATERIAIS E MÉTODOS 43
4.1. Matéria-prima 43
4.2. Extração da carragenana 44
4.3. Planejamento experimental Fatorial 2^4 completo para hidrólise ácida da carragenana bruta 46
4.4. Manutenção do microrganismo e padronização do inóculo 48

4.5. Produção de células de Saccharomyces cerevisiae em frascos agitados: avaliação da tolerância ao HMF 49
4.5.1. Pré-tratamento da biomassa algal (hidrólise da carragenana) 49
4.5.2. Avaliação da tolerância da levedura ao HMF 50
4.6. Produção de células de Saccharomyces cerevisiae CBS 1782 em biorreator instrumentado 53
4.6.1. Obtenção do hidrolisado algal 53
4.6.2. Condições utilizadas para produção de células de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 em batelada simples e alimentada 54
4.7. Amostragem 55
4.8. Métodos analíticos 56
4.8.1. Quantificação da biomassa celular 56
4.8.2. Quantificação de galactose, HMF e etanol por CLAE 57
4.8.3. Quantificação de HMF por espectrofotometria de UV 57
4.9. Análise dos resultados experimentais 58
4.10. Pré-tratamento da biomassa algal para obtenção de oligossacarídeos com baixa formação de HMF 60
CAPÍTULO 5 61
RESULTADOS E DISCUSSÕES 61
5.1. Extração da carragenana 61
5.2. Planejamento experimental Fatorial 2^4 completo para hidrólise ácida da carragenana bruta 63
5.3. Pré-tratamento da biomassa algal para obtenção de oligossacarídeos com baixa formação de HMF 70
5.4. Desenvolvimento de método para quantificação de HMF por espectrofotometria de UV. 74
5.5. Produção de células de Saccharomyces cerevisiae em frascos agitados: ensaio para avaliação da tolerância ao HMF 77
5.6. Produção de células de Saccharomyces cerevisiae CBS 1782 em biorreator instrumentado 85
5.6.1. Obtenção do hidrolisado algal 85
5.6.2. Bioprocesso para produção de células em batelada simples e alimentada 86
CAPÍTULO 6 96
CONCLUSÕES E SUGESTÕES 96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Produção dos diferentes grupos de macroalgas ao longo dos anos 17

Figura 2.2 – Diferentes aspectos e cores da alga da espécie *Kappaphycus alvarezii*..... 17

Figura 2.3 – Cultivo de *Kappaphycus alvarezii*. 19

Figura 2.4 – Estrutura da Kappa carragenana. 21

Figura 2.5 – Estrutura celulósica: ligações de hidrogênio inter e intra cadeias de celulose. 28

Figura 2.6 – Etanol de terceira geração a partir de *Kappahycus alvarezii* utilizando o conceito de biorrefinaria segundo Goh e Lee (2010). 31

Figura 2.7 – Esquema mostrando a Via de Leloir. 34

Figura 4.1 – Etapas para extração da carragenana da biomassa algal. 45

Figura 4.2 – Etapas adotadas para cada ensaio do planejamento experimental. 48

Figura 4.3 – Esquema do ensaio para avaliação do crescimento celular e de tolerância ao HMF frente à inoculação com células aclimatadas ou não aclimatadas. 52

Figura 4.4 – Biorreatores instrumentados utilizados nos bioprocessos: à esquerda New Brunswick BioFlo 310 e à direita Biostat B. 55

Figura 4.5 – Curva de calibração para quantificação de células. 56

Figura 4.6 – Varredura de espectro para o desenvolvimento do método para análise de HMF por espectrofotometria de UV. (A) Varredura de espectro das soluções padrão de HMF e análise de hidrolisado algal contendo HMF (identificado por CLAE); (B) Varredura de soluções padrão e de hidrolisado algal sem HMF. 58

Figura 5.1 – Etapas para extração da carragenana da biomassa algal. **A**: Aspecto dos grânulos antes da extração; **B**: Aspecto viscoso evidenciado após a extração aquosa; **C**: Aspecto da carragenana bruta precipitada. 62

Figura 5.2 – Diagramas de Pareto. (A) Galactose (B) Eficiência de hidrólise (C) HMF. 65

Figura 5.3 – Gráficos gerados pelo software Design-expert® 6.0.6 (Stat-ease) ilustrando a influência exercida pela interação de parâmetros para liberação de galactose. Em (A): em função da temperatura de reação e carga de Sólidos; Em (B): em função da concentração de ácido sulfúrico e carga de sólidos (B). 67

Figura 5.4 – Cromatogramas obtidos da análise por CLAE de ensaios do planejamento fatorial completo 24 com carragenana bruta. A: 100°C/ ácido sulfúrico 0,2%; B: 110°C /ácido sulfúrico 0,5%; C: 120°C/ácido sulfúrico 0,8%. 72

Figura 5.5 – Cromatogramas obtidos da análise por CLAE dos ensaios de pré-tratamento da biomassa algal. (A) etapa de hidrólise branda (0,25% H_2SO_4; 100ºC; 60 min); (B), segunda etapa de hidrólise em condição mais severa (1% H_2SO_4; 120ºC; 60 min). 74

Figura 5.6 – Curva de calibração para quantificação de HMF por espectrofotometria de UV. 76

Figura 5.7 – Correlação entre os métodos para quantificação de HMF (espectrofotometria de UV e CLAE). 77

Figura 5.8 - Etapa de aclimatação dos ensaios em frascos agitados. Realizada com inóculo de suspensão de células em hidrolisado algal com 4,06 g/L de HMF. Condições experimentais: temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 100 mL. 78

Figura 5.9 - Avaliação do crescimento celular frente à inoculação com células aclimatadas ou não aclimatadas. As células aclimatadas, provenientes da etapa de aclimatação, e não aclimatadas (suspensão de células mantidas em placa) foram inoculadas em hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF. Condições experimentais: temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 100 mL. 79

Figura 5.10 – Bioconversão do HMF à 2,5-di-hidroximetilfurano. 80

Figura 5.11 – Avaliação da concentração de HMF frente à inoculação com células aclimatadas ou não aclimatadas. As células aclimatadas, provenientes da etapa de aclimatação, e não aclimatadas (suspensão de células mantidas em placa) foram inoculadas em hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF. Condições experimentais: temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 100 mL. 81

Figura 5.12 – Análise por CLAE, em fase reversa, da cultura de S. cerevisiae em meio definido contendo HMF por LIU *et al.* (2004). (a) detecção inicial de HMF com absorvância de UV a 282 nm, não detectável após 48 horas de incubação. (b) Novo pico detectável a 222 nm, identificado como a 2,5-di-hidroximetilfurano, relatando a bioconversão do HMF. Fonte: LIU (2006). 82

Figura 5.13 – Varredura de espectro demonstrando a variação da concentração de HMF durante o período de incubação dos ensaios aclimatados e não aclimatados (NA 48h)*. As setas em vermelho indicam a tendência decrescente em 280 nm e crescente em 222 nm... 83

Figura 5.14 - Análise por espectrofotometria de UV a 220 nm e 280 nm dos ensaios com células aclimatadas. NA 48 corresponde à amostra do ensaio com células não aclimatadas em 48 horas de incubação. 83

Figura 5.15 – Resultados dos plaqueamentos feitos após o período de incubação dos ensaios aclimatado (à esquerda) e não aclimatado (à direita) em hidrolisado agarizado. 84

Figura 5.16 – Etapa de aclimatação de células a serem utilizadas como inóculo para os experimentos em biorreatores instrumentados. Realizada com inóculo de suspensão de células em hidrolisado algal com 4,06 g/L de HMF. Condições experimentais: temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 100 mL. 87

Figura 5.17 – Cinética da produção de células de *S. cerevisiae* conduzido por batelada simples em biorreator. Condições experimentais: hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF; temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 1,2 L; inóculo com células aclimatadas. 87

Figura 5.18 – Cromatogramas sobrepostos obtidos da análise de HMF de amostras do reator em batelada simples por CLAE. O cromatograma possui zoom entre 3 e 6 minutos. . 88

Figura 5.19 – Cinética da produção de células de *S. cerevisiae* conduzido por batelada alimentada. Galactose, HMF e células. Condições experimentais: hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF; temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 400 mL; Alimentações realizadas por pulsos (em mL) 135, 180, 240; inóculo com células aclimatadas. 89

Figura 5.20 – Cinética da produção de células de *S. cerevisiae* conduzido por batelada alimentada. Condições experimentais: hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF; temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 400 mL; Alimentações realizadas por pulsos (em mL) 135, 180, 240; inóculo com células aclimatadas. 91

Figura 5.21 – Repressão metabólica causada pela redução de compostos inibidores..... 93

Figura 5.22 - Diferentes estratégias para superar efeitos inibitórios causados por furaldeídos. 95

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Comparação do potencial para produção de bioetanol entre diferentes biomassas baseado em suas taxas de crescimento. 14

Tabela 2.2 – Composição das macroalgas em seus diferentes grupos. 16

Tabela 2.3 – Microrganismos produtores de carragenases. 26

Tabela 4.1 – Parâmetros e variáveis de resposta do planejamento experimental. 46

Tabela 4.2 – Valores codificados e reais para os parâmetros do planejamento experimental. 47

Tabela 4.3 – Condições dos ensaios do pré-tratamento da biomassa algal e hidrólise da carragenana. 49

Tabela 4.4 – Composição da solução de minerais proposta por Pereira Jr. (1991). 51

Tabela 5.1 – Matriz do planejamento experimental Fatorial 2^4 completo para hidrólise ácida da carragenana bruta. 64

Tabela 5.2 – Resultados obtidos pela análise de HMF por espectrofotometria de UV e CLAE. 76

Tabela 5.3 – Resultados do pré-tratamento da biomassa algal. 78

Tabela 5.4 – Resultados dos parâmetros analisados nos ensaios de tolerância ao HMF em frascos agitados. 85

Tabela 5.5 – Resultados dos parâmetros analisados nos experimentos em biorreator. 89

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE UMA LINHAGEM DE *Saccharomyces cerevisiae* EM MEIOS CONTENDO GALACTOSE ORIUNDA DO HIDROLISADO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* VISANDO À PRODUÇÃO DE ETANOL 3G

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Camylle Guimarães Scheliga
Orientadores: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* e Roberto Nobuyuki Maeda, *DSc*

Uma das características, que fazem com que o uso de macroalgas seja promissor para produção de bioetanol e outros bioprodutos, pode ser exemplificada pela sua elevada taxa de crescimento, já que resulta em uma alta taxa de consumo de CO_2 atmosférico. Além de remover este gás de emissões antropogênicas, o CO_2 é incorporado à biomassa algal, resultando em um elevado teor em carboidratos, característico desta biomassa. Além disso, diferentemente das culturas agrícolas, a maricultura prescinde do uso de áreas agriculturáveis, de disponibilidade cada vez mais limitada. A maricultura também faz com que o uso abundante da água potável para irrigação não seja necessário, sendo, também, uma das medidas preventivas para projeções de escassez de água. No entanto, o maior desafio para produção do etanol de terceira geração (3G), a partir de *Kappaphycus alvarezii*, consiste na formação de compostos como 5-hidroximetilfurfural (HMF), obtido nas condições de hidrólise ácida da carragenana. Este composto tem inibido fortemente o crescimento de leveduras e a fermentação etanólica. De modo a superar esta desvantagem, alguns métodos de destoxificação têm sido desenvolvidos, visando contrapor o efeito inibidor exercido por este composto e obter uma eficiente fermentabilidade do hidrolisado. No entanto, incluir etapas de destoxificação implica na adição de custos ao processo, como também, em uma maior complexidade e na geração de resíduos adicionais. Deste modo, o presente trabalho foi pioneiro ao avaliar a possibilidade da destoxificação *in situ* do HMF, oriundo do pré-tratamento ácido de *Kappaphycus alvarezii*, através da conversão em uma forma menos inibitória (forma alcoólica) por leveduras competentes, capazes de co-metabolizar este composto inibidor. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi produzir células de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 a partir do hidrolisado algal não destixificado (contendo HMF). Inicialmente, buscou-se entender a influência das variáveis de processo (temperatura, tempo, concentração de sólidos e concentração de ácido) para eficiência de hidrólise ácida da carragenana (%), formação de HMF (g/L) e obtenção de galactose (g/L), através de um planejamento fatorial 2^4 completo. A tolerância da linhagem ao HMF foi investigada em seguida, onde também se avaliou a influência exercida pela estratégia de aclimatação celular. Para isso, foram feitos ensaios em frascos agitados, a partir do hidrolisado da biomassa algal. Posteriormente, em condições similares, foi feita a produção de células em biorreator instrumentado sendo empregados dois modos de condução do processo fermentativo (batelada simples e batelada alimentada). Os resultados revelaram que é possível produzir células aclimatadas da levedura *S. cerevisiae* sem a necessidade de destoxificação do hidrolisado algal, sendo evidenciada tolerância a 8 g/L de HMF. Em batelada simples, o crescimento celular atingiu 4 g/L após 40 horas de cultivo. Quando o processo foi conduzido por batelada alimentada, obteve-se a produção de 8 g de células com alta atividade metabólica (Q_{HMF} 1,334 $g.L.h^{-1}$), evidenciada através da conversão de 10 g/L de HMF em 8 horas na segunda batelada. A tolerância observada foi superior a estudos recém-publicados com leveduras tolerantes a partir de modificações genéticas, denotando que o processo de produção de células de *S. cerevisiae* em biorreator, conduzido por batelada, é capaz de potencializar a aclimatação celular ao hidrolisado algal, com elevadas concentrações de HMF.

EVALUATION OF THE GROWTH OF A STRAIN OF *Saccharomyces cerevisiae* IN MEDIA CONTAINING GALACTOSE FROM THE HYDROLYSATE OF THE MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* AIMING AT THE PRODUCTION OF ETHANOL 3G

Abstract of the Master Dissertation presented to the Post-graduation Course on Technology of Chemical and Biochemical Processes of the School of Chemistry of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

Camylle Guimarães Scheliga
Supervisors: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* e Roberto Nobuyuki Maeda, *Dsc*.

Macroalgae are a promising feedstock for the production of bioethanol and other bioproducts due to their fast growth rate and their enormous capacity to convert CO_2, removing it from anthropogenic emissions, and incorporating it into biomass with high levels of carbohydrates. Therefore, mariculture is not limited by agricultural expansion over terrestrial plants and greatly prevents fresh water crisis. However, the main challenge of the third-generation (3G) ethanol production from *Kappaphycus alvarezii* is the formation of byproduct compounds from the acid hydrolysis of carrageenan, such as 5-hydroxymethylfurfural (HMF) that severely inhibits cell growth and ethanol production. To overcome this drawback, some detoxification methods have been developed to achieve high fermentability. Nonetheless, detoxification steps add cost and complexity to the process and generate additional waste products. Based on this, this work was the first to study the viability for in situ detoxification of HMF, from the *Kappaphycus alvarezii* acid pre-treatment, by its reduction to a less inhibitory compound (its alcoholic form) through co-metabolism by competent yeast cells. Therefore, the aim of this work was to produce cells of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 from the algal hydrolysate without detoxification steps. Initially, a 2^4 full factorial design was carried out as for understanding the effect of process variables (temperature, time, concentration of solids and acid concentration) on carrageenan hydrolysis. The response variables were the galactose concentration (g/L), HMF concentration (g/L) and hydrolysis efficiency (%). The yeast strain tolerance to HMF was investigated, evaluating the influence of cell acclimatization, in shake-flask assays with the algal hydrolysate and producing cells in bioreactor using two modes of operation (simple batch and fed batch). The results revealed that it is possible to produce yeast cells of *S. cerevisiae* in algal hydrolysate (without detoxification), which were able to grow in 8 g/L of HMF after cell acclimatization. In simple batch operation the final cell concentration reached 4 g dw/L after 40 hours. When the process was carried out in feed batch, the cell growth reached 8 g with high metabolic activity (Q_{HMF}=1.3 g $L^{-1}h^{-1}$), reducing 10 g/L of HMF in 8 hours in the second batch. These results are far superior than those published with genetically engineered strains, denoting that the growth of *S. cerevisiae* in bioreactor by feed batch promotes cell acclimatization to the algal hydrolysate with high concentration of HMF. This strategy is very promising for future studies that will integrate the production of cells acclimatized in algal hydrolyzate, with high conversion rate of HMF, to fermentative process in order to produce 3G ethanol without detoxification steps.

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO DO TEMA DA DISSERTAÇÃO

Atualmente, muito se discute em relação às consequências ambientais vinculadas à utilização de fontes fósseis, como mudanças climáticas geradas pela intensa emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa além de constantes vazamentos de óleo decorrentes de acidentes na prospecção do petróleo (DEMIRBAS, 2010 e DEMIRBAS, 2011).

Diante deste panorama e de questões econômicas atribuídas à possível esgotabilidade destas fontes, houve mudanças relacionadas à forma de obtenção de combustíveis, onde a busca por matrizes renováveis, sustentáveis e alternativas às fontes petrolíferas tem mobilizado os setores acadêmicos, sociais e governamentais (COSTA *et al.*, 2010).

Dentre as fontes renováveis, a utilização da biomassa apresenta um grande potencial de crescimento para os próximos anos, por ser mais sustentável e possibilitar a produção de energia elétrica, de biocombustíveis como o etanol, como também, de diversos produtos que atualmente são produzidos por rota petroquímica (DEMIRBAS, 2010 e ELLIS *et al.*, 2012).

Diante disso, espera-se que tanto a produção quanto o consumo de etanol aumentem ao longo dos anos, sendo estimado um crescimento anual de 10,3% da demanda por este biocombustível até 2020, fazendo com que seu consumo seja estimado em 73,3 bilhões de litros (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2011).

Dentre os diferentes tipos de biomassa, as macroalgas apresentam vantagens e possuem um grande potencial a ser empregado para produção de bioetanol ou de outros bioprodutos. Seu cultivo marinho dispensa a necessidade de utilizar água potável para irrigação, prática necessária aos cultivos agrícolas que consome mais de 70% dos recursos hídricos disponíveis; a maricultura faz com que o espaço destinado ao seu cultivo não entre em conflito com o utilizado para as culturas agrícolas, fazendo com que o custo de seus produtos não esteja atrelado ao aumento do preço dos alimentos mais importantes da dieta alimentar; possuem elevado teor de carboidratos sob a forma de polissacarídeos organizados em estruturas mais simples quando comparadas às estruturas presentes na biomassa lignocelulósica; possuem teor baixo ou nulo de lignina; sua elevada taxa de crescimento, resultante de uma alta atividade fotossintética faz com que haja maior taxa de absorção de CO_2 atmosférico quando comparadas a diferentes tipos de biomassa empregadas. Todas estas características fazem com que o uso futuro de macroalgas como biomassa seja atrativo e resulte em processos mais sustentáveis (NOGUEIRA, 2008; GOH & LEE, 2010; ANASTASAKIS & ROSS, 2011; JONES e MAYFIELD, 2012).

Dentre as espécies de macroalgas, optou-se neste trabalho estudar o potencial de *Kappaphycus alvarezii*, por possuir altas taxas de crescimento, suas metodologias de cultivo já serem estabelecidas, sendo a principal matéria-prima empregada mundialmente para a produção de carragenana e apresentar alto teor em carboidratos distribuídos em 56,81% de carragenana e 7,49% de celulose (GOH & LEE, 2010 e HARGREAVES *et al.*, 2013).

Em estudos prévios relacionados à produção de etanol a partir da fermentação de galactose resultante da hidrólise ácida da carragenana, presente em maior teor em *Kappaphycus alvarezii*, constatou-se que as condições propícias para hidrólise também resultaram na formação de hidroximetilfurfural (HMF), um composto inibitório que reprime o metabolismo dos microrganismos, podendo impedir ou

prolongar a fermentação etanólica e inviabilizar a produção de etanol 3G[1]. Visando contrapor estes efeitos, tem sido utilizada a estratégia de remoção do HMF por diferentes métodos de destoxificação, onde o uso do carvão ativo mostrou-se eficiente ao remover (porém, não seletivamente) este composto sem alterações significativas na concentração de galactose (KHAMBHATY *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011; MEINITA *et al.*, 2012; DAROCH; GENG; WANG, 2013).

Diante de limitações ao incluir etapas de destoxificação como custo elevado e perda de massa, no presente estudo será discutida a possibilidade de utilizar a estratégia de aclimatação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 ao hidrolisado contendo HMF, de modo a melhor entender seus mecanismos de tolerância a este composto. Ao utilizar esta estratégia, será abordada a influência do modo de condução do bioprocesso para adaptação celular ao hidrolisado algal contendo HMF, como também, a viabilidade de integrar a produção de células, ao processo de produção de etanol 3G, ambos a partir da biomassa algal, já que também contribui para estratégia de aclimatação celular, visando, futuramente, prescindir de etapas de destoxificação para ambos os processos.

Além da utilização desta estratégia, pioneira em relação aos estudos recém-publicados com *Kappaphycus alvarezii*, serão relatados neste trabalho os parâmetros influentes para hidrólise da carragenana à galactose e para formação de HMF, como também, as perspectivas para hidrólise enzimática deste polissacarídeo, já que diferentemente da hidrólise ácida, não resultaria na formação de HMF, consistindo em outra possível estratégia a ser utilizada para viabilização do etanol 3G.

[1] Etanol de terceira geração. Tecnologia fundamentada na produção de etanol a partir de biomassas marinhas.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Panorama mundial da matriz energética e suas implicações

Nos últimos cem anos, a ampla utilização dos combustíveis de origem fóssil (petróleo, gás natural e carvão) reconhecidamente teve sua grande importância para o estabelecimento da sociedade moderna. O fato de esta matriz ser utilizada tanto como fonte de energia quanto como matéria-prima para fabricação de inúmeros produtos proporcionou uma expansão industrial em diferentes setores ao longo dos anos. Diante disso, novas tecnologias foram desenvolvidas, que atreladas ao advento de motores movidos à gasolina e a óleo diesel, permitiram o desenvolvimento da civilização do automóvel que contribuiu de forma significativa para o processo de urbanização das cidades através da mobilidade de pessoas e produtos (SHAFIEE; TOPAL, 2009).

Dada à importância desta matriz energética, o petróleo ainda tem sido consolidado como o recurso mais utilizado no mundo moderno, onde o crescimento populacional aliado ao desenvolvimento tecnológico faz com que a demanda pelo mesmo seja cada vez mais expressiva ao longo dos anos (PEREIRA JR*. et al.*, 2008).

De acordo com os dados disponibilizados pela *International Energy Agency* (IEA), publicados em 2012, houve um aumento do consumo mundial de petróleo, entre 1973 e 2010, de 1500 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (TEP), sendo o setor de transportes o responsável por 61,5% do mesmo no último ano. Estima-se que, em 2030, este setor contribuirá em 97% para o aumento da demanda mundial por esta fonte energética (IEA, 2009).

Ainda que a demanda por este combustível fóssil seja cada vez mais necessária, seu uso é conflitante com o fato desta matriz não ser renovável a um prazo acessível pela sociedade humana. Alguns estudos inclusive relatam a possibilidade de esgotabilidade das reservas desta matriz, relatando que a depleção poderá ocorrer nos próximos 40 anos, considerando constante nossa taxa de consumo (SHAFIEE; TOPAL, 2009).

Aliada à esgotabilidade, nossa demanda por fontes fósseis tem sido alvo de intensos conflitos políticos e econômicos entre os países, por serem distribuídas mundialmente de forma irregular, e estarem concentradas em regiões geopoliticamente instáveis (COLGAN, 2011).

Diante disso, depara-se frequentemente com a flutuação do preço do barril de petróleo, ocasionada por estas questões abordadas, onde se estima que seu custo seja cada vez mais alto com o passar das décadas, explicado também por investimentos cada vez mais elevados, necessários para exploração destas reservas, cada vez menos acessíveis, exigindo, portanto, tecnologias mais sofisticadas e de alto custo. Assim, valores que tangem US $200 dólares por barril já são estimados para o final de 2030 (OWEN *et al.*, 2010).

A utilização intensa desta matriz energética ao longo destes anos não gerou mudanças somente nos setores industriais e na dinâmica econômica da geopolítica mundial. Atualmente, tornou-se notável e necessária para a sociedade moderna a mudança ideológica no que se remete a preocupação com os expressivos impactos ambientais consequentes da intensa utilização de fontes fósseis (RUSSO *et al.,* 2012).

A intensa emissão de gases como metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O), hidrofluorcarbonos (HFC), perfluorcarbonos (PFC), hexafluor sulfúrico (SF6) e, especialmente, o gás carbônico (CO_2) tem acentuado o efeito estufa. Estes gases, resultantes da intensa combustão de combustíveis fósseis e acumulados na atmosfera ao longo dos anos, têm proporcionado mudanças ambientais por ocasionar o aumento da temperatura mundial, que se resulta, por exemplo, no derretimento da camada de gelo no oceano Ártico, alterando, portanto o nível dos mares, onde estas mudanças acarretam diretamente na perda da biodiversidade como um todo, afetando também e cada vez mais a saúde humana (PEREIRA JR*. et al*., 2008).

Desta forma, estudos relatam que esta emissão excessiva de CO_2 poderá acarretar no aumento da temperatura da superfície terrestre em aproximadamente 1,5-4°C nos próximos 40 anos. Considerando-se que a emissão mundial de CO_2 resultante da queima de combustíveis líquidos, como gasolina e óleo diesel, decorrente do setor de transportes tem aumentado ao longo dos anos (45% entre 1990 e 2007), com projeções de aumento de aproximadamente 40% até 2030, e que dentre o setor de transportes a emissão do setor rodoviário tem sido a mais expressiva, esforços tem sido direcionados visando uma redução significativa da emissão de CO_2 atrelada a este setor por medida de controle dos impactos previstos (KÖNE; BÜKE, 2010 e OECD/ITF, 2010).

Estabeleceu-se, portanto, entre diversos países, um conjunto de metas que constituem o Tratado de Kyoto, criado no âmbito da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas, com o intuito de diminuir a emissão de gases de efeito estufa. Tais esforços incluem o incentivo à pesquisa, à produção e ao consumo de biocombustíveis líquidos, como etanol, biodiesel e butanol, por serem produzidos através do uso de biomassas, uma fonte de energia renovável em curto prazo, menos agressora ao meio ambiente e alternativa, por conta disso, a muitas problemáticas relacionadas ao uso de fontes fósseis abordadas anteriormente (BETANCUR, 2010 e NAJAFI *et al*., 2011).

2.2. Biomassas e Biocombustíveis

As biomassas podem ser definidas como recursos naturais provenientes de matéria orgânica com potencial utilização para produção de energia. Semelhante a outros modos de obtenção de energia renovável, a biomassa constitui uma forma indireta de energia solar, ao ser convertida em formas de energia química acumulada diante das reações fotossintéticas. Podem ser geradas naturamente ou por atividade antropogênica, onde madeiras, produtos agrícolas e seus resíduos, plantas aquáticas, algas, resíduos de animais e da indústria alimentícia podem ser citados como exemplos de biomassa utilizada (NOGUEIRA, 2008 e BETANCUR, 2010).

Explica-se o atrativo das biomassas por serem constituídas de diferentes tipos de carboidratos em altas concentrações podendo ser utilizadas como combustível sólido, ou convertida em forma líquida ou gasosa para produção de energia elétrica, calor, compostos químicos e combustíveis líquidos e gasosos, por vias termoquímica ou bioquímica (DEMIRBAS, 2010).

Consequentemente, biocombustíveis podem ser definidos como combustíveis obtidos a partir do uso de biomassas, que são renováveis em curto prazo, sendo exemplificados por formas líquidas como o bioetanol e biodiesel ou por formas gasosas como o biogás. Por conta disso, as numerosas vantagens da utilização destes biocombustíveis encontram-se atreladas aos benefícios presentes na utilização de biomassas, que podem ser exemplificadas também pela valorização econômica de compostos considerados resíduos industriais; pelas crescentes oportunidades de desenvolvimento econômico associado à grande diversidade de biomassas além de não potencializarem o aquecimento global já que o processo fotossintético proporciona a absorção de CO_2 (KOH; JABOURY, 2008 e BETANCUR, 2010).

Devido à grande extensão do território brasileiro associada também às suas condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de diferentes tipos de biomassa e ao uso de outras fontes renováveis, a matriz energética brasileira é uma das mais limpas do mundo, sendo 45% da mesma proveniente de fontes renováveis (COSTA *et al.*, 2010).

O bioetanol, por sua vez, é o biocombustível líquido mais utilizado mundialmente podendo ser usado puro ou misturado a combustíveis derivados do petróleo, sendo empregado em veículos automotores com combustão iniciada por motores do ciclo Otto (NOGUEIRA, 2008).

No Brasil, para produção do bioetanol, utiliza-se a cana-de-açúcar como biomassa onde a sacarose, proveniente do caldo de cana, do melaço ou da mistura de ambos é o carboidrato predominante, prontamente disponível e utilizado como substrato a ser assimilado por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* para a produção deste álcool através da fermentação alcoólica (BASSO, 2011).

O Brasil tem tido iniciativa para produção deste biocombustível desde 1927, ano em que foi instalada a primeira bomba de álcool. Devido ao aumento dos preços dos barris de petróleo, em virtude da crise mundial, o Programa Nacional do Álcool (Pro-álcool) foi criado em 1975 pelo Governo Federal, estimulando sua produção de forma a suprir tanto o mercado interno quanto o externo. Desde então, o incentivo à produção de etanol, refletido no Pró-alcool, passou por diferentes fases em que o favorecimento da produção e fases de estagnação foram estimuladas pelos preços do barril de petróleo, pela iniciativa da indústria automobilística de fabricar carros movidos a álcool, como também pelo mercado de açúcar (MUSSATTO *et al.*, 2010).

Atualmente, a produção mundial de etanol encontra-se em torno de 84,5 bilhões de litros por ano (produção alcançada em 2011) sendo o Brasil o segundo maior produtor e o primeiro maior exportador mundial deste biocombustível, com uma produção de 26 bilhões de litros na safra de 2009-2010. Já os Estados Unidos, que alcançaram uma produção de 10.600 milhões de galões de etanol em 2009, são os maiores produtores de bioetanol até então (BASSO, 2011; RFA, 2012).

O sucesso brasileiro por ser exemplificado por tais incentivos governamentais e pelas características desta biomassa, compatível com o clima brasileiro, exigirem tecnologias menos extensivas para seu processamento, proporcionando o maior superávit em relação de energia, quando comparada aos outros tipos de biomassas já empregadas mundialmente para produção deste biocombustível (MILANEZ; NYKO, 2012).

Entende-se por relação de energia, a energia renovável produzida na cadeia produtiva do biocombustível dividida pela quantidade de energia não-renovável requerida para sua produção. Esta característica influi nas despesas decorrentes da sua etapa produtiva, onde a tecnologia brasileira possui um custo 39% menor comparado à tecnologia empregada pelos Estados Unidos, que utilizam o milho e mesmo assim são maiores produtores de bioetanol (BETANCUR, 2010 e MILANEZ; NYKO, 2012).

2.3. Perspectivas brasileiras para produção de biocombustíveis

Atualmente, o Brasil vive um cenário promissor com a autossuficiência em petróleo iniciada em 2006 sendo prolongado pelas descobertas do grande potencial petrolífero na área do pré-sal. Área esta, que engloba as bacias sedimentares do Espírito Santo, Campos e Santos e cujos depósitos situam-se entre 5 mil metros e 7 mil metros, sob uma camada de sal, abaixo do leito do Oceano Atlântico. Deste modo, toda a tecnologia que tem sido desenvolvida e implementada para a exploração destas reservas contribuirá para que a produção nacional de petróleo e de gás natural seja no mínimo duplicada ao longo do decênio 2011-2020 (BRASIL, 2009 e TOLMASQUIM, 2012).

Por outro lado, todos os benefícios econômicos atrelados a este potencial petrolífero também se encontram acompanhados dos impactos ambientais vinculados à utilização destas fontes fósseis, tanto decorrentes de acidentes na prospecção, com maiores probabilidades dada às maiores profundidades da área pré-sal, quanto pela emissão contínua de gases de efeito estufa. Desta forma, ainda que haja certa estabilidade, esforços continuam sendo direcionados ao uso de fontes mais limpas e renováveis como as biomassas, onde nos últimos 30 anos, seu uso para produção de biocombustíveis, aliado ao consumo do etanol em detrimento à gasolina, evitou emissões de cerca de 800 milhões de toneladas de CO_2 (BRASIL, 2009 e GALDOS *et al.*, 2013).

Diante disso, estima-se que 50% da produção brasileira de petróleo será direcionada ao mercado externo em 2020, fazendo com que o Brasil possa usufruir economicamente sem que sua produção, em sua totalidade, comprometa o aumento da participação de fontes fósseis na matriz energética nacional. Ainda que haja a disponibilidade de novas fontes petrolíferas, é esperado que a participação de fontes renováveis como as biomassas seja cada vez maior nesta matriz ao longo dos anos (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2011 e TOLMASQUIM, 2012).

Assim, espera-se que tanto a produção quanto o consumo de etanol aumentem, sendo estimado um crescimento anual de 10,3% da demanda por etanol até 2020, alcançando um consumo de 73,3 bilhões de litros, justificado também pelo aumento da frota de veículos *flex-fuel* de 12,4 milhões em 2010 para 39,1 milhões em 2020. Tal fato sinaliza para necessidade do desenvolvimento e da implementação de novas tecnologias de produção de etanol, tanto no Brasil quanto mundialmente, visando o aumento da sua produção e o suprimento desta demanda. (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2011 e TOLMASQUIM, 2012).

2.4. Tecnologias para produção do bioetanol - Primeira e Segunda Geração

Para que os carboidratos, presentes nas biomassas, possam ser utilizados como fonte de carbono por grande parte dos microrganismos capazes de fermentar e produzir altas concentrações de etanol é necessário que os açúcares estejam disponíveis em formas simples, ou seja, na forma de mono ou dissacarídeos, que são facilmente internalizados por estas células microbianas e metabolizados a etanol (MOSIER *et al.*, 2005).

Neste contexto, o etanol considerado de primeira geração, é produzido por tecnologias simples, bem estabelecidas e implementadas pelas indústrias produtoras, compreendendo o uso de biomassas que possuem em sua composição altas concentrações destas formas monossacarídicas, dissacarídicas ou estruturas polissacarídicas de fácil hidrólise (STÖCKER, 2008 e SILVEIRA, 2011).

Um exemplo desta tecnologia corresponde ao uso do caldo da cana-de-açúcar e do melaço, já que possuem altas concentrações de sacarose em sua composição. Outro exemplo, consiste na utilização de biomassas como o milho, que possui altas concentrações de amido, um polissacarídeo composto por monômeros de glicose, facilmente hidrolisado por ataque ácido ou por ação de enzimas. Ainda que esta metodologia seja mais laboriosa, pela necessidade de hidrólise do polissacarídeo, tal tecnologia é bem estabelecida e utilizada pelos Estados Unidos (STÖCKER, 2008; CGEE, 2010 e TAN *et al.*, 2010).

Apesar da simplicidade implícita na produção do etanol de primeira geração, alguns fatores sugerem a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias, justificadas pelo fato de a biomassa utilizada ser a mesma empregada pra produção de alimentos de alta importância da dieta alimentar, como o açúcar no caso da cana-de-açúcar, fazendo com que a produção a partir desta matéria-prima seja dividida entre estas duas finalidades. Isso faz com que tanto a produção quanto o custo final deste biocombustível sejam influenciadas pelo mercado de açúcar. Diante disso e das preocupações que concernem o uso da área agriculturável para estes fins, iniciativas têm sido crescentes no intuito de desenvolver novas tecnologias e de aumentar a produção de etanol visando suprir a demanda crescente ao longo dos anos (MAPA, 2007; NAIK *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010 e DIAS *et al.*, 2011).

Neste âmbito, a tecnologia do etanol de segunda geração é inspirada em agregar valor aos resíduos agrícolas ou agroindustriais, existentes em quantidades maiores que as requeridas no local de produção. São utilizadas nesta tecnologia, biomassas de caráter lignocelulósico exemplificadas por bagaço, palhas, folhas e resíduos de exploração madeireira (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Deste modo, com esta tecnologia emergente, espera-se aumentar a produtividade dos biocombustíveis sem a necessidade de aumentar as áreas de cultivo onde se espera que o etanol de segunda geração seja comercializado nos próximos cinco anos (PEREIRA JR. *et al.*, 2008 e DIAS *et al.*, 2011).

A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por polímeros de celulose (34-47%), hemicelulose (24-29%) e lignina (18-28%), em base seca, onde a porção celulósica, mais representativa na biomassa lignocelulósica, tem forma polimérica sendo composta por numerosos monômeros de glicose arranjados por ligações de complexa hidrólise para sua disponibilização, sendo utilizadas para hidrólise desta estrutura enzimas que atuam sinergicamente denominadas celulases (SERPA, 2012).

Pelo fato da lignina ser covalentemente ligada tanto à celulose quanto à hemicelulose, tendo função primária de proporcionar o suporte estrutural dos vegetais, proporcionando resistência à degradação de sua parede celular, diferentes tecnologias de pré-tratamento têm sido propostas e aprimoradas visando desorganizar esta estrutura, remover a lignina e expor tanto a celulose quanto a hemicelulose à ação hidrolítica destes biocatalisadores, para em breve implementar a produção do etanol de segunda geração (ROSA; GARCIA, 2009; SOCCOL *et al.*, 2010; KAZI *et al.*, 2010 e SERPA, 2012).

2.5. Etanol de Terceira Geração – Tecnologia portadora de Futuro

Têm sido cada vez maiores as preocupações em relação ao intenso uso da água potável destinada ao crescimento das biomassas vegetais. Estudos em escala mundial indicam que a irrigação já consome mais de 70% dos recursos hídricos disponíveis, onde a produção agrícola é responsável por 40% deste consumo, sendo contrastante ao fato das mudanças climáticas, decorrentes do aumento do efeito estufa, tenderem a alterar de forma crítica os regimes pluviais e hídricos, diminuindo severamente sua disponibilidade ao longo dos anos (NOGUEIRA, 2008).

No mais, ainda que em países como o Brasil momentaneamente não haja conflito no uso da terra para biocombustíveis e alimentos, sendo utilizada somente 1,4% da área agriculturável para esta finalidade (produção de álcool e açúcar), tal realidade é passível de mudanças ao serem consideradas as hipóteses de esgotabilidade de fontes fósseis (GOH; LEE, 2010).

Devem ser consideradas também as crescentes preocupações em torno dos impactos ambientais decorrentes da produção de outros compostos químicos, além dos combustíveis, por rota petroquímica, onde já têm surgido iniciativas para produção de ácidos orgânicos e de outros compostos químicos de ampla utilidade na indústria, a partir do uso de biomassas, fazendo com que nestes cenários, seja ainda mais complexa a administração das áreas agriculturáveis (GOH; LEE, 2010; LI *et al.*, 2011).

Neste contexto, por mais da metade da biomassa mundial ser originada no ambiente marinho, tem se destacado a pesquisa por algas com potencial, em termos de composição química, de serem utilizadas como biomassa para produção de bioetanol. Assim, pode-se definir a tecnologia de etanol de terceira geração pela ideologia da produção de biocombustíveis a partir de algas marinhas, já que são promissoras ao não competirem com a área agriculturável, não desprendendo, portanto, solos férteis ao seu cultivo e não desviando também grande parte da água potável para irrigação, já que os principais requisitos para seu cultivo envolvem a abundante água marinha, a luz solar e o CO_2 (JOHN *et al.*, 2011).

Normalmente, esta biomassa algal é agrupada em duas categorias baseadas na sua morfologia e tamanho: as microalgas são organismos microscópicos, grande parte das espécies são unicelulares, ao contrário das macroalgas, caracterizadas por serem multicelulares, macroscópicas, possuindo estruturas que lembram raízes, caules e folhas de plantas superiores. Como vantagens intrínsecas ao cultivo marinho, a utilização das mesmas dispensa gastos com fertilizantes químicos, não danificando o solo através dos impactos ambientais causados pelo frequente monocultivo (DEMIRBAS, 2010; JUNG *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2012).

Aliado a isso, em relação às macroalgas, pode-se destacar sua capacidade de converter energia solar em energia química com eficiência fotossintética de 6 a 8%, visivelmente superior quando comparada a de biomassas terrestres comumente utilizadas (1,8 a 2,2%) (BORINES; DE LEON; MCHENRY, 2011; JOHN *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2012).

Tal característica faz com que sua taxa de crescimento também seja superior a de outros vegetais, assim como sua taxa de absorção de CO_2 atmosférico, fazendo com que a utilização das macroalgas seja uma opção mais sustentável no que se remete às preocupações com o efeito estufa. O fato desta biomassa se desenvolver em menos tempo, reflete-se também em uma produção mais eficiente de estruturas como carboidratos, lipídeos e proteínas, passíveis de serem processadas para produção de compostos de interesse industrial, incluindo biocombustíveis como o etanol (BORINES; DE LEON; MCHENRY, 2011; JOHN *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2012).

Tais características favoráveis podem ser visualizadas na **Tabela 2.1**, que mostra o volume de etanol produzido de acordo com as taxas de crescimento de diferentes biomassas já empregadas.

Tabela 2.1 – Comparação do potencial para produção de bioetanol entre diferentes biomassas baseado em suas taxas de crescimento.

	Trigo (grão)	**Milho (semente)**	**Beterraba-sacarina**	**Cana-de-açúcar**	**Macroalga**
Rendimento médio global (Kg ha^{-1} ano $^{-1}$)	2.800	4.815	47.070	68.260	730.000
Peso seco dos carboidratos hidrolisáveis (Kg ha^{-1} ano $^{-1}$)	1.560	3.100	8.825	11.600	40.150
Volume potencial de bioetanol (L ha^{-1} ano $^{-1}$)	1.010	2.010	5.150	6.756	23.400

Fonte: BORINES *et al.*, 2011.

Em relação às características estruturais destes carboidratos, outra vantagem presente na utilização das macroalgas é justificada pelas macromoléculas destas biomassas estarem organizadas entre si de formas mais simples quando comparada à biomassa lignocelulósica. Apesar de, aparentemente, serem semelhantes às

plantas, as macroalgas possuem muito baixo ou inexistente teor de lignina, fazendo com que os catalisadores utilizados, em especial as enzimas, possuam fácil acesso aos polissacarídeos de interesse. Além disso, a ausência da lignina, que proporciona a resistência da biomassa terrestre à degradação quando exposta ao ambiente, não inviabiliza o estoque da biomassa algal, quando seca, por um período favorável ao seu uso industrial (JONES; MAYFIELD, 2012).

Em termos de cultivo, o de muitas espécies de macroalgas já é bem estabelecido e implementado, já que são utilizadas para produção de compostos gelificantes e espessantes utilizados no ramo alimentício e de cosméticos. Tais produtos ainda que com uma produção significativa, não compõem os principais alimentos da dieta alimentar como o açúcar e o milho (BORINES; DE LEON; MCHENRY, 2011).

Todas estas vantagens justificam, portanto, tanto o enfoque quanto o desenvolvimento de pesquisas que permitam viabilizar o uso da biomassa marinha, em especial das macroalgas, para produção de biocombustíveis como o etanol tanto por sua composição química e características de crescimento serem atrativas quanto pela conscientização das questões ambientais, dadas às presentes condições que tendem a tornarem-se críticas ao longo dos anos como limitação de recursos hídricos, esgotabilidade das fontes fósseis, aumento do efeito estufa, entre outras, como mencionado anteriormente.

2.6. Macroalgas - *Kappaphycus alvarezii*

As macroalgas são historicamente divididas em três grandes grupos baseados em seus diferentes tipos de pigmentos fotossintéticos, sendo estes o grupo das algas castanhas (Phaeophyta), das algas verdes (Chlorophyta) e das algas vermelhas (Rhodophyta) (BORINES *et al.*, 2011).

Tanto seus pigmentos, quanto sua taxa de crescimento e sua composição química são diretamente afetadas pelo seu habitat devido à variação de fatores como a luminosidade, temperatura, salinidade, níveis de nutrientes, de poluição, entre

outros. Deste modo, a composição dos diferentes grupos de macroalgas pode ser visualizada na **Tabela 2.2**, onde pode ser destacado o teor expressivo de carboidratos (FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 2007). Dentre os diferentes grupos, o das algas vermelhas apresenta taxa de crescimento satisfatória, sendo o grupo de algas mais produzido nos últimos anos, como pode ser observado na **Figura 2.1.**

Tabela 2.2 – Composição das macroalgas em seus diferentes grupos.

Componente	Algas pardas (%)	Algas vermelhas (%)	Algas verdes (%)
Água	75-90	70-80	70-85
Minerais	30-50	25-35	10-25
Carboidratos	30-50	30-60	20-50
Proteínas	7-15	7-15	10-15
Lipídios	2-5	1-5	1-5
Celulose	2-10	2-10	20-40

Fonte: Faccini (2007).

Integrante deste grupo, as algas da espécie *Kappaphycus alvarezii* são cultivadas especialmente em áreas rasas, adaptam-se a altos níveis de iluminação, tendo preferência por águas claras e limpas, crescendo também em águas turvas causadas por sedimentação em suspensão, sendo preferencial uma temperatura para crescimento que varia de 20ºC a 32ºC. Possuem como pigmentos as clorofilas a e d, e as ficobilinas, principalmente ficoeritrina, influenciando diretamente em sua coloração que pode ser desde rosa, negra até esverdeada (**Figura 2.2**). Como produtos de reserva possuem o amido das florídeas, que ocorre como grânulos no citoplasma, fora do cloroplasto (HAYASHI, 2007).

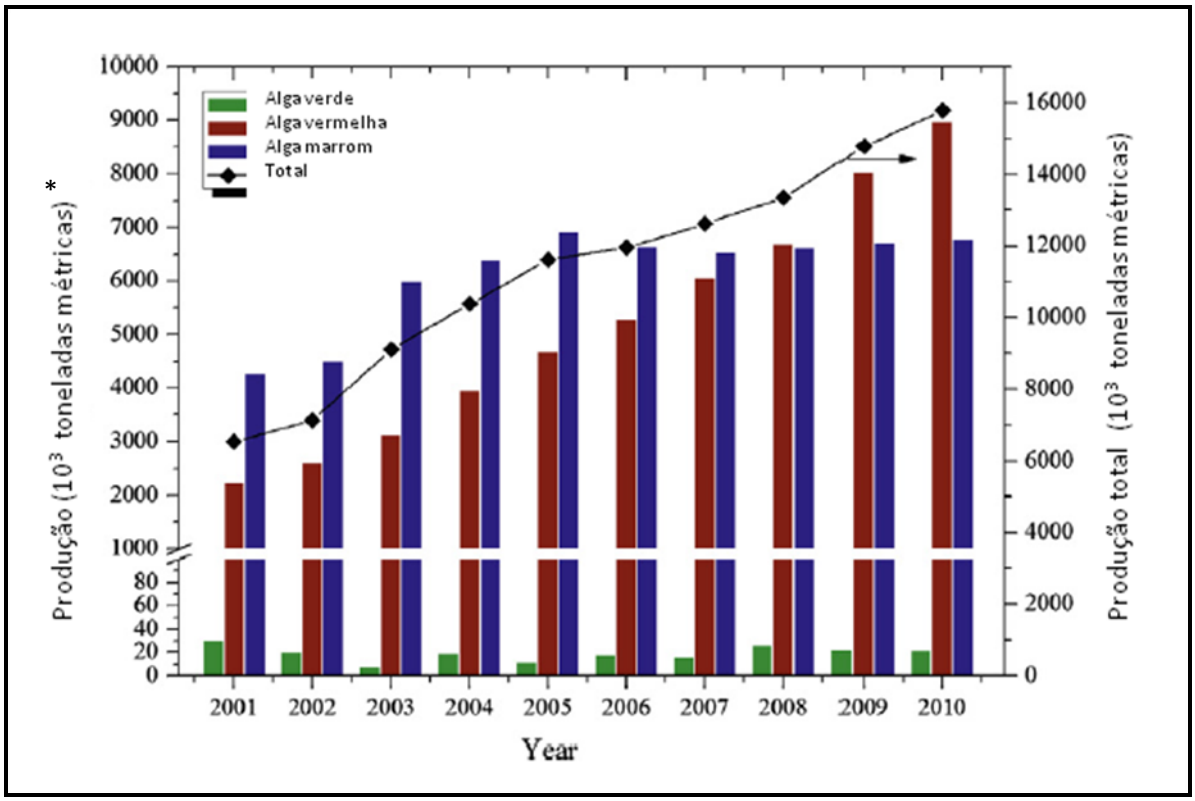


Figura 2.1 – Produção dos diferentes grupos de macroalgas ao longo dos anos

Fonte: Adaptado de Jung *et al.* (2012). Onde: * Massa úmida.

Figura 2.2 – Diferentes aspectos e cores da alga da espécie *Kappaphycus alvarezii*

Fonte: http://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=6791&sk=0.

Em relação aos carboidratos predominantes nesta espécie, passíveis de uso industrial, apresenta aproximadamente 56,81% de carragenana, um polissacarídeo

composto principalmente por monômeros de galactose, além de possuir em torno de 7,49% de celulose (HARGREAVES *et al.*, 2013).

Devido ao seu teor expressivo de carragenana, um carboidrato que atualmente tem aplicação na indústria alimentícia como espessante e gelificante, *Kappaphycus alvarezii* é a principal matéria-prima para a obtenção destes produtos, sendo procedente de cultivos nas Filipinas, Indonésia e Tanzânia, onde sua produção aumentou cerca de 5.000 toneladas, em 1985, para mais de 110.000, em 2005 (GOH; LEE, 2010).

2.7. Cultivo de *Kappaphycus alvarezii*

A maricultura de *Kappaphycus alvarezii* é feita em um sistema extensivo, sem adição de nutrientes e tratamento com compostos químicos. Seus cultivos comerciais são realizados em larga escala empregando o sistema conhecido como "tie-tie", onde porções do talo são amarradas em cabos de cultivo e estes são mantidos fixos ao fundo ou em sistemas flutuantes como balsas ou *long-lines* (HAYASHI *et al.*, 2007).

Além do mais, a propagação de *K. alvarezii* é um processo de caráter contínuo baseado na sua multiplicação vegetativa de ciclos sucessivos de cultivo por 40 a 60 dias (**Figura 2.3**). A maricultura desta alga teve início nas Filipinas na década de 70, onde em dez anos, modificou o cenário mundial da indústria de ficocolóides e empregou mais de 60 mil famílias. Tal sucesso, justificado pelo rápido crescimento da espécie e pela metodologia simples de cultivo, inspirou sua propagação para diversas regiões do mundo, em países como Estados Unidos, Japão, Cuba, Venezuela e Brasil (HAYASHI, 2007).

No Brasil, o cultivo desta espécie foi introduzido experimentalmente na Praia do Itaguá (Ubatuba, SP), em 1995, após estudos acadêmicos para a obtenção do conhecimento sobre a biologia deste clone e a verificação da possibilidade de cultivá-la neste local sem danos ambientais. Em 1998, outro clone trazido da Venezuela, foi introduzido na Baía da Ilha Grande e posteriormente na Baía da Marambaia, ambas

no Estado do Rio de Janeiro, para a implantação do primeiro cultivo do Brasil em escala comercial (ONDAS BIOMAR).

Os resultados obtidos durante estes experimentos evidenciaram características favoráveis das linhagens desta espécie de algas para o cultivo comercial no Brasil. Verificou-se que a adaptação da espécie à região devido às altas taxas de crescimento e ao alto teor de carragenana durante todo o ciclo anual. Além do mais, observou-se a influência da temperatura para sazonalidade e a necessidade de um melhor controle da herbivoria. No entanto, não foram observados indícios de riscos ambientais, o que torna atrativo o cultivo desta espécie (ONDAS BIOMAR).

Figura 2.3 – Cultivo de *Kappaphycus alvarezii*.
Fonte: http://www.ondasbiomar.com.br/?page_id=375

Diante disso, a criação de legislação específica para este tipo de cultivo no Brasil foi iniciada em 29 de novembro de 2005, através da realização da primeira reunião temática, coordenada pela SEAP-PR (Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca – Presidência da República) e pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), na Universidade Estadual do Rio de Janeiro, para tratar da sua regulamentação no Brasil. Em 18 de julho de 2007 com a publicação no Diário Oficial da União (DOU), pelo IBAMA, da Instrução Normativa (IN) nº 165, de 17 de julho de 2007, foi permitido o cultivo de *Kappaphycus alvarezii*, exclusivamente no litoral sudeste e sul do Brasil, mediante assinatura de Termo de Compromisso (TC), para os empreendimentos que houvessem protocolado

solicitação de cessão de uso de espaço físico de domínio da União para fins de aquicultura na SEAP-PR até a data de 29 de novembro de 2005 (ONDAS BIOMAR).

Posteriormente, em 23 de julho de 2008, foi publicada no DOU a IN n° 185 (IBAMA), que permitiu o cultivo de *Kappaphycus alvarezii* entre a Baía de Sepetiba (RJ) e a Ilha Bela (SP) regulamentando definitivamente esta atividade no Brasil. Atualmente, tais legislações e a adaptação da espécie no litoral brasileiro estimulou o surgimento de empresas como a Ondas Biomar que foi fundada em 2004 e tem sido pioneira tanto no cultivo quanto no ciclo completo da fabricação de carragenana, possuindo também um dos maiores cultivos de *Kappaphycus alvarezii*, da América Latina, situados na restinga da Marambaia, litoral Sul do Rio de Janeiro (ONDAS BIOMAR).

Sendo assim, as bem estabelecidas características de cultivo tanto mundialmente quanto ao litoral brasileiro, ainda que a prática seja recente e pioneira, justificam a escolha desta espécie para estudo como biomassa para aplicação biotecnológica, resultando-se na produção de outros compostos de interesse industrial como os biocombustíveis.

2.8. Principais características da carragenana

As carragenanas são polissacarídeos lineares e sulfatados, presentes em várias espécies de algas do gênero Rhodophyta, onde sua estrutura é composta por sequências dissacarídicas que compreendem as repetições de resíduos de β-D-galactopiranose ligados nas posições 1 e 3, e resíduos de α-D-galactopiranose ligados nas posições 1 e 4 . A presença de monômeros de D-galactose como unidade básica, torna a aplicação da carragenana, e consequentemente, o uso de *Kappaphycus alvarezii* mais atrativo para os processos fermentativos quando comparado ao de espécies de algas que possuem, por exemplo, o agar como polissacarídeo predominante, que possui tanto D-galactose quanto L-galactose. O fato de possuir L-galactose faz com que este açúcar possa agir como um inibidor para o processo fermentativo uma vez que as espécies de leveduras, comumente

empregadas para fermentação alcoólica, não fermentam este monômero quando nesta configuração (DAROCH; GENG; WANG, 2013).

Os diferentes tipos de carragenanas, por sua vez, são diferenciados entre si pelo seu grau de sulfatação e pela sua quantidade de 3,6-anidro-D-galactopiranose sendo, por conta disso, distribuídos em grupos denominados *Kappa*, *Lambda*, e *Iota* (KHAMBHATY *et al.*, 2012).

Em relação ao teor de sulfato, a carragenana do tipo *Lambda* apresenta três grupamentos por unidade de repetição, diferentemente do tipo *Iota* que possui dois e do tipo *Kappa* que é constituído por um. Diante disso, existem estudos que relatam que o teor de sulfato é diretamente proporcional à dificuldade de hidrólise desta estrutura, sendo, portanto, o uso de *Kappaphycus alvarezii* vantajoso na medida em que apresenta basicamente carragenanas do tipo kappa (KHAMBHATY *et al.*, 2012).

Assim, a estrutura da Kappa carragenana, como pode ser observada na **Figura 2.4**, é organizada em unidades repetidas de D-galactopiranose-4-O-sulfato, conectadas por ligações do tipo α(1→3), alternadas a unidades de 3,6 anidro-D-galactopiranose, unidas por ligações do tipo β(1→4).

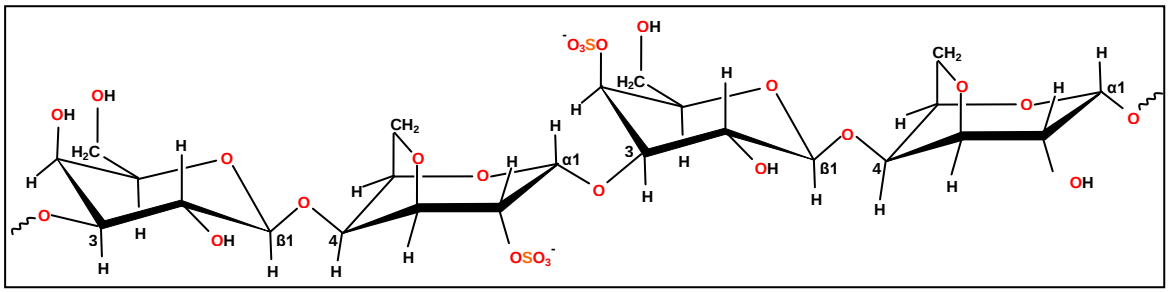


Figura 2.4 – Estrutura da Kappa carragenana.

Fonte: http://www.lsbu.ac.uk/water/hycar.html. Acesso em 20/02/2013.

2.9. Pré-tratamento da biomassa algal e hidrólise ácida da carragenana

Tanto para solubilizar a carragenana, com o objetivo de separá-la da estrutura celulósica, quanto para hidrolisar esta galactana a monômeros de galactose,

passíveis de serem utilizados em processos fermentativos, a estratégia mais utilizada compreende o uso de catalisadores químicos. Diante disso, o tratamento desta biomassa algal com ácido diluído, em temperaturas elevadas, tem sido a metodologia mais adotada para esta finalidade. Desta forma, o ácido sulfúrico tem sido o mais utilizado, proporcionando a melhor eficiência de hidrólise dentre os ácidos testados, como por exemplo, o ácido clorídrico (KIM *et al.*, 2011; DAROCH; GENG; WANG, 2013).

Em diferentes trabalhos recém-publicados, as estratégias mais adotadas compreendem a exposição da biomassa algal seca a uma solução de ácido sulfúrico, sendo avaliadas as concentrações de 0,1% a 3% v/v, em temperaturas que variam de 120 a 130°C, por 15 a 120 minutos (LEE *et al.*, 2011; MEINITA *et al.*, 2012; DAROCH; GENG; WANG, 2013).

Tais condições promovem a separação de duas fases, onde na fase líquida encontram-se os monômeros de galactose oriundos da hidrólise da carragenana e na fase sólida o conteúdo celulósico exposto e pronto para ser submetido ao processo de sacarificação, visando hidrolisar esta estrutura a monômeros de glicose e fazendo com que estes dois tipos de açúcares possam ser utilizados, posteriormente, como substrato para produção de etanol ou de outros compostos de interesse comercial (HARGREAVES *et al.*, 2013).

Observa-se, portanto, que tal estratégia de pré-tratamento é mais simples quando comparada ao pré-tratamento necessário às biomassas lignocelulósicas, em que se necessita de mais uma etapa para a remoção da lignina. Para o pré-tratamento de ambas as biomassas, o uso de ácido diluído a temperaturas elevadas tem levado a resultados satisfatórios relacionados à eficiência de hidrólise (JONES; MAYFIELD, 2012; DAROCH; GENG; WANG, 2013).

No entanto, apesar destas condições serem favoráveis à formação de açúcares simples, as mesmas também proporcionam a formação de compostos inibitórios que são tóxicos aos microrganismos e afetam o seu metabolismo. Isso faz com que ocorra uma queda significativa na produtividade em etanol na etapa fermentativa e constitui um dos desafios para viabilização do etanol de segunda e terceira geração (JONES; MAYFIELD, 2012; DAROCH; GENG; WANG, 2013).

Dentre os compostos inibidores resultantes do pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica, os mais comuns são o ácido acético, o furfural, o hidroximetilfurfural (HMF) e os compostos fenólicos. Já nas condições de hidrólise ácida da carragenana ocorre a formação de hidroximetilfurfural (HMF), um composto inibidor comumente gerado a partir da desidratação de hexoses, como a galactose (BETANCUR, 2010; NICHOLS, 2010; MEINITA *et al.*, 2012).

A toxicidade destes compostos é consequente dos possíveis danos causados em nível de membrana celular ou na síntese de macromoléculas que incluem as enzimas envolvidas no metabolismo fermentativo, especialmente na via glicolítica (NICHOLS, 2010). Dentre estas enzimas, as com atividade mais afetada pela presença do HMF são a triose-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase (BETANCUR, 2010).

Ainda que este efeito inibitório seja em menor intensidade comparado ao exercido pelo furfural, um composto inibidor que possui mecanismo de ação similar, tal consequência faz com que, dependendo da concentração de HMF, possa ocorrer desde o aumento da fase lag, que retarda o crescimento celular e o processo fermentativo, até mesmo a perda da viabilidade destas células, obstaculizando a ocorrência de fermentação. No mais, nas condições de temperatura mais elevadas, dentre as recentemente testadas, o HMF pode ser degradado resultando na formação de ácido levulínico, um composto de efeito mais tóxico comparado ao HMF, por causar efeito inibitório ainda que presente em baixas concentrações no hidrolisado (MEINITA; HONG; JEONG, 2012).

2.10. Principais estratégias visando diminuir a toxicidade de compostos inibidores no hidrolisado ácido da biomassa algal

Diferentes estratégias têm sido propostas para reduzir a concentração de compostos inibidores nos hidrolisados de diferentes tipos de biomassa, de modo a deixá-lo em condições fermentáveis para o microrganismo. As técnicas mais conhecidas envolvem a mudança de pH do hidrolisado com CaO, $Ca(OH)_2$, H_2SO_4,

utilização de carvão ativo, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos e enzimas (BETANCUR, 2010; NICHOLS, 2010).

Em relação ao hidrolisado da carragenana, estratégias de diluição do hidrolisado, como também a de mudança de pH, têm sido adotada em alguns trabalhos . No entanto, diluir o hidrolisado, além de diminuir a concentração de HMF, reduz significativamente a concentração de galactose, resultando em concentrações muito baixas de etanol após a fermentação (KHAMBHATY *et al.*, 2011). Por conta disso, têm sido crescentes estudos que propõem a destoxificação do hidrolisado através do uso de carvão ativo, para proporcionar a fermentabilidade da galactose em concentrações mais favoráveis à fermentação etanólica (HARGREAVES *et al.*, 2013; MEINITA; HONG; JEONG, 2012).

Dependendo das concentrações de galactose e de HMF presentes no hidrolisado, concentrações altas de carvão ativo são necessárias para destoxificá-lo completamente, em relação ao volume de hidrolisado. Isso faz com que esta estratégia apresente como desvantagem o custo adicional ao processo, também atrelado a perdas de hidrolisado decorrente da destoxificação e à geração de resíduos químicos (VILLARREAL *et al.*, 2006; OKUDA *et al.*, 2008)

Por outro lado, o uso desta metodologia permitiu, até então, os melhores resultados de produção de etanol, tendo, este composto inibidor, sido removido sem que houvesse variação significativa na concentração de galactose (HARGREAVES *et al.*, 2013; MEINITA; HONG; JEONG, 2012).

Outra forma de minimizar o efeito inibitório destes compostos compreende a aclimatação do microrganismo ao meio, utilizando a metodologia de cultivos sucessivos em meios que contenham, gradativamente, maiores concentrações das substâncias inibidoras. Este método tem permitido aumentos na concentração de etanol, produtividade e rendimento, em fermentações com hidrolisados hemicelulósicos pela levedura *Pichia stipitis*, após suas células serem aclimatadas, adquirindo maior resistência à repressão metabólica causada pelos compostos inibidores. Desta forma, a aclimatação tem sido estudada com o intuito de,

futuramente, prescindir etapas de destoxificação (ALMEIDA *et al.*, 2009; BETANCUR, 2010).

Além disso, têm sido crescentes estudos que relatam a capacidade presente em algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de superexpressar genes homólogos e heterólogos codificadores de enzimas que conferem resistência à compostos inibidores. Neste âmbito, sabe-se que, através destas enzimas, algumas linhagens são tolerantes a concentrações de HMF que são letais às leveduras não resistentes, pelo fato de as mesmas serem capazes de converter o HMF a 2,5-di-hidroximetilfurano, que compreende uma forma menos tóxica para a célula (LIU, 2006; JORDAN *et al.*, 2011).

Apesar disso, não têm sido publicados estudos que investiguem a capacidade de conversão do HMF, e consequentemente de resistência, das linhagens de leveduras que são submetidas à fermentação do hidrolisado da carragenana, proveniente da alga *Kappaphycus alvarezii*, sendo também pouco exploradas, as estratégias de aclimatação celular.

2.11. Microrganismos produtores de carragenases – perspectivas para hidrólise enzimática da carragenana

Além do desenvolvimento de novas técnicas que visam diminuir os efeitos indesejados causados por altas concentrações de HMF resultantes da hidrólise ácida, a proposição de métodos alternativos para a hidrólise da carragenana, em que haja ausência ou baixas concentrações de HMF, faz-se necessária. Diante disso, a possibilidade futura de se utilizar biocatalisadores para a hidrólise desta galactana pode resolver os entraves da formação de compostos inibidores, pelo fato de as enzimas terem maior especificidade pelos substratos quando comparados aos catalisadores químicos e requererem uma menor temperatura para que a reação ocorra, evitando-se desta forma, a formação de compostos tóxicos para o crescimento microbiano, gerados nas condições severas e necessárias para hidrólise ácida.

Diversas bactérias marinhas que secretam diferentes tipos de carragenases têm sido isoladas, onde os gêneros *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Zobellia* and *Cytophaga* têm sido os mais estudados. Neste contexto, estão distribuídas na **Tabela 2.3** as espécies bacterianas produtoras de carragenases, que possuem ação hidrolítica específica para os diferentes tipos de carragenana (*Kappa, Lambda* e *Iota*) (MICHEL *et al.*, 2001).

As carragenases agem nas carragenanas do tipo *Kappa*, catalisando a hidrólise da ligação beta (1→4) entre a porção D-galactose-4-sulfato e a 3,6-anidro-D-galactose (**Figura 2.4**), liberando como produto kappa-neocarrabiose + D-galactose.

Apesar de existirem na literatura estudos relacionados à produção destas enzimas, as mesmas ainda não são comercialmente disponíveis, o que pode justificar, a até então, ausência de trabalhos publicados relacionados à hidrólise enzimática da carragenana para posterior aplicação em processos fermentativos (GOH; LEE, 2010).

Tabela 2.3 – Microrganismos produtores de carragenases.

Enzimas	*Kappa*-carragenanase	*Iota*-carragenanase	*Lambda*-carragenanase
Números EC	3.2.1.83	3.2.1.127	3.2.1.162
Substratos	*Kappa*-carragenana	*Iota*-carragenana	*Lambda*-carragenana
Microrganismos produtores	*Pseudoalteromonas carrageenovora* (ATCC 43555) *Pseudomonas elongate* *Zobellia galactanivorans* *Pseudoalteromonas porphyrae*	*Pseudoalteromonas fortis* *Zobellia galactanivorans*	*Pseudoalteromonas carrageenovora* *Pseudoalteromonas CL19*

Fonte: Adaptado de HENARES *et al.* (2010).

Para que estas enzimas possam ser utilizadas com esta finalidade futuramente, as condições ideais e necessárias tanto para extração da carragenana da biomassa algal quanto para sua solubilização devem ser elucidadas.

No mais, para obtenção de monômeros de galactose a partir da atividade hidrolítica de *k*-carragenases, que possuem especificidade pelas ligações do tipo beta, deve-se estabelecer uma condição prévia de hidrólise das ligações do tipo alfa, também presentes nesta estrutura. Tais ligações possuem uma característica mais lábil e menos resistente às condições de hidrólise ácida, quando comparada à ligação do tipo beta (1→4) inibidoras sejam necessárias (FALSHAW, R.; FURNEAUX, 1995; KHAMBHATY *et al.*, 2011).

2.12. A estrutura celulósica

Além da carragenana, a *Kappaphycus alavrezii*, por estar inclusa no grupo das algas vermelhas, pode apresentar de 2 a 10% de celulose, estando a biomassa em estudo, cultivada pela empresa Ondas Biomar, com conteúdo celulósico de 7,49% (HARGREAVES *et al.*, 2013).

Esta estrutura é formada por uma longa cadeia polimérica composta por de monômeros de D-glicose unidos por ligações do tipo β(1→4). A estrutura cristalina da celulose interage a outras cadeias por ligações de hidrogênio e força de *Van der Waals*, resultando em uma estrutura altamente insolúvel. Além desta característica, esta estrutura também é composta por uma região amorfa ou paracristalina pouco ordenada (**Figura 2.5**) (MAEDA, 2010).

Desta forma, a estratégia predominantemente adotada para a hidrólise da porção celulósica em muitos estudos com a biomassa algal, consiste na utilização de celulases. Estas enzimas, classificadas segundo seu modo e tipo de atuação na estrutura celulósica em endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidases atuam sinergicamente proporcionando a hidrólise deste substrato a monômeros de glicose (BORINES *et al.*, 2011; YANAGISAWA *et al.*, 2011; Ellis *et al.*, 2012).

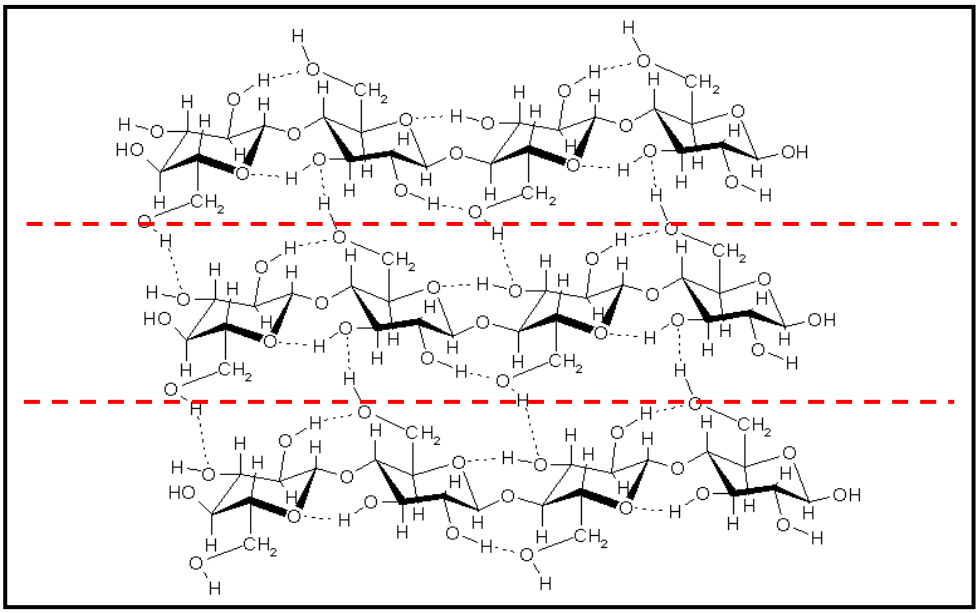


Figura 2.5 – Estrutura celulósica: ligações de hidrogênio inter e intra cadeias de celulose.
Fonte: http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/wood/

A estratégia de hidrólise enzimática da estrutura celulósica pode ser explicada pelas altas atividades destas enzimas e, consequentemente, por uma favorável eficiência de hidrólise com condições bem caracterizadas na literatura, além das mesmas possuírem uma maior especificidade pelo substrato celulósico quando comparadas aos catalisadores químicos (MAEDA, 2010).

No mais, o uso de celulases requer uma menor temperatura para que a reação ocorra, contrastando com processos químicos de hidrólise de celulose que demandam condições que geram compostos inibidores e tóxicos para o crescimento microbiano (SINGHANIA *et al.*, 2010).

A utilização destas enzimas, portanto, pode ser considerada uma estratégia mais sustentável, já que requer um menor gasto energético para estabelecer sua temperatura de reação, como também pela menor quantidade de resíduos gerada quando comparada às concentrações resultantes da hidrólise ácida (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Apesar de as celulases estarem disponíveis comercialmente, a utilização das mesmas aumentaria significativamente o custo do processo por estas enzimas serem

importadas. Porém, crescentes iniciativas refletidas em estudos e patentes publicadas apontam para, em um futuro próximo, a produção nacional de celulases visando contribuir com a viabilidade econômica do etanol celulósico e, posteriormente, de outros bioprodutos (Patente WO2010/076552 A1).

2.13. O aproveitamento da biomassa algal dentro do contexto de biorrefinaria

Diante das características atrativas da biomassa algal e das propriedades de seus principais polissacarídeos, Goh e Lee (2010) idealizaram as principais etapas para produção do etanol de terceira geração integrando o conceito de biorrefinaria. Este conceito relativamente novo visa integrar diferentes processos para o aproveitamento de diferentes constituintes da biomassa objetivando sua conversão em produtos de interesse industrial.

Como observado no fluxograma apresentado na **Figura 2.6**, os autores propõem a extração e a solubilização da carragenana em um processo independente e anterior à hidrólise. Acredita-se que esta estratégia esteja associada à visão futura quanto ao desenvolvimento de metodologias que permitam a hidrólise enzimática desta estrutura polissacarídica (sem gerar inibidores), como também por esta separação e purificação possibilitarem o melhor aproveitamento de outras estruturas presentes na biomassa algal, como a porção protéica. Complementar a estas motivações, a extração da carragenana também foi proposta diante da dúvida se nas condições de hidrólise ácida recém-estudadas, esta estrutura é devidamente solubilizada, extraída e suscetível ao ataque ácido.

As metodologias propostas neste estudo para extração e purificação da carragenana compreendem as mesmas utilizadas para produção da carragenana purificada que é comercializada para indústria alimentícia e utilizada como agente espessante e gelificante. Estes procedimentos envolvem, principalmente, o tratamento da alga com uma solução álcali ou somente com água destilada, sendo submetida a uma temperatura que tem variado, de acordo com alguns trabalhos, de

50 a 90°C por 1 a 5 horas. Após a extração, a carragenana é precipitada com álcool isopropílico, seguindo, posteriormente, para as etapas de purificação (MONTOLALU *et al.*, 2009).

Posterior à extração, purificação e a separação das estruturas, idealiza-se que as mesmas sejam submetidas à hidrólise, no caso da celulose, por via enzimática utilizando-se celulases e da carragenana, em condições ácidas, com expectativas futuras para hidrólise enzimática, onde os açúcares resultantes de ambos os processos hidrolíticos (glicose e galactose) possam ser submetidos à fermentação, em correntes distintas para fermentação a etanol. Aliado a isso, estima-se que os subprodutos decorrentes das principais etapas possam ser aproveitados, para geração de energia, como também, a comercialização de proteínas.

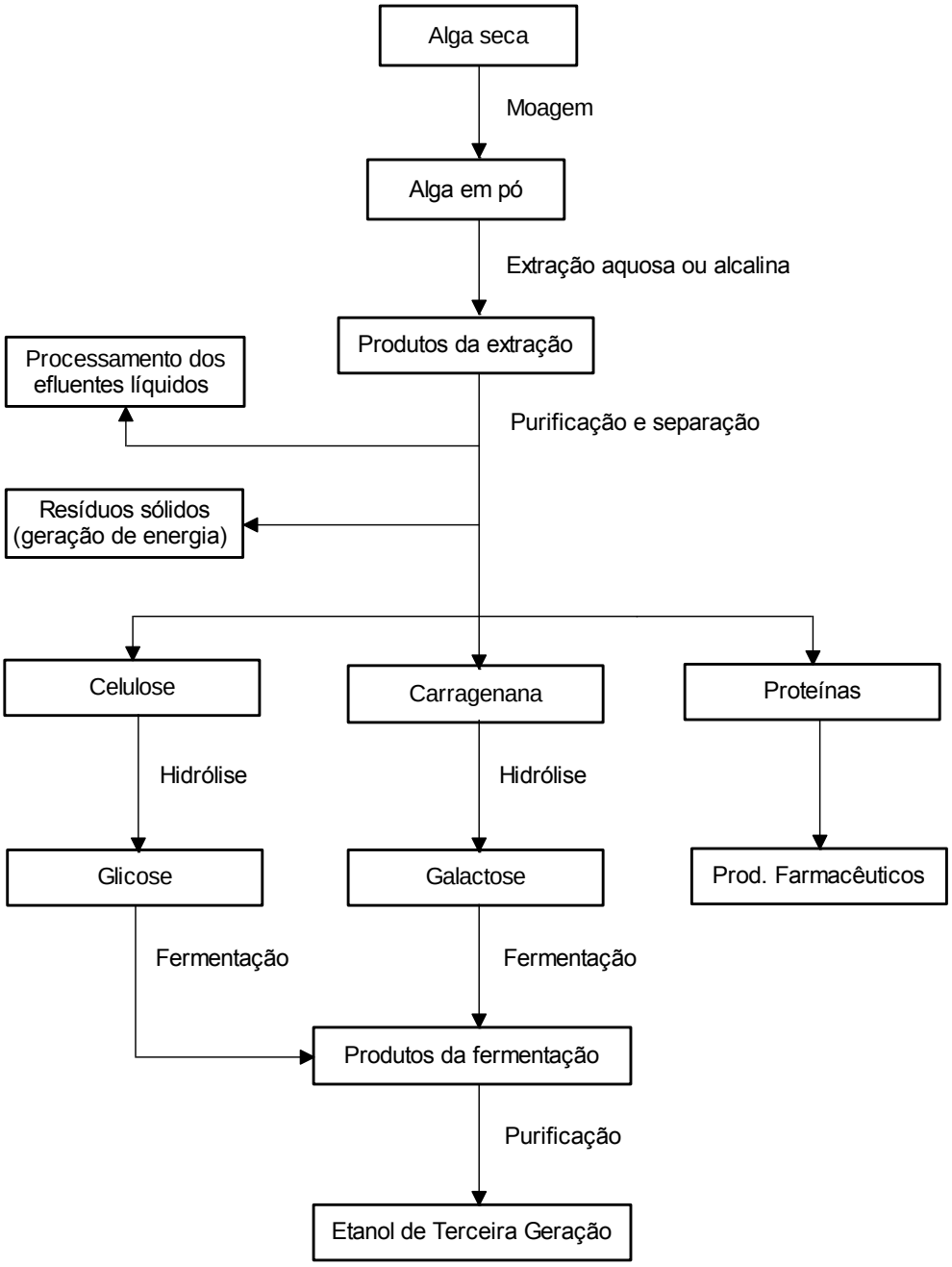


Figura 2.6 – Etanol de terceira geração a partir de *Kappahycus alvarezii* utilizando o conceito de biorrefinaria segundo Goh e Lee (2010).

2.14. Fermentação alcoólica – Principais aspectos do metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Algumas espécies de leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, assim como a bactéria *Zymomonas mobilis*, são exemplos de microrganismos que

apresentam as características mais indicadas a serem utilizadas para a fermentação etanólica (FERREIRA, 2010).

Aspectos vantajosos estes, que incluem a tolerância a concentrações elevadas de etanol; capacidade de fermentação de altas concentrações de açúcares; requerer condições nutricionais simples para crescimento celular, não sendo, portanto, auxotrófico; tolerância a pH de ácido a neutro; não ser patogênico; ter robustez a inibidores e serem termotolerantes fazem com que as linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* sejam as mais indicadas para produção do bioetanol (FERREIRA, 2010).

Desta forma, o primeiro estágio para o metabolismo de açúcares a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, caracteriza-se por uma série de dez reações catalisadas por enzimas específicas, de modo a catabolizar moléculas de glicose a ácido pirúvico. Estas reações compõem, portanto, a via glicolítica que também é conhecida como via *Embden Meyerhof Parnas* (TORTORA *et al.*, 2010).

A primeira etapa desta via envolve uma série de reações enzimáticas preparatórias para produção de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato a partir de uma molécula de glicose. Já a segunda etapa é caracterizada por uma série de reações de oxidação a partir do gliceraldeído-3-fosfato, que proporcionam um rearranjo molecular neste composto intermediário que se resulta na formação de duas moléculas de ácido pirúvico. Como consequências destas reações, que também justificam a importância desta etapa, a energia é conservada em forma de moléculas de ATP, havendo também, a reposição dos cofatores NADH (MADIGAN *et al.*, 2003).

Dependendo das condições em que as leveduras são mantidas, em especial do nível de aeração e da concentração de substrato, o ácido pirúvico, produzido na via glicolítica, é descarboxilado pela ação da enzima piruvato descarboxilase, resultando na formação de acetaldeído. O etanol é então produzido a partir da redução deste composto pela enzima álcool desidrogenase, possibilitando também a reciclagem do cofator NAD na forma oxidada (MADIGAN *et al.*, 2003).

Apesar de a galactose possuir estrutura semelhante a da glicose, açúcar metabolizado na via de *Embden-Meyerhof-Parnas*, nem todas as linhagens de *S. cerevisiae* são capazes de metabolizar a galactose. Tal fato justifica-se pelas enzimas

que constituem a via glicolítica não metabolizarem este açúcar, impossibilitando a produção de ácido pirúvico, um composto importante para o metabolismo celular por ser intermediário para diferentes rotas metabólicas (OSTERGAARD *et al.*, 2000; VAN DEN BRINK *et al.*, 2009).

Sendo assim, para que uma linhagem possa metabolizar a galactose, é necessário que a mesma seja capaz de expressar um conjunto de enzimas que atuam desde o transporte deste carboidrato até a sua conversão à glicose-6-fosfato, por ser um composto intermediário para via glicolítica. Estas enzimas atuam, portanto, nas reações que constituem a via de Leloir, que pode ser visualizada na **Figura 2.7** (OSTERGAARD *et al.*, 2000; VAN DEN BRINK *et al.*, 2009).

Diante disso, apesar da maioria das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* não metabolizar a galactose naturalmente, dada à biodiversidade, a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782, em estudo neste trabalho, é naturalmente adaptada (linhagem não manipulada geneticamente), sendo capaz de assimilar este açúcar, direcionando-o tanto para o metabolismo fermentativo, quanto para o oxidativo ou para biossíntese de precursores importantes para o crescimento e multiplicação celular (**Figura 2.7**).

Pelo fato de estas leveduras serem anaeróbias facultativas, crescendo tanto na ausência de oxigênio quanto em sua presença, a presença de oxigênio molecular é uma das características capaz de direcionar o seu metabolismo dentre as diferentes vias existentes (VAN DEN BRINK *et al.*, 2008).

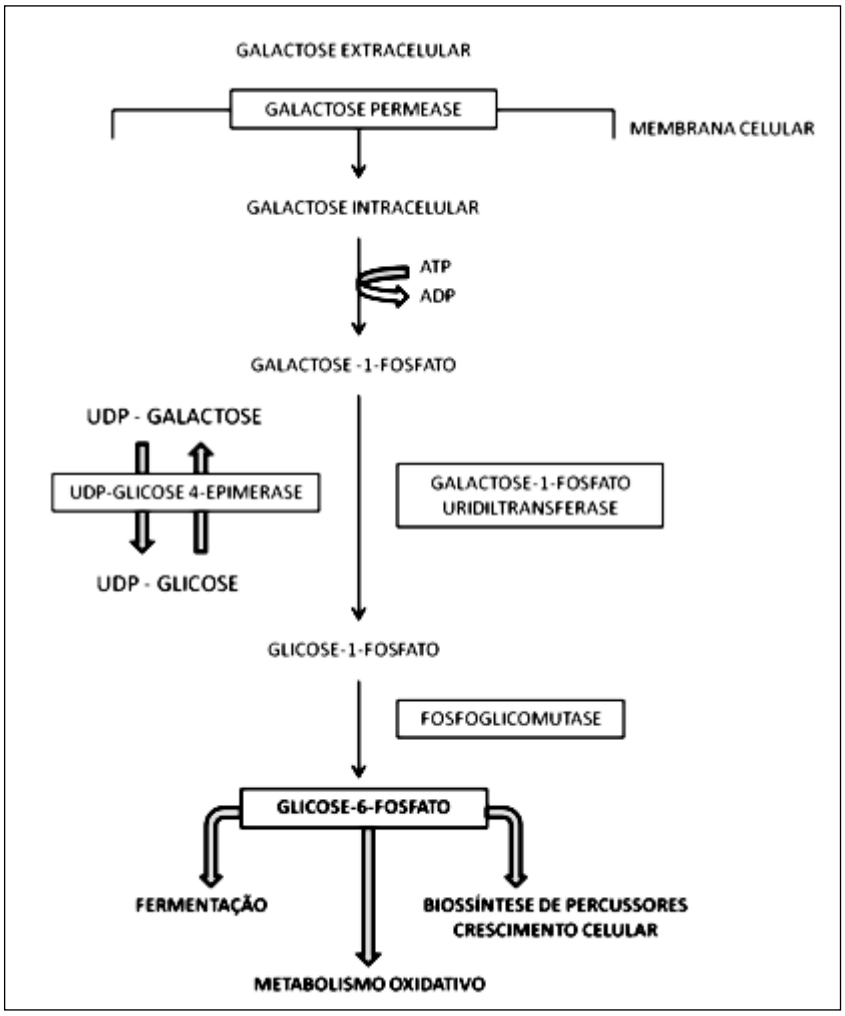


Figura 2.7 – Esquema mostrando a Via de Leloir.
Fonte: Ostergaard *et al* (2000).

Em presença de oxigênio, parte do ácido pirúvico é deslocada para o Ciclo de Krebs, onde este será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água. Já a ausência de oxigênio, favorece a via fermentativa, onde ocorre a descarboxilação do piruvato para formação de acetaldeído que em seguida é reduzido a etanol (TORTORA *et al*., 2010).

Conclui-se, portanto, que a presença do oxigênio molecular induz a mudança no metabolismo energético de fermentação para respiração, onde os balanços globais das duas vias estão expressas nas seguintes equações de Gay-Lussac:

Em anaerobiose:

- $C_6H_{12}O_6 + 2\ Pi + 2\ ADP \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + 2\ ATP + 2\ H_2O + 57\ kcal$

Em aerobiose:

- $C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 38\ ATP + 688\ kcal$

Além das condições de aeração, a concentração de carboidrato no meio reacional, neste caso, de galactose também induzirá o metabolismo fermentativo ou oxidativo. Ou seja, mesmo em presença de oxigênio a via fermentativa poderá ser preferencial caso a concentração de galactose esteja acima de um parâmetro denominado concentração crítica (C_{crit}). Tal fato justifica-se por esta concentração reprimir a expressão de genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, como também da cadeia respiratória e de estruturas mitocondriais (RETTORI; VOLPE, 2000; VAN DEN BRINK *et al.*, 2008; BARCELOS, 2012).

Desta forma, encontrando-se reduzida a atividade mitocondrial na *S. cerevisiae*, a via a ser seguida pelo piruvato é a anaeróbia com formação de etanol, mesmo em condições aeradas. Pode-se concluir, portanto, que para possibilitar o metabolismo oxidativo é necessário que a concentração deste carboidrato esteja inferior a C_{crit}. (RETTORI; VOLPE, 2000; VAN DEN BRINK *et al.*, 2008; BARCELOS, 2012).

Já que o metabolismo oxidativo favorece a biossíntese de percussores que proporcionam o crescimento celular e que as condições que induzem este metabolismo são distintas das que favorecem a via fermentativa, inicialmente, em condições aeradas e com baixa concentração de carboidratos obtém-se uma concentração alta de biomassa celular em fase estacionária de crescimento, propícia a ser utilizada na etapa de fermentação, em mínimas condições de aeração e com alta concentração de açúcar (LEE & LEE, 2012).

2.15. Condução de Bioprocessos

Anteriormente, alguns aspectos do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae,* em especial, as condições reacionais que influem no favorecimento da via fermentativa e do metabolismo oxidativo foram discutidas. Um dos meios de melhor proporcionar o controle destes parâmetros consiste em variar o modo de condução do bioprocesso, já que, algumas formas de condução possibilitam que o processo ocorra em níveis mais adequados e constantes da concentração de açúcares e de células evitando-se, desta forma, que o metabolismo da levedura seja deslocado para uma via distinta da que proporciona a obtenção do produto de interesse (PACHECO, 2010).

Diante disso, as principais formas de condução de bioprocessos podem ser exemplificadas pelos processos descontínuos (batelada simples), descontínuos alimentados (batelada alimentada) e contínuos. Avaliar, portanto, diferentes formas de condução de bioprocessos têm proporcionado um ganho em produtividade tanto na etapa prévia de produção de células quanto, posteriormente, na etapa fermentativa (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

Na batelada simples, transcorre-se o processo após a adição da suspensão celular ao meio de cultivo, sem adição ou retirada do mesmo durante o bioprocesso. Por conta disso, as concentrações de nutrientes tendem a ser reduzidas ao longo do tempo e as de produtos e sub-produtos aumentadas, onde conclui-se que as condições ambientais são alteradas a todo instante. Tal tipo de condução pode desfavorecer tanto o crescimento celular quanto o processo fermentativo ao proporcionar fenômenos de inibição pelo substrato, produto e outros metabólitos (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

Já a condução por batelada alimentada caracteriza-se em um modo de operação na qual um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular são adicionados ao biorreator durante o bioprocesso, de modo intermitentemente ou continuo, sem que ocorra retirada de material durante a operação. A variação do volume do meio reacional após a alimentação é dependente da concentração do

substrato presente no meio de alimentação e da taxa de evaporação do sistema (PEREIRA JR *et al.*, 2008; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Em comparação à batelada simples, a batelada alimentada é vantajosa ao manter a concentração de açúcar residual baixa, como também, pela maior produtividade alcançada devido ao menor tempo de fermentação, justificada por esta forma de condução transpor os efeitos de inibição/repressão pelo substrato em níveis sub-inibitórios ou sub-repressores (PEREIRA JR *et al.*, 2008; BARCELOS, 2012).

Assim como na batelada alimentada, na condução contínua ocorre alimentação de nutriente e de substrato com a diferença de que há também a retirada de produto (meio fermentado), ambos de forma contínua, como o próprio nome sugere. Neste tipo de condução, o bioprocesso ocorre em condições estacionárias que podem ser pré-meditadas para o melhor desempenho do microrganismo, diferentemente da batelada simples onde o mesmo é exposto à variação das condições reacionais. Por conta disso, perante aos demais modos de condução, a forma contínua possibilita a operação do sistema por períodos extensos de tempo o que resulta em um aumento de produtividade (PEREIRA JR *et al.*, 2008; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Diante disso, ainda que o modo de condução mais utilizado seja a batelada simples, de modo que os estudos que envolvem a produção de etanol de terceira geração têm se limitado a esta forma, abranger estudos com outros tipos, aliados a estratégias de aclimatação, podem contribuir para o aumento da produtividade tanto na produção de células quanto na etapa fermentativa. Além disso, a variação do modo de condução possibilitaria avaliar se o mesmo pode influir na tolerância dos agentes biológicos à compostos inibidores formados a partir da hidrólise ácida da biomassa algal, tornando mais amplo este entendimento.

2.16. Considerações gerais

Pode-se observar nos assuntos previamente abordados toda a problemática que envolve o uso de fontes fósseis ainda que a demanda por combustíveis líquidos,

destinada ao setor de transportes, seja crescente ao longo dos anos. Questões estas se resumem principalmente em conflitos políticos, flutuação do preço do barril de petróleo, possibilidade de esgotamento destas fontes e, principalmente, nos impactos ambientais decorrentes de seu uso.

Diante disso, muitos países como o Brasil tem explorado seu potencial em termos de biodiversidade preocupando-se em manter sua matriz energética sustentável a partir de fontes renováveis como as biomassas. A partir do uso das biomassas, iniciativas foram crescentes no que se remete a transferência da rota petroquímica para a bioquímica para produção de combustíveis como o etanol.

Atualmente, esforços têm sido direcionados no sentido de aumentar a produtividade deste biocombustível sem a necessidade do aumento de áreas agriculturáveis. No entanto, as preocupações frente à disponibilidade atual dos recursos naturais não se remetem somente ao espaço para o cultivo destas biomassas, mas também ao consumo superior a 70% dos recursos hídricos disponíveis destinados a irrigação.

Neste âmbito, as crescentes iniciativas para produção de outros compostos por via bioquímica, por ser mais sustentável, como também as projeções de escassez das fontes petrolíferas, fazem com que a utilização das macroalgas, que dispensam a irrigação, possuem taxas de crescimento superiores às terrestres e cujo espaço para cultivo não compete com os destinados aos principais alimentos da dieta alimentar, seja cada vez mais atrativo e, possivelmente, indispensável futuramente.

Dentre as espécies de macroalgas, a *Kappaphycus alavrezzi* tem condições conhecidas e estabelecidas de cultivo, possui alto teor em carboidratos organizados de forma menos complexa quando comparados à estrutura lignocelulósica, já que possui baixo ou ausente teor de lignina. No entanto, um dos principais desafios para a produção do etanol de terceira geração compreende a formação de altas concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) resultante da hidrólise ácida da carragenana, de modo que a destoxificação através do uso de carvão ativo, estratégia mais utilizada nos estudos, além de não ser sustentável impacta economicamente o processo.

Ainda assim, nos estudos, que envolvem a produção de etanol 3G, recém-publicados, pouco se tem focado na avaliação da tolerância das linhagens ao HMF, como também, em estratégias alternativas como a aclimatação celular para prescindir etapas de destoxificação. Além disso, têm sido crescentes estudos que relatam a capacidade de algumas linhagens de consumir compostos inibidores, convertendo-os em compostos com baixa toxicidade para célula.

Diante disso, estudos com diferentes modos de condução de bioprocesso são necessários para este contexto de modo que tem sido relatado que a batelada alimentada não somente proporciona o aumento da produtividade, como também, possibilita a aclimatação, em curto prazo, de linhagens em presença de compostos inibidores.

Paralelas às pesquisas em torno dos desafios consequentes da hidrólise ácida, faz-se necessário o entendimento das condições de extração/solubilização da carragenana que também possibilitem a hidrólise de suas ligações do tipo alfa, de modo a favorecer, futuramente, estudos com hidrólise enzimática, já que ao contrário da hidrólise ácida, suas condições de reação não propiciariam a formação de inibidores como o HMF.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Diante do que foi previamente relatado, tornou-se atrativo, neste estudo, avaliar a viabilidade da produção de células a partir da biomassa algal em batelada simples e alimentada, havendo, também, o intuito de analisar a tolerância da linhagem em estudo (*Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782) a este inibidor frente ao metabolismo oxidativo, já que muito se sabe que as linhagens são severamente inibidas pelo HMF em metabolismo fermentativo somente. Outro fator estimulante foi o fato de alguns estudos relatarem a capacidade de algumas linhagens de levedura de converter este composto a estruturas menos tóxicas. Acredita-se que, se satisfatórios os resultados, constatando esta capacidade na levedura em estudo, a etapa de produção de células também possa funcionar como estratégia de aclimatação celular ao hidrolisado algal contendo HMF. A idéia de produzir células aclimatadas possibilitaria, possivelmente, uma maior produtividade em etanol na etapa fermentativa, ainda que em presença do composto inibidor, devido à maior robustez das células proporcionada por tal estratégia. Tem-se como objetivo, portanto, prescindir de etapas de destoxificação para remoção do HMF, já que este processo eleva o custo do processo e proporciona perdas de hidrolisado. Faz-se necessário também melhor entender a influência exercida pelas condições de hidrólise ácida da carragenana para obtenção de galactose e formação de HMF. Para

isso também é necessário avaliar se incluir a etapa de extração da carragenana, prévia à hidrólise ácida, acarretará na melhoria da eficiência de hidrólise. O intuito de avaliar a inclusão desta etapa prévia de extração justifica-se pela possibilidade das condições necessárias para hidrólise ácida e obtenção de altas concentrações de galactose, como a alta concentração de sólidos, limitarem a extração e disponibilização desta macromolécula. No mais, entender as condições de extração/solubilização da carragenana e de hidrólise ácida de suas ligações do tipo alfa também foi atrativo neste presente trabalho. Espera-se, através disso, possibilitar estudos futuros com hidrólise enzimática das resistentes ligações do tipo beta também presentes na carragenana.

Objetivo Geral:

Produzir células de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 a partir da biomassa algal, avaliando seu desempenho frente a compostos inibidores.

Objetivos Específicos:

- Avaliar métodos de extração da carragenana;
- Avaliar se a etapa de extração da carragenana proporciona uma melhor eficiência de hidrólise ácida, gerando maiores concentrações de galactose e menores de hidroximetilfurfural (HMF) em comparação à hidrólise da alga integral (sem extração da carragenana);
- Analisar a influência dos parâmetros tempo, temperatura, concentração de ácido e concentração de carragenana bruta para hidrólise ácida da carragenana, tendo como variáveis de resposta a obtenção de monômeros de galactose e a formação de hidroximetilfurfural (HMF);
- Avaliar a tolerância desta linhagem ao HMF;
- Avaliar o uso de estratégia de aclimatação da levedura *S. cerevisiae*, em hidrolisado algal, para posterior uso como inóculo da produção de células.

- Utilizar as melhores condições de hidrólise encontradas, com baixas concentrações de HMF, para produção de células de *Saccharomyces cerevisiae* em frascos agitados*;*
- Produzir células de S. cerevisiae em biorreator, comparando duas formas de condução: batelada simples e batelada alimentada).
- Desenvolver um método mais rápido e simples para quantifição de HMF.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

O material experimental, a macroalga *Kappaphycus alvarezii*, foi gentilmente disponibilizado pela empresa Sete Ondas Biomar Cultivo de Algas Ltda (Itaguaí-RJ, Brazil), sendo cultivadas em Itacuruçá e originárias das Filipinas. Para a execução de todos os experimentos, a biomassa algal foi lavada com água para remoção de sal, areia, pequenos animais e materiais residuais. Posteriormente foi seca em uma estufa a 65 °C com circulação forçada de ar. Após secagem, a alga foi cominuída em um moinho de facas de modo a obter partículas de até 5 mm.

Em estudos prévios realizados no LADEBIO por Hargreaves *et al*. (2013) esta biomassa foi caracterizada e constatou-se cerca de 56,81% de carragenana e 7,49% de celulose.

4.2. Extração da carragenana

A metodologia empregada nesta etapa foi adaptada de estudos que visam a melhoria da extração e purificação da carragenana com interesse para a indústria alimentícia (FREILE-PELEGRÍN & ROBLEDO, 2007 e MONTOLALU, *et al.*, 2009).

A extração da carragenana, como proposta por Goh e Lee (2010) para produção de etanol de terceira geração, foi estudada neste trabalho com o objetivo de se avaliar a necessidade de extração da carragenana ou a possibilidade de uso de biomassa algal em estado íntegro, para hidrólise ácida desta biomassa. Como o intuito deste experimento foi solubilizar e extrair a carragenana da biomassa algal as etapas de purificação foram excluídas.

Dois tipos diferentes de soluções extratoras foram comparados em relação ao seu desempenho para extração: água destilada, que caracteriza a extração aquosa, e solução de hidróxido de potássio 1% (m/v), que caracteriza a extração alcalina. As mesmas condições de extração foram utilizadas para as duas soluções extratoras: temperatura, 60°C; tempo de reação, 3 horas; concentração de biomassa algal seca e cominuída, 20g/L. As etapas adotadas neste processo podem ser melhor entendidas na **Figura 4.1**.

A biomassa algal, previamente seca e cominuída, foi submersa nas soluções extratoras, em temperatura ambiente, por duas horas para proporcionar a absorção das soluções extratoras pela biomassa algal, evidenciada através do inchaço dos grânulos. Posteriormente, os frascos contendo a mistura foram incubados em banho a 60°C, por 3 h e agitados a 200 rpm com auxílio de um homogeneizador.

Ao final do tempo de incubação o material foi peneirado e para evitar perdas, os grânulos inchados por conterem carragenana solubilizada foram macerados. Para precipitação da carragenana solubilizada adicionou-se dois volumes de etanol (500 mL) em cada ensaio deixados em reação por 12 horas.

Em seguida, removeu-se o etanol da carragenana bruta por lavagem com água destilada para posterior secagem do conteúdo precipitado a 65 °C com

circulação de ar forçada. Após seco, o material composto principalmente pela carragenana extraída (bruta) foi cominuído.

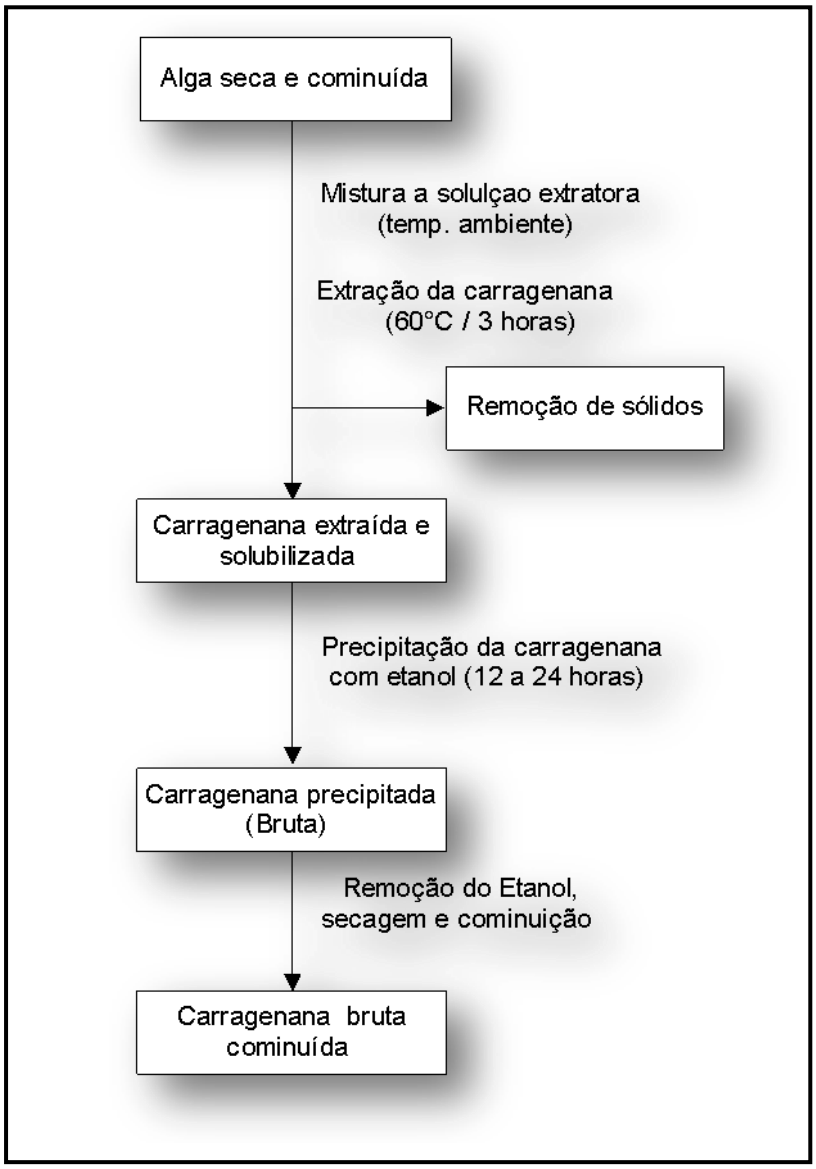


Figura 4.1 – Etapas para extração da carragenana da biomassa algal.

A escolha da solução de extração a ser adotada para os experimentos posteriores de hidrólise ácida deste material foi baseada na comparação da massa da carragenana bruta precipitada obtida nos dois ensaios. Na melhor condição encontrada, fez-se duas extrações em volume maior (2L) para reunir material suficiente para a continuação do trabalho. A carragenana bruta precipitada resultante

destas duas extrações foi reunida e utilizada para os ensaios do planejamento experimental para hidrolise ácida.

4.3. Planejamento experimental Fatorial 2^4 completo para hidrólise ácida da carragenana bruta

Para este planejamento, foi utilizado o ácido sulfúrico diluído como catalisador químico, onde os parâmetros e as variáveis de resposta analisadas podem ser visualizados na **Tabela 4.2**. Visando obter uma análise com critérios estatísticos da influência destes parâmetros para a obtenção de galactose e mínima formação de hidroximetilfurfural (HMF) resultantes da hidrólise, optou-se pela realização de um planejamento experimental fatorial.

Tabela 4.1 – Parâmetros e variáveis de resposta do planejamento experimental.

Parâmetros	Variáveis de resposta
Temperatura/Pressão de reação Tempo de reação Concentração de carragenana bruta Concentração de H_2SO_4	Galactose (g/L) Eficiência de hidrólise (%) Hidroximetilfurfural (HMF) (g/L)

Normalmente, este tipo de planejamento é realizado em dois níveis, codificados como superior (+1) e inferior (-1), onde, para *n* níveis avaliados em *k* parâmetros, o planejamento torna-se um fatorial n^k, sendo o número de ensaios necessários correspondente ao resultado desse fatorial (HELENO *et al.*, 2010).

Neste caso, foi feito um planejamento fatorial completo, com 4 parâmetros em dois níveis, sendo executados 3 experimentos do ponto central, totalizando portando 19 experimentos. Optou-se pela inclusão dos pontos centrais para possibilitar o cálculo do erro experimental e a tendência de linearidade. Os valores reais e

codificados que irão compor a matriz deste planejamento podem ser visualizados na **Tabela 4.3**. Tanto para a montagem da matriz de experimentos quanto para a análise estatística dos resultados os *softwares* STATISTICA 6.0 (STATSOFT Inc., 2002) e Design-expert® 6.0.6 (Stat-ease) foram utilizados.

Tabela 4.2 – Valores codificados e reais para os parâmetros do planejamento experimental.

Valores Codificados	Tempo (minutos)	Carragenana bruta (g/L)	H_2SO_4 (%)	Temp. - Pressão (°C - kg/cm²)
-1 (Mínimo)	20	20	0,2	100 - 0
0 (Ponto central)	40	60	0,5	110 - 0,5
+1 (Máximo)	60	100	0,8	121 - 1

O modo com que os ensaios foram conduzidos encontra-se resumido na **Figura 4.2**. Todos os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 100 mL com volume de trabalho de 30 mL. Inicialmente, misturou-se a carragenana bruta cominuída à água destilada para ressolubilizar em uma temperatura de 60°C por 30 minutos. Após a adição do ácido sulfúrico, os ensaios foram conduzidos à autoclave para proporcionar as condições experimentais mencionadas previamente na **Tabela 4.3**.

Após hidrólise, foi feita a remoção de sólidos de cada ensaio por centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos e a correção do pH com hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) para valores entre 5,0 e 6,0. Os hidrolisados (fração líquida) foram congelados mantendo a integridade das suas condições para as posteriores análises quantitativas de açúcares e HMF por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

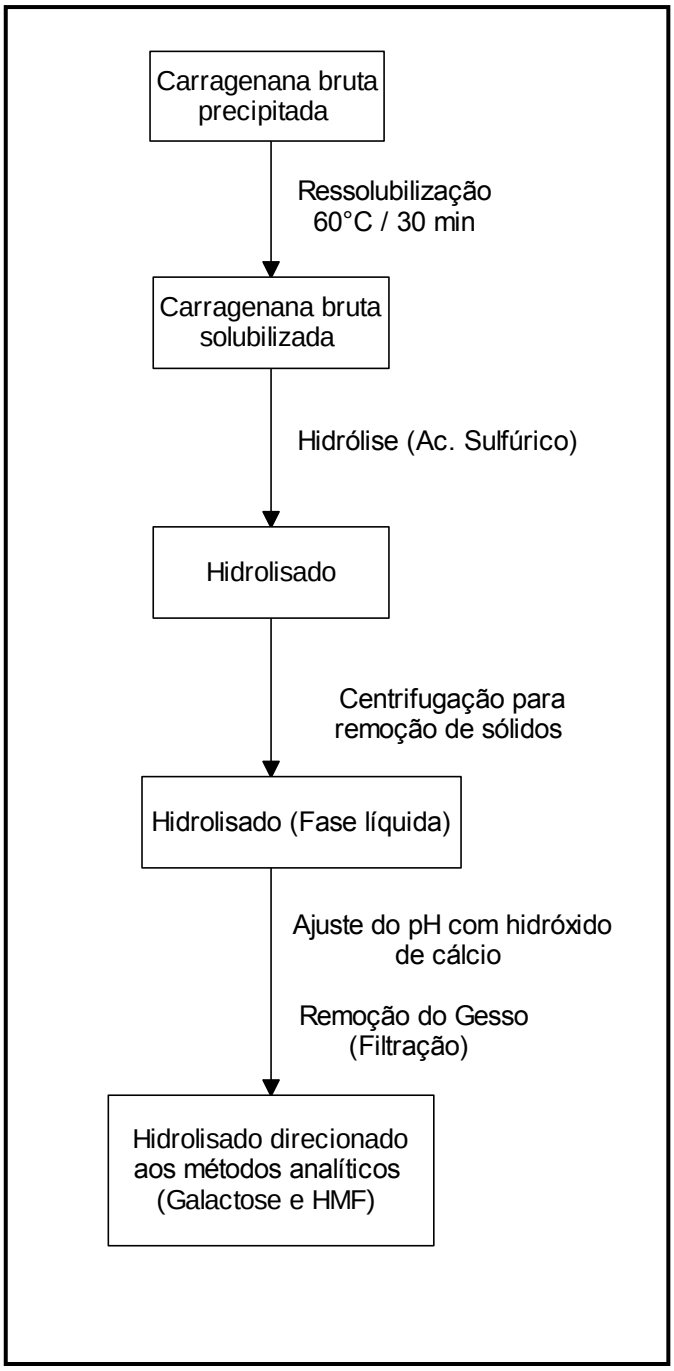


Figura 4.2 – Etapas adotadas para cada ensaio do planejamento experimental.

4.4. Manutenção do microrganismo e padronização do inóculo

Todos os ensaios foram realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782. A cultura estoque foi conservada em Agar Sabouraud cuja composição (em g/L) corresponde a galactose, 20; peptona, 10; extrato de levedura, 5 e Agar, 20. A mesma foi incubada a 30°C, durante 72 h, para posterior estoque a 5°C.

Para o inóculo de cada experimento, a partir das colônias obtidas em placas de Petri, foi feita uma suspensão de células concentrada em solução salina estéril (5 mL). Obteve-se o valor da concentração de células na suspensão (em g/L) a partir de uma curva de calibração obtida de acordo com o item 4.8.1.

4.5. Produção de células de *Saccharomyces cerevisiae* em frascos agitados: avaliação da tolerância ao HMF

4.5.1. Pré-tratamento da biomassa algal (hidrólise da carragenana)

Após evidenciar os parâmetros influentes para obtenção de galactose com menores concentrações de HMF a partir da hidrólise da carragenana bruta, suprimiu-se a fase de extração e precipitação deste polissacarídeo como uma forma de reduzir etapas do processo. Dessa forma, foram avaliadas as condições determinadas na hidrólise da biomassa algal bruta. Para a escolha da melhor condição a ser adotada para a obtenção do hidrolisado a ser utilizado nos ensaios de crescimento em frascos, variou-se a relação sólido líquido e a concentração de ácido sulfúrico, que foram parâmetros significativos para hidrólise, e manteve-se constante a temperatura e o tempo de reação conforme apresentado na **Tabela 4.4**. Todos os ensaios foram realizados em um volume útil de 100 mL.

Tabela 4.3 – Condições dos ensaios do pré-tratamento da biomassa algal e hidrólise da carragenana.

Relação S:L (g:mL)	H_2SO_4 (%)
1:10 (93,75 g/L)	0,5 0,8 1
1:5 (176,47 g/L)	0,5 0,8 1

Nestas condições, a biomassa algal seca foi misturada à solução de ácido sulfúrico sendo posteriormente mantida em temperatura ambiente até que se observasse o inchaço dos grânulos (em torno de uma hora). Posteriormente, os frascos foram autoclavados à temperatura de 121°C por uma hora. Após a hidrólise, removeu-se os sólidos residuais por filtração, utilizando-se um filtro prensa, sendo feita posteriormente a correção do pH da fase líquida (pH 5) com a adição de hidróxido de cálcio. Em seguida, após a remoção do sulfato de cálcio por filtração, foi feita a amostragem para determinações analíticas (concentração de galactose e de HMF) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na condição em que resultou a melhor eficiência de hidrólise preparou-se 1 litro de hidrolisado para os ensaios de crescimento em frascos agitados.

4.5.2. Avaliação da tolerância da levedura ao HMF

Neste experimento, avaliou-se o crescimento celular frente à inoculação com células aclimatadas ou não aclimatadas ao HMF, como também a importância da aclimatação para sua tolerância ao HMF presente no hidrolisado algal.

Todos os ensaios foram realizados em frascos cônicos (500 mL) com volume útil de 100 mL. O hidrolisado algal, que apresentava 20,05 ±0,008 g/L de galactose e 8,17 g/L de HMF, foi suplementado com meio de crescimento para leveduras proposto por Pereira Jr. (1991) contendo (em g/L): extrato de levedura, 2; KHPO4, 1,1; uréia, 1,25 e 40 mL/L de uma solução composta por minerais cuja composição está apresentada na **Tabela 4.5**. O pH do meio foi ajustado para em torno de 4,5, sendo posteriormente esterilizados a 0,5 atm por 20 min. Após o inóculo, foram mantidos à temperatura de 30°C e agitados a 200 rpm.

Tabela 4.4 – Composição da solução de minerais proposta por Pereira Jr. (1991).

Composto	Concentração (g/L)	Composto	Concentração (g/L)
$MgSO_4.7H2O$	12,5	$CuSO_4.5H2O$	0,025
$CaCl_2.2H2O$	1,25	$CoCl_2.6H2O$	0,025
Ácido Cítrico	12,5	$NaMoO_4.2H2O$	0,035
$FeSO_4.7H2O$	0,9	H_3BO_3	0,050
$MnSO_4$	0,19	KI	0,009
$ZnSO_4.7H2O$	0,30	$Al_2(SO_4)_3$	0,0125

Nos ensaios com células aclimatadas, para a etapa de aclimatação, o hidrolisado foi diluído (fator de diluição 2) e inoculou-se 0,06 g/L de células *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782. Após 48 horas de incubação, 10% (v/v) foram utilizados como inóculo para a etapa de crescimento, onde para esta, não se diluiu o hidrolisado. No ensaio com células não aclimatadas o meio (hidrolisado algal enriquecido com nutrientes, como já descrito) foi diretamente inoculado com a suspensão de células. A concentração celular inicial foi igualada para que os experimentos, com células aclimatadas e não aclimatadas, iniciassem com o mesmo tamanho de inóculo. Para todos estes ensaios foram feitas replicatas e todo o processo encontra-se exemplificado na **Figura 4.3**.

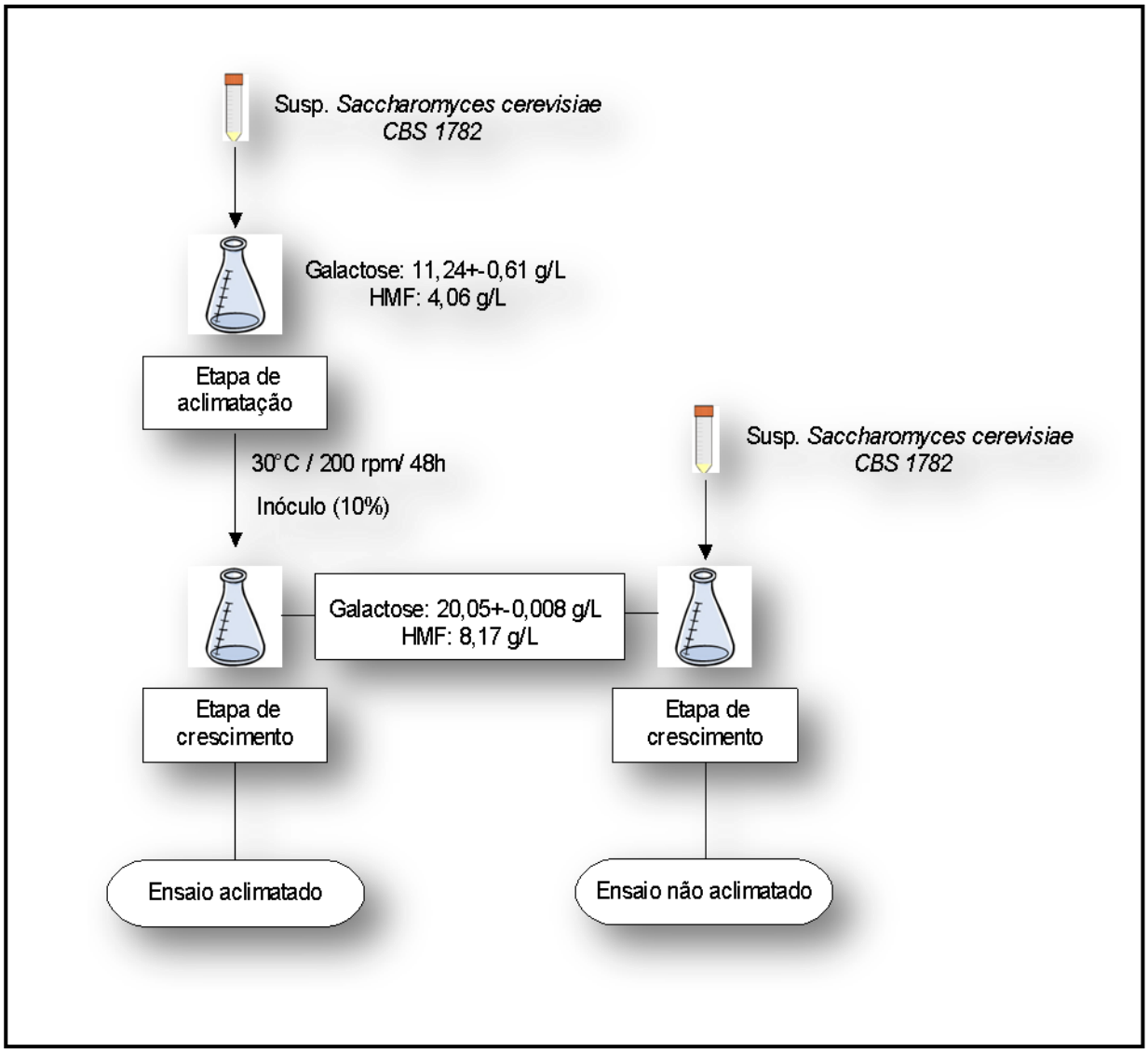


Figura 4.3 – Esquema do ensaio para avaliação do crescimento celular e de tolerância ao HMF frente à inoculação com células aclimatadas ou não aclimatadas.

Foram coletadas amostras assepticamente em intervalos regulares de 4 horas para quantificação da biomassa por espectrofotometria, galactose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e HMF por espectrofotometria de UV.

Ao final do experimento, foram retiradas alíquotas dos ensaios com células aclimatadas e não aclimatadas a fim de serem inoculadas em placas de Petri contendo o hidrolisado suplementado (utilizado na etapa de crescimento) com 20%

de Agar. Após o inóculo, as placas foram mantidas na temperatura de 30°C por 4 dias.

4.6. Produção de células de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 em biorreator instrumentado

Após conhecimento das condições de crescimento e constatação da tolerância ao HMF e possibilidade de aclimatação a este composto tóxico, realizou-se produção de células em biorreator. Os bioprocessos foram conduzidos tanto por batelada simples, como também por batelada alimentada. Como variáveis de resposta, foram avaliados a produção de célula (X), consumo de substrato (S), rendimento de substrato em células ($Y_{X/S}$), produtividade volumétrica em células (Q_X), taxa específica de crescimento (μ_X), taxa de conversão de HMF (QHMF) e conversão específica de HMF (qHMF).

4.6.1. Obtenção do hidrolisado algal

O hidrolisado algal utilizado como meio de produção nos biorreatores foi obtido de modo semelhante aos ensaios em frascos agitados (**4.5.1**). No entanto, para obtenção do hidrolisado algal, com elevada concentração de açúcares a ser utilizado para as alimentações do reator conduzido por batelada alimentada, foi utilizada uma alta relação sólido:líquido (1:2,5), conforme indicado pelos resultados de planejamentos experimentais e por ensaios preliminares. Baseou-se também nas condições de pré-tratamento, reportadas por Hargreaves *et al.* (2013), necessárias para se obter altas concentrações de açúcares. Para isso, utilizou-se uma concentração de 320 g/L de biomassa algal seca em solução de ácido sulfúrico 0,8%, sendo realizado em volume final de 1,75 L.

Após a exposição à temperatura de 121°C por uma hora, separou-se a fração líquida da sólida em um reator (Patente PI 0505299-8A), projetado para esta finalidade, através da aplicação da pressão hidráulica de 10 kgf/cm^2.

Após a prensagem, a massa úmida da fração sólida resultou em 663 g. Visando o aproveitamento da galactose ainda presente nesta fração, lavou-se e homogeneizou-se a mesma com 600 mL de água destilada, para posterior prensagem, sendo também aproveitada a fração líquida (450 mL) resultante deste processo para produção de células proporcionando, portanto, um destino biotecnológico a esta galactose residual adsorvida no resíduo sólido da prensagem.

4.6.2. Condições utilizadas para produção de células de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 em batelada simples e alimentada

A produção de células conduzida por Batelada Simples foi realizada em biorreator Biostat B, com volume útil de 1,2 L, com concentrações de galactose e HMF semelhantes às utilizadas no processo anterior (20 g/L e 8 g/L, respectivamente). O hidrolisado foi suplementado com solução de sais, conforme já descrito no ítem 4.5.2, e esterilizado a 121°C/30 min.

O bioprocesso para produção de células conduzido por Batelada Alimentada foi realizado em biorreator New Brunswick BioFlo 310®, com volume útil de 400 mL. Para a primeira batelada, utilizou-se o lavado (resultante do pré tratamento da biomassa algal) diluído 2x, apresentando, portanto 21,14 g/L de galactose e 7,73 g/L de HMF. O meio foi suplementado e esterilizado a 121°C/30 min. Para as alimentações, realizadas por pulsos, utilizou-se em mL 135; 180 e 240 do hidrolizado algal concentrado (87,4 g/L de galactose e 28,68 g/L de HMF), respectivamente nas três primeiras alimentações, de forma obter-se concentrações reacionais que tangem 20 g/L de galactose e 8 g/L de HMF. Os meios foram suplementados com 0,25 g/L de ureia.

Os processos foram controlados automaticamente a uma temperatura de 30ºC; pH 4,5, através da adição de NaOH (2M) ou HCL (2M) e agitação que proporcionasse uma DO_2 de 40 % (oxigênio dissolvido) **(Figura 4.4)**. A cada 4 horas foram feitas amostragens para quantificar a biomassa celular (por espectrofotometria), a concentração de galactose, HMF e de etanol por CLAE.

O inóculo utilizado em ambos os processos foi obtido a partir da etapa de aclimatação (10% v/v) realizada seguindo as mesmas condições dos ensaios em frascos agitados.

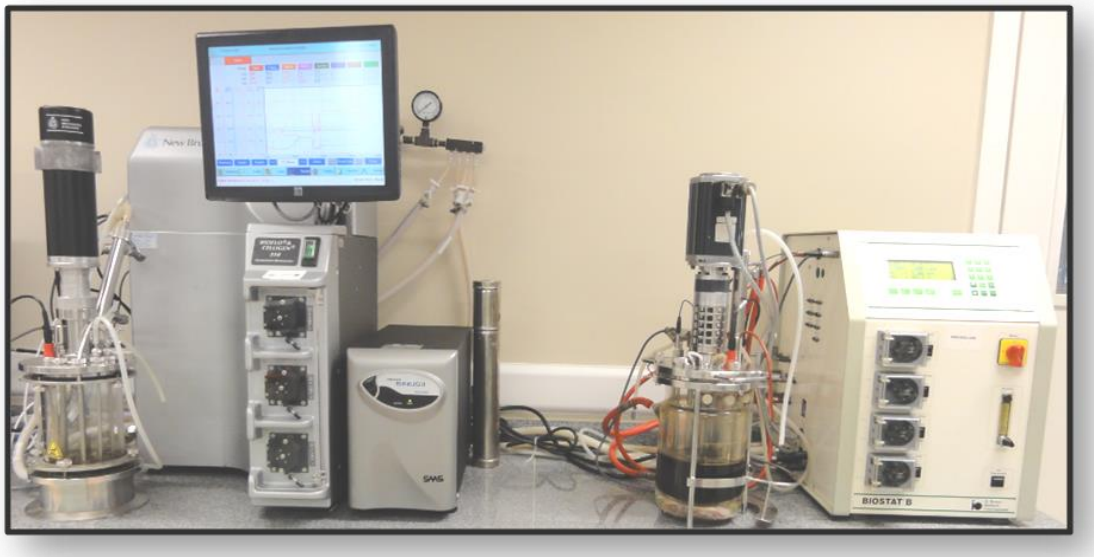


Figura 4.4 – Biorreatores instrumentados utilizados nos bioprocessos: à esquerda New Brunswick BioFlo 310 e à direita Biostat B.

4.7. Amostragem

Nos experimentos de crescimento celular em frascos agitados e de produção de células em biorreator coletou-se assepticamente amostras de 2 mL de todos os ensaios em intervalos regulares de 4 h. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 10°C, possibilitando a coleta do sobrenadante para determinações analíticas (glicose, galactose, etanol e HMF).

Após centrifugação, foi feita a lavagem do precipitado com água destilada seguida de nova centrifugação, nas condições previamente descritas, tendo como intuito a remoção de compostos solúveis do meio que interferem na quantificação da biomassa. Por conta disso, foram feitas 3 lavagens para posterior diluição das amostras e quantificação da biomassa celular por espectrofotometria.

4.8. Métodos analíticos

4.8.1. Quantificação da biomassa celular

Para determinação da concentração celular da linhagem em estudo elaborou-se uma curva correlacionando-se a absorvância com a massa seca. Para este procedimento, foi feita uma densa suspensão de células a partir da qual foram feitas sucessivas diluições em água destilada, lidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 600 nm contra água destilada como branco, visando obter os valores de absorvância correspondentes a cada concentração de células.

Para determinação da massa seca, foram retiradas alíquotas desta mesma suspensão para Eppendorfs (previamente secos, pesados e mantidos em dessecador). As mesmas foram centrifugadas sendo seu sobrenadante descartado e o precipitado (células) lavado com água destilada e centrifugada novamente. Esta operação de lavagem e centrifugação foi repetida três vezes para eliminação de sólidos solúveis como açúcares e sais. Após a secagem a 65 °C com circulação de ar forçada, até atingirem massa constante indicando a remoção da umidade. A curva de calibração resultante deste procedimento pode ser visualizada na **Figura 4.5**.

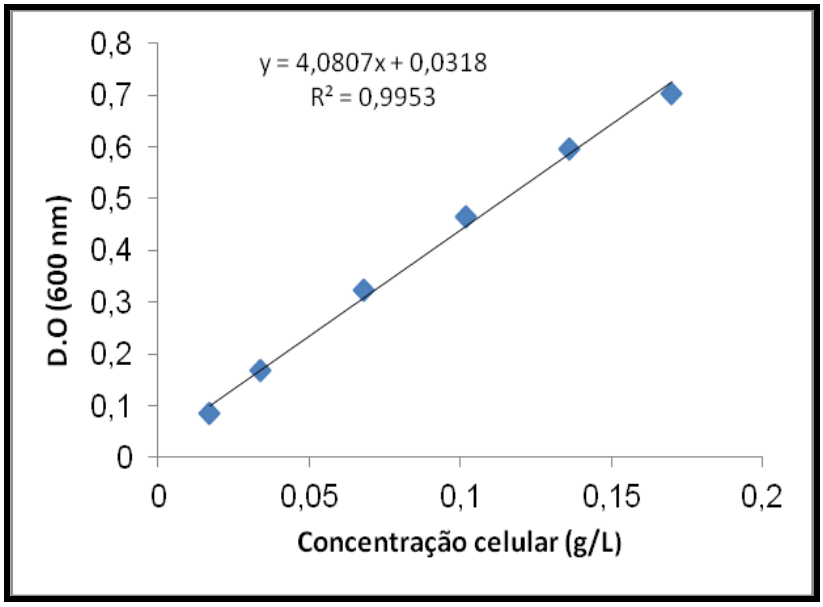


Figura 4.5 – Curva de calibração para quantificação de células.

4.8.2. Quantificação de galactose, HMF e etanol por CLAE

Para quantificação de galactose e etanol analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), as amostras, após diluídas, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos para posterior filtração em membrana 0,22 µm. A quantificação foi então realizada em detector Waters 2414 (RID) (com temperatura de 40°C), utilizando a coluna aminex HPX-87P (Biorad®) (com temperatura de 80°C) e água ultra pura (Milli-Q) como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL/minuto.

Para quantificação de HMF por CLAE (Shimadzu) as amostras foram diluídas em metanol:acetonitrila (30:70) sendo posteriormente centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos. Realizou-se a análise em detector UV (280 nm), utilizando a coluna C18 150 x 4,6 mm e metanol:acetonitrila (30:70) como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL/minuto.

4.8.3. Quantificação de HMF por espectrofotometria de UV

Este estudo teve como objetivo desenvolver um método analítico alternativo à analise por CLAE a fim de se obter uma resposta mais rápida e menos dispendiosa. A análise de HMF por espectrofotometria de UV também foi proposta por ZHANG *et al.* (2010).

Para o desenvolvimento do método, foi feita uma varredura de espectro (Shimadzu UV-1800) de 200 a 400 nm, com registro de leitura a cada 2nm, utilizando soluções padrão com concentrações variadas de HMF (em mg/L: 2,5; 3,125; 4,17; 6,25; 12,5 e 25) e amostras (com concentrações de HMF analisadas por CLAE) visando obter o comprimento de onda ideal para análise da absorvância deste composto (**Figura 4.6**).

Posteriormente, uma curva de calibração foi estabelecida, relacionando-se a absorvância de luz UV a 280 nm com a concentração de HMF em mg/L. Para serem analisadas, as amostras foram diluídas em metanol:acetonitrila (30:70), sendo centrifugadas posteriormente a 12.000 rpm por 20 minutos. Utilizou-se a solução

metanol:acetonitrila como branco durante a leitura. Para garantir que o pico apresentado em 280 nm não teria interferencia de outros compostos (condições primordial para a validade do método por espectrofotometria), contou-se com o apoio do CLAE para verificar esta condição.

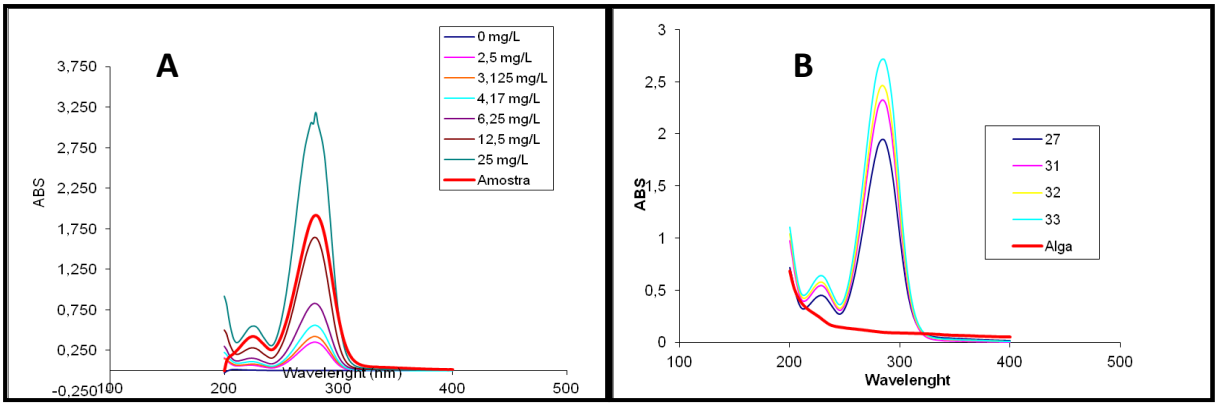


Figura 4.6 – Varredura de espectro para o desenvolvimento do método para análise de HMF por espectrofotometria de UV. (A) Varredura de espectro das soluções padrão de HMF e análise de hidrolisado algal contendo HMF (identificado por CLAE); (B) Varredura de soluções padrão e de hidrolisado algal sem HMF.

4.9. Análise dos resultados experimentais

Para construção dos gráficos foram utilizados os programas Microsoft Excel e Origin Pro70. Encontram-se a seguir os principais parâmetros utilizados para analisar os resultados experimentais.

(a) A eficiência de hidrólise foi estimada de acordo com Hargreaves *et al.* (2013), expressa na **Equação (1)**. Neste artigo, estimou-se a concentração de galactose teórica de acordo com os estudos de Lechat *et al.* (1997), que sugerem que haja 320 gramas de galactose para cada quilo de *K. alvarezii* seca.

Equação (1)

$$Eficiência\ de\ hidrólise\ (\%) = \frac{[Gal_{Obtida}]}{[Gal_{Teórica}]} \times 100$$

(b) Taxa específica de crescimento celular (μ_X):

$$\mu_X(h^{-1}) = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}$$ **Equação (2)**

(c) Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$):

$$Y_{x/s}(g.g^{-1}) = \frac{X - Xo}{So - S}$$ **Equação (3)**

(d) Produtividade volumétrica em células (Qx):

$$Q_X(g.L^{-1}.h^{-1}) = \frac{X - Xo}{t}$$ **Equação (4)**

Para interpretar os dados experimentais referentes ao consumo de HMF, assim como nos estudos de Petersson *et al*. (2006) e Almeida *et al*. (2008), calculou-se:

(e) Taxa de conversão de HMF (Q_{HMF}).

$$Q_{HMF}(g.L^{-1}.h^{-1}) = \frac{HMF_0 - HMF}{t}$$ **Equação (5)**

(f) Taxa de conversão específica de HMF (q_{HMF})

$$q_{HMF}(g.g^{-1}.h^{-1}) = -\frac{1}{X}\cdot\left(\frac{d_{HMF}}{dt}\right)$$ **Equação (6)**

Onde:

S: concentração final de galactose (g.L-1);
S_0: concentração inicial de galactose (g.L-1);
t: tempo (h);
X: concentração final de células (g.L-1);
X_0: concentração inicial de células (g.L-1);
HMF: concentração de final de HMF (g.L-1);
HMF_0: concentração inicial de HMF (g.L-1).

4.10. Pré-tratamento da biomassa algal para obtenção de oligossacarídeos com baixa formação de HMF

Nos resultados obtidos no planejamento experimental para hidrólise ácida da carragenana bruta, encontrou-se uma condição em que houve hidrólise das ligações mais lábeis (tipo alfa) resultando na liberação de dissacarídeos, além de resultar em uma concentração de HMF quase nula. Desta forma, 200 g/L de biomassa algal cominuída, foi pré-tratada, em uma solução ácida com 0,25% de ácido sulfúrico, temperatura de 100 °C (vapor fluente em autoclave) por 60 minutos.

Visando confirmar se o produto formado com esta hidrólise referia-se a um açúcar (conforme identificado por um pico, com tempo de retenção de 7,6 min, no cromatograma por CLAE) submeteu-se este hidrolisado líquido, com possíveis dímeros de galactose, a uma hidrólise ácida mais severa (1% de H_2SO_4 por 30 minutos de reação a 121 °C) de modo a constatar a presença de galactose resultantes da segunda hidrólise.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Extração da carragenana

O primeiro parâmetro utilizado para avaliar o resultado da extração da carragenana perante o uso das duas soluções extratoras comparadas neste experimento foi a viscosidade aparente. Segundo Freile-Pelegrín & Robledo (2007) e Montolalu *et al*. (2008), este é um dos aspectos mais característicos da carragenana quando extraída da biomassa algal em condições ideais que proporcionam a manutenção de sua característica nativa. Deste modo, quando feita a extração com água destilada como solução extratora, constatou-se após o período de incubação de 3 horas a perda da rigidez dos grânulos e a alta viscosidade na fração líquida.

No entanto, aspectos contrários foram observados quando se utilizou a solução de KOH, o que resultou na manutenção da rigidez dos grânulos e na fluidez da fração líquida. Tal característica, que indica o sucesso da extração, foi confirmada após a etapa de precipitação da carragenana adotada na fração líquida resultante deste processo.

Na extração aquosa, recuperou-se a quantidade de 4,16 g de carragenana bruta das 5 g de biomassa algal utilizadas para este ensaio; já na extração alcalina obteve-se 1,15 g, havendo uma diferença de 72,35% em massa seca entre ambas as soluções empregadas para extração. Na **Figura 5.1**, encontram-se ilustrados os aspectos observados e já mencionados.

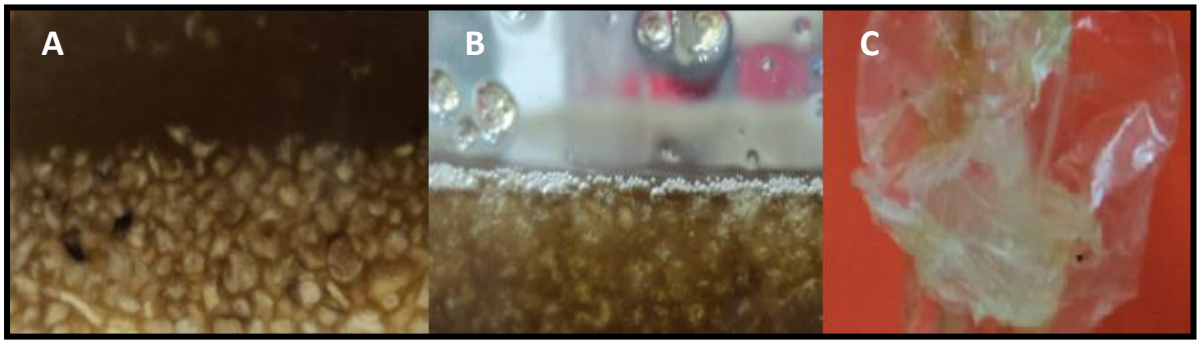


Figura 5.1 – Etapas para extração da carragenana da biomassa algal. **A**: Aspecto dos grânulos antes da extração; **B**: Aspecto viscoso evidenciado após a extração aquosa; **C**: Aspecto da carragenana bruta precipitada.

Tais resultados corroboram com os reportados por Freile-Pelegrín & Robledo (2007); Hayashi *et al*. (2007) e Montolalu *et al*. (2008), que observaram maiores rendimentos em carragenana através da extração aquosa. Por outro lado, Freile-Pelegrín & Robledo (2007) e Wiratni (2011), ainda que tenham obtido melhores rendimentos com a extração aquosa, alcançaram rendimentos na extração alcalina mais favoráveis que os observados neste trabalho. Tal insucesso da extração alcalina no presente estudo pode ser justificado pelo uso de condições mais amenas já que nos demais, a extração foi realizada em temperaturas mais elevadas (85°C) avaliando-se diferentes concentrações de KOH, sugerindo que a eficiência de extração está associada ao uso de condições mais severas.

Com este trabalho objetivou-se simplificar a metodologia de extração da carragenana buscando condições mais econômica e brandas, uma vez que trata-se de um processo para produção de etanol 3G, um produto de baixo valor agregado.

Sendo assim, diante da comparação entre as duas soluções extratoras (água destilada e KOH 1%), a metodologia de extração aquosa, além de ter proporcionado uma maior recuperação de carragenana bruta, demonstrou-se mais atrativa, sendo a mesma utilizada para os experimentos futuros .

5.2. Planejamento experimental Fatorial 2^4 completo para hidrólise ácida da carragenana bruta

Na **Tabela 5.1** é possível analisar a matriz do planejamento experimental fatorial 2^4 para hidrólise ácida da carragenana bruta e os resultados experimentais dos ensaios. Perante a análise dos dados, observa-se que as maiores concentrações de galactose, assim como a maior eficiência de hidrólise, foram obtidas em condições experimentais que também proporcionaram a maior formação de hidroximetilfurfural (HMF).

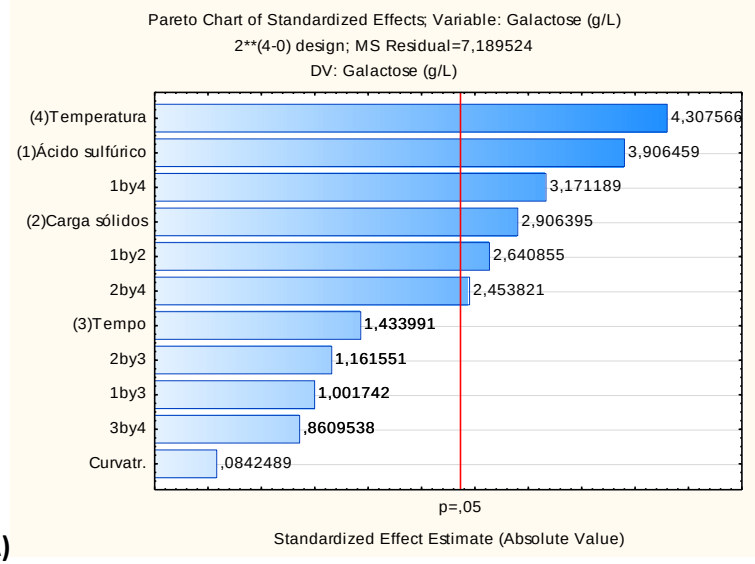
A maior eficiência de hidrólise alcançada com este planejamento (76,39%) foi resultante do ensaio 16, realizado com todos os parâmetros no nível +1 (temperatura, 120°C; tempo, 60 minutos; ácido sulfúrico, 0,8%; carragenana bruta, 100 g/L), onde as condições deste ensaio também proporcionaram a maior obtenção de galactose (22,92 g/L) e formação de HMF (9,09 g/L) deste planejamento. Esta avaliação sugere que os parâmetros analisados, em sua maioria, exerceram influência positiva para as três varáveis de resposta, ou seja, o aumento de cada parâmetro, do nível -1 para o +1 resultou em aumento das variáveis de resposta.

Tabela 5.1 – Matriz do planejamento experimental Fatorial 2^4 completo para hidrólise ácida da carragenana bruta.

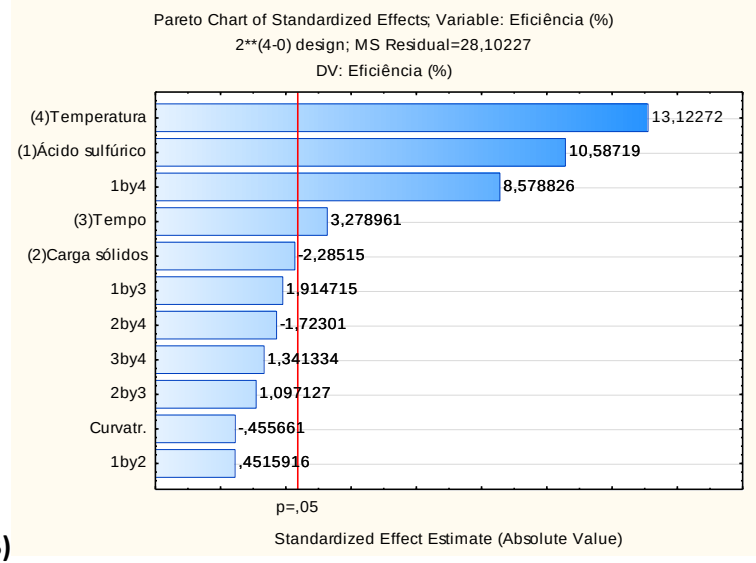
Ensaio	Ácido sulfúrico (%)	Carga de sólidos (g/L)	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	Galactose (g/L)	HMF (g/L)	Eficiência (%)
1	0,2	20	20	100	0,04	0,99	0,55
2	0,8	20	20	100	0,12	0,12	1,82
3	0,2	100	20	100	0,00	0,56	0,00
4	0,8	100	20	100	0,65	1,00	2,17
5	0,2	20	60	100	0,20	1,22	3,18
6	0,8	20	60	100	0,77	0,52	12,24
7	0,2	100	60	100	0,13	1,33	0,43
8	0,8	100	60	100	2,77	3,81	9,23
9	0,2	20	20	120	1,05	0,51	16,56
10	0,8	20	20	120	4,17	0,90	65,99
11	0,2	100	20	120	1,17	3,22	3,91
12	0,8	100	20	120	12,90	7,12	42,99
13	0,2	20	60	120	1,42	0,90	22,47
14	0,8	20	60	120	4,43	1,47	70,17
15	0,2	100	60	120	2,82	3,81	9,41
16	0,8	100	60	120	22,92	9,09	76,39
17 (C)	0,5	60	40	110	3,64	2,28	19,72
18 (C)	0,5	60	40	110	3,62	2,87	19,60
19 (C)	0,5	60	40	110	3,58	2,32	19,41

Onde: (C) Ponto Central. Valores codificados: ácido sulfúrico (0,2%: -1; 0,8%: 1); carga de sólidos (20 g/L: -1; 100 g/L: 1); tempo (20 minutos: -1; 60 minutos: 1); temperatura (100°C: - 1; 120°C: 1).

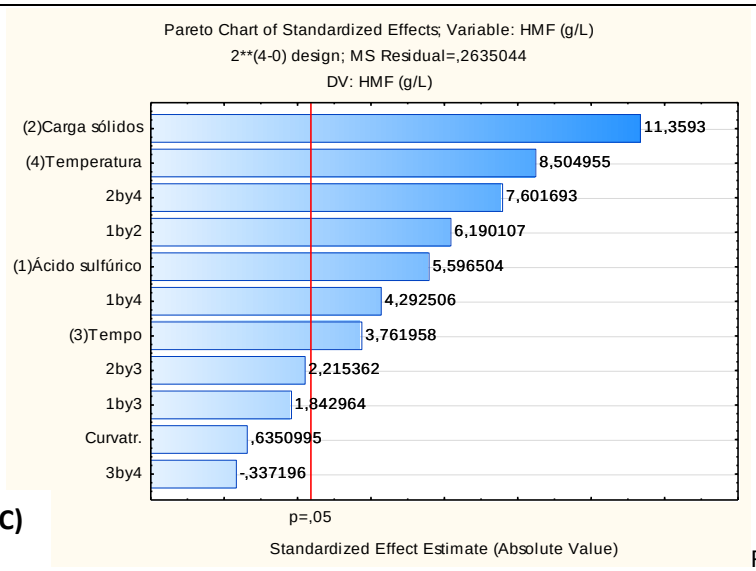
Deste modo, avaliou-se a significância estatística das influências exercidas por cada parâmetro, ilustradas nos diagramas de Pareto, gerados pelo *software* STATISTICA 6.0 (**Figura 5.2**). Nestes diagramas, pode-se observar que a temperatura exerceu o maior efeito para eficiência de hidrólise e, consequentemente, para obtenção de galactose. Por conta disso, nos ensaios realizados a 100°C (nível -1), este açúcar foi obtido em baixas concentrações (**Tabela 5.1**), sugerindo que temperaturas superiores a 100°C são necessárias para hidrolisar a carragenana à galactose.



(A) R^2=0,90964; Adj:0,76766



(B) R^2=0,98209; Adj:0,95395



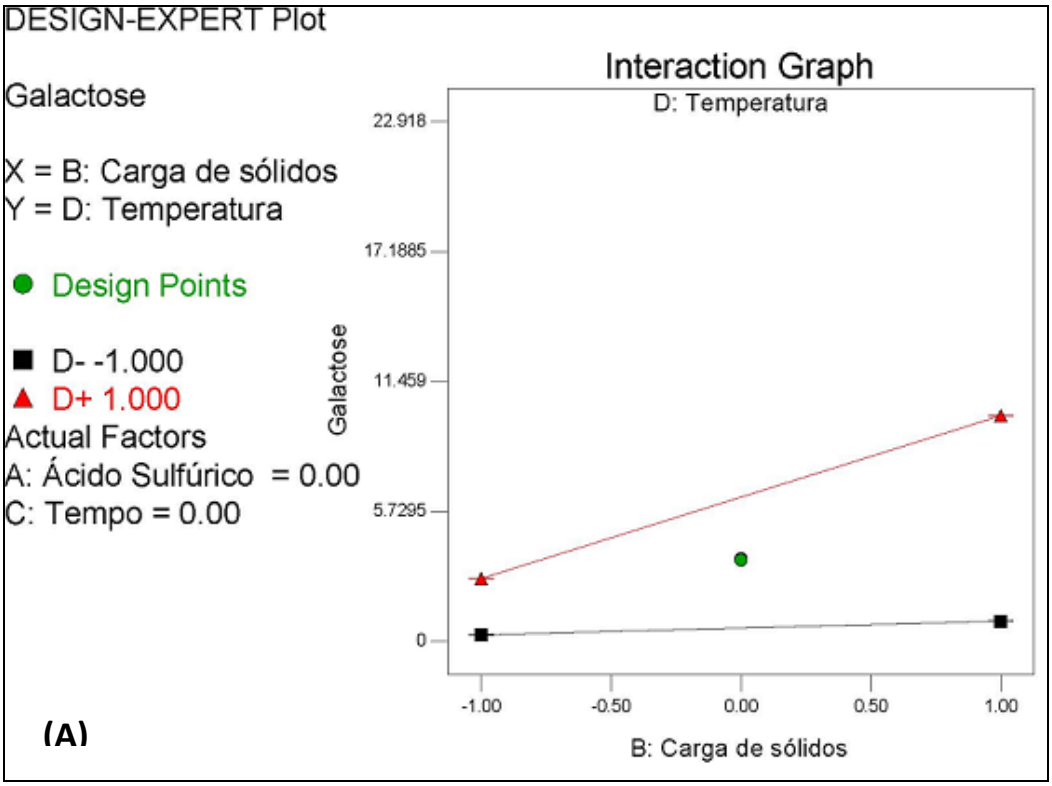
(C) R^2=0,98144; Adj:0,95228

Figura 5.2 – Diagramas de Pareto. (A) Galactose (B) Eficiência de hidrólise (C) HMF.

Ainda que temperaturas elevadas sejam favoráveis, o nível máximo de 120°C, utilizado para este planejamento, foi estabelecido baseando-se nos estudos de Menita, Hong & Jeong (2012), Menita, Kang *et al.* (2012) e Tan, Lam & Lee (2013), que efetuaram a hidrólise ácida em carragenana de *Kappaphycus alvarezii* a 130°C por 15 minutos. Nestes estudos, foi constatada a formação de HMF e sua degradação à concentrações elevadas de ácido levulínico, um composto que exerce toxicidade ainda maior aos microrganismos quando comparado ao HMF, justificada também por esta temperatura de reação.

Além disso, as concentrações de galactose resultantes da hidrólise ácida nestes estudos a 130°C inferem que não há uma diferença significativa em comparação às obtidas a 120°C, onde no primeiro estudo citado, realizado em condições similares às que resultaram na maior concentração alcançada com este planejamento, obteve-se 23,9±2,83 g/L. Diante disso, como constatado por Hargreaves *et al.* (2013), estes resultados corroboram que a temperatura de 120°C é a mais adequada para hidrólise, sugerida também por Tan, Lam & Lee (2013) mediante ensaios de comparação de ambas as temperaturas em períodos similares de reação.

Os efeitos da interação dos parâmetros temperatura e concentração de ácido sulfúrico com a concentração de carragenana bruta podem ser visualizados na **Figura 5.3**, que contém os gráficos de interação, gerados pelo *software* Design-expert® 6.0.6 (Stat-ease). Nestes gráficos, os níveis dos demais parâmetros foram fixados em pontos centrais. Em **A**, pode-se observar que o aumento da temperatura de reação de 100 para 120°C (níveis -1 para +1), foi menos significativo para obtenção de galactose nos ensaios com menor carga de sólidos (nível -1), assim como em **B**, em que se variou a concentração de ácido sulfúrico de 0,2% para 0,8%, sugerindo que para ensaios com maior carga de sólidos são necessárias condições mais severas, já que nestes, a variação da temperatura de reação e da concentração de ácido sulfúrico proporcionou uma maior obtenção de galactose.



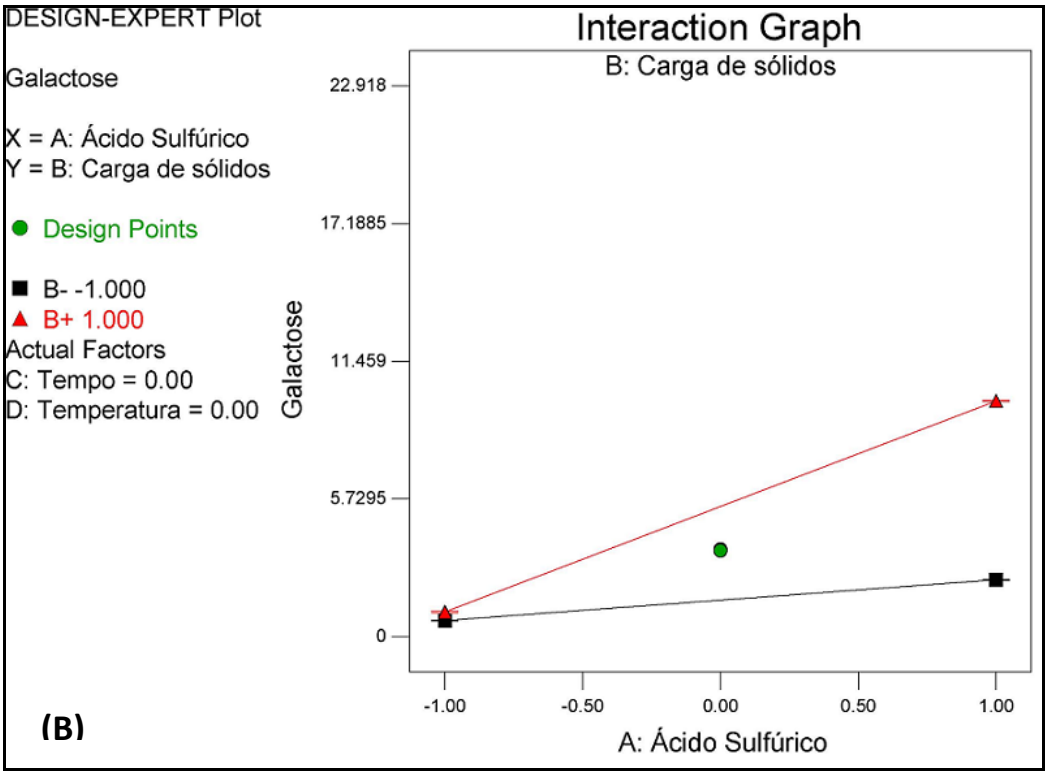


Figura 5.3 – Gráficos gerados pelo software Design-expert® 6.0.6 (Stat-ease) ilustrando a influência exercida pela interação de parâmetros para liberação de galactose. Em (A): em função da temperatura de reação e carga de Sólidos; Em (B): em função da concentração de ácido sulfúrico e carga de sólidos (B).

A diminuição da eficiência de hidrólise ácida diante do aumento da concentração de sólidos, evidenciada também no diagrama de Pareto para eficiência (**Figura 5.2 B**), pode ser justificada pelas próprias características bioquímicas e estruturais da carragenana. Segundo Khambhaty *et al*. (2012), a presença de grupamentos sulfato gera mudanças conformacionais nesta estrutura, resultantes da sua carga negativa, tornando mais dificultoso o ataque ácido. Como relatado em estudos relacionados às características da carragenana, por Freile-Pelegrín & Robledo (2007); Hayashi *et al*. (2007) e Montolalu *et al*. (2008), o aspecto viscoso da carragenana quando em solução, também observado neste estudo nas etapas de extração e resolubilização, é proporcional ao teor de sulfato presente nesta estrutura. Tan, Lam & Lee (2013) observaram que a viscosidade pode ser um fator que dificulta a hidrólise à medida que a carga de sólidos aumenta. Khambhaty *et al*. (2012) também atribuiram a baixa susceptibilidade da carragenana à hidrólise em condições ácidas moderadas à presença de resistentes ligações glicosídicas do tipo beta 1→4 além das do tipo alfa 1→3, com característica lábil nestas condições.

Sendo assim, como observado no diagrama de Pareto para HMF, ilustrado na figura **Figura 5.2 C**, que indica a carga de sólidos como o parâmetro mais influente para formação deste composto inibidor, pode-se sugerir que o nível de severidade necessário para a hidrólise ácida, diante das características previamente mencionadas da carragenana e da reatividade da galactose, fazem com que grande parte dos carboidratos que resultariam na obtenção deste açúcar sejam desviados para formação de HMF, contribuindo também para a diminuição da eficiência de hidrólise.

Baseando-se no estudo de Goh & Lee (2010), que sugere a inclusão da etapa de extração da carragenana prévia a de hidrólise (**Capítulo 2, ítem 2.11**), diante da possibilidade da condição favorável de hidrólise ácida (com alta concentração de sólidos) distinguir-se da que proporciona melhor extração e disponibilização desta macromolécula, avaliou-se a inclusão da etapa de extração aquosa da carragenana neste estudo.

Avaliou-se, também, a estratégia de utilizar uma baixa concentração de biomassa algal (20 g/L) para eficiente extração desta macromolécula e de aumentar

a concentração de carragenana bruta na etapa posterior de hidrólise (60 e 100 g/L), possibilitada pela precipitação da carragenana. Analisou-se, então, se haveria mudanças significativas quanto ao aumento da eficiência de hidrólise e diminuição da formação de HMF, mediante a comparação com estudos recém-publicados que prescindem desta etapa.

A partir da análise dos resultados deste planejamento, entendeu-se que tanto a eficiência de hidrólise quanto à quantidade de HMF obtido foram próximos aos estudos previamente citados com *Kappaphycus alvarezii,* sugerindo que os aspectos discutidos anteriormente em relação às características desta macromolécula, mesmo que inclusa a etapa de extração, ainda exercem forte influência para eficiência de hidrólise e formação de HMF.

Goh & Lee (2010) também propuseram a etapa de extração e purificação da carragenana para o aproveitamento integral da biomassa algal (**Figura 2.6**). No entanto, deve-se levar em consideração limitações evidenciadas após este processo como a perda de massa de 18,46% ± 0,04 e a elevada viscosidade da carragenana em solução, não incluindo a complexidade da posterior etapa de purificação, prescindida neste estudo. Diante destas avaliações, a etapa prévia de extração da carragenana foi prescindida para os demais ensaios.

Diante dos fatores previamente discutidos que entornam à formação de HMF, avanços são necessários para o pré-tratamento da biomassa algal, que podem ser atingidos ao explorar diferentes estratégias. Podem ser inclusos como alternativa, estudos futuros com *Kappa*-carragenases, que atuam especificamente na ligação do tipo beta 1→4, resistente ao ataque ácido, entre unidades D-galactose-4-sulfato e a 3,6-anidro-D-galactose. Diante desta estratégia, para possibilitar a hidrólise completa da carragenana à galactose faz-se necessário conhecer as condições limitantes para sua extração e hidrólise das ligações do tipo alfa. Sendo assim, uma condição de pré-tratamento para biomassa algal, passível de ser utilizada em estudos futuros com hidrólise enzimática da carragenana, foi proposta no **Tópico 5.3** a partir de uma análise aprofundada destes resultados. Para os demais experimentos, a etapa prévia de extração da carragenana foi eliminada, sendo realizado o pré-tratamento ácido a partir da biomassa íntegra de *Kappaphycus alvarezii*.

Em relação ao pré-tratamento ácido de *Kappaphycus alvarezii* e hidrólise ácida da carragenana para produção de etanol 3G, os melhores resultados existentes na literatura foram resultantes de estudos prévios reportados por Hargreaves *et al*. (2013) ao utilizar uma concentração de sólidos de 333 g/L combinada à temperatura de reação de 120°C e concentração de ácido sulfúrico de 1% (v/v). Nestas condições, 80 g/L de galactose foram obtidos, sendo esta a maior concentração alcançada, favorável à fermentação etanólica, já que são necessárias altas concentrações de açúcares como já mencionado. Através da estratégia de destoxificação de 20 g/L de HMF com carvão ativo, proporcionou-se a fermentabilidade deste hidrolisado, obtendo-se, portanto, 38 g/L de etanol.

Hargreaves *et al*. (2013) também estabeleceram condições para o aproveitamento da fração celulósica através da hidrólise enzimática deste componente, o que permitiu a fermentação de glicose e a obtenção de 53 g/L de etanol, sendo as maiores concentrações de etanol reportadas em estudos de terceira geração.

Desta forma, este trabalho também objetivou a produção de células a partir da fração líquida da biomassa algal pré-tratada em condições baseadas neste estudo. No entanto, a estratégia de destoxificação do hidrolisado não foi adotada com o intuito de avaliar a tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 ao HMF, frente ao metabolismo oxidativo, e da possibilidade de integrar a produção de células ao processo proposto por Hargreaves *et al*. (2013) para produção de etanol.

5.3. Pré-tratamento da biomassa algal para obtenção de oligossacarídeos com baixa formação de HMF

Paralelamente às discussões realizadas neste trabalho relacionadas a diferentes estratégias que possam eliminar ou reduzir os efeitos causados pelo hidroximetilfurfural (HMF) no crescimento celular, buscou-se também estudar um composto que no cromatograma por CLAE apresentou-se com uma altura e área significativa, no tempo de retenção de 7,6 min. Este composto, derivado do pré-tratamento ácido, mostra-se presente na maioria dos experimentos relacionados à

hidrolise de carragenana, incluindo trabalhos de outros autores (Ramos, 2010) e trabalhos realizados no LADEBIO (dados não publicados).

Após extrair a carragenana bruta da biomassa algal e submetê-la à hidrólise ácida, em diferentes condições avaliadas no planejamento de experimentos, notou-se que, nos experimentos realizados na temperatura de 100°C, houve a perda da viscosidade da carragenana (indicativo de hidrólise), porém não sendo detectada galactose após a análise por CLAE, sugerindo, portanto, que houve hidrólise parcial da carragenana, possivelmente das ligações do tipo alfa, que são lábeis à hidrólise ácida mesmo em condições mais brandas de temperatura. Considerando esta possibilidade, já que as ligações são alternadas, haveria formação de dímeros ou oligômeros resultantes desta reação.

Os cromatogramas resultantes da análise de açúcares por CLAE reforçaram esta hipótese. Como se pode observar na **Figura 5.4**, na temperatura de 100°C, não houve detecção de galactose, mas sim de um único pico no tempo de retenção 7,6 minutos, característico de dímeros nas condições experimentais em que o cromatógrafo foi operado (Bio-Rad Laboratories, Inc. s/a.). Além disso, à medida que houve aumento do grau de severidade, notou-se a diminuição deste pico e aumento do pico relacionado à galactose, sugerindo que em condições mais severas, além das ligações do tipo alfa, as ligações beta também estariam sendo hidrolisadas.

Por conta disso, optou-se por avaliar se a condição de 100°C, com uma solução de ácido sulfúrico 0,5% e tempo de reação de 1 hora, haveria solubilização e extração da carragenana, como também, hidrólise das ligações do tipo alfa ao aumentar para 200 g/L de biomassa algal íntegra e cominuída. Como demonstrado na **Figura 5.5**, na análise por CLAE para açúcares, resultante deste ensaio, o mesmo pico isolado no tempo de retenção de 7,6 minutos foi observado.

Para confirmar se o pico no tempo de retenção de 7,6 min era correspondente a um açúcar, a partir deste hidrolisado, límpido e não viscoso, fez-se uma segunda hidrólise ácida, porém em condições mais severas (1% de H_2SO_4 por 30 minutos de reação a 121 °C), já que possibilitariam a hidrólise das ligações do tipo beta que resultaria na diminuição da concentração do suposto oligossacarídeo, constatado através da diminuição do pico e aumento do pico de galactose.

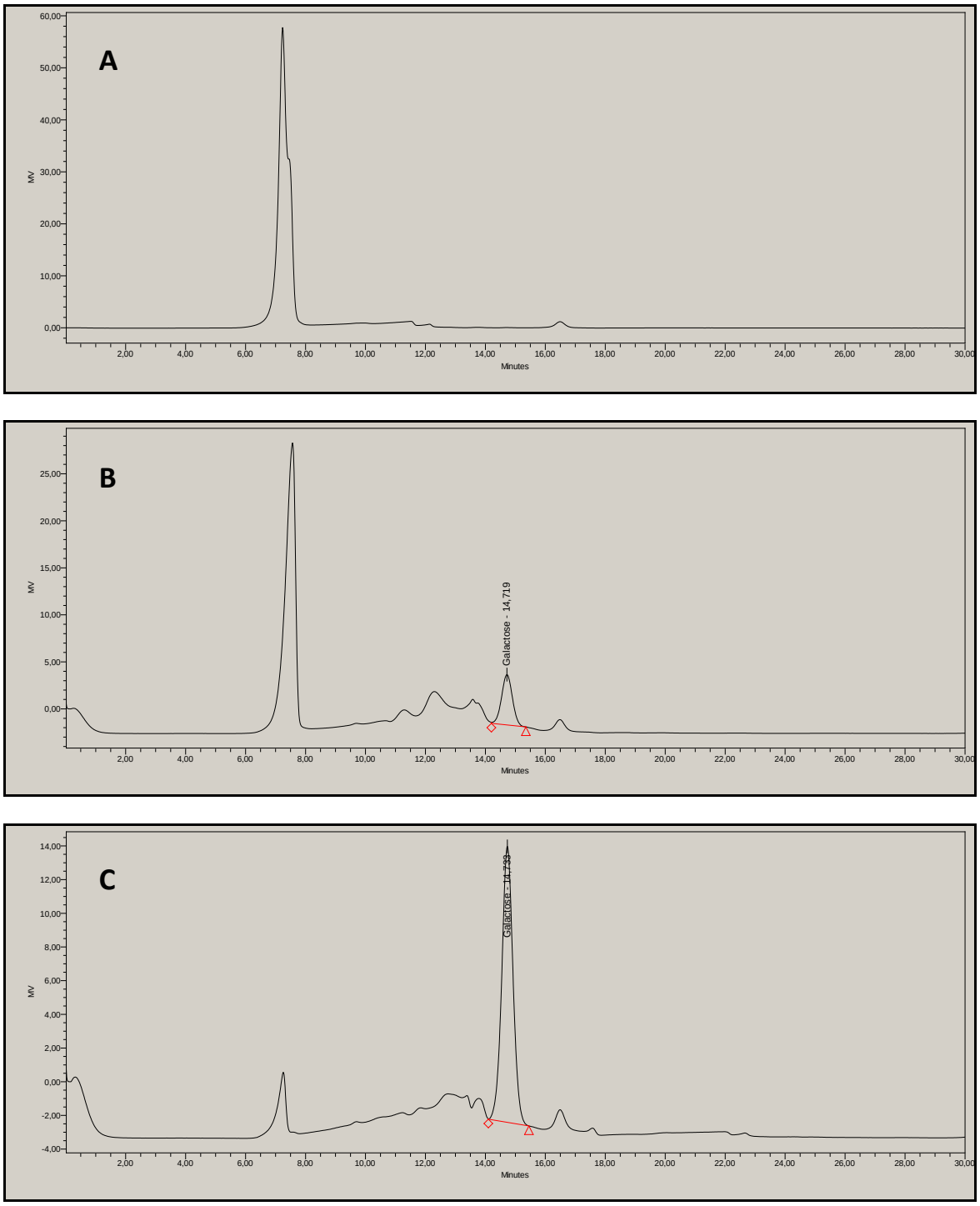


Figura 5.4 – Cromatogramas obtidos da análise por CLAE de ensaios do planejamento fatorial completo 24 com carragenana bruta. A: 100°C/ ácido sulfúrico 0,2%; B: 110°C /ácido sulfúrico 0,5%; C: 120°C/ácido sulfúrico 0,8%.

Como esperado, após a segunda hidrólise, detectou-se galactose (24 g/L) havendo também a redução do pico analisado (**Figura 5.5**). Sendo assim, a partir desta metodologia mais simples obteve-se um hidrolisado com uma concentração estimada de 135 g/L de oligossacarídeos e 2,32 g/L de HMF, antes de ser submetido à segunda etapa de hidrólise. Como ainda houve formação de HMF, reduziu-se a concentração de ácido sulfúrico de 0,5% para 0,25% havendo a uma redução para 0,0126 g/L de HMF formado, que foi sugestivo para uma otimização futura dos parâmetros, para que se alcance as mínimas condições necessárias para obtenção destes carboidratos em maiores concentrações sem que haja formação deste inibidor.

Foi importante identificar o que correspondia no pico no tempo de 7,6 min (observado no cromatograma de açucares por CLAE), pois refere-se a um composto que está presente em diversos outros trabalhos realizados com hidrólise ácida da alga *Kappaphycus alvarezii* e que aparece com altura e área que não se pode negligenciar. Identificado como um açúcar (possivelmente dissacarídeo), podendo originar galactose, este resultado abre novas perspectivas para o pré-tratamento da alga, podendo este hidrolisado ser utilizado diretamente na forma de dissacarídeo para algum determinado microrganismo. Há também a possibilidade de uso de β-galactosidases ou *kappa*-carragenases que são enzimas que atuam nas ligações do tipo β-1-4 de um galactopiranosídeo, em condições mais brandas, sem geração de HMF. Além disso, o pré-tratamento empregado para gerar este dissacarídeo foi realizado em condições em que a formação de HMF foi praticamente nula. Logicamente, apesar de todos os dados indicarem que o composto formado trata-se de um dissacarídeo, faz-se necessário estudo mais aprofundado para confirmar (por meio de padrões específicos) e buscar por uma alternativa de uso deste composto já que pode ser obtido em condições menos severas e sem formação de inibidores como HMF.

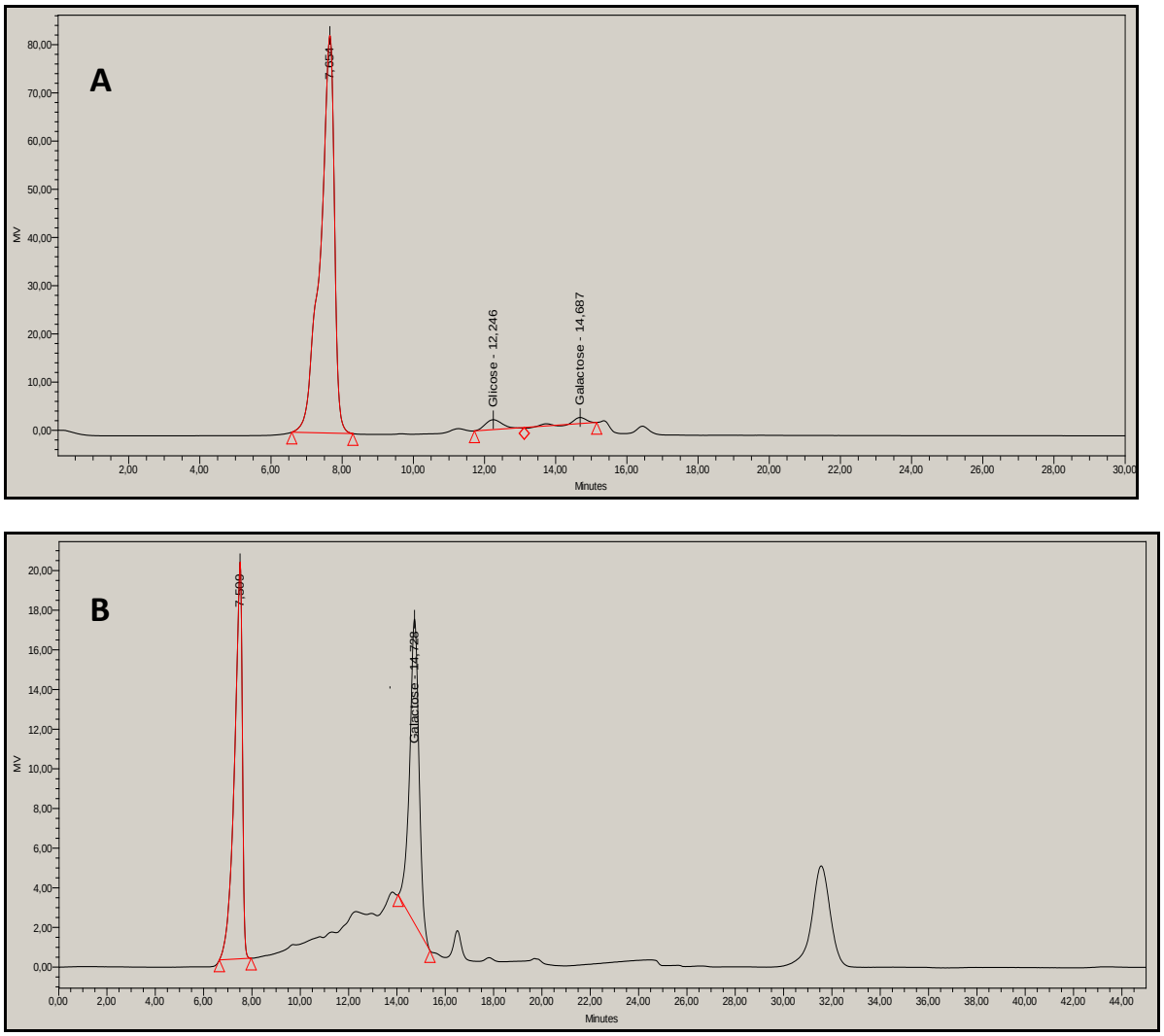


Figura 5.5 – Cromatogramas obtidos da análise por CLAE dos ensaios de pré-tratamento da biomassa algal. (A) etapa de hidrólise branda (0,25% H_2SO_4; 100ºC; 60 min); (B), segunda etapa de hidrólise em condição mais severa (1% H_2SO_4; 120ºC; 60 min).

5.4. Desenvolvimento de método para quantificação de HMF por espectrofotometria de UV.

De acordo com o que foi previamente relatado, pode-se entender a importância da quantificação dos compostos inibidores tanto após o pré-tratamento quanto durante os processos metabólicos nos bioprocessos, para que seja possível ter uma visão mais ampla dos mecanismos de tolerância das células a estes compostos. Diante disso, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), dada a

sua alta resolução e detectabilidade para análises quantitativas e qualitativas, é um dos métodos analíticos utilizados para análise de HMF.

No entanto, devido ao alto custo (equipamentos, manutenção, reagentes para fase móvel, colunas) bem como elevado tempo de análise necessário para estes métodos, para suportar estes estudos, foi necessário o desenvolvimento de um método mais simples, rápido e com menor custo, podendo sua acuracidade ser confirmada por CLAE. Métodos espectrofotométricos são, portanto, utilizados para esta finalidade e análise de muitos compostos como, por exemplo, açúcares redutores, devido à sua simples operação e instrumentação, com menor custo, e por favorecer resultados mais rápidos (ZHANG *et al.*, 2010; DAVIES *et al.*, 2011).

Por conta disso, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos espectrofotométricos para análise de hidroximetilfurfural, que foi uma das iniciativas deste trabalho. A análise de HMF por espectrofotometria de UV demonstrou seletividade para este analito em hidrolisado algal, já que distinguiu amostras de hidrolisado algal que continham ou não HMF após a varredura de espectro e sensibilidade, tanto com amostras padrão em concentração crescente deste composto (**Item 4.8.3**) quanto com resultantes dos ensaios de crescimento.

Na **Figura 5.6** pode-se observar a curva de calibração que relaciona a absorvância de luz UV a 280 nm com a concentração de HMF em mg/L por espectrofotometria.

Ao se utilizarem os dados da batelada para produção de células de *S. cerevisiae*, analisou-se a correlação entre ambos os métodos (espectrofotometria de UV e CLAE) através do coeficiente de variação (CV), que é uma medida de dispersão empregada para estimar a precisão de métodos ao expressar o desvio-padrão dos dados como porcentagem da média, e do coeficiente de determinação (R^2), ao estimar a relação linearmente proporcional entre os resultados obtidos pelos métodos analíticos avaliados (**Tabela 5.2**).

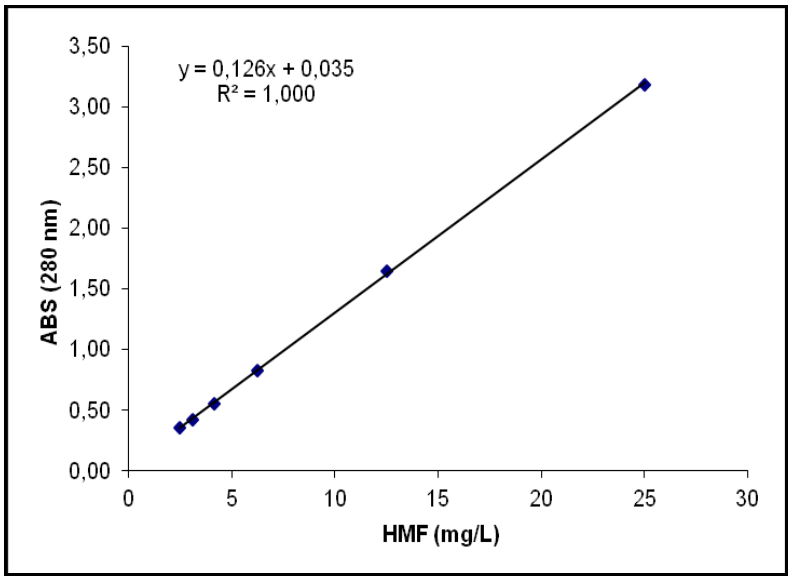


Figura 5.6 – Curva de calibração para quantificação de HMF por espectrofotometria de UV.

Tabela 5.2 – Resultados obtidos pela análise de HMF por espectrofotometria de UV e CLAE.

Código	CLAE HMF (g/L)	Espectrofotômetro HMF (g/L)	Média	DP	CV (%)
22	8,65	7,99	8,318	0,468	5,63
23	8,28	8,39	8,335	0,083	1,00
24	7,85	7,86	7,854	0,009	0,11
25	5,58	5,64	5,610	0,039	0,70
26	3,94	4,08	4,006	0,099	2,48
29	1,28	1,54	1,410	0,179	12,67

Da análise dos resultados obtidos, concluiu-se que os valores de CV foram aceitáveis para as diferentes concentrações de HMF avaliadas pelos dois métodos. Já o valor que ultrapassou o limite aceitável (12,67%) é consequente do limite de sensibilidade (2,5 a 25 mg/L) do método espectrofotométrico em baixas concentrações de analito. A correlação entre os métodos (R^2=0,991) foi bastante satisfatória (**Figura 5.7**), potencializando, portando, o estímulo para estudos futuros do método de análise de HMF por espectrofotometria de UV, como também, para sua utilização em quantificações preliminares de HMF, já que o método também demonstrou simplicidade e a rapidez quanto ao tempo de análise.

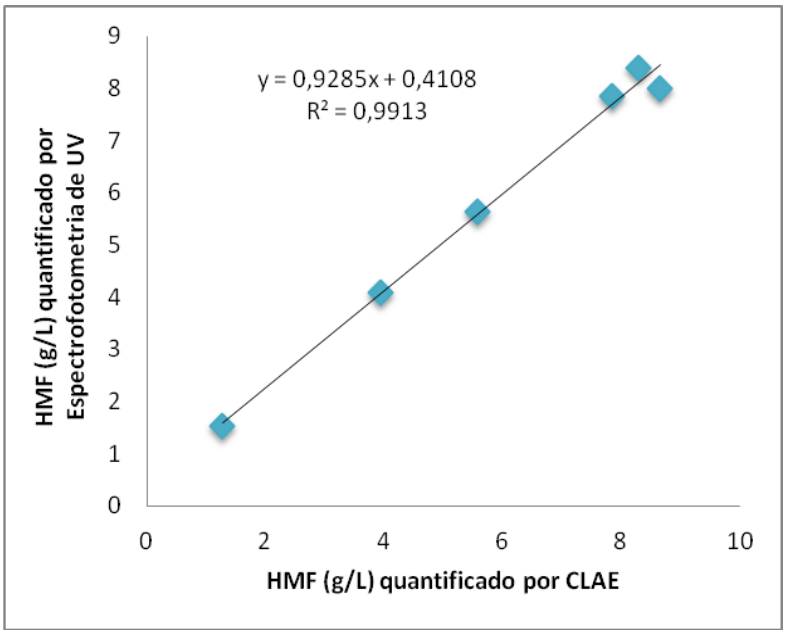


Figura 5.7 – Correlação entre os métodos para quantificação de HMF (espectrofotometria de UV e CLAE).

5.5. Produção de células de *Saccharomyces cerevisiae* em frascos agitados: ensaio para avaliação da tolerância ao HMF

Para o preparo do meio de cultivo foram estudadas diferentes condições de concentração de sólidos e concentração de ácido conforme se observa na Tabela 5.2. Dentre as condições avaliadas de pré-tratamento ácido com a biomassa algal íntegra, utilizou-se a condição que resultou na maior eficiência de hidrólise (93,7 g/L de biomassa algal; 0,8% (v/v) de ácido sulfúrico; temperatura de reação de 120°C e 1 hora de reação), como observado na **Tabela 5.3**, para os ensaios de tolerância ao HMF.

A **Figura 5.8** ilustra a cinética do crescimento e consumo de galactose na etapa de aclimatação. Nesta etapa, o meio obtido conforme as condições acima citada, foi diluído a um fator de 2. Dessa forma, as leveduras foram submetidas a 4,06 g/L de HMF, presentes no hidrolisado algal, e ainda assim, pode-se observar o crescimento celular, com concentração final de 3,33 g/L de células, ao final do período de incubação, além do esgotamento de galactose em 48 horas.

Tabela 5.3 – Resultados do pré-tratamento da biomassa algal.

Exp	Fatores		Variáveis de Resposta		
	Relação S:L	H_2SO_4 (%)	HMF (g/L)	Galactose (g/L)	Eficiência de hidrólise (%)
1	1:10 93,75 (g/L)	0,5	8,90	21,18	70,615
2		0,8	8,86	25,24	84,144
3		1	8,02	25,00	83,349
4	1:5 176,47 (g/L)	0,5	13,28	31,11	55,094
5		0,8	16,70	40,88	72,398
6		1	17,45	43,30	76,672

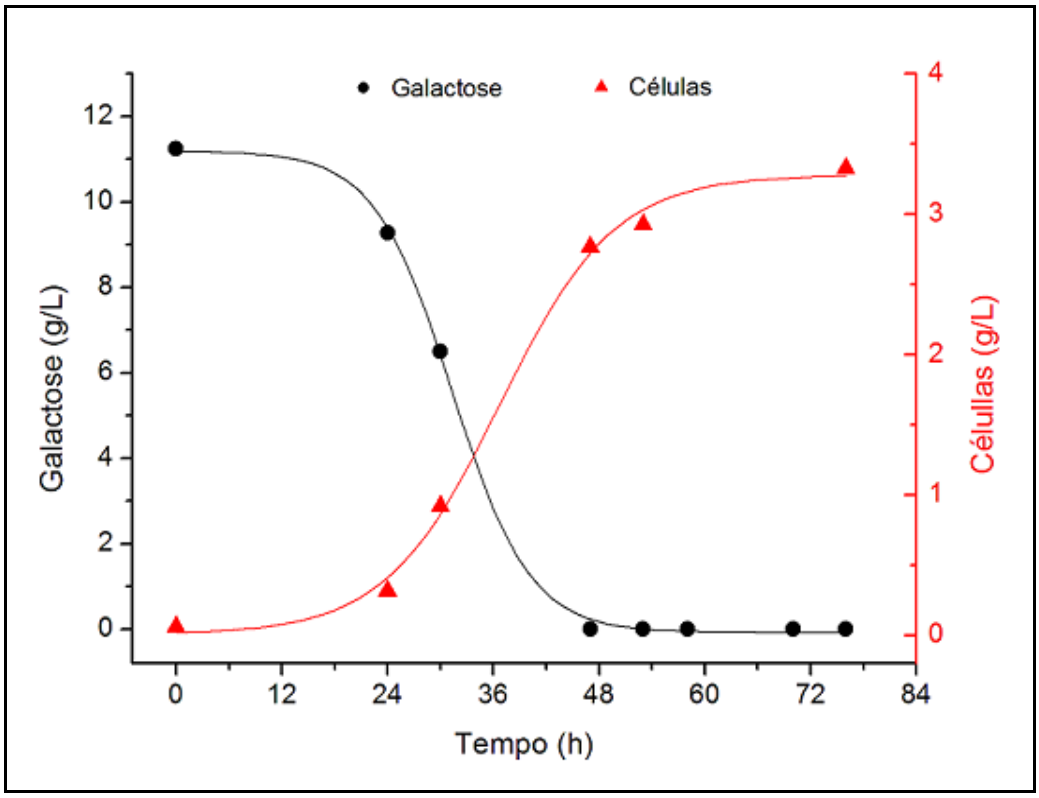


Figura 5.8 - Etapa de aclimatação dos ensaios em frascos agitados. Realizada com inóculo de suspensão de células em hidrolisado algal com 4,06 g/L de HMF. Condições experimentais: temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 100 mL.

Diante disso, após 48 horas, nesta condição, estas células (0,28 g/L) foram utilizadas como inóculo, 10% (v/v), para avaliação de uso de células aclimatadas, que foram comparadas com as não aclimatadas, em ensaios inoculados com suspensão celular. Perante a análise dos resultados (**Figura 5.9**), observou-se que

mesmo submetidas a aproximadamente 8 g/L de HMF, nos ensaios com células aclimatadas, houve crescimento celular, atingindo uma concentração final de 5 g/L, havendo o esgotamento de galactose em 36 horas de incubação e com nítida redução da fase lag de crescimento.

Já em relação aos ensaios com células não aclimatadas, não foi observado crescimento celular nem consumo de galactose. De acordo com a análise de ambos os gráficos foi sugestiva a influência exercida pela etapa de aclimatação celular, diante da resistência desta linhagem à concentrações elevadas de HMF, consideradas letais para as células em alguns estudos.

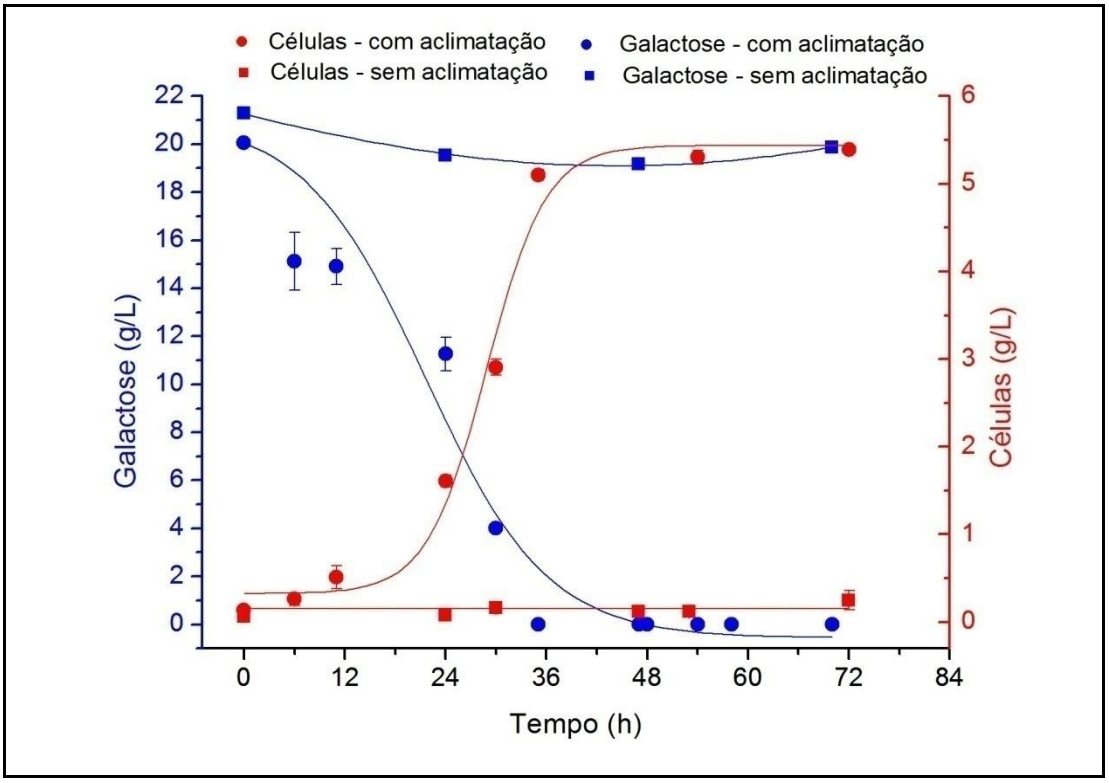


Figura 5.9 - Avaliação do crescimento celular frente à inoculação com células aclimatadas ou não aclimatadas. As células aclimatadas, provenientes da etapa de aclimatação, e não aclimatadas (suspensão de células mantidas em placa) foram inoculadas em hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF. Condições experimentais: temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 100 mL.

Ultimamente, muito se tem estudado a respeito de mecanismos de tolerância de linhagens microbianas a compostos inibidores resultantes do pré-tratamento ácido, necessário para proporcionar a aplicação industrial de diferentes tipos de

biomassa. Em relação ao HMF, Martín & Jönsson (2003); Liu *et al.* (2004); Liu, Slininger & Gorsich (2005); Liu (2006); Petersson *et al.* (2006); Almeida *et al.* (2008); Almeida *et al.* (2009); Nichols, Dien & Cotta (2010); Akillioglu, Mogol & Gokmen (2011); Jordan *et al.* (2011); Liu (2011) e Tian, Zhu & Yang (2011), têm relatado que a resistência dos microrganismos a este composto inibidor está relacionada à sua capacidade de reduzi-lo em formas alcoólicas correspondentes que exercem efeitos menos inibitórios às células. Supõe-se, então, que o HMF seja reduzido à 2,5-di-hidroximetilfurano (FDM), em geral, pela ação de enzimas álcool desidrogenases a partir oxidação dos cofatores NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), como esquematizado na **Figura 5.10** (ALMEIDA *et al.*, 2009).

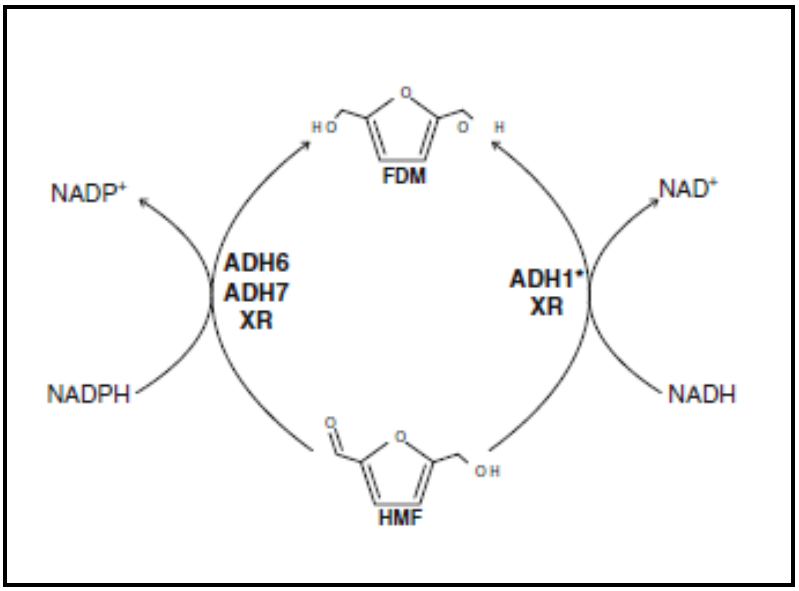


Figura 5.10 – Bioconversão do HMF à 2,5-di-hidroximetilfurano.
Fonte: ALMEIDA *et al.* (2009).

De acordo com o que foi mencionado nestes estudos, optou-se por também avaliar a concentração de HMF durante o experimento, onde seu decréscimo poderia sugerir a biorredução deste composto inibidor. Assim, o experimento foi repetido para comprovação e avaliação do comportamento do HMF durante o crescimento celular. Na **Figura 5.11**, pode-se observar a concentração de HMF e de células

correlacionadas com o período de incubação dos ensaios aclimatados e não aclimatados.

Como esperado, nos ensaios com células aclimatadas, o término da fase lag, seguido do início da fase exponencial está relacionado à diminuição da concentração de HMF, quase nula em 24 horas de incubação, diferentemente dos ensaios não aclimatados em que não houve o esgotamento deste composto inibidor mesmo após 96 horas de incubação. O crescimento celular esteve, então, relacionado à redução da concentração de HMF.

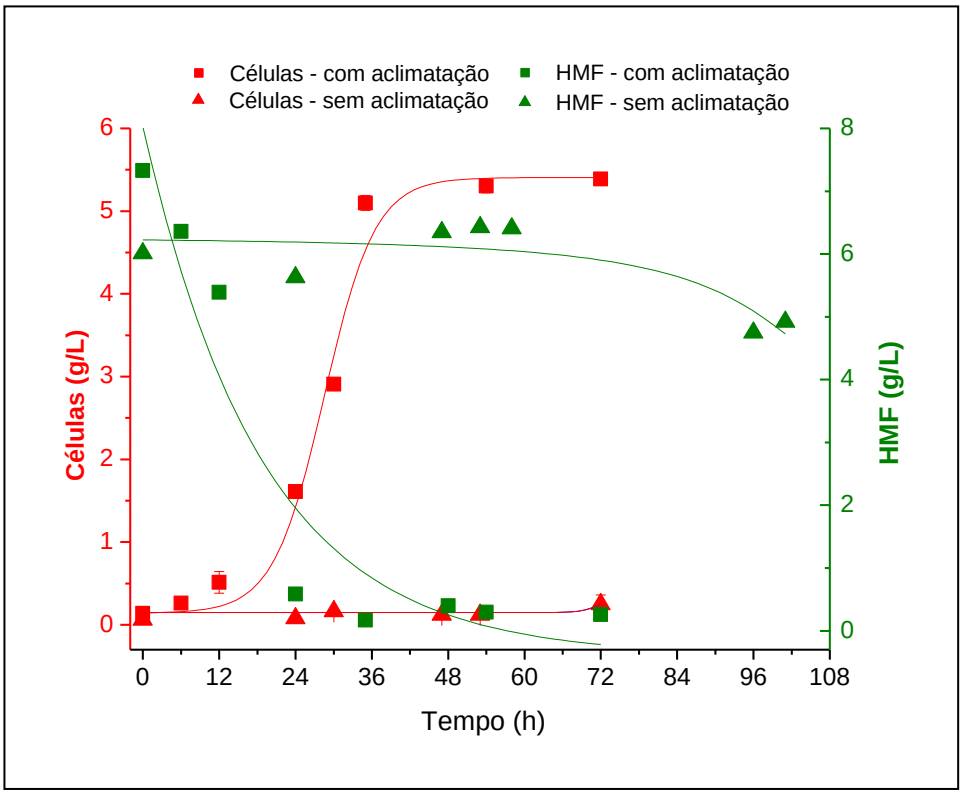


Figura 5.11 – Avaliação da concentração de HMF frente à inoculação com células aclimatadas ou não aclimatadas. As células aclimatadas, provenientes da etapa de aclimatação, e não aclimatadas (suspensão de células mantidas em placa) foram inoculadas em hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF. Condições experimentais: temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 100 mL.

Liu *et al.* (2004), em ensaios de crescimento celular utilizando diferentes concentrações de HMF em meio sintético, observaram que na condição com 30 mM (3,78 g/L), após 48 horas, este inibidor não foi detectado através da análise por

CLAE em fase reversa a 282 nm (**Figura 5.12**). No entanto, observou-se um novo pico a 222 nm, associado, posteriormente, ao produto de conversão do HMF. Diante disso, foi feita uma varredura de espectro, por espectrofotometria de UV, das amostras obtidas durante o período de incubação dos ensaios aclimatados (**Figura 5.13**).

Como se pode observar na **Figura 5.13**, comportamento similar foi evidenciado com o passar do período de incubação, em que houve o decréscimo do pico relacionado ao HMF (280 nm) à medida que ocorreu o surgimento de outro a 222 nm, reforçando a hipótese de que a resistência ao HMF, mostrada pelo crescimento celular, está relacionada a sua conversão em um composto menos inibitório.

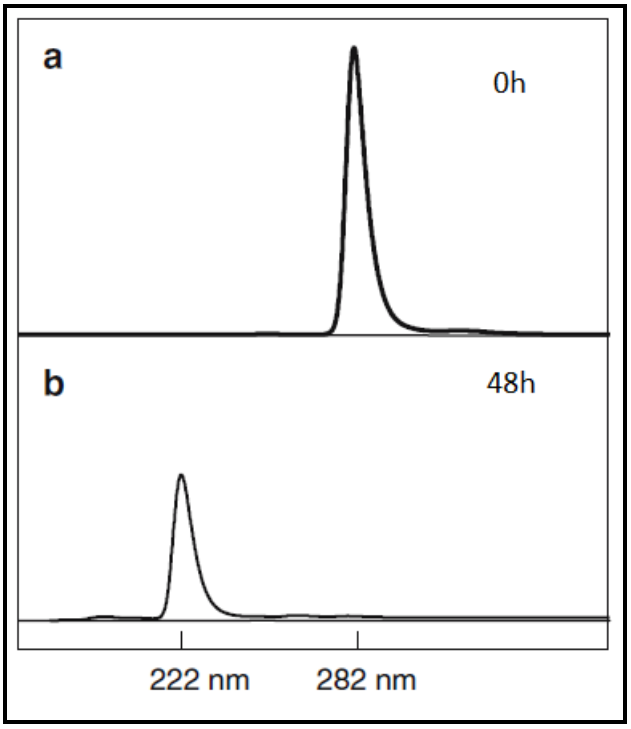


Figura 5.12 – Análise por CLAE, em fase reversa, da cultura de S. cerevisiae em meio definido contendo HMF por LIU *et al.* (2004). (a) detecção inicial de HMF com absorvância de UV a 282 nm, não detectável após 48 horas de incubação. (b) Novo pico detectável a 222 nm, identificado como a 2,5-di-hidroximetilfurano, relatando a bioconversão do HMF. Fonte: LIU (2006).

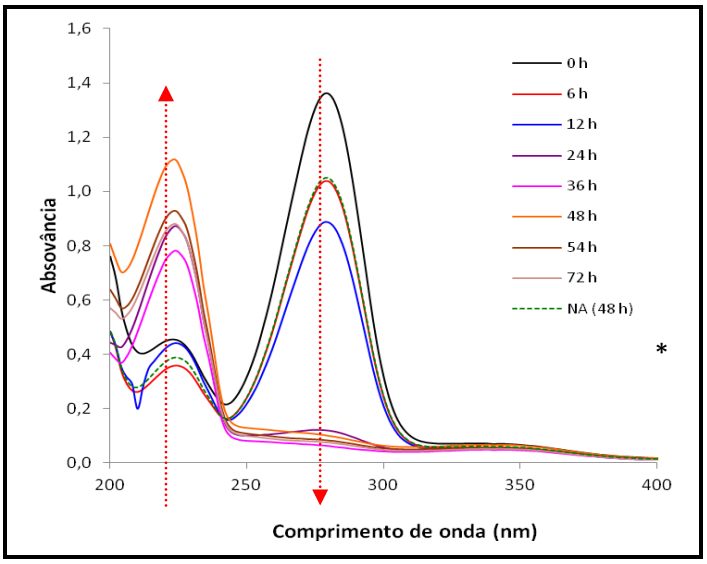


Figura 5.13 – Varredura de espectro demonstrando a variação da concentração de HMF durante o período de incubação dos ensaios aclimatados e não aclimatados (NA 48h)*. As setas em vermelho indicam a tendência decrescente em 280 nm e crescente em 222 nm.

Com isso, os valores das absorvâncias registradas a 280 nm, relacionadas ao HMF, e a 222 nm, possível produto de conversão, foram expressos no histograma ilustrado na **Figura 5.14**, onde é possível relacionar o aumento das absorvâncias a 222 nm à medida que as absorvâncias a 280 nm diminuem ao longo do período de incubação dos ensaios aclimatados.

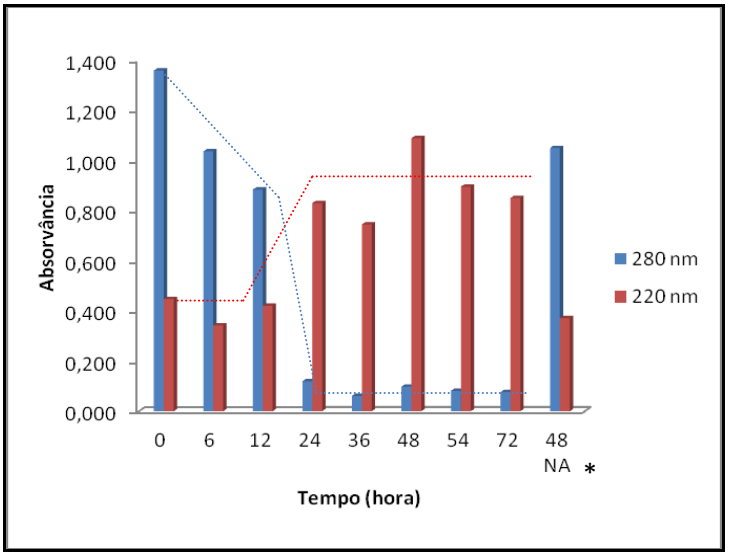


Figura 5.14 - Análise por espectrofotometria de UV a 220 nm e 280 nm dos ensaios com células aclimatadas. NA 48 corresponde à amostra do ensaio com células não aclimatadas em 48 horas de incubação.

Na concentração de 30 mM (3,78 g/L) de HMF, utilizada por Liu *et al*. (2004), similar à utilizada neste estudo para etapa de aclimatação (4,06 g/L), também foi observado crescimento celular, ainda que sem aclimatação prévia. No entanto, quando se avaliou o crescimento celular a 60 mM (7,56 g/L), os autores constataram ausência de crescimento, assim como evidenciado no ensaio inoculado com células não aclimatadas, realizado neste estudo com concentração de aproximadamente 8 g/L, reforçando a influência exercida pela etapa de aclimatação.

Outro fato mostra claramente o efeito positivo da aclimatação. Como demonstrado na **Figura 5.15**, somente as células provenientes dos ensaios para aclimatação, foram capazes de crescer em placas contendo hidrolisado algal agarizado com 8 g/L de HMF. O fato de estas células serem mantidas, já em presença deste composto inibidor, sugere que tanto a fase lag, como também, o tempo necessário para redução de HMF podem ser otimizados ao utilizá-las em detrimento às mantidas em meio sintético, aliando esta estratégia, ao aumento do inóculo na etapa de aclimatação.

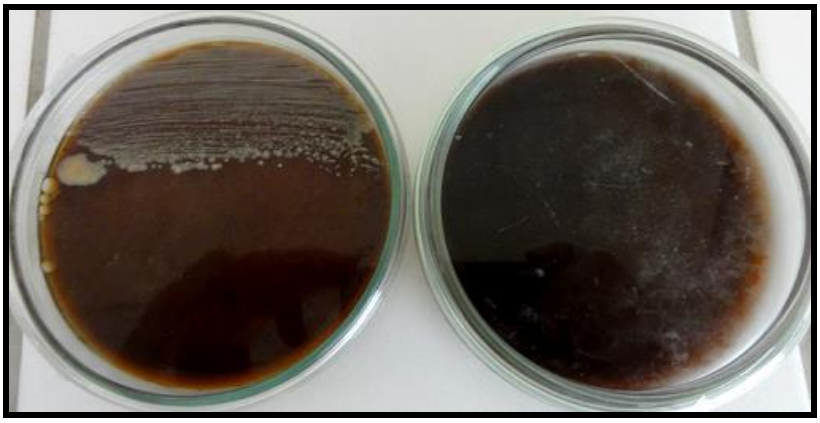


Figura 5.15 – Resultados dos plaqueamentos feitos após o período de incubação dos ensaios aclimatado (à esquerda) e não aclimatado (à direita) em hidrolisado agarizado.

Na **Tabela 5.4**, encontram-se as variáveis de resposta que demonstram o aumento significativo da produtividade volumétrica de células (Q_X) e da taxa de conversão de HMF (Q_{HMF}) entre a etapa de aclimatação e a de produção de células utilizando inóculo aclimatado. Já nos ensaios em que os frascos foram inoculados com células não aclimatadas, não houve conversão de HMF, os parâmetros q_{HMF} e

Q_{HMF} foram nulos. Por conta da melhoria dos fatores de rendimento e produtividade e a fim de se aumentar a produção de células, na etapa seguinte em biorreator, decidiu-se incluir um processo conduzido por batelada alimentada, para se avaliar a influência do modo de condução para o aumento da produção e destas taxas.

Tabela 5.4 – Resultados dos parâmetros analisados nos ensaios de tolerância ao HMF em frascos agitados.

	μ_X (h^{-1})	q_{HMF} ($g.g^{-1}.h^{-1}$)	$Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}$)	Q_X ($g.L.h^{-1}$)	Q_{HMF} ($g.L.h^{-1}$)
Etapa de aclimatação	0,094	0,032	0,255	0,058	0,086
Ensaio com células aclimatadas	0,105	0,041	0,247	0,142	0,281
Ensaio não aclimatado	0,034	-	0,029	0,001	-

5.6. Produção de células de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 em biorreator instrumentado

5.6.1. Obtenção do hidrolisado algal

Para obtenção do hidrolisado algal, utilizado nos experimentos em biorreatores, optou-se por um pré-tratamento com maior concentração de sólidos, com o objetivo de se obter uma maior concentração de galactose. Ainda que altas concentrações de substrato não sejam necessárias para produção de células, diferentemente da etapa fermentativa, buscou-se unificar as condições de pré-tratamento de modo a integrar os processos.

O pré-tratamento então realizado, com uma concentração de 320,7 g/L de biomassa algal resultou em uma eficiência de hidrólise de 79,53%, indicando que para condições mais concentradas, a concentração de 0,8% de ácido sulfúrico, menor utilizada em comparação com outros estudos, foi suficiente para proporcionar a hidrólise da carragenana. No entanto, como esperado, estas mesmas condições também proporcionaram a formação de 28,68 g/L de HMF.

Diante dos resultados de crescimento celular, a serem apresentados, foi possível o aproveitamento da galactose resultante da lavagem da fração sólida, que

já era constituída de 42,28 g/L de galactose e 15,46 g/L de HMF. Como o volume obtido deste lavado foi proporcional à massa sólida resultante do pré-tratamento, em escala industrial este lavado, poderia suprir grande parte do hidrolisado necessário para produção de células.

5.6.2. Bioprocesso para produção de células em batelada simples e alimentada

A análise das **Figuras 5.16** e **5.17**, que ilustram, respectivamente, os resultados da etapa de aclimatação (pré-inóculo) e de uma batelada simples. Nota-se que os resultados obtidos nos ensaios em frascos foram reproduzidos nos experimentos realizados em biorreator instrumentado. Nos cromatogramas resultantes da análise de HMF por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das amostras do ensaio em bioreator conduzido por batelada simples (**Figura 5.18**) é possível confirmar o decréscimo da concentração de HMF durante o período de incubação. Neste modo de condução, atingiu-se em torno de 4 g/L de células em 40 horas de incubação em hidrolisado algal com aproximadamente 8 g/L de HMF.

Visando diminuir o tempo necessário para redução de HMF de 24 horas, como também a fase Lag de 20 horas, o desempenho de outro biorreator, conduzido por batelada alimentada foi com este comparado.

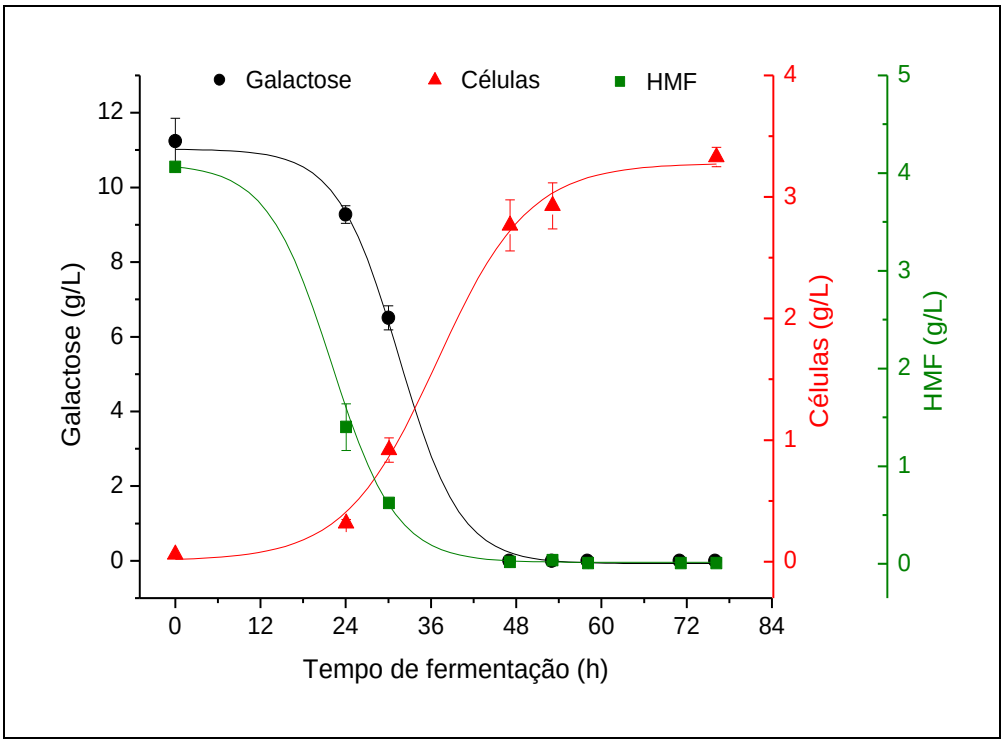


Figura 5.16 – Etapa de aclimatação de células a serem utilizadas como inóculo para os experimentos em biorreatores instrumentados. Realizada com inóculo de suspensão de células em hidrolisado algal com 4,06 g/L de HMF. Condições experimentais: temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 100 mL.

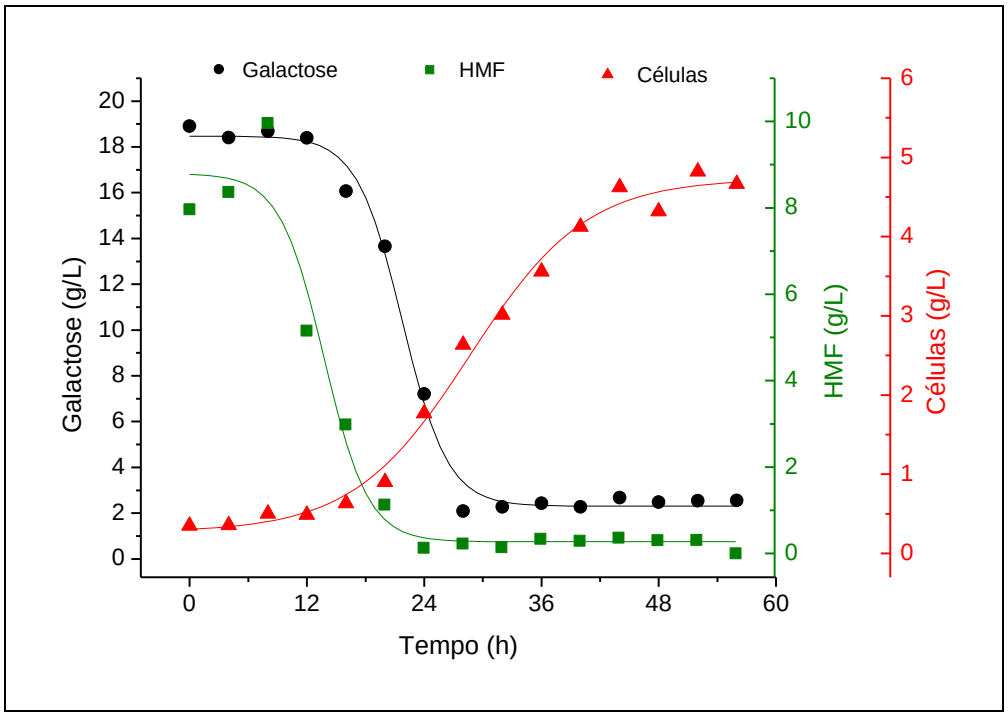
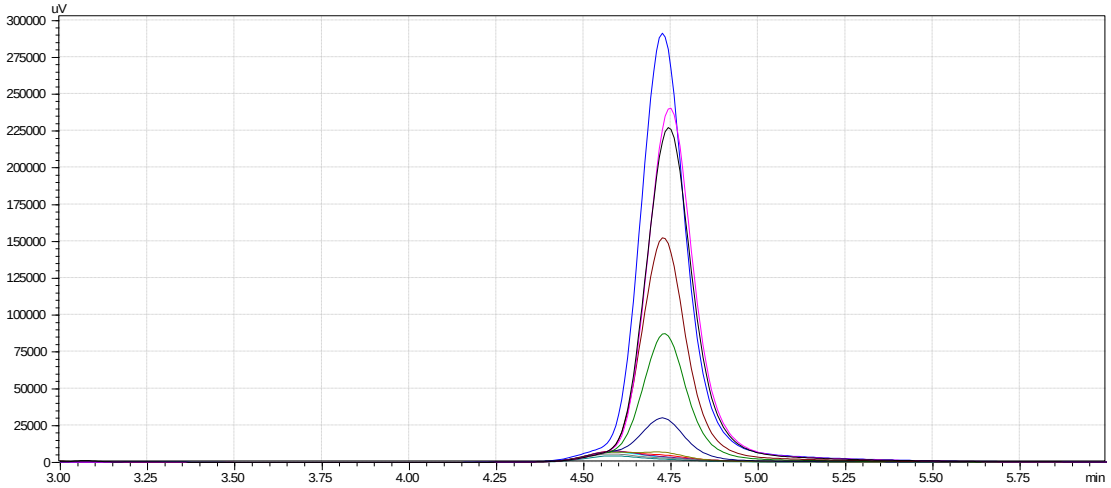


Figura 5.17 – Cinética da produção de células de *S. cerevisiae* conduzido por batelada simples em biorreator. Condições experimentais: hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF; temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 1,2 L; inóculo com células aclimatadas.



LEGENDA

Tempo (h)	Tempo (h)	Tempo (h)
0	16	32
4	20	36
8	24	40
12	28	44

Figura 5.18 – Cromatogramas sobrepostos obtidos da análise de HMF de amostras do reator em batelada simples por CLAE. O cromatograma possui zoom entre 3 e 6 minutos.

No processo em batelada alimentada (**Figura 5.19**), alcançou-se um crescimento com 7,33 g/L de células (8 g em massa), ao final do processo. Além de se alcançar uma maior concentração celular com esta forma de condução, houve uma diminuição significativa do tempo de redução da concentração de HMF após cada alimentação por pulso. Na fase de batelada simples, 8 g/L de HMF esgotaram-se em 24 horas, já diante da segunda alimentação, este tempo foi reduzido para 8 horas, ainda que as alimentações com hidrolisados concentrados tenham causado um ligeiro acúmulo de HMF atingindo uma concentração de 10 g/L.

Os efeitos favoráveis exercidos pelas alimentações podem ser analisados na **Tabela 5.5** que apresenta os resultados dos fatores de crescimento e consumo de HMF. Como se pode observar, houve um aumento expressivo da taxa de conversão de HMF (Q_{HMF}), atingindo 1,33 ($g.L.h^{-1}$), como também da produtividade volumétrica de células (Q_X). Os dados cinéticos referentes à terceira alimentação foram subestimados já que a amostragem só pode ter sido feita após 12 horas da alimentação, diferentemente das alimentações antecedentes em que foi feita após 4

horas, explicando, portanto, a aparente queda da produtividade volumétrica de células e da taxa de conversão de HMF.

Tabela 5.5 – Resultados dos parâmetros analisados nos experimentos em biorreator.

Parâmetros cinéticos	Biorreator conduzido por batelada simples	**Biorreator conduzido por batelada alimentada**			
		Fase simples inicial	**1ª alimentação**	**2ª alimentação**	**3ª alimentação**
μ_X (h^{-1})	0,134	0,139	0,063	0,046	0,015
q_{HMF} ($g.g^{-1}h^{-1}$)	0,325	0,388	0,325	0,724	0,737
$Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}$)	0,263	0,206	0,163	0,089	0,088
Q_X ($g.L.h^{-1}$)	0,0971	0,118	0,203	0,263	0,093
Q_{HMF} ($g.L.h^{-1}$)	0,249	0,368	0,885	1,334	0,819

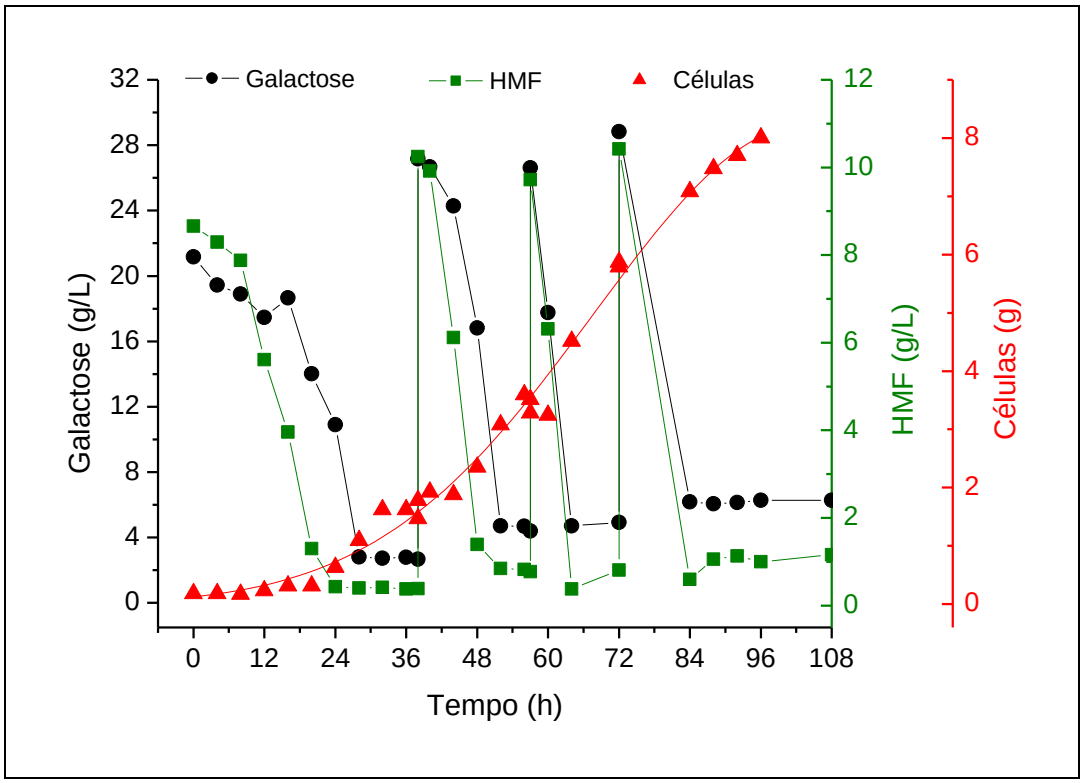


Figura 5.19 – Cinética da produção de células de *S. cerevisiae* conduzido por batelada alimentada. Galactose, HMF e células. Condições experimentais: hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF; temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 400 mL; Alimentações realizadas por pulsos (em mL) 135, 180, 240; inóculo com células aclimatadas.

Apesar de este processo ter proporcionado um crescimento celular satisfatório, tanto a queda da taxa específica de crescimento celular (μ_X), quanto do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foram observados. Como demonstrado na **Figura 5.19**, as alimentações proporcionaram o aumento da concentração de galactose, que atingiu em torno de 30 g/L, diante da alta concentração de galactose presente no hidrolisado algal utilizado para as alimentações por pulsos. Sugere-se que este aumento tenha alterado a concentração reacional adequada para favorecer a produção de células (que tange 20 g/L).

Desta forma, supõe-se que tanto o aumento da concentração de substrato evidenciado quanto a carga de células, ainda que em condições aeradas, desfavoreceram o metabolismo oxidativo e, consequentemente, diminuíram os valores de μ_X. Os resultados apresentados na **Figura 5.20**, reforçam esta suposição, já que demonstram que houve produção de etanol durante o processo.

A mudança metabólica para a via fermentativa, ainda que em condições aeradas, é descrita pelo efeito *Cabtree* por explicar que o aumento da concentração de substrato, além de causar repressão no metabolismo oxidativo, pode desviá-lo parcialmente para a via fermentativa (REIS, 2009).

A **Figura 5.20** também sugere, através da variação da concentração de etanol, que ocorreu o consumo do etanol produzido pela levedura. Este efeito pode ser explicado pela diauxia, que se relaciona ao consumo de dois tipos distintos de substrato fazendo com que o crescimento celular ocorra em duas fases em uma cultura aeróbia. A primeira fase é caracterizada por uma maior taxa específica de crescimento celular e um menor rendimento em biomassa, ao passo que na segunda, que neste caso ocorreu a partir do consumo de etanol após o esgotamento da galactose, observa-se uma diminuição da taxa de crescimento e um aumento do rendimento em biomassa. O efeito diáuxico, explica, portanto, o aumento de Q_X, a cada batelada, ainda que tenha sido evidenciada a diminuição de μ_X (REIS, 2009).

Ainda que a produção de células pudesse ter sido mais eficiente, caso as condições do processo fossem melhores controladas para não reprimir o metabolismo oxidativo, este resultado evidenciou a capacidade destas células de exercerem o metabolismo fermentativo mesmo em condições contrárias, havendo a

produção de 6,38 g/L de etanol (não considerando o acúmulo do etanol produzido e consumido previamente), simultânea a elevada taxa de conversão de HMF. Tais fatos também ressaltam a alta atividade metabólica das leveduras após as bateladas.

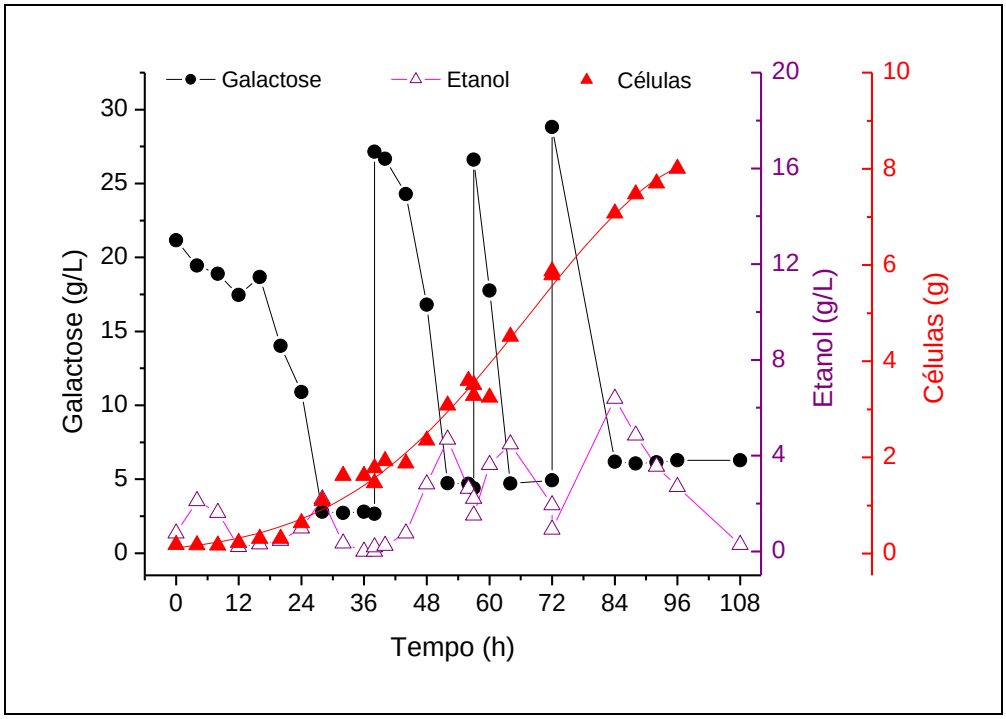


Figura 5.20 – Cinética da produção de células de *S. cerevisiae* conduzido por batelada alimentada. Condições experimentais: hidrolisado algal com 8,17 g/L de HMF; temperatura, 30°C; agitação, 200 rpm, volume útil, 400 mL; Alimentações realizadas por pulsos (em mL) 135, 180, 240; inóculo com células aclimatadas.

Em estudos prévios no LADEBIO em que esta linhagem foi submetida a condições de anaerobiose e propícias ao metabolismo fermentativo a partir do hidrolisado de *K. alvarezii*, verificou-se que 2,5 g/L de HMF foi suficiente para reprimir o metabolismo fermentativo (LOUREIRO, 2009). Entretanto, o meio foi inoculado com células crescidas em meio definido, e em ausência de HMF, não possibilitando a sua aclimatação.

Liu (2006) explica que a repressão metabólica causada por compostos como HMF e furfural em leveduras é decorrente dos cofatores NADH e NADPH serem necessários tanto para atividades de álcool desidrogenases, envolvidas na conversão de inibidores em compostos com menor toxicidade, como também para o equilíbrio de reações metabólicas também dependentes destes cofatores. Um dos efeitos

repressores para o metabolismo fermentativo, portanto, deve-se ao acúmulo de acetaldeído, causado pelo desvio dos cofatores necessários para redução deste composto a etanol (**Figura 5.21**).

Ainda diante da análise da **Figura 5.21**, pode-se intuir que a presença de diferentes tipos de compostos inibidores em um hidrolisado, como furfural e hidroximetilfurfural, tende a aumentar a complexidade para tolerância da linhagem através do co-metabolismo, devido, principalmente, ao desequilíbrio nos níveis de cofatores consequente destas reações como mencionado anteriormente.

Desta forma, pode-se sugerir que a tolerância evidenciada pode também ter sido favorecida pelo hidrolisado algal, nestas condições de pré-tratamento, apresentar exclusivamente HMF. Por conta disso, em trabalhos relacionados ao uso da estratégia de aclimatação de linhagens em hidrolisados hemicelulósicos, oriundos do pré-tratamento ácido do bagaço, têm se observado maior complexidade para potencializar a tolerância das linhagens estudadas, de modo que são constituídos de ácido acético (de maior toxicidade e presente em concentrações elevadas), furfural e compostos fenólicos, além do HMF (BETANCUR, 2010).

Em estudos como de Martín & Jönsson (2003) também é possível ter uma noção mais aprofundada, já que submetem diferentes tipos de linhagens de leveduras a meios definidos com um mix de compostos inibidores. Este estudo ainda ressalta a grande diferença quanto à capacidade de tolerância presente em diferentes linhagens avaliadas.

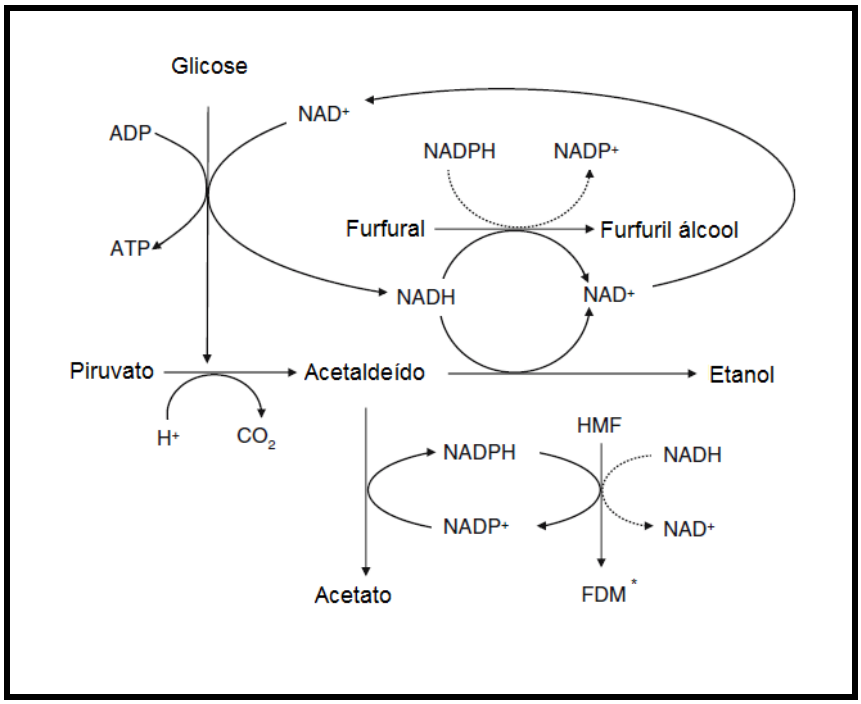


Figura 5.21 – Repressão metabólica causada pela redução de compostos inibidores.
* FDM: 2,5-di-hidroximetilfurano. Fonte: Adaptado de LIU, 2006.

Os resultados obtidos neste trabalho sugeriram também que realizar a etapa de crescimento celular a partir do hidrolisado algal e a etapa de aclimatação podem ter favorecido a conversão de HMF, já que o metabolismo oxidativo favorece a produção dos cofatores NADH e NADPH, que de acordo com Liu (2006) e Almeida *et al.* (2009) é um ponto chave para a conversão de HMF para FDM, a forma não tóxica para os microrganismos. Além disso, Modig *et al.* (2008) relata que a condução por batelada alimentada em estudos relacionados à bioconversão de compostos inibidores consiste em uma adaptação a curto prazo (aclimatação), que proporciona o aumento da expressão de genes e de atividades de enzimas que potencializam o metabolismo e regeneração de NADH e NADPH, favorecendo o metabolismo Redox, que resulta no aumento da taxa de conversão de HMF e na tolerância à este composto inibidor, como mostrado neste estudo.

Estes resultados mostraram-se animadores e sinalizam para estudos futuros com a linhagem de levedura aclimatada e com altas taxas de conversão em hidrolisados mais concentrados, visando favorecer o metabolismo fermentativo.

Adicionalmente, foi demonstrada a importância de se realizar a etapa de propagação celular também em hidrolisado algal, conferindo aclimatação às células e desta forma potencializando a sua tolerância ao HMF, expressa na sua habilidade de converter este composto furânico. Os resultados aqui relatados mostram que é factível produzir células de levedura a partir de hidrolisado de *K. alvarezii* sem destoxificação em presença de 10 g/L de HMF, não sendo ainda constatada a concentração máxima inibitória para esta linhagem.

Diante dos diferentes tipos de estratégia que visam contrapor os efeitos causados por compostos inibidores, esquematizados na **Figura 5.22**, têm sido crescentes os estudos em torno do consumo de compostos inibidores em hidrolisados oriundos de materiais lignocelulósicos, sendo estudada a adaptação da linhagem em curto prazo, como mencionado previamente, e em longo prazo, que envolve transferências sequenciais e seleção de resistentes ou manipulação genética em torno da atividade de álcool desidrogenases e do fluxo dos cofatores NADH e NADPH.

Moon & Liu (2012), através da manipulação genética, observaram crescimento celular ao submeter as leveduras mutantes a 3,78 g/L de HMF, comparando com culturas não manipuladas em que não foi observado crescimento celular em meio sintético. Sehnem *et al*. (2013), em condições de limitação de oxigênio, reportaram a conversão de 5 g/L de HMF em 30 horas ao submeter linhagens mutantes a meio sintético contendo HMF.

Sendo assim, este presente trabalho foi pioneiro ao transpor a estratégia de estimular e potencializar o consumo de HMF pela linhagem de levedura estudada, para estudos com etanol 3G. Estratégia esta, possibilitada e favorecida pela baixa especificidade de enzimas álcool desidrogenases, presentes na linhagem em estudo, capazes de também reduzir compostos inibidores como HMF além de subtratos específicos para sua atividade.

Desta forma, a diminuição da toxicidade do HMF através do co-metabolismo mostrou-se promissora para o hidrolisado algal já que, diferentemente do hidrolisado lignocelulósico, que é composto por diferentes tipos de inibidores, o hidrolisado da carragenana possui predominantemente HMF. Ressalta-se também a influência

exercida pela aclimatação celular e pelo modo de condução por batelada alimentada para tolerância a este composto.

Espera-se que o tempo de oito horas observado para redução de 10 g/L de HMF possa ser reduzido ao submeter as linhagens a estudos de tolerância mediante a concentrações superiores de HMF, como também, de transferências sequenciais, ao aumentar o inóculo nas etapas de aclimatação, ao melhor entender a influência exercida pela aeração, ao estudar estratégias que favoreçam o fluxo de cofatores e ao testar outros modos de condução de bioprocessos como o contínuo.

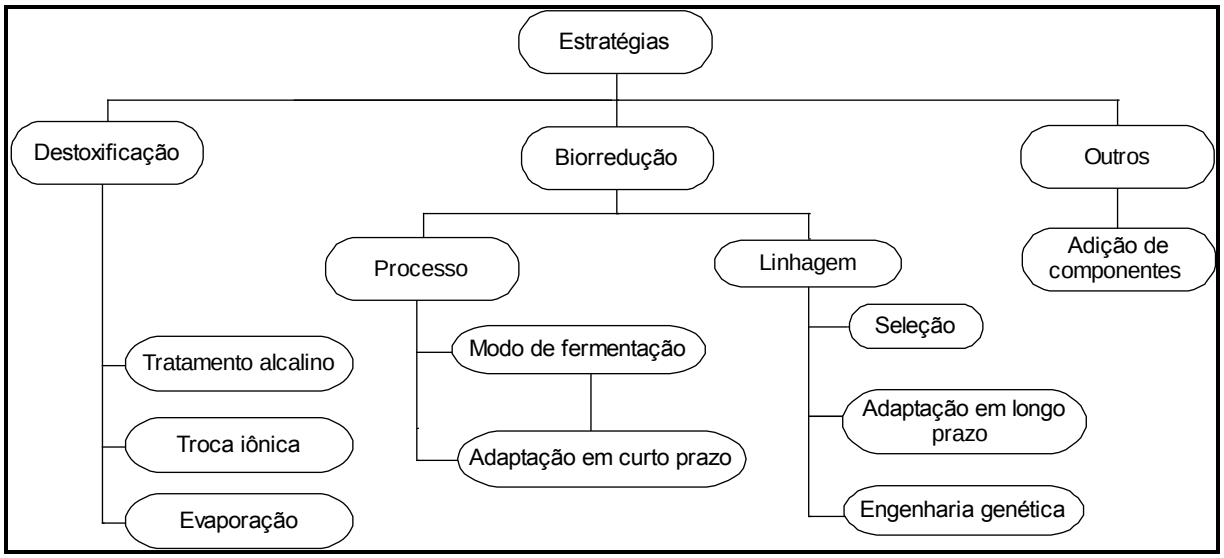


Figura 5.22 - Diferentes estratégias para superar efeitos inibitórios causados por furaldeídos. Fonte: Adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2009.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Baseando-se nos resultados obtidos na presente dissertação de mestrado, pode-se concluir que:

- Nas condições avaliadas de tempo e temperatura, a extração aquosa da carragenana foi mais eficiente que a alcalina. No entanto, a extração da carragenana não exerceu influência positiva para posterior hidrólise ácida, que justifique o custo para inclusão desta etapa;
- As condições ideais de hidrólise ácida da carragenana para obtenção de galactose também proporcionam a formação de HMF, através da análise do planejamento experimental Fatorial 2^4 completo;
- A maior eficiência de hidrólise ácida (84,14%) foi obtida na condição: 0,8% de ácido sulfúrico; 120°C; 1 hora; relação S:L de 1:10 (g:mL), que resultou em 25,24 g/L de galactose e 8,86 g/L de HMF;

- A condição mais adequada para obtenção de altas concentrações de galactose consistiu em: 0,8% de ácido sulfúrico; 120°C; 1 hora; relação S:L de 1:2,5 (g:mL) ou 320,7 (g/L), que resultou em 87,4 g/L de galactose e 28,68 g/L de HMF com uma eficiência de hidrólise de 75,53%;
- A galactose resultante da lavagem da fração sólida, constituída de 42,28 g/L de galactose e 15,46 g/L de HMF pode ser utilizada para produção de células, diluindo-se 2x o lavado, sem necessidade de destoxificação do mesmo;
- Nos ensaios em frascos, a etapa de aclimatação exerceu influência positiva para a tolerância da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782 à aproximadamente 8 g/L de HMF;
- Os resultados foram reproduzidos em escala de biorreator instrumentado, no qual se observou em batelada simples a produção em torno de 4,0 g/L de células em 40 horas de incubação e em batelada alimentada 7,33 g/L (8 g em massa) em 96 h de processo;
- A batelada alimentada proporcionou uma adaptação a curto prazo ao HMF, sendo evidenciada o aumento de Q_x e de Q_{HMF} (1,334 $g.L.h^{-1}$) ao decorrer das alimentações, em que foi evidenciado o consumo em 8 horas de 10 g/L de HMF;
- A produção de células foi afetada pela repressão do metabolismo oxidativo durante as alimentações e estímulo ao metabolismo fermentativo ainda que em aeração;
- Obteve-se 8 g de células aclimatadas e em alta atividade metabólica mesmo que em presença de 10 g/L de HMF sendo sugestiva a capacidade de consumo deste composto inibidor em metabolismo fermentativo já que houve produção de 6,38 g/L de etanol;
- Realizar o cultivo celular a partir do hidrolisado com composição semelhante ao utilizado na etapa fermentativa pode funcionar como estratégia de aclimatação e proporcionar entendimento dos mecanismos de tolerância da linhagem em processos metabólicos distintos;

- A estratégia de potencializar o consumo de HMF por linhagens tolerantes e capazes de co-metabolizar este composto inibidor pode ser promissora para estudos de viabilização do Etanol 3G;
- O método de quantificação de HMF por espectrofotometria de UV demonstrou-se simples, rápido com boa reprodutibilidade, mediante a análise confirmatória por CLAE;

SUGESTÕES

- Avaliar a concentração letal de HMF para a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782;
- Submeter as células aclimatadas à condições de fermentação para produção de etanol a partir do hidrolisado algal;
- Avaliar influência da aeração no consumo de HMF;
- Aumentar o inóculo nas etapas de aclimatação, com células mantidas em hidrolisado agarizado contendo HMF;
- Incluir novas etapas de aclimatação;
- Realizar estudo de adaptação em longo prazo com transferências sequenciais e seleção de linhagens resistentes;
- Avaliar condições metabólicas e de composição do meio que possam favorecer o fluxo de cofatores (NADH e NADPH);
- Avaliar outros modos de condução de bioprocessos como o contínuo;
- Incluir ensaios complementares de avaliação do método de quantificação de HMF por espectrofotometria de UV;
- Realizar estudos com microrganismos produtores de *kappa*-carragenases (EC 3.2.1.83)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKILLIOGLU, H. G.; MOGOL, B. A.; GOKMEN, V. Degradation of 5-hydroxymethylfurfural during yeast fermentation. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess,** Volume 28 (12), Pg. 1629-35, 2011.

ALMEIDA, J. R. Roder, A., Modig, T., Laadan, B., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M. F., NADH-vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in Saccharomyces cerevisiae. **Appl Microbiol Biotechnol**, Volume 78 (6), Pg. 939-45, 2008.

ALMEIDA, J. R., BERTILSSON, M., GORWA-GRAUSLUND, M. F., GORSICH, S., LIDÉN, G., Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Volume. 82 (4), Pg. 625-638, 2009.

ANASTASAKIS, K. & ROSS, A. B. Hydrothermal liquefaction of the brown macro-alga Laminaria saccharina: effect of reaction conditions on product distribution and composition. **Bioresour Technol**. Volume 102 (7). Pg. 4876-4883. 2011.

BARCELOS, C. A., **Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench] para a produção de bioetanol**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

BASSO, T. O. **Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, 2011.

BETANCUR, G.J.V., **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010.

Bio-Rad Laboratories, Inc. Aminex HPX-87P Column #125-0098. 2p. s/a.

BORINES, M. G., LEON, R. L., MCHENRY, M. P., Bioethanol production from farming non-food macroalgae in Pacific island nations: Chemical constituents, bioethanol yields, and prospective species in the Philippines, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Volume 15 (9), Pg. 4432-4435, 2011.

BRASIL, República Federativa do. **Energia no Brasil: garantia de oferta, visão inovadora e oportunidades de investimentos**. Secretaria de Comunicação Social, Presidência da República, 2009, disponível em http://www.brasil.gov.br/navegue_por/noticias/textos-de-referencia/garantia-de-oferta-visao-inovadora-e-oportunidades-de-investimentos, Acesso em: 27/12/2012.

BRENDA-ENZYMES, Número EC 3.2.1.83, http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.83&organism=; Acessado em 09/04/2013.

CHENG, J. J. & TIMILSINA, G. R., Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review, **Renewable Energy**, Volume 36 (12), Pg. 3541-3549, 2011.

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - **Química verde no Brasil: 2010-2030** – Edição revista e atualizada, Brasília - DF, 2010.

COLGAN, J., Oil and resource-backed aggression, **Energy Policy**, Volume 39 (3), Pg. 1669-1676, 2011.

COSTA, A. C. A.; PEREIRA JR., N. & ARANDA, D. A. G., The situation of biofuels in Brazil: New generation technologies, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Volume 14 (9), Pg. 3041-3049, 2010.

DAROCH, M., GENG, S. & WANG, G., Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks, **Applied Energy**, Volume 102, Pg. 1371-1381, 2013.

DAVIES, S. M., LINFORTH, R. S., WILKINSON, S. J., SMART, K. A., COOK, D. J., Rapid analysis of formic acid, acetic acid, and furfural in pretreated wheat straw hydrolysates and ethanol in a bioethanol fermentation using atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, **Biotechnol Biofuels**, Volume 4 (1), Pg. 28, 2011.

DEMIRBAS, A., Biofuels securing the planet's future energy needs, **Energy Conversion and Management**, Volume 50 (9), Pg. 2239-2249, 2010.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**. Volume 51 (12). Pg. 2738-2749. 2010.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**. Volume 88 (10). Pg. 3473-3480. 2011.

DIAS, M. O. S., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROCHA, G. J. M., PRADELLA, J. G. C., ROSSELL, C. E.V., FILHO, R. M., BONOMI, A., Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production?, **Bioresource Technology**, Volume 102 (9), Pg. 8964-897, 2011.

ELLIS, J. T., HENGGE, N. N., SIMS, R. C., MILLER, C. D., Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae, **Bioresour Technol**, Volume 111, Pg. 491–495, 2012.

FACCINI, A., L., X Simpósio de Biologia Marinha da Unisanta, 2007.

FALSHAW, R. & FURNEAUX, R. H., The Structural Analysis of Disaccharides from Red Algal Galactans by Methylation and Reductive Partial Hydrolysis. **Carbohydrate Chemistry**, Volume 269, Pg. 183-189, 1995.

FERREIRA, V., **Produção de β-glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

FREILE-PELEGRÍN, Y. *&* ROBLEDO, D., Carrageenan of Eucheuma isiforme (Solieriaceae, Rhodophyta) from Nicaragua, **J Appl Phycol**, Volume 20 (5), Pg. 87-91, 2007.

GALDOS, M., CAVALETT, O., SEABRA, J. E. A., NOGUEIRA, L. A. H., BONOMI, A., Trends in global warming and human health impacts related to Brazilian sugarcane ethanol production considering black carbon emissions, **Applied Energy**, Volume 104, Pg. 576-582, 2013.

GOH, C. S.; LEE, K. T. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Volume 14 (2), Pg. 842-848, 2010.

HARGREAVES, P. I., BARCELOS, C. A., DA COSTA, A. C., PEREIRA JR., N., Production of Ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of Different Process Strategies. **Bioresource Technology**, 2013. ISSN0960-8524. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413002162.

HAYASHI, L. OLIVEIRA, E. C., BLEICHER-LHONNEUR, G., BOULENGUER, P., PEREIRA, R. T. L., SECKENDORFF, R., SHIMODA, V. T., LEFLAMAND, A., VALLÉE, P., CRITCHLEY, A. T., The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. **Journal of Applied Phycology**, Volume 19 (5), Pg. 505-511, 2007.

HAYASHI, L. **Contribuição à Maricultura da alga Vermelha Kappaphycus alavrezzi (Rodophyta, Sloieriaceae) para Produção de Carregenana.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2007.

HELENO, F. F., Lima, A. C., Afonso, R. J. C. F., Coutrim, M. X., Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. **Química Nova**, Volume 33, Pg. 329-336, 2010.

HENARES, B. M., ENRIQUEZ, E. P., DAYRIT, F. M., ROJAS, N. R. L**,** Iota-carrageenan hydrolysis by Pseudoalteromonas carrageenovora IFO12985, **Philippine Journal of Science**, Volume 139 (2), Pg.131-138, 2010.

IEA (International Energy Agency), **World Energy Outlook**, Paris: OECD/IEA, 2009.

IEA (International Energy Agency), **World Energy Outlook**, Paris: OECD/IEA, 2012.

JOHN, R. P., ANISHA, G. S., NAMPOOTHIRI, K., MADHAVAN PANDEY, A., Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol, **Bioresource Technology**, Volume 102 (1), Pg. 186-193, 2011.

JONES, C. S.; MAYFIELD, S. P. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. **Current Opinion in Biotechnology,** Volume 23 (3), Pg. 346-351, 2012.

JORDAN, D. B., BRAKER, J. D., BOWMAN, M. J., VERMILLION, K. E., MOON, J., LIU, Z. L., Kinetic mechanism of an aldehyde reductase of *Saccharomyces cerevisiae* that relieves toxicity of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. **Biochim Biophys Acta**, Volume 1814 (12), Pg. 1686-94, 2011.

JUNG, K. A. LIM, S-R, KIM, Y., PARK, J. M., Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery, **Bioresource Technology**, ISSN 0960-8524, 2012.

KAZI, F. K., FORTMAN, J. A., ANEX, R. P., HSU, D. D., ANDY, A., DUTTA, A., KOTHANDARAMAN, G., **Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover, Fuel**, Volume 89,(1), Pg. S20-S28, 2010.

KHAMBHATY, Y., MODY, K., GANDHI, M. R., THAMPY, S., MAITI, P., BRAHMBHATT, H., ESWARAN, K., GHOSH, P. K., Kappaphycus alvarezii as a source of bioethanol, **Bioresour Technol**, Volume 103,(1), Pg. 180-5, 2012.

KIM, N. J., LI, H., JUNG, K., CHANG, H. N., LEE, P. C., Ethanol production from marine algal hydrolysates using Escherichia coli KO11, **Bioresour Technol**. Volume 102 (16), Pg. 7466-9, 2011.

KOH, L. P. & JABOURY G., Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities, **Biological Conservation**, Volume 141 (10), Pg. 2450-2460, 2008.

KÖNE, A. Ç. & BÜKE, T., Forecasting of CO2 emissions from fuel combustion using trend analysis, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Volume 14 (9), Pg. 2906-2915, 2010.

LECHAT, H., AMAT, M., MAZOYER, J., GALLANT, D. J., BULÉON, A., Lahaye, M., Cell wall composition of the carrageenophyte Kappaphycus alvarezii (Gigartinales, Rhodophyta) partitioned by wet sieving. **Journal of Applied Phycology**, Volume 9 (6), Pg. 565-572, 1997.

LEE, S-M. & LEE, J-H., Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Volume 18 (1), Pg. 16-18, 2012.

LEE, S., OH, Y., KIM, D., KWON, D., LEE, C., LEE, J., Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic Escherichia coli strains. **Appl Biochem Biotechnol**, Volume 164, Pg. 878–88, 2011.

LI, J., ZHENG, X-Y., FANG, X-J., LIU, S-W., CHEN, K-Q., JIANG, M., WEI, P., OUYANG, P-K., A complete industrial system for economical succinic acid production by Actinobacillus succinogenes, **Bioresource Technology**, Volume 102 (10), Pg. 6147-6152, 2011.

LIU, Z. L., SLININGER, P. J., DIEN, B. S., BERHOW, M. A., KURTZMAN, C. P., GORSICH, S. W., Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **J Ind Microbiol Biotechnol**, Volume 31 (8), Pg. 345-52, 2004.

LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; GORSICH, S. W. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. **Appl Biochem Biotechnol**, Volume 121-124, Pg. 451-60, 2005.

LIU, Z. L. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. **Appl Microbiol Biotechnol**, Volume 73 (1), Pg. 27-36, 2006.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology,** Volume 90 (3), Pg. 809-825, 2011.

LOUREIRO, P., **Avaliação do potencial de Kappaphycus alvarezii como matéria-prima para a produção de etanol de terceira geração**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J., PÉREZ, M. S. **Biología de los microorganismos: Brock**. Décima edição. Editora: Pearson, Préntice Hall. Capítulo 5: Nutrición, cultivo y metabolismo microbiano. Pg. 120, 2003.

MAEDA, R.N., **Produção de Celulases por Penicillium funiculosum em Fermentação Submersa de Bagaço de Cana Pré-Tratado e sua aplicação na Produção de Etanol de 2ª Geração**, Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

MAPA/SPAE - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Balanço nacional de cana-de-açúcar e agroenergia**, Secretaria de Produção e Agroenergia, Brasília, 2007.

MARTÍN, C. & JÖNSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of Saccharomyces and Zygosaccharomyces to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, Volume 32 (3–4), Pg. 386-395, 2003.

MEINITA, M., HONG, Y-K., JEONG, G-T., Detoxification of acidic catalyzed hydrolysate of Kappaphycus alvarezii (cottonii), **Bioprocess and Biosystems Engineering,** Volume 35 (1), Pg. 93-98, 2012.

MEINITA, M., KANG, J-Y., JEONG, G-T., KOO, H., PARK, S., HONG, Y-K., Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte Kappaphycus alvarezii (cottonii), **J Appl Phycol**, volume 24 (4), Pg. 857-862, 2012.

MILANEZ, A. Y. & NYKO, D. O futuro do setor sucroenergético e o papel do BNDES, **BNDES 60 anos: perspectivas setoriais**, Volume 2, Pg. 62, 2012.

MICHEL, G., CHANTALAT, L., DUEE, E., BARBEYRONT, H. B,. KLOAREG, B., DIDEBERG, O., The kappa-carrageenase of *P.* carrageenovora features a tunnel-shaped active site: A novel insight in the evolution of clan-B glycoside hydrolases, **Structure**, Volume 9 (6), Pg.513-25, 2001.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, Empresa de Pesquisa Energética. **Plano Decenal de Expansão de Energia 2020**, Brasília: MME/EPE, 2011.

MODIG, T., ALMEIDA, J. R., GORWA-GRAUSLUND, M. F, LIDÉN, G. Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. **Biotechnol Bioeng**. Volume 100. Pg. 423–429, 2008.

MONTOLALU, I. R., TASHIRO, Y., MATSUKAWA, S., OGAWA, H., Effects of extraction parameters on gel properties of carrageenan from Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta), **Journal of Applied Phycology**, Volume 2, Pg. 71-76, 2009.

MOON, J. & LIU, Z.L. Engineered NADH-dependent GRE2 from *Saccharomyces cerevisiae* by directed enzyme evolution enhances HMF reduction using additional cofactor NADPH. **Enzyme Microb Technol**, Volume 50 (2), Pg. 115-20, 2012.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y. Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, **Bioresour. Technol**, Volume 96(6), Pg. 673-86, 2005.

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**, Volume 28 (6), Pg. 817-830, 2010.

NAIK, S.N., GOUD, V. V., ROUT, P. K., DALAI, A. K., Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, **Renewable and Sustainable Energy** Reviews, Volume 14 (2), Pg. 578-597, 2010.

NAJAFI, G., GHOBADIAN, B., YUSAF, T. F., Algae as a sustainable energy source for biofuel production in Iran: A case study, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Volume 15 (8), Pg. 3870-3876, 2011.

NICHOLS, N. N., DIEN, B. S., COTTA, M. A., Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors, **Bioresour Technol**., Volume 101 (19), Pg. 7545-50, 2010.

NOGUEIRA, L. A. H., Bioetanol de cana-de-açúcar. **Energia para o desenvolvimento sustentável**. Organização BNDS e CGEE, Rio de Janeiro, 2008.

OKUDA, N., SONEURA, M., NINOMIYA, K., KATAKURA, Y., SHIOYA, S., Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using Ureibacillus thermosphaericus for bioethanol production, **J Biosci Bioeng**, Volume 106 (2), Pg. 128-33, 2008.

ONDAS BIOMAR (Em: <http://www.ondasbiomar.com.br/?page_id=375>. Acesso em: 07/04/2013).

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD/ITF), Reducing transport greenhouse gas emissions, **Trends & Data**, 2010.

OSTERGAARD, S., OLSSON, L., JOHNSTON, M., NIELSEN, J., Increasing galactose consumption by *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering of the GAL gene regulatory network. **Nat. Biotechnol**, Volume 18, Pg. 1283–1286, 2000.

OWEN, N, A., INDERWILDI, O. R., KING, D. A., The status of conventional world oil reserves—Hype or cause for concern?, **Energy Policy**, Volume 38 (8), Pg. 4743-4749, 2010.

PACHECO, T. F., **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Uberlândia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2010.

PARK, J-H., YOON, J-J., PARK, H-D., LIM, D. J., KIM, S-H, Anaerobic digestibility of algal bioethanol residue. **Bioresource Technology**, Volume 113, Pg. 78-82, 2012. ISSN 0960-8524.

PATENTE Nº WO2010/076552 A1. MAEDA, R. N., PEREIRA JUNIOR, N., SANTA ANNA, L. M. M., CASTRO, A. M., GOMES, A. C., MENEZES, E. P., SILVEIRA, C. J. G., MOYSES, D. N., DEIRA, L. F. M. **Process for production of an enzymatic preparation for hydrolysis of cellulose from lignocellulosisc residues and application thereof in the procduction of ethanol**. Brasil. Data de depósito: 22/12/2009.

PEREIRA JR., N., **Investigation of D-xylose fermenting yeast**. *Ph.D.* Thesis. Deparment of Chemistry. The University of Manchester, U.K, 1991.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M., Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **In Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, Volume 2, 45 p, 2008.

PEREIRA JR, N. ; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Séries em Biotecnologia: Tecnologia de Bioprocessos**.Rio de Janeiro: Copiadora Amiga dos Estudantes Ltda, Volume 1, 62 p, 2008.

PETERSSON, A. ALMEIDA, J. R. MODIG, T., KARHUMAA, K., HAHN-HAGERDAL, B., GORWA-GRAUSLUND, M. F., LIDEN, G., A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. **Yeast**, Volume 23 (6), Pg. 455-64, 2006.

RAMOS, C.E.P., **Produção de Bioetanol de Terceira Geração: Aproveitamento da Biomassa Algal**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

REIS, G. B., **Simulação e controle do processo de produção de levedura**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, 2009.

RETTORI, D. & VOLPE, P. L. O., Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da Saccharomyces cerevisiae. **Química Nova**, Volume 23, Pg. 257-261, 2000.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Global Ethanol Production to Reach 85.2 Billion Litres in 2012**. Disponível em http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanol-production-to-reach-85.2-billion-litres-in-2012/. Acesso em 22/05/2013.

ROSA, S. E. S. & GARCIA, J. L. F., **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades**, Revista do BNDES 32, 2009. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev3204.pdf , Acesso em: 07/01/2013.

RUSSO D., DASSISTI M., LAWLOR V., OLABI A. G., State of the art of biofuels from pure plant oil, Renewable and Sustainable, **Energy Reviews**, Volume 16 (6), Pg. 4056-4070, 2012.

SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P., MEDEIROS, A. B., KARP, S. G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L. P., PITARELO, A. P., FERREIRA-LEITÃO, V., GOTTSCHALK, L. M., FERRARA, M. A., DA SILVA BOM, E. P, DE MORAES, L. M, ARAÚJO, J. D. E. A., TORRES, F. A., Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil, **Bioresour Technol**, Volume 101(13), Pg. 4820-5, 2010.

SHAFIEE S. & TOPAL E., When will fossil fuel reserves be diminished? **Energy Policy**. Volume 37 (1). Pg.181-189, 2009.

SEHNEM, N. T., DA SILVA MACHADO, A., LEITE, F. C., DE BARROS PITA, W., DE MORAIS, M. A, JR., AYUB, M. A. 5-Hydroxymethylfurfural induces ADH7 and ARI1 expression in tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. **Bioresour Technol**. Volume 133. Pg. 190-6, 2013.

SIMS, R. E. H., MABEE, W., SADDLER, JACK. N., TAYLOR, M., **An overview of second generation biofuel technologies**, Bioresource Technology, Volume 101 (6), Pg. 1570-1580, 2010.

STÖCKER, M. Biofuels and Biomass-To-Liquid Fuels in the Biorefinery: Catalytic Conversion of Lignocellulosic Biomass using Porous Materials. **Angew. Chem**. Volume 47 (48), Pg. 9200–9211, 2008.

TAN, H. T., LEE, K. T., MOHAMED, A. R., Second-generation bio-ethanol (SGB) from Malaysian palm empty fruit bunch: Energy and exergy analyses, **Bioresource Technology**, Volume 101 (14), Pg. 5719-5727, 2010.

TAN, I. S., LAM, M. K., LEE, K. T., Hydrolysis of macroalgae using heterogeneous catalyst for bioethanol production. **Carbohydrate Polymers**, Volume 94 (1), Pg. 561-566, 2013.

TIAN, S., ZHU, J., YANG, X., Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood. **Applied Energy,** Volume 88 (5), Pg. 1792-1796, 2011.

TOLMASQUIM, M. T., Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. **Estud. av**., Volume 26 (74), Pg. 247-260, 2012.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 10th ed. Part one: Fundamentals of Microbiology, chapter 5: Microbial Metabolism. Pg. 124, 2010.

SERPA, V. I., **Estudos moleculares e estruturais de enzimas do complexo celulolítico do fungo *Trichoderma harzianum* com potencial na transformação enzimática da biomassa**. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, USP, 2012.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, Volume 2, capítulo 8. Pg. 185, 2001.

SILVEIRA, C. F. S., **Monitoramento Tecnológico de Ésteres de Sacarose**, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2011.

SINGHANIA, R. R., SUKUMARAN, R. K., PATEL, A. K., LARROCHE, C., PANDEY, A., Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases, **Enzyme and Microbial Technology**, Volume 46 (7), Pg. 541-549, 2010.

VAN DEN BRINK, J., DARAN-LAPUJADE, P., PRONK, J. T., DE WINDE, J. H., New insights into the *Saccharomyces cerevisiae* fermentation switch: Dynamic transcriptional response to anaerobicity and glucose-excess, **BMC Genomics**, Volume 9, Pg. 100, 2008.

VAN DEN BRINK, J., AKEROYD, M., VAN DER HOEVEN, R., PRONK, J.T., DE WINDE, J.H., DARAN-LAPUJADE, P., Energetic limits to metabolic flexibility: responses of *Saccharomyces cerevisiae* to glucose-galactose transitions**, Microbiology**, Volume 155 (4), Pg. 1340-50, 2009.

VILLARREAL, M. L. M., PRATA, A. M. R., FELIPE, M. G. A., ALMEIDA E SILVA, J. B., Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by Candida guilliermondii. **Enzyme and Microbial Technology,** Volume 40 (1), Pg. 17-24, 2006.

WIRATNI, S. D., FAHRURROZI, M. & ROCHMADI, S.U, Carrageenan Properties Extracted From Eucheuma cottonii, Indonesia, **World Academy of Science, Engineering and Technology**, Volume 54, 2011.

YANAGISAWA, M., NAKAMURA, K., ARIGA, O., NAKASAKI, K., Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides, **Process Biochemistry**, Volume 46 (11), Pg. 2111–2116, 2011.

ZHANG, C. CHAI, X. S., LUO, X. L., FU, S. Y., ZHAN, H. Y., Rapid method for determination of furfural and 5-hydroxymethyl furfural in pre-extraction stream of biomass using UV spectroscopy. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, Volume 30 (1), Pg. 247-50, 2010.

ZÚÑIGA, Ú. F. R. **Desenvolvimento de um Bioprocesso para Produção de Celulases Específicas na Cadeia Produtiva do Etanol de Segunda Geração**. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Amb) - Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 2010.