



2015

Produção de bioetanol a partir de *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Phaeophyceae)

Raphaella P.C. Nazaré



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Produção de bioetanol a partir de *Sargassum muticum* (Phaeophyceae)

Raphaella Piedade Corrêa Nazaré

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Produção de bioetanol a partir de *Sargassum muticum* (Phaeophyceae)

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Leonel Carlos dos Reis Tomás Pereira (Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Jorge Manuel Tavares Branco Varejão (Escola Superior Agrária de Coimbra)

Raphaela Piedade Corrêa Nazaré

2015

Pensa! O pensamento tem poder.
Mas não adianta só pensar.
Você também tem que dizer! Diz!
Porque as palavras têm poder.
Mas não adianta só falar.
Você também tem que fazer! Faz!

Porque você só vai saber se o final vai ser feliz depois que tudo acontecer.

(Gabriel O Pensador, trecho da música *Se liga aí!*)

“À minha Mãe, exemplo de fé e batalha, que não largou a minha mão nas horas mais difíceis, ao Lod, minha metade e, quem primeiro me incentivou e me sustentou na tentativa deste mestrado e à Sophia, minha neguinha e cereja no topo do bolo”

AGRADECIMENTOS

No término de mais uma etapa não posso deixar de agradecer a todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para o sucesso da mesma.

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Leonel Pereira, meu orientador, por ter sido o primeiro a acreditar e investir neste trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge Varejão, meu co-orientador, pela paciência e companheirismo em laboratório. Sei que ainda lhe devo um bolo de chocolate!

Ao IMAR – Instituto do Mar, pela disponibilização do equipamento para as fermentações, sem esta etapa fundamental a finalização deste trabalho não seria possível.

Ao Senhor Zé, meu anjo da guarda no Botânico e que por intermináveis situações consegui os materiais que necessitei.

A todos os “filhos do Leonel”, que estiveram pelo laboratório em meio a alegrias, dificuldades e muito trabalho.

A todos os Tugas meus colegas da UC, por todas as histórias que levarei sempre comigo, nas imitações do “brasileirês” pelos corredores e cantinas.

À minha Mãe que durante todo este tempo esteve firme e forte ao meu lado, mesmo quando tudo parecia correr mal e agora que também serei mãe só consigo lhe admirar, amar e agradecer mais ainda a Deus que dentre tantos ventres me colocou no seu. Melhor não poderia ter sido!

Ao Lodney, meu esposo, que me incentivou, me deu um mega apoio para à candidatura deste mestrado, por suas correções dos meus vícios de escrita, mesmo depois de tantos desafios continua ao meu lado e agora será mais conhecido como o pai da Sophia.

À minha família que mesmo a distância me apóia e se preocupa com o andamento das coisas por cá.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas e Anexos	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1. Considerações Gerais	3
1.2. Utilização atual	3
1.2.1. Setor alimentar	4
1.2.2. Indústria têxtil e farmacêutica	5
1.2.3. Energética	5
1.2.4. Biocombustíveis: evolução da 1ª a 3ª geração	6
1.3. Taxonomia da Família Sargassaceae	10
1.3.1. <i>Sargassum muticum</i> (Yendo) Fensholt 1955	11
1.4. Contextualização do trabalho e objetivos	13
2. Material e Métodos	16
2.1. Amostras	17
2.2. Extração de Polissacarídeos	17
2.2.1. Extração Titulimétrica (Adaptado de Cameron, Ross e Percival, 1948)	17
2.2.2. Extração Simplificada de Ficocolóides (Adaptada de Pereira, 2011)	18
2.3. Degradação de Polissacarídeos	19
2.3.1. Hidrólise Ácida (Variação 1)	19
2.3.2. Hidrólise Ácida (Variação 2)	20
2.3.3. Hidrólise Enzimática	20
2.4. Fermentação	20
2.5. Análises	21
2.5.1. Determinação aproximada do Teor de Hidratos de Carbono por medição do índice de refração (BRIX).....	21

2.5.2.	Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	22
2.5.3.	Determinação de Etanol por Cromatografia Gasosa (GC)	22
3.	Resultados e Discussão	26
3.1.	Extração/hidrólise de hidratos de carbono	27
3.1.1.	Extração simplificada de polissacarídeos	27
3.1.2.	Método Enzimático e Ácido	27
3.2.	Fermentação de hidrolisados	29
3.2.1.	Análise de resultados	30
3.2.2.	Condições não sépticas e eventual presença de inibidores	31
4.	Conclusões e Perspectivas Futuras	36
4.1.	Conclusões	37
4.2.	Perspectivas Futuras	38
5.	Referências Bibliográficas	41
6.	Anexos	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aplicação das algas e seus derivados nos diversos setores industriais

Figura 2: Utilizações atuais das algas para geração de energia elétrica.

Figura 3: Perspectiva sobre os biocombustíveis segundo a mídia mundial.

Figura 4: subprodutos resultantes da hidrólise ácida do ácido algínico em algas da classe Phaeophyceae, as quais apresentam predominância deste composto.

Figura 5: mapa ilustrativo com as zonas de maior incidência dos gêneros *Sargassum* e *Turbinaria* nos mares do planeta.

Figura 6: “Mar de Sargaço” nas águas da Ilha do Marajó, Norte do Brasil, banhada pelo oceano Atlântico.

Figura 7: Localização geográfica da Praia de Buarcos onde as amostras de *S. muticum* foram colhidas.

Figura 8: Etapas da Extração Titulimétrica.

Figura 9: Etapas da Simplificada de Ficolóides.

Figura 10: Amostras após a realização das hidrólises adotadas.

Figura 11: Agrupamento das amostras para fermentação segundo o tipo de hidrólise sofrida.

Figura 12: Tratamento das amostras para HPLC.

Figura 13: Preparação das alíquotas para GC.

Figura 14: Cromatogramas por HPLC dos hidrolisados com H₂SO₄ a 2,5%, 3% e 5%.

LISTA DE TABELAS E ANEXOS

Tabela I: Produção de energia e eficiência fotossintética de diferentes fontes de biomassa.

Tabela II: Controle das amostras e o tipo de hidrólise sofrida.

Tabela III: Composição do meio de crescimentos para incubação.

Tabela IV: Composição aproximada do *Sagarssum muticum*.

Tabela V: Teores de hidratos de carbono em hidrolisados de *Sargassum muticum*.

Tabela VI: Teor de etanol nos hidrolisados de *Sagarssum muticum*.

Tabela VII: Percentagem de conversão da biomassa de *S. muticum* em etanol.

Anexo A: Gráfico do teor de etanol dos hidrolisados com H₂SO₄ 3%, 4,5% e 5%.

Anexo B: Gráfico da evolução da percentagem (%) diária de produção de etanol em cada amostra utilizada em fermentação.

Anexo C: Tabela de procedimentos realizados durante o pré-tratamento e fementação dos hidrolisados.

RESUMO

Sagarssum muticum é membro da ordem *Fucales*, da família Sargassaceae, e do gênero *Sagarssum*. Esta espécie é um potencial competidor e substituto de membros de *Laminariales* e *Fucales* que, em suas comunidades, são considerados como espécies chaves ou críticas. As macroalgas têm como um dos seus constituintes predominantes, os polissacarídeos, onde os principais são: alginato, ágar e carragenanas, assim a classe Phaeophyceae, apresenta especial predominância do ácido algínico, que através de hidrólise ácida destaca subprodutos como a glicose, a fucoídano e o ácido algínico, sendo este último um polímero linear que apresenta resíduos do ácido β -D manorônico, assemelhando-se desta forma à pectina e à celulose, que ao sofrerem fermentação permitem a produção de bioetanol.

As amostras de *Sargassum muticum* foram submetidas a extração de polissacarídeos, sacarificação ácida e enzimática, fermentação com *S. cerevisiae* e analisadas por HPLC e CG para monitoração dos índices de etanol.

Os maiores teores de açúcares foram encontradas nas sacarificações realizadas com H_2SO_4 a 5%, seguida por 2,5% e 3%. Entre os hidrolisados submetidos a fermentações com *Saccharomyces cerevisiae*, obteve-se os maiores teores de produção de etanol. Já as que apresentaram os menores índices foram as amostras H_2SO_4 a 4% e as que receberam sacarificação por celulase.

O baixo desempenho das fermentações dos hidrolisados com celulase pode ter sido influenciado pela baixa atividade da enzima (1,44U/mg), se comparada com as celulases comercializadas atualmente (atividade igual ou superior a 700 U/mg). Neste trabalho, foram analisadas e contabilizadas por Cromatografia Gasosa, a presença de etanol que mostrou de forma clara resultados compatível com taxa de produção de etanol observada nos hidrolisados com H_2SO_4 a 2,5% e 4% (variação 2), pois, estes são os únicos a apresentar valores acima de 50%, distanciando-se do percentual dos demais hidrolisados.

Palavras-chave: *S. muticum*, bioetanol, hidrólises, fermentação.

ABSTRACT

Sagarssum muticum is member of the Fucales Order, Sargassaceae Family, and *Sagarssum* Genus. This species is a potential competitor and substitute of the Laminariales and Fucales members that in their communities, they are considered key species or critical. The macroalgae have as one of its predominant constituent, polysaccharides, where the main ones are: alginate, agar and carrageenan. thus the class Phaeophyceae, presents special predominance of alginic acid, which by acid hydrolysis by-products out as glucose, and fucoïdano alginic acid, the last being a linear polymer having residues of the β -D manorônico acid, thus resembling the pectin and cellulose that undergo fermentation to allow the production of bioethanol.

The samples of the *S. muticum* were subjected to extraction of polysaccharides, acidic and enzymatic saccharification, fermentation with *S. cerevisiae* and analysed by HPLC and GC to monitor levels of ethanol.

The higher sugar content were found in sacarificações performed with 5 % H₂SO₄, followed by 2.5% and 3%. Among the hydrolysates subjected to fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, the highest levels of ethanol production was obtained. Those that had the lowest rates were samples H₂SO₄ 4% and those receiving saccharification by cellulase.

The poor performance of fermentation of hydrolyzed with cellulase may have been influenced by the low enzyme activity (1,44U/mg), compared with cellulases currently marketed (activity less than 700U/mg). In this work, the presence of ethanol was recorded and analyzed by gas chromatography, which clearly showed consistent results with ethanol production rate observed in hydrolyzed with H₂SO₄ 2,5% and 4%, because these are the only present values above 50%, away from the percentage of other hydrolysates.

Keywords: *Sagarssum muticum*, bioethanol, hydrolysis, fermentation.



1

Introdução

1.1. Considerações Gerais

As algas constituem um grupo de organismos que têm sido geralmente descritos como fotoautotróficos unicelulares ou multicelulares, habitantes de mares e rios, e encontram-se superiormente divididas em microalgas e macroalgas. Estes seres, abundantes em nosso planeta terra exercem importante papel no ciclo do carbono, sendo capazes de transformar o dióxido de carbono em carboidratos, por meio da fotossíntese e em carbonato de cálcio, pela calcificação (Raven, 2007).

1.2. Utilização atual

As algas têm ganhado grande preponderância na indústria alimentar, cosmética, farmacêutica, agrícola e até mesmo na indústria tecnológica. A sua utilização tem sofrido um aumento significativo de tempo em tempo. Dados bibliográficos apontam que já em 1994, foram utilizadas a nível mundial 221 espécies de macroalgas; sendo 125 rodofíceas, 64 feofíceas e 32 clorofíceas. Destas, 145 espécies foram utilizadas nas indústrias alimentícias; 101 espécies foram utilizadas na indústria de extração de ficocolóides; 24 espécies na medicina tradicional; 25 espécies na agricultura, em produções de rações e adubos; e cerca de 12 espécies cultivadas em aquicultura (Zemke-White & Ohno, 1999).

Em menos de uma década, a estimativa de crescimento deste mercado indicou o volume equivalente a US\$ 6 bilhões movimentados pela produção de 7, 5 T de algas em 2003, voltadas ao mercado alimentar, de medicamentos, cosmético e agrícola, o que demonstra que, mesmo ao haver crescimento quantitativo da utilização das algas, o destino desta matéria prima ainda é para os mesmos fins. Apenas na década a seguir o mercado biotecnológico das algas conheceu uma ampliação, atingindo, no entanto o sector de energia e biocombustíveis, fato este que, acarretou um aumento significativo das pesquisas científicas a partir de 2009 (Mchugh, 2003). Em Portugal, apesar do reconhecimento do potencial e da importância do sector das algas marinhas, as atividades nos domínios ligados à ficologia são ainda de reduzida dimensão e inferiores ao desejável e necessário. No entanto, vários estudos feitos por ficologistas e por organizações governamentais ligadas à indústria, têm identificado inúmeras espécies que podem constituir um importante recurso natural (Pateira 1993 *in* Pereira, 2008).

1.2.1. Setor alimentar

Apesar das algas serem conhecidas e exploradas há muitos séculos pelos orientais, em especial China e Japão, dois de seus maiores derivados mais valorizados até hoje, ainda são a carragenana e o ágar, sendo o primeiro extraído majoritariamente das algas vermelhas *Gelidium*, *Gracilaria* e *Gracilariopsis* e o segundo de *Kappaphycus alvarezii* e *Euchema denticulatum*, que juntos representam 90% do destino biotecnológico das algas, voltados principalmente para indústria alimentar, seja para dar sabor, textura, ou melhor, aparência aos produtos alimentares, desde os achocolatados, queijos, gelatinas e produtos na base de carne, composição de ração animal e cremes dentais (Bezerra, 2008).

Entre as espécies mais utilizadas está a alga castanha conhecida vulgarmente como Wakame (*Undaria pinnatifida*) originária do Pacífico, que vive em águas profundas (até 25 m) e pode atingir 1,5 m de comprimento, sua produção principal é originária do Japão, Coreia e China, onde são cultivadas por meio de aquicultura e, atingem um volume anual de produção anual de 500 mt, peso fresco (Pereira, 2008). Apesar da abundância de algas na costa portuguesa, o uso destas na alimentação não tem grande aplicação na culinária nacional, exceto para algumas comunidades costeiras nos Açores.

Quando o ágar oriundo da Ásia, em particular do Japão, se tornou escasso, devido à II Guerra Mundial, teve início a indústria de ficocolóides portuguesa. Esta indústria chegou a ter expressão ao nível da produção mundial de ágar, devido à abundância e qualidade das algas portuguesas (Sousa-Pinto & Araújo, 2006). A primeira fábrica de ágar em Portugal foi construída em 1947, tendo o seu número aumentado até 6 fábricas, em 1971. Por essa altura, Portugal tornou-se num dos maiores produtores mundiais de ágar, produzindo cerca de 1.620 toneladas por ano (Palminha 1971 *in* Pereira, 2008). No entanto, o declínio ou desaparecimento de algumas populações de agarófitas, a incapacidade de diversificar, de apostar na qualidade e a conjuntura internacional desfavorável, levaram ao desaparecimento desta indústria, restando hoje apenas uma empresa, a Iberagar (Vieira e Santos, 1995).

Economicamente são utilizadas as partes secas e pulverizadas do gênero *Sargassum* para preparar massas de biscoitos, sorvetes e outros produtos alimentícios, como o enriquecimento de ração ovina em regiões com escassez de variadas fontes alimentares (Marín *et al.*, 2009). E além de serem utilizadas nesta indústria, tem o importante papel de

...

biofitos marinhos de metais pesados tóxicos em regiões costeiras litorâneas (Murugadas 1995 *in* Montes, 2012).

1.2.2. Indústria têxtil e farmacêutica

O terceiro maior derivado das algas é o alginato, que por sua vez, apesar de ser amplamente utilizado na indústria têxtil (cerca de 50% de sua produção é utilizado como espessante de algumas pastas que constituem os corantes), ainda sim, como os anteriores é também destinado à indústria alimentar em pelo menos 45% do restante de sua produção em larga escala (Amandawy, 2012). Este espessante é utilizado também em produtos farmacêuticos, como cosméticos (Figura 1) e, embora alguns produtos deste setor, feitos em Portugal, contenham algas na sua composição, a indústria nacional não utiliza amplamente nenhuma macroalga portuguesa (Sousa-Pinto, 1998). Um dos exemplos a considerar é o instituto de Talassoterapia, tratamento fisioterapêutico com água do mar e elementos marinhos, em que o instituto encontra-se em Portugal e os seus produtos são importados de França.



Figura 1: Aplicação das algas e seus derivados nos diversos setores industriais; a) sal marinho de produção portuguesa enriquecido com algas (Foto: ALGApplus, 2014); b) utilização de alginato como espessante de corantes têxteis por empresas alemãs (Foto: Two Square Meters, 2011); c) utilização de Agar como componente da indústria farmacêutica brasileira (Foto: fruticon®, 2010)

1.2.3. Energética

O cultivo de algas em biorreatores consiste em um dispositivo de vários tubos de vidro interconectados (Figura 2b), que vão desde 100 metros até vários quilômetros de comprimento, com seu volume chegando a milhares de litros. Assim as condições ótimas de crescimento podem ser obtidas em sistemas fechados, em vez de tanques abertos, com a vantagem da diminuição no risco de contaminação e variação do pH, melhor controle da concentração de nutrientes e níveis de oxigênio do sistema (Fuhr, 2014). Além da

...

possibilidade de utilização de luz natural ou artificial para estímulo do crescimento algal, otimizando a produção das mesmas.

O principal país investidor desta tecnologia é a Alemanha, que possui as duas maiores empresas produtoras de biorreatores: SCHOTT® e SSC® (Strategic Science Consult), onde a segunda foi responsável pela criação dos biorreatores planos instalados na fachada do primeiro edifício completamente alimentado por energia a partir das algas, a *BIQ House* (Figura 2a e 2c), apresentado em 2013 durante a International Building Exhibition (IBA) em Hamburgo, Alemanha (IBA-Hamburg, 2015).

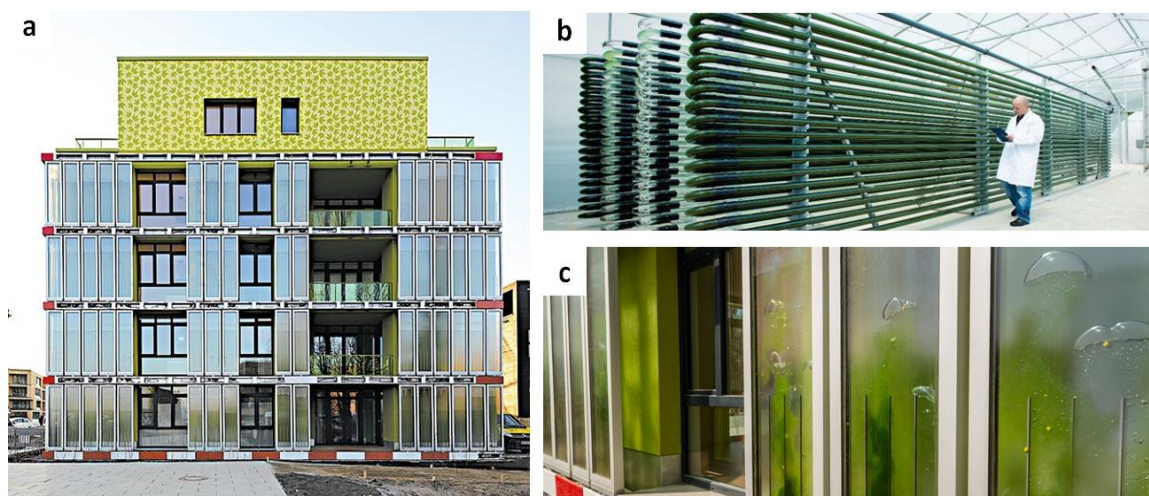


Figura 2: Utilizações atuais das algas para geração de energia elétrica; a) BIQ House com sua fachada constituída por biorreatores planos (Foto: ARUP®, 2013), diferentes dos tubulares que são mais utilizados nas indústrias como mostra a imagem b (Foto: ARUP®, 2013), possibilitando maior superfície de contato com a luz solar que incide sobre a casa, como podemos ver com maior detalhe na imagem c (Foto: SCHOTT®, 2013).

1.2.4. Biocombustíveis: evolução da 1ª a 3ª geração

O principal fator de grande relevância, que ainda promove grandes debates sobre a 1ª e 2ª geração de biocombustíveis, são as implicações decorrentes da utilização de fontes vegetais com destino tradicional alimentar como a soja, a cana de açúcar e o milho, na chamada 1ª geração deste combustível, que ao serem redirecionados – ao menos em parte – para o setor de produção de biodiesel ou bioetanol, promovem o encarecimento desta matéria prima e seus derivados no mercado mundial, seja pela diminuição na disponibilidade dos mesmos ou pela supervalorização de seu novo destino, os combustíveis, além da discussão ética sobre a utilização crescente para fins não alimentares aumentar a disparidade da oferta de comida pelo globo, já que, assim estar-se-

...

ia a usar alimentos para a produção de combustíveis, fato que não tem sido bem aceito pela população mundial (Figura 3) (Maceiras, 2010).

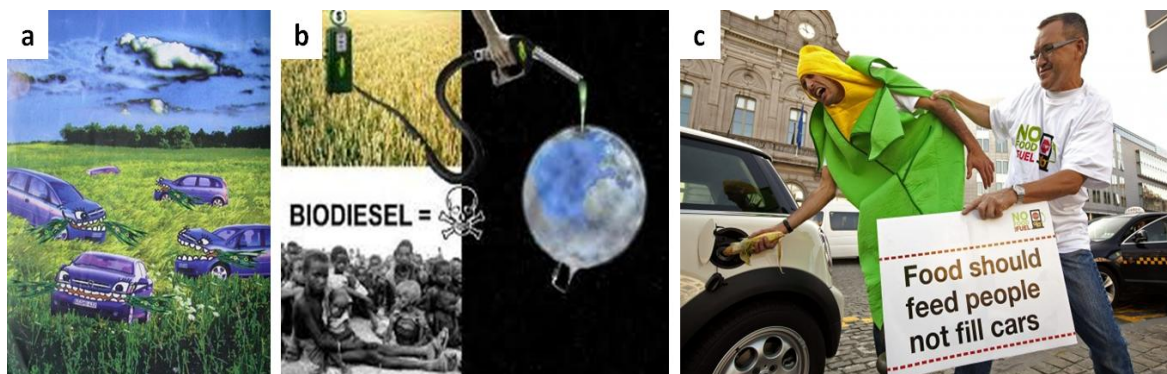


Figura 3: Perspectiva sobre os biocombustíveis segundo a mídia mundial. a) Campanha de alerta para o aumento da produção de biocombustíveis em França (Foto: visionbrazil.com, 2010); b) Propaganda anti biocombustíveis no Brasil (Foto: resistir.info, 2008); c) Manifestação contra o uso de fontes alimentares vegetais para produção de etanol na Bélgica (Foto: estado.com.br, 2013)

Biocombustíveis como biodiesel e bioetanol podem ser obtidos a partir de óleos vegetais e gordura animal (Marchetti *et al.*, 2007), com relevante importância no combate a degradação ambiental por serem, apesar de toda polêmica, oriundos de fontes renováveis (Balat, 2007), dando origem a chamada 2ª geração, que utiliza a biomassa lignocelulósica, no caso de óleos vegetais, e procura maximizar a rentabilidade por volume utilizado e diminuir o redirecionamento do setor alimentar para o setor de combustíveis, porém, trabalha com espécies que ainda estão entre as como a cana-de-açúcar.

Uma segunda questão importante surge no cenário, pois são necessárias grandes áreas e importantes recursos para o cultivo dos principais vegetais fornecedores da lignocelulose como amplas faixas de terras, alto consumo de adubos e água, recursos que poderiam estar a ser enviados para a produção alimentar, além da separação da lignina da lignocelulose ainda ser um obstáculo técnico e, neste contexto, a 3ª geração de biocombustíveis baseados em algas, oferece uma excelente alternativa como substituto aos combustíveis fósseis (Wyman 1994; Goh *et al.*, 2010).

A área costeira é um excelente local para o crescimento algal, já que as macroalgas por exemplo, podem ser cultivadas ancoradas (crescimento bentônico) ou a flutuar na linha do oceano (crescimento planctônico), não havendo necessidade de ocupação de áreas voltadas a agricultura em detrimento a outras espécies, além da disponibilidade natural de nitrogênio solúvel a partir da matéria orgânica em decomposição no meio aquático (Goh *et al.*, 2010). Outra grande vantagem é a possibilidade da exploração de algas que não são

...

utilizadas como alimentação, para a produção do bioetanol, diminuindo a competição agrícola que outras espécies promovem, além da alta produção de biomassa por área não dependente de fertilizantes, pesticidas, terras cultiváveis e água fresca (Kraan, 2013). Desta forma, o potencial biotecnológico das algas vem sendo ampliado e altamente valorizado no que toca os combustíveis renováveis e à sustentabilidade, seja das microalgas (biodiesel) e macroalgas (bioetanol) a partir de seus principais componentes orgânicos.

Pesquisas neste campo tomam cada vez mais importância, já que a procura por “fontes amigas do meio ambiente” a serem utilizadas para assegurar a crescente demanda por fornecimento energético, tende a aumentar cada vez mais, pois segundo a Organização das Nações Unidas, a população atual ultrapassa o número de 7 bilhões de pessoas no planeta, com estimativa de chegada aos 9 bilhões até 2050 (ONU, 2013), fator que acarretará de forma crescente uma maior demanda de transportes e fornecimento de energia elétrica. Portanto, combustíveis de fontes renováveis tendem a ser mais valorizados por permitir produção contínua e seu uso em longo prazo (Antunes, 2010).

O biodiesel de terceira geração, a partir de microalgas, tem recebido maior atenção como substituto dos combustíveis fósseis, pela possibilidade de utilização em sua forma “pura” ou adicionada ao diesel comum, em variadas concentrações. Isso tem sido possível a partir da combinação de produtividade de biomassa máxima com teor de óleo máxima, construindo números fantásticos de produtividade, que foram explorados para o financiamento de intensa pesquisa no setor (Garofalo, 2010), sendo, portanto as microalgas, suas potenciais produtoras, constituem grandes fornecedores de biomassa, que graças a sua eficaz realização fotossintética, conseguem duplicar sua produção orgânica diária ao receberem altos estímulos luminosos (Tabela I) é possível uma grande geração de óleo comparado a outras fontes alimentares concorrentes de vegetais superiores (Franco, 2013).

Tabela I: Produção de energia e eficiência fotossintética de diferentes fontes de biomassa (Franco, 2013)

Fonte de Biomassa	Tipo de Combustível Produzido	Produtividade (bep ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Eficiência fotossintética (%)
Milho	Etanol	20	0,2
Cana-de-açúcar	Etanol	210 – 250	2 – 3
Soja	Biodiesel	13 – 22	0,1 – 0,2
Girassol	Biodiesel	8,7 – 16	0,1 – 0,2
Microalgas	Biodiesel	390 – 700	4 – 7

A terceira geração de bioetanol (TGB) é produzida através a biomassa algal e, geralmente este etanol é obtido através da fermentação enzimática de monossacarídeos como a glucose. Certas algas têm a habilidade de produzir altos níveis de carboidratos de lipídeos de reserva, assim estas espécies tornam-se excelentes candidatas a serem utilizadas na produção de bioetanol (Goh *et al.*, 2010).

As macroalgas têm como um dos seus constituintes predominantes, os polissacarídeos, onde os principais são: alginato (oriundo das algas castanhas), ágar e carragenanas (oriundos das algas verdes e vermelhas), onde o filo Ochrophyta (ou Heterokontophyta), classe Phaeophyceae, apresenta especial predominância do ácido algínico (polissacarídeo), que através de hidrólise ácida destaca subprodutos como a glicose, a fucoidana e o ácido algínico (figura 4), sendo este último um polímero linear que apresenta resíduos do ácido β -D manorônico, assemelhando-se desta forma à pectina e à celulose, que ao sofrerem fermentação permitem a produção de bioetanol. Este pode ser produzido alternativamente, a partir da extração de conteúdo oleaginoso derivado também de macroalgas, já que nestas, encontram-se geralmente de forma abundante três componentes principais: carboidratos, proteínas e lipídios e, após a extração lipídica para a produção do biodiesel, carboidratos existentes podem ser utilizados como substrato para a fermentação e conseqüente produção do etanol, potencializando a biomassa. Portanto, para a produção atual de bioetanol a partir de macroalgas, são necessárias três etapas: hidrólise de polissacarídeos e monossacarídeos, fermentação dos monossacarídeos e recuperação do bioetanol (Meinita *et al.*, 2013).

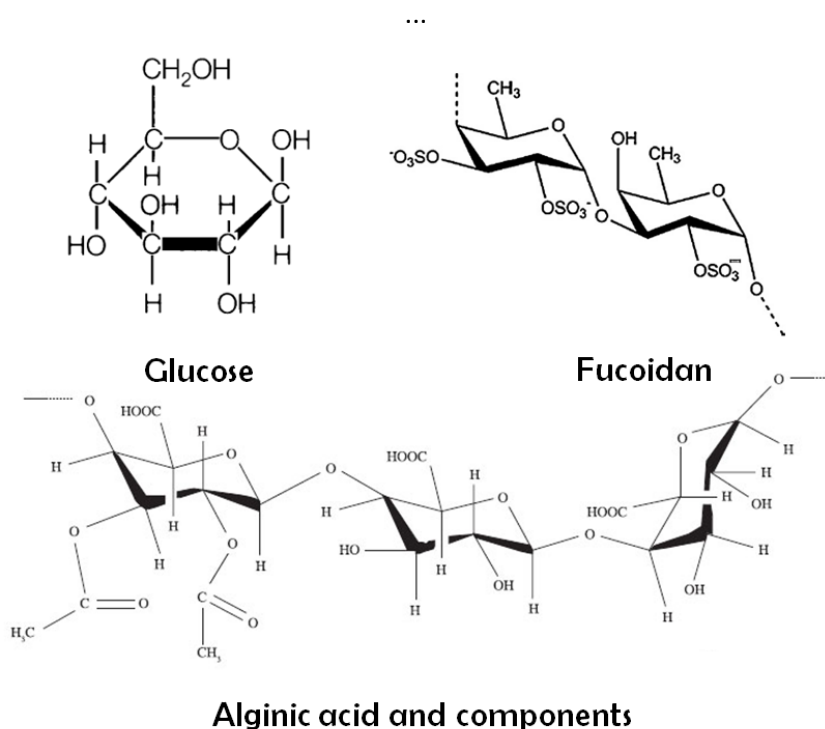


Figura 4: subprodutos resultantes da hidrólise ácida do ácido algínico em algas da classe Phaeophyceae, as quais apresentam predominância deste composto (Imagem: harvardforest.fas.harvard.edu, 2011).

1.3. Taxonomia da Família Sargassaceae

Pertencente ao Domínio Eukaryota, Reino Protista, Divisão Heterokontophyta, tem-se a Classe Phaeophyceae, onde seu delineamento ordinal tem tido por base principal o ciclo de vida, modo de crescimento e tipologia do talo principal - filamentosos ou parênquimatosos (Torres, 2013), desta forma hoje esta classe apresenta a importante ordem Fucales na qual está a Família Sargassaceae.

A família Sargassaceae perfila como uma das principais famílias neste táxon, porém, existem poucos relatos literários a sua relação filogenética. Esta família é representada por algas castanhas, e é constituída por 31 gêneros: *Acrocarpia*, *Antrophycus*, *Axillariella*, *Bifurcaria*, *Brassicophycus*, *Carpoglossum*, *Carpophyllum*, *Caulocystis*, *Cladophyllum*, *Coccophora*, *Cystophora*, *Cystophyllum*, *Cystoseira*, *Halidrys*, *Hormophysa*, *Landsburgia*, *Myagropsis*, *Myriodesma*, *Nizamuddinia*, *Oerstedtia*, *Palaeohalidrys*, *Phyllotricha*, *Platythalia*, *Polycladia*, *Sargassopsis*, ***Sargassum***, *Scaberia*, *Sirophysalis*, *Stephanocystis*, *Stolonophora* e *Turbinaria*, nos quais estão distribuídas cerca de 494 espécies, divididas nos gêneros (Guiry & Guiry, 2015).

...

Os gêneros *Turbinaria* e *Sargassum* são os de maior distribuição biogeográfica, sendo o primeiro encontrado em regiões tropicais e subtropicais em quase todos os oceanos e o segundo em regiões tropicais e subtropicais dos oceanos Pacífico e Índico (Figura 5) (Coimbra, 2006; Rohfritsch *et al.*, 2010). As espécies deste gênero distribuem-se predominantemente em zonas costeiras através de substrato consolidado, muitas vezes formando os “bancos de sargaço”.

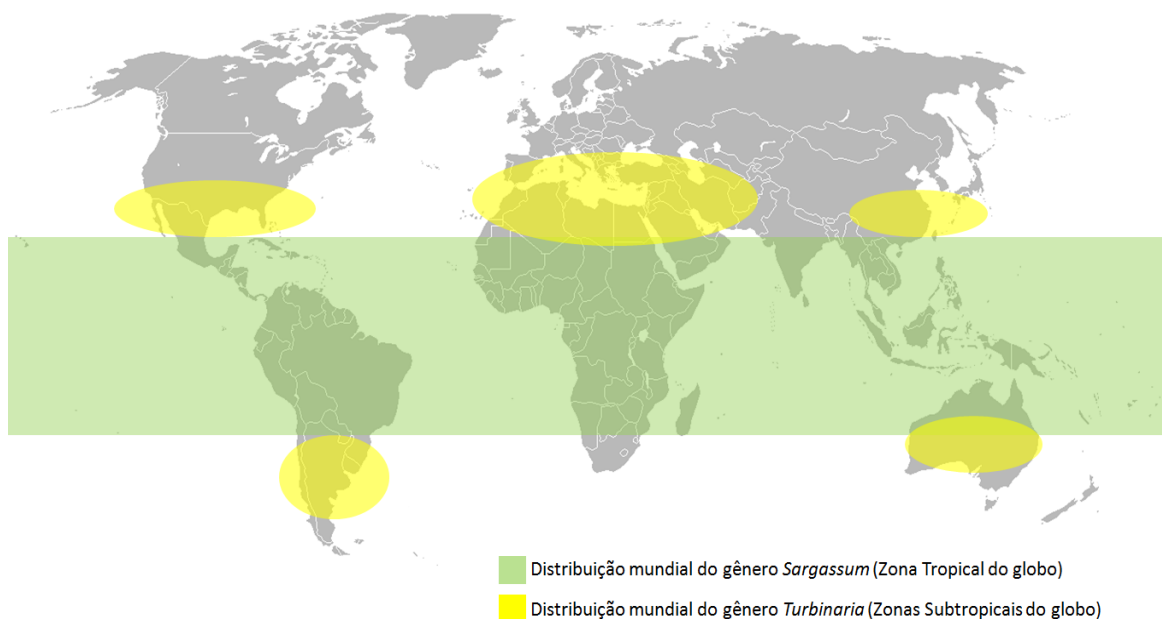


Figura 5: mapa ilustrativo com as zonas de maior incidência dos gêneros *Sargassum* e *Turbinaria* nos mares do planeta.

1.3.1. *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt 1955

Sargassum muticum membro da ordem *Fucales*, da família Sargassaceae, e do gênero *Sargassum*, grupo de macroalgas castanhas com ampla distribuição em mares tropicais e subtropicais, sendo a alginófita dominante nas áreas tropicais. Nas Filipinas espécies de *Sargassum* são as maiores entre as algas marinhas, mas ainda é subdesenvolvido e minimamente utilizado entre algas disponíveis localmente (Trono & Ganzon-Fortes, 1988).

Sargassum muticum é, portanto, uma grande alga marrom, com ramos laterais que destacam no verão ou no outono, durante o verão, recipientes reprodutivas em forma de charuto desenvolvem nas áreas onde a sessão anual ou "ramo" atribuí à haste, mas também pode sentar-se em cima do galho (Pereira *et al.*, 2008). Seu habitat preferencial são locais protegidos por substratos duros ou enriquecidos por conchas, já que a exposição direta não

...

é benéfica para a espécie, porém, *S. muticum* é tolerante a correntes e frequentemente é encontrado em águas rasas, no patamar infralitoral que se estende desde o limite mínimo da zona mediolitoral até ao limite inferior de penetração luminosa eficaz para a realização da fotossíntese das algas (Josefsson, 2011). Esta alga, forma imensas massas flutuantes chamadas “mar de Sargaço” (Figura 6), no Oceano Atlântico, a nordeste do Caribe, podendo como outras algas castanhas produzir crescimentos indesejáveis quando introduzidas em áreas não-nativas, comportando-se como invasora, interfere seriamente em atividades de maricultura e prejudica os ecossistemas aquáticos.



Figura 6: “Mar de Sargaço” nas águas da Ilha do Marajó, Norte do Brasil, banhada pelo oceano Atlântico (Foto: Danielle Cavalcante, 2014)

S. muticum é um potencial competidor e substituto de membros de *Laminariales* e *Fucales* que, em suas comunidades, são considerados como espécies chaves ou críticas (Raven, 2007). Nativo do sudeste da Ásia (Pereira *et al.*, 2008), sua distribuição atual como uma espécie invasora é generalizada, incluindo Europa, Mar Mediterrâneo e costa oeste da América do Norte. Em alguns países como EUA, observa-se esta espécie com este comportamento alastrando-se em extensas coberturas, com até 2 metros acima de tudo, diminuindo o fluxo de luz e disponibilidade de nutrientes utilizados pelas algas nativas, além de aumentar a sedimentação local (Britton-Simmons, 2004).

Análises da composição de *Sargassum spp.* revelam sua vantagem como matéria-prima para a produção de etanol, a temperatura de pré-tratamento para esta macroalga, bem como as condições de sacarificação de enzimas utilizadas são relativamente mais suaves em comparação com a de biomassa terrestre, além de conversões de etanol obtidas serem significativamente mais elevadas do que o rendimento teórico baseado em glicose como substrato (Borines, 2013). Contudo, o grupo de algas castanhas apresenta

...

composição diferente durante o ano, variando sua utilização de reservas alimentares, com riqueza de carboidratos durante o outono e escassez no inverno, fator altamente relevante para a escolha do período de recolha das mesmas para esta finalidade (Fasahati, 2012). Assim, o potencial de produção do bioetanol a partir do gênero *Sagarssum* vem sendo melhorado, na tentativa de driblar estas desvantagens, como mostra o projeto intitulado “Ocean Sunrise Project”, que foi criado com objetivo de cultivar de *Sargassum horneri*, utilizando 4.470.000 km² de áreas não utilizadas da zona econômica exclusiva (ZEE) do Japão, e através da produção de bioetanol de algas marinhas, combater o aquecimento global, contribuindo com alternativa aos combustíveis fósseis (Aizawa, 2007).

Portanto, é de alta relevância unir a produção biotecnológica à gestão ambiental em torno desta espécie, a fim de promover uma melhoria no quadro instalado em território nacional português, já que em zonas como a da Figueira da Foz, encontra-se *S. muticum* em grande abundância, o que aponta para um quadro cada vez mais sério de predominância desta invasora nas praias do país, constituindo um perigo para as espécies nativas e um alerta para o agravamento num futuro próximo do estado de alastramento da mesma. Contudo, a produção de bioetanol a partir desta alga alia estes dois pontos de grande importância atual, com a produção de combustível renovável e gerenciamento do quadro invasor presente em Portugal, promovendo sustentabilidade e desenvolvimento de pesquisa do biocombustível de terceira geração.

1.4. Contextualização do trabalho e objetivos

O Laboratório de Macroalgas do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra em conjunto com o Laboratório de Química da Escola Superior Agrária de Coimbra tem dedicado-se a investigação na área de inovação biotecnológica, o que inclui espécies com potencial económico como *S. muticum*. Assim, o propósito principal deste trabalho foi a produção de bioetanol a partir da macroalga *Sargassum muticum* (Phaeophyceae).

Para concretização deste objetivo geral foram delineadas as seguintes tarefas:

- a) Extração simplificada e refinada de ficocolóides como o Alginato, a fim de verificar se este composto isolado poderia influenciar nos níveis de produção de etanol;

...

- b)** Degradação da biomassa por hidrólises ácidas e enzimáticas, para quebra de ligações do tipo β ;
- c)** Fermentação e Análise por Cromatografia gasosa, para verificação da ocorrência e variação dos níveis de etanol obtidos nesta etapa final.

...



2

*Material e
Métodos*

...

2.1. Amostras

As amostras de *Sargassum muticum* foram encontradas na Praia de Buarcos, localizada na Freguesia de Buarcos, uma das dezoito freguesias pertencentes ao Conselho de Figueira da Foz (Figura 7), colhidas em maio de 2014 e transportadas até o Laboratório de Macroalgas da Universidade de Coimbra, destinaram-se a serem lavadas em água do mar filtrada, drenadas, cortadas e secas em estufa a 40 °C por 4 dias. Após sua secagem completa, realizou-se a moagem em Moinho KUNFT GTM 8803, pesagem e armazenamento das mesmas.



Figura 7: Localização geográfica da Praia de Buarcos onde as amostras de *S. muticum* foram colhidas.

2.2. Extração de Polissacarídeos

Foram testados dois métodos de extração de polissacarídeos: o método titulimétrico adaptado de Cameron, Ross e Percival 1948, o qual destina-se à extração específica de alginatos e o método simplificado de extração de ficocolóides adaptado de Pereira 2011.

2.2.1. Extração Titulimétrica (Adaptado de Cameron, Ross e Percival, 1948)

Após reidratação com 10mL de H₂O destilada e imersa em 20 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 0,2M por 24h em temperatura ambiente (22°C), a biomassa de 1g de *S. muticum* seca e moída, foi filtrada em filtro de porosidade 3G, lavada novamente em 60mL de H₂O destilada e misturada a 40mL de Carbonato de Sódio (Na₂CO₃) a 6% para ser submetida a

...

banho Maria com temperatura de 50°C por 2h, com posterior repouso de 24h à temperatura ambiente (em torno dos 22°C). Acrescentou-se então, 40mL de Na₂CO₃ a 1,5% e H₂O destilada até seu volume atingir 300mL no total e sobre este volume foi projetado um fino jato de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) a 10% em meio a agitação branda para ser deixada em repouso por 24h em temperatura ambiente e filtrada em filtro 3G, possibilitando a separação do material extraído após este período (Figura 8).

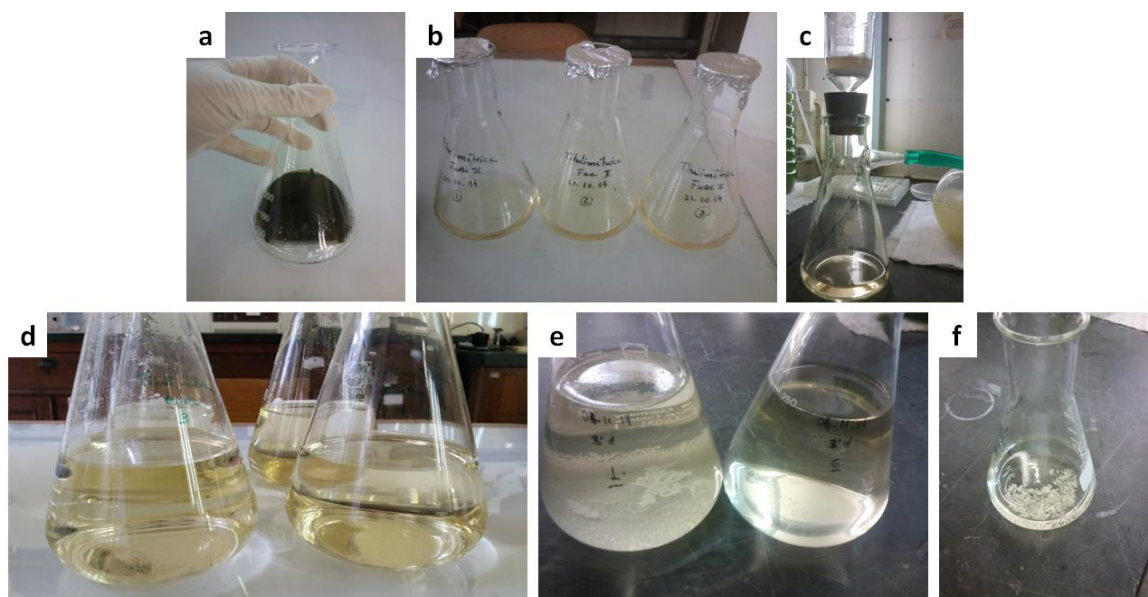


Figura 8: Etapas da Extração Titulimétrica; a) Reidratação e imersão em H₂SO₄; b) imersão em Na₂CO₃; c) Filtração; d) pós-acréscimo do jato de CaCl₂ e f) precipitação do extraído.

2.2.2. Extração Simplificada de Ficocolóides (Adaptada de Pereira, 2011)

A biomassa de 5g de *S. muticum* seca e moída foi imersa em 5mL metanol e acetona na proporção de 1:1 ocasionando eliminação da fração organossolúvel, reidratada com 5mL de H₂O destilada e deixada em repouso de 24h em temperatura ambiente (22°C), após este período deu-se a primeira separação (aquosa) em 150mL de H₂O destilada a 100°C por 3h e filtrada a quente em filtro de porosidade 1G. Na segunda separação (alcalina), a amostra foi misturada a 150mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 molar, aquecida em duas etapas de banho Maria – 2h a 50°C e 1h a 70°C – após aquecimento, a solução foi duplamente filtrada a quente em filtro de porosidade 3G, para precipitação dos ficocolóides. Foi acrescido etanol a 96%, com dobro do volume do precipitado, para posterior remoção e secagem (em estufa a 60°C por 48h) do coágulo esbranquiçado de ficocolóides (Figura 9).

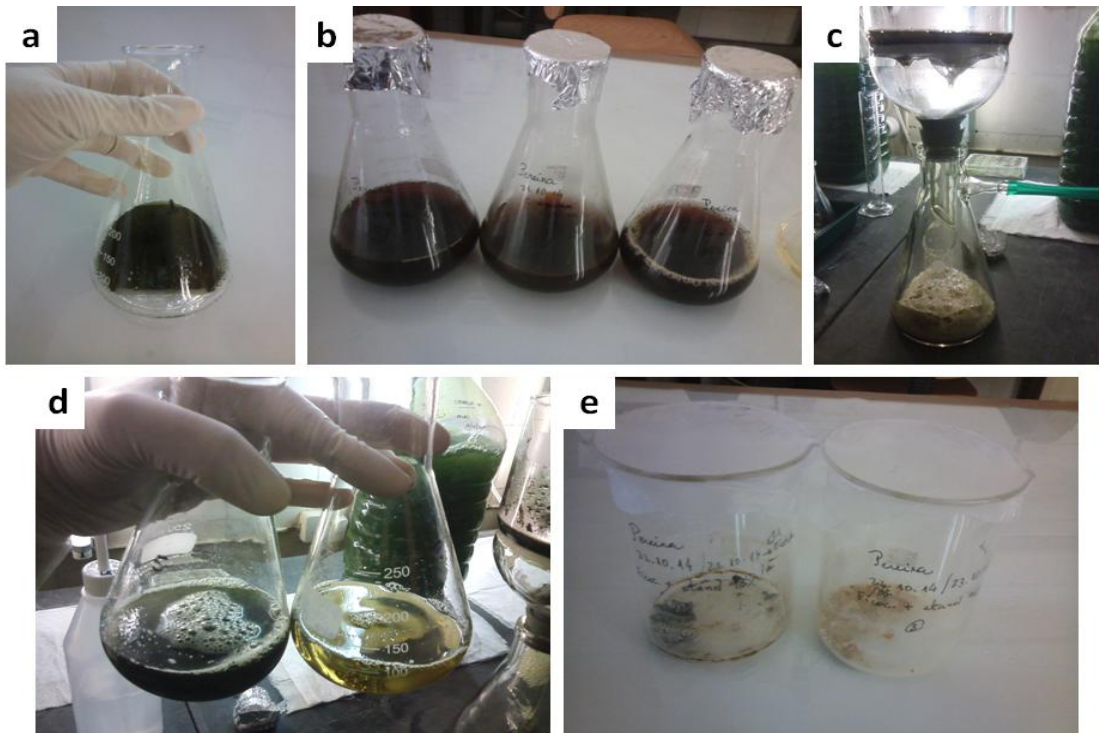


Figura 9: Etapas da Simplificada de Ficolóides; a) Reidratação e imersão em H_2SO_4 ; b) eliminação da fração organossolúvel; c) Filtração; d) adição de NaOH e início da adição de etanol a 96%; e) coágulo de ficolóides já seco.

2.3. Degradação de Polissacarídeos

A degradação de polissacarídeos foi obtida por meio de hidrólises ácidas adaptadas de Borines 2013, autor que apresentou resultados satisfatórios com outras espécies do gênero *Sargassum* e, hidrólise enzimática com celulase (Figura 10). A hidrólise ácida é caracterizada por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido clorídrico e sulfúrico e condições rígidas de pH e temperatura (pH 1 e 2 – temperatura entre 100 a 150°C) (Santiago, 2004), fornecendo assim uma ampla eficiência na quebra de ésteres, aminas e principalmente açúcares que foram o composto alvo deste trabalho.

2.3.1. Hidrólise Ácida (Variação 1)

3g de *S. muticum* seca e moída foi submetida a banho Maria a 100°C durante 1h, misturada em 120mL de H_2SO_4 a seis diferentes concentrações (2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% e 5%).

...

2.3.2. Hidrólise Ácida (Variação 2)

No segundo tipo de hidrólise ácida, as condições foram as mesmas, com exceção, das concentrações de H_2SO_4 serem apenas de 4% e 5%, e o banho parafina a $115^\circ C$ com duração de 1h 30min.

2.3.3. Hidrólise Enzimática

3g de *S. muticum* seca em estufa a $40^\circ C$ e moída foi reidratada com 150mL de H_2O destilada e aquecida em microondas a $100^\circ C$, segundo o termômetro digital do mesmo, por 10 minutos, após seu aquecimento foi adicionado à solução 120mL de tampão (Ácido Acético + Hidróxido de sódio) com pH5 e 100mg de celulase (50 FPU cellulase/g de biomassa), com agitação branda a $40^\circ C$ por uma semana em estufa.



Figura 10: Amostras após a realização das hidrólises adotadas.

2.4. Fermentação

Os eumicetos (Fungi) são o grupo mais utilizado na fermentação para a produção de etanol por apresentarem diversas formas de crescimento e multiplicação. Sob certas condições de cultivo, são capazes de utilizar uma variedade de substratos, dependendo da espécie em questão. Em geral estes microrganismos são capazes de crescer e de produzir etanol eficientemente em valores de pH entre 3,5 e 6,0 e de temperatura entre $28^\circ C$ e $40^\circ C$ (Kosaric, 1983).

Assim, foram utilizados os sacarificados em fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em incubação a $40^\circ C$ por 8 dias seguidos, em agitação orbital

...

com rotação de 130 rot/min. Para tal, foram preparadas 12 amostras, sendo 2 destas, controles com sacarose 50FPU/g a substituir a biomassa (Figura 11 e Tabela II), em erlenmeyers contendo 50mL de amostra e 50mL de fermento (preparado segundo a Tabela III) com pH de 3,8 e vedados com parafilm®

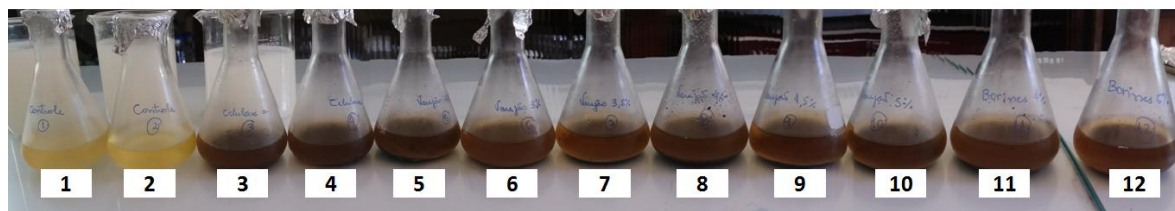


Figura 11: Agrupamento das amostras para fermentação segundo o tipo de hidrólise sofrida.

Tabela II: Controle das amostras e o tipo de hidrólise sofrida.

Controle	Tipo de Hidrólise
1	Controle (sacarose)
2	Controle (sacarose)
3	Hidrólise Enzimática
4	Hidrólise Enzimática
5	Hidrólise com H ₂ SO ₄ 2,5% (Var. 1)
6	Hidrólise com H ₂ SO ₄ 3% (Var. 1)
7	Hidrólise com H ₂ SO ₄ 3,5% (Var. 1)
8	Hidrólise com H ₂ SO ₄ 4% (Var. 1)
9	Hidrólise com H ₂ SO ₄ 4,5% (Var. 1)
10	Hidrólise com H ₂ SO ₄ 5% (Var. 1)
11	Hidrólise com H ₂ SO ₄ 4% (Var. 2)
12	Hidrólise com H ₂ SO ₄ 5% (Var. 2)

Tabela III: Composição do meio de crescimento para incubação.

Nutrientes	g/L
Extrato de levedura	5
KHPO ₄	5
NH ₄ Cl	1,5
MgCl ₂	0,6
KCl	1,7

2.5. Análises

2.5.1. Determinação Aproximada do teor de hidratos de carbono por medição do índice de refração (BRIX)

O Brix das amostras foi medido antes da etapa de fermentação, ou seja, logo após as hidrólises para verificação do teor de compostos solúveis, principalmente de açúcares, após subtração da percentagem de ácido conhecida em cada uma das soluções.

...

2.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

O processo de sacarificação foi monitorizado por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). O HPLC é método físico-químico que, promove a separação de componentes de uma mistura realizada pela sua composição, em uma fase móvel que é eluída sob altas pressões (Gabriel, 2009). Este procedimento tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes na amostra, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins, 2009).

Para esta etapa, as amostras já hidrolisadas segundo a variação ácida 1 e hidrólise enzimática com celulase, foram neutralizadas até cessação de formação de CO_2 com Carbonato de Potássio (K_2CO_3) e ultrafiltradas em membrana Millipore de 20 ou 47 micro para injeção no HPLC (Figura 12).



Figura 12: Tratamento das amostras para HPLC; a) ultrafiltração; b) amostras já basificadas para injeção e c) ilustração do funcionamento do HPLC com sua coluna de separação (Imagem: hiq.lindegas.com, 2008)

2.5.3. Determinação de Etanol por Cromatografia Gasosa (GC)

A Determinação de Etanol por Cromatografia Gasosa (CG) permite a separação e análise de misturas de substâncias voláteis, como o etanol, onde a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo com gás adequado denominado de fase móvel (FM), este fluxo de o gás com a amostra vaporizada passa por uma coluna contendo a fase estacionária (FE) da coluna cromatográfica, onde ocorre a separação da mistura (Del Grande, 2008).

Para realização desta etapa, foram colhidas alíquotas diárias em duplicata (2mL por alíquota) das amostras em fermentação, armazenadas e congeladas a -6°C . As injeções também foram realizadas em duplicata por cada alíquota, com auxílio de seringas de 2 μL , após diluição de 200 μL de metanol (CH_4O) a 2% em 200 μL de amostra, constituindo proporção de 1:1 em equipamento Agilent mod 6890 séries, gás de arraste azoto a 1mL/min, injetor divisor com taxa de divisão de 1/20, $T_{\text{inj}}=270^{\circ}\text{C}$, coluna FFAP

...

Phemonenex (USA) 30m x 0,32mmx 0,25micro m de espessura de fase, em modo isotérmico a 45°C; detector de ionização em chama de ar/hidrogênio, T=260°C. método de quantificação com base em padrão externo (solução de etanol a 0,2%, 0,5%, 1,5%, 3% e 5% V/V) na presença de padrão interno (metanol a 2%, V/V) (Figura 13).

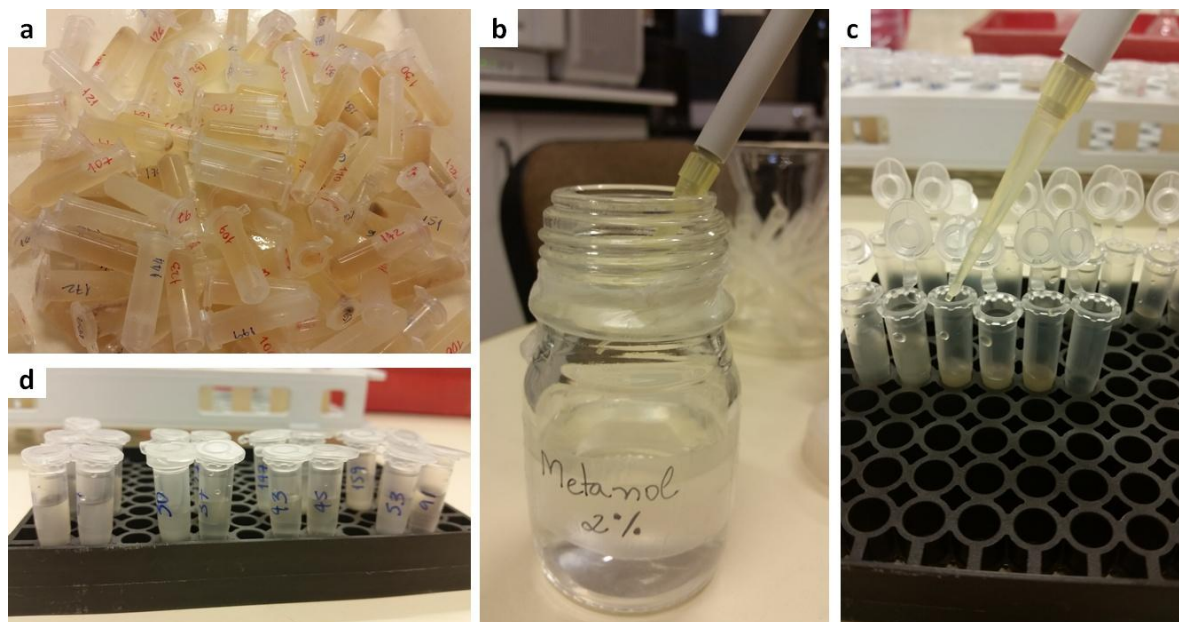
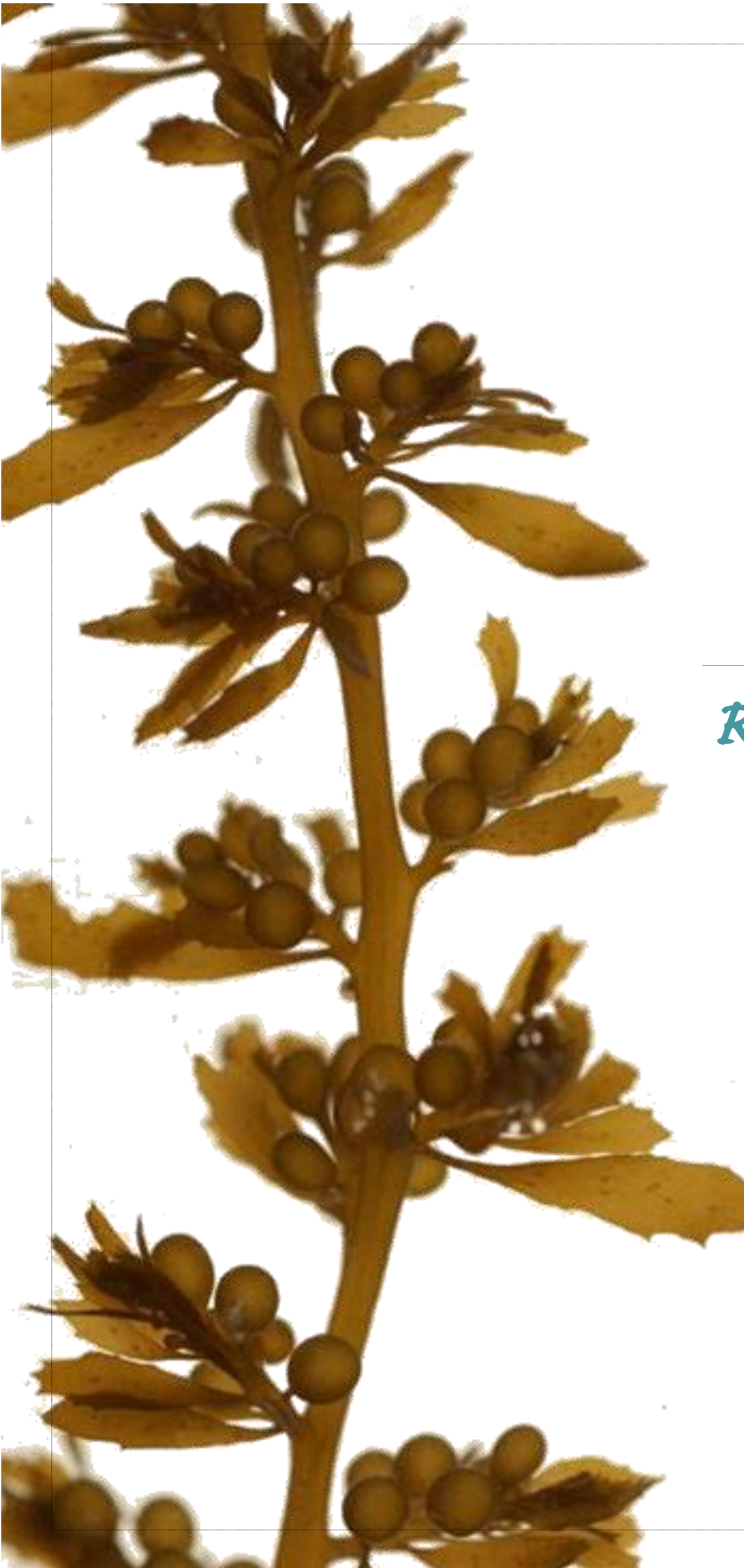


Figura 13: Preparação das alíquotas para GC; a) alíquotas diárias em duplicata (2mL); b) e c) diluição de 200 μ L de metanol (CH_4O) a 2% em 200 μ L de amostra, constituindo proporção de 1:1 e c) amostras homogeneizadas para injeções em GC.

...



3

*Resultados &
Discussão*

...

3.1. Extração/hidrólise de hidratos de carbono

3.1.1. Extração simplificada de polissacarídeos

A variedade da composição orgânica das espécies de *Sargassum* é amplamente influenciada por fatores ambientais como a salinidade, temperatura da água, disponibilidade luminosa e de nutrientes, que podem em conjunto, estimular ou inibir a biossíntese dos componentes orgânicos esperados nestas algas (John *et al.*, 2011). Os hidratos de carbono, por exemplo, compõe de 46% a 49% da biomassa dos Sargaços, dentre estes, os mais importantes nas Phaeophytas são: o alginato, que representa de 20% a 40% da massa total algal (Lodeiro & Cordero *et al.*, 2004) e a celulose, com percentual variável, que é o segundo hidrato de carbono encontrado em maior quantidade, sob a forma de alfa celulose, porção deste constituinte que é insolúvel em hidróxido de sódio.

Assim, para a produção de etanol estes polissacarídeos complexos têm que ser hidrolizados a açúcares mais simples (monoméricos) como a glicose e a galactose. Monômeros como a glicose, galactose e ácido algínico são derivados das hexoses e ao serem simplificados por hidrólise do alginato, tornam possível sua metabolização por leveduras como o *Saccharomices cerevisiae* para a produção de etanol. (Borines, 2013).

Desta forma, os primeiros pré-tratamentos adotados foram as extrações de polissacarídeos: titulimétrica (Cameron, Ross & Percival, 1948) e simplificada de ficocolóides (Pereira, 2011), porém, não apresentaram resultados satisfatórios, particularmente em relação à extração simplificada, o que pode ter ocorrido pelo fato deste método ser utilizado até o momento, com maior eficácia em polissacarídeos sulfatados pertencentes a algas que apresentem menor teor de alfa celulose, a qual está presente em grande parte da biomassa do *S. Muticum* (Rodrigues & Souza, *et. al.*, 2015). Portanto, o terceiro pré-tratamento que substituiu estes métodos, foi a sacarificação do *S. muticum* através das hidrólises ácidas e enzimáticas, as quais se mostraram mais eficazes. Assim, a extração refinada de alginato não foi viável, porém, a ausência desta etapa não afetou de forma significativa a realização dos métodos para a produção de etanol.

3.1.2. Método Enzimático e Ácido

Existem inúmeros trabalhos experimentais no campo da sacarificação e fermentação de algas, porém, a maioria destes trabalhos apresenta certa dificuldade em padronizar as

...

condições ideais destes métodos para as Phaeophytas, pois cada estudo utiliza espécimes oriundas de uma localização geográfica específica (Fasahati & Liu, 2012), fator este como foi citado acima, influencia amplamente na variação das concentrações dos componentes orgânicos que estão resumidos em valores aproximados na Tabela IV (Rodrigues *et al.*, 2015).

Tabela IV: Composição aproximada do *Sagarssum muticum* (Rodrigues *et al.*, 2015).

Constituinte	(%) g/100g de alga
Proteínas	16,90 ± 0,2
Hidratos de carbono	49,30
Lípidos	1,45 ± 0,07
Componentes inorgânicos	22,94 ± 0,06

A hidrólise do ácido algínico leva a formação de ácidos como o glucorónico e galacturónico, componentes do alginato, que, todavia não foram claramente identificados pelo HPLC, pois a coluna utilizada não apresentava características adequadas para análises destes açúcares, no entanto, a mesma apresentou sucesso para glucose e a galactose. Assim, os maiores teores de hidratos de carbono solúveis (glucose e galactose) foram encontrados nas sacarificações realizadas com H₂SO₄ a 5% com 58%, seguida por 2,5% com 52,65% e 3% com 44,10% (Tabela V e Figura 14), valores bem acima dos resultados com *Sargassum polycystum* (5,3 ± 0,14 de galactose) e *Sargassum duplicatum* (6,3 ± 0,27) quando submetidos a hidrólise ácida com H₂SO₄ a 0,2M com temperatura a 115°C (Mutripah, 2014).

Tabela V: Teores de hidratos de carbono em hidrolisados de *Sargassum muticum*.

Tipo de Sacarificação	¹ Concentração de açúcares totais - BRIX (mg/mL)	¹ Concentração de glucose + galactose (mg/mL)	Porcentagem de de glucose + galactose (w/w)
<i>S. muticum</i> + H ₂ SO ₄ (2,5%)	62,5	26,33	52,65%
<i>S. muticum</i> + H ₂ SO ₄ (3%)	50,0	22,06	44,10%
<i>S. muticum</i> + H ₂ SO ₄ (3,5%)	37,5	18,09	36,20%
<i>S. muticum</i> + H ₂ SO ₄ (4%)	50,0	9,65	19,30%
<i>S. muticum</i> + H ₂ SO ₄ (4,5%)	62,5	7,40	14,80%
<i>S. muticum</i> + H ₂ SO ₄ (5%)	50,0	28,99	58,00%
<i>S. muticum</i> + celulase	180,0	4,34	33,90%

¹ valores obtidos segundo a média dos valores observados através das análises realizadas com a sacarificação referida

...

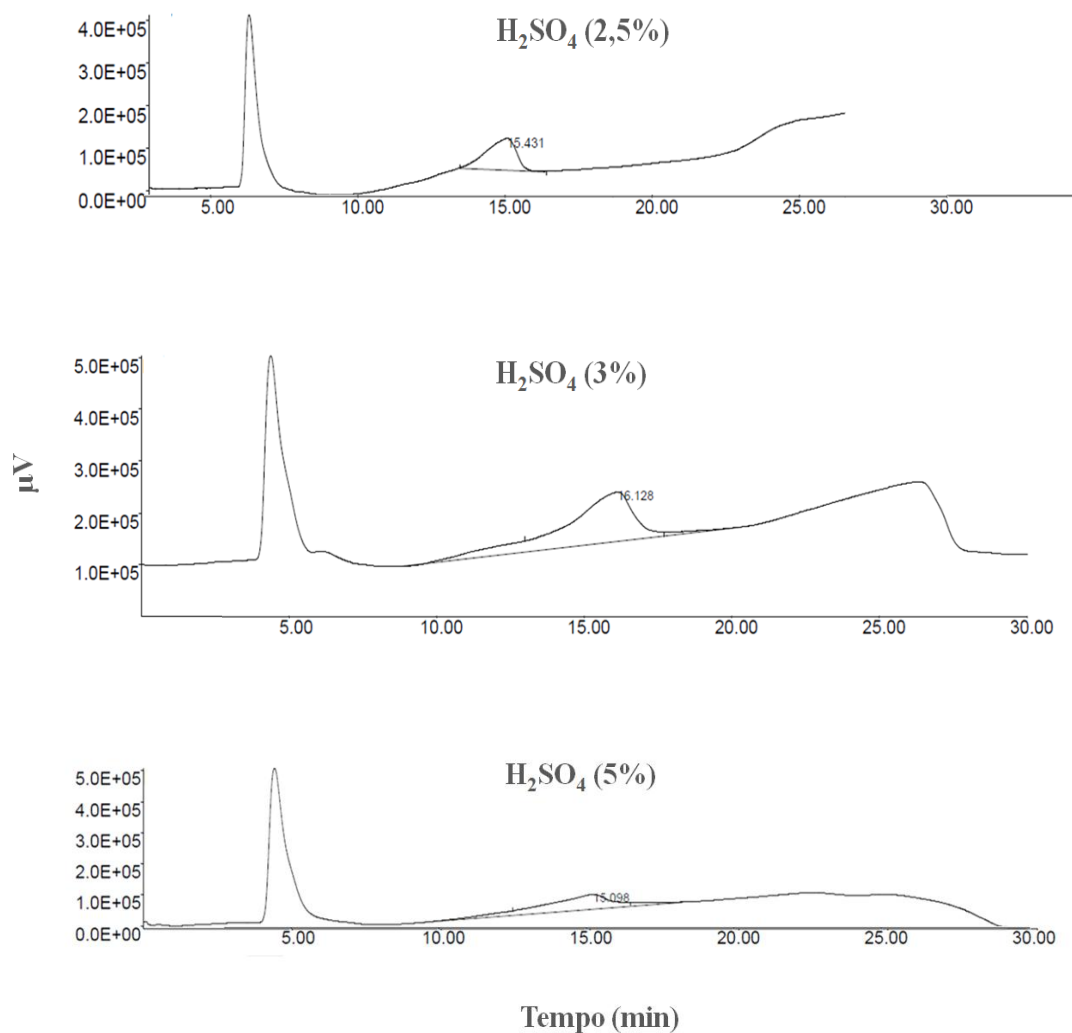


Figura 14: Cromatogramas por HPLC dos hidrolisados com H₂SO₄ a 2,5%, 3% e 5%.

3.2. Fermentação de hidrolisados

Durante os processos enzimáticos de formação do ATP e, inerentes à formação de etanol, outras rotas metabólicas são ativadas para formar materiais necessários para a constituição da biomassa (polissacarídeos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e outros), assim como substâncias relacionadas, direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência celular. Portanto, com o metabolismo anaeróbico, são formados e excretados, além do etanol e o dióxido de carbono, o glicerol, ácidos orgânicos (piruvato, succínico, acético e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetona, butilenoglicol e compostos de menor significado quantitativo (Antônio, 2010).

...

3.2.1. Análise de resultados

Os hidrolisados anteriores foram submetidos a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, com um meio mínimo de nutrientes e em condições não sépticas, monitorando-se a concentração de etanol no meio.

Obtiveram-se os maiores teores de produção de etanol (Tabela VI), nas amostras com hidrólises nas condições designadas de “variação 1”, ou seja, em banho maria a 100°C por 1h e adição de H₂SO₄ a 2,5% e com hidrólises nas condições designadas de “variação 2”, ou seja, em banho parafina a 115°C por 1h30 e adição de H₂SO₄ a 4%.

As que apresentaram os menores índices foram as amostras com hidrólise nas condições de “variação 1” (100°C | 1h) e adição de H₂SO₄ a 4% e as com sacarificação por celulase. O que pode indicar que a temperatura tem maior influência que a concentração de H₂SO₄ no sucesso deste procedimento, pois observa-se ainda que, a igual concentração de H₂SO₄ a 4%, submetida a 100°C e 115°C faz com que as amostras apresentem resultados bem diversos entre si (Anexo B).

Trabalhos como o de Borines 2013, baseia seus pré-tratamentos na alteração da temperatura como fator principal, deixando a concentração do H₂SO₄ como agente secundário, já Daroch 2013, reúne dados sobre a influência da temperatura na produção de etanol com macroalgas do gênero *Sargassum*, onde apresenta resultados de aproximadamente 10% de produção total de etanol com *Sargassum sagamianum*, pré-tratada apenas sob cozedura térmica a 200 °C por tempo estimado em 15 min e fermentação com *Pichia stipitis* CBS7126, por 48h.

Portanto, faz-se necessária maior verificação das variações dos teores de etanol produzidos durante as fermentações com *S. cerevisiae* sob as mesmas concentrações de H₂SO₄ e diferentes temperaturas, para se chegar ao quadro mais próximo ao rela fator que influencia de forma crucial esta etapa.

...

Tabela VI: Teor de etanol nos hidrolisados de *Sagarssum muticum*.

Tipo de Sacarificação	Tempo de Fermentação				
	3º dia (%)	4º dia (%)	5º dia (%)	6º dia (%)	7º dia (%)
Hidrólise nas condições de variação 1 (100°C 1h)					
H ₂ SO ₄ a 2,5%	1,02	1,06	1,44	1,44	1,16
H ₂ SO ₄ a 3%	0,57	0,69	0,78	0,80	0,96
H ₂ SO ₄ a 3,5%	1,01	0,95	0,84	0,82	0,60
H ₂ SO ₄ a 4%	0,42	0,43	0,45	0,47	0,48
H ₂ SO ₄ a 4,5%	0,57	0,78	0,79	0,91	0,96
H ₂ SO ₄ a 5%	0,74	0,74	0,75	0,79	0,83
Hidrólise nas condições de variação 2 (115°C 1h30)					
H ₂ SO ₄ a 4%	1	1,22	1,47	1,65	1,75
H ₂ SO ₄ a 5%	0,70	0,77	0,85	0,98	0,99
Hidrólise enzimática					
Celulase	0,50	0,41	0,41	0,41	0,39

Os níveis de produção de etanol podem ainda ter sofrido alteração por fatores promovidos pelas condições não sépticas, pois a manipulação das fermentações, ainda que em incubadora, pode promover a mudança do microambiente anaerobiótico para o aerobiótico, permitindo assim, a propagação de microrganismos não desejados e consequente contaminação, com queda da produção de etanol como consequência.

Os produtos finais da transformação do açúcar dependem do meio em que a levedura se encontra, já que, na anaerobiose, a maior parte do açúcar é transformada em dióxido de carbono e etanol – fermentação alcoólica – enquanto que, na aerobiose uma porção deste açúcar é convertida em biomassa, CO₂ e água (António, 2010), fatores estes que abrem espaço para maior probabilidade de proliferação de microrganismos que promovem a fermentação láctica e maloláctica, as quais necessitariam de análise para verificação e medição de seus produtos.

Os hidrolisados com H₂SO₄ 3%, 4,5% e 5%, apresentaram resultados próximos entre si, sendo possível agrupá-los para análise como mostra o Anexo A.

3.2.2. Condições não sépticas e eventual presença de inibidores

A hidrólise enzimática da celulose é efetuada por β-hidrolases altamente específicas para a quebra destas ligações e os produtos são geralmente açúcares simples tais como a glucose (Sun & Cheng, 2002). O ácido algínico, que por ser um polímero linear, também

...

contêm o ácido β -D-manurônico, com ligações $\beta(1\rightarrow4)$, assemelhando-se à pectina e à celulose, este polissacarídeo resulta principalmente na hidrólise de produtos como ácido glucorônico, galacturônico e fucoidana, heteropolissacarídeo parcialmente sulfonado que frequentemente contém ácido urônico.

O baixo desempenho das fermentações dos hidrolisados com celulase (Tabela IV) pode ter sido influenciado pela baixa atividade da enzima (1,44U/mg), se comparada com as celulases comercializadas atualmente (atividade igual ou superior a 700 U/mg), pois, diversos fatores como os físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e contaminação bacteriana) afetam o rendimento fermentativo mesmo de leveduras relativamente novas, ainda em seu armazenamento, caso ocorra de forma inadequada. Quedas na eficiência fermentativa alteram a estequiometria do processo, ocorrendo maior formação de produtos secundários (principalmente glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa (Aquarone *et al.*, 2001).

O processo de fermentação e produção de etanol não é conduzido em completa condição de assepsia, com a contaminação bacteriana podendo estar presente, em teores toleráveis. Segundo a literatura, as principais bactérias envolvidas nas prováveis contaminações são os *Lactobacillus* e os *Bacillus* e, o aumento da formação de ácido lático está relacionado com esta contaminação bacteriana, que é um dos fatores predominantes dentre aqueles que podem afetar a fermentação alcoólica (Aquarone *et al.*, 2001; Nobre *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foram analisadas e contabilizadas por Cromatografia Gasosa, apenas a presença de etanol durante o tratamento dos dados (Tabela VII), que mostra de forma clara resultados compatíveis com taxa de produção de etanol observada nos hidrolisados com H_2SO_4 a 2,5% e 4% (variação 2), pois, estes são os únicos a apresentar valores acima de 50%, distanciando-se do percentual dos demais hidrolisados e próximos aos valores de Jang 2012, que obteve conversão de biomassa em torno de 21% com *Saccharina japonica*, a partir de pré-tratamentos apenas com hidrólises ácidas, 31,2% quando ocorreu adição da enzima alfa-amilase Termamyl® e, 69,1% somente quando realizada hidrólise ácida e *Bacillus sp.*

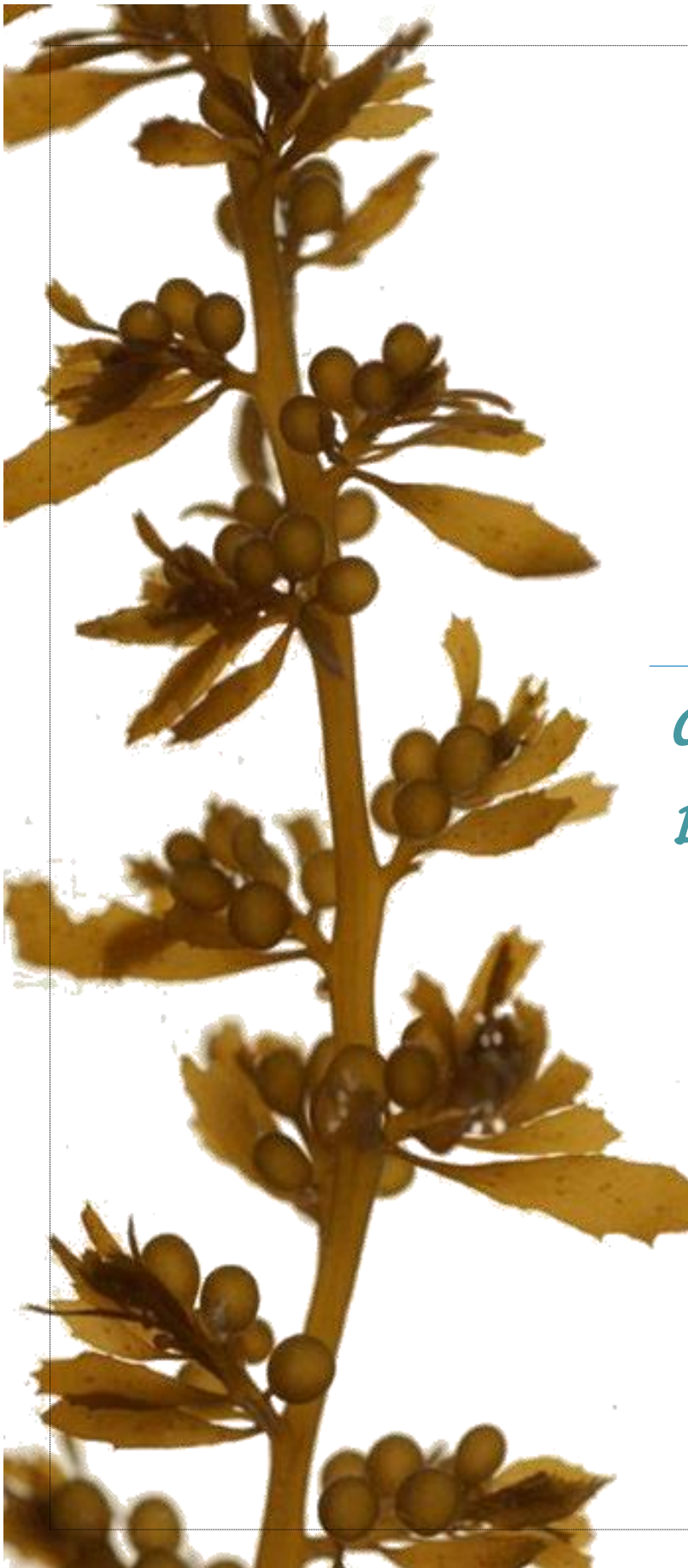
...

Entretanto, há outro fator relevante na diferença destes resultados, é a formação de furfurais que são potentes inibidores do crescimento de *S. cerevisiae*, interferência possivelmente observada também na amostra com H₂SO₄ a 3,5%, quando esta apresenta uma queda brusca dos valores observados a partir do 4º dia, rebaixando-a para índices menores que as fermentações com concentração a 2,5% e 3%.

Tabela VII: Percentagem de conversão da biomassa de *S. muticum* em etanol.

Tipo de Hidrolisado	Taxa de conversão de biomassa (%)
Enzimático - celulase)	32,58
Ácido - H ₂ SO ₄ 2,5%	84,36
Ácido - H ₂ SO ₄ 3%	56,32
Ácido - H ₂ SO ₄ 3,5%	59,18
Ácido - H ₂ SO ₄ 4% (Var. 1)	28,24
Ácido - H ₂ SO ₄ 4,5%	56,32
Ácido - H ₂ SO ₄ 5% (Var. 1)	48,27
Ácido - H ₂ SO ₄ 4% (Var. 2)	96,19
Ácido - H ₂ SO ₄ 5% (Var. 2)	57,84

...



4

*Conclusões e
Perspectivas
Futuras*

4.1. Conclusões

De forma geral as extrações de polissacarídeos mostraram-se pouco relevantes para a realização das etapas seguintes, já que os pré-tratamentos através de hidrólises ácidas resultaram de forma satisfatória em relação à sacarificação de polissacarídeos. Porém, não foi possível verificar se estes ensaios teriam melhores resultados em diferentes condições de temperatura.

Os teores de hidratos de carbono resultantes da sacarificação mostraram-se variantes em relação às concentrações de ácido sulfúrico, porém, os resultados não foram suficientemente conclusivos, dadas variações que podem ter ocorrido durante as fermentações promovidas pelas condições não-sépticas. Fator igualmente relevante para os baixos índices de conversão de biomassa e produção de etanol observado com o uso da celulase, provavelmente devido à sua baixa atividade catalítica.

Entretanto, mesmo com estas interferências, as sacarificações efetuadas com ácido sulfúrico em *Sagarssum muticum*, mostraram-se promissoras e de rendimento viável para a produção de bioetanol, pois, apresentaram rendimento acima de 50% na conversão da biomassa em etanol mesmo a baixas concentrações de H₂SO₄ sob fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*.

Esta utilização poderia ser uma alternativa para promoção da sustentabilidade, pois viabiliza-se a utilização desta alga como forma de mitigação do quadro ambiental atual, instalado em território nacional, onde a mesma apresenta comportamento invasor e prejudicial às algas naturais do litoral português.

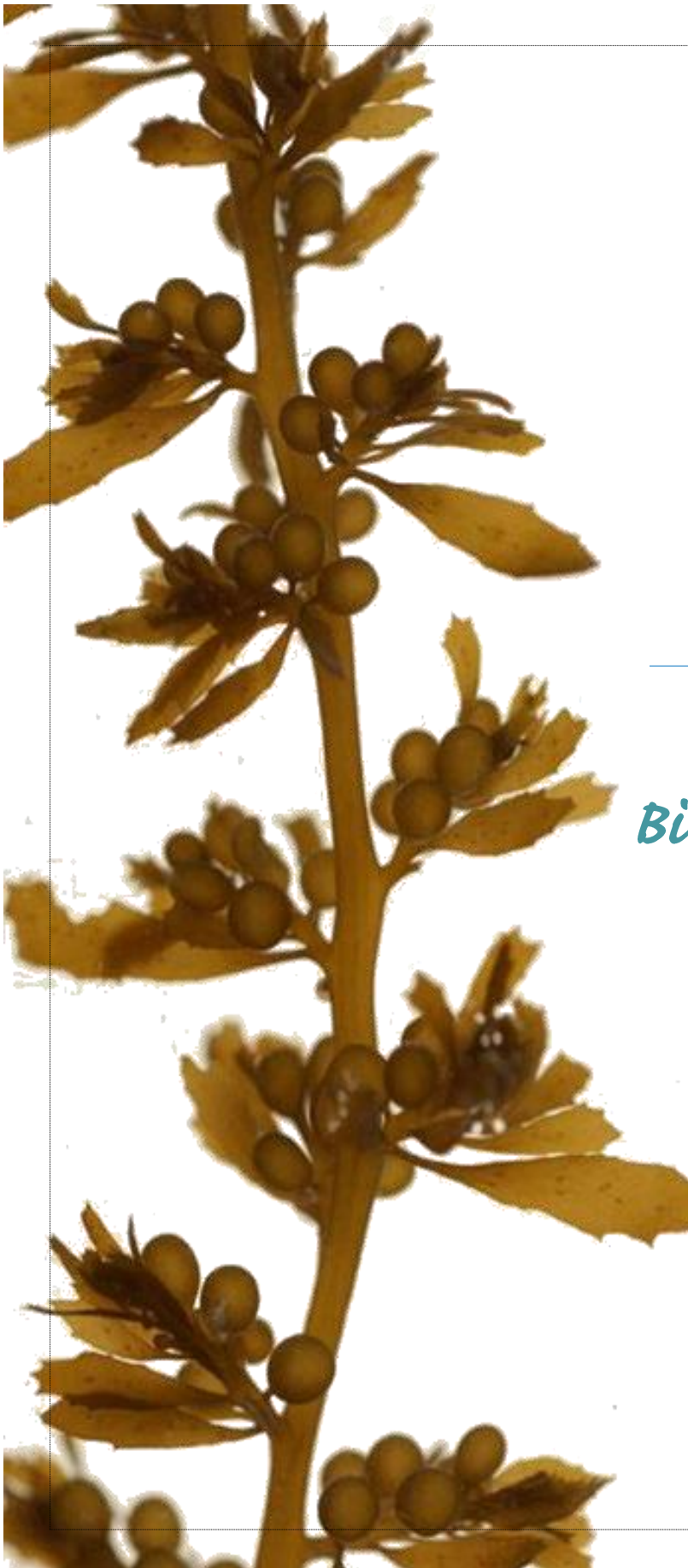
...

4.2. Perspectivas Futuras

Apesar do principal objetivo do trabalho ter sido atingido pois foi possível etanol a partir de *S. muticum*, trabalhos futuros podem ser considerados a partir de melhorias a serem realizadas. A citar, a verificação da influência de novas condições de temperatura sobre o nível de sacarificação e utilização de celulasas com maior atividade enzimática. É indicado também, que se realizem novos testes com fermentações “mistas”, ou seja, sobre influência consecutiva destes dois fatores – ácido e enzimático.

Por fim, as análises por HPLC, podem mostrar-se mais conclusivas a partir da utilização de colunas que identifiquem tanto açúcares quanto as hexoses ácidas esperados na composição do *S. muticum*, podendo revelar altos índices de produção de etanol futuramente.

...



5

*Referências
Bibliográficas*

...

- Aizawa, M. Asaoka, K. ; Atsumi, M. & Sakou, T. (2007). **Seaweed Bioethanol production in Japan - The Ocean Sunrise Project**. Oceans.
- Antônio, L. de F. (2010). **Hidrólise Ácida de Polissacarídeos de Microrganismos para Produção de Etanol**. Dissertação De Mestrado. Riberão Preto, SP.
- Antunes, R. & Silva, I.C. (2010). **Utilização de algas para a produção de biocombustíveis**. Cluster Do Conhecimento De Energias Renováveis. Inpi. Lisboa.
- Aquarone, E.; Borzani, W.; Lima, U. de A. & Schmidell, W. (2001). **Biotecnologia Industrial**. São Paula. Editor Edgard Blücher Ltda Volume 3: 11 – 39.
- Borines, M. G.; Leon, R. L & Cuello, J. L. (2013). **Bioethanol Production from the macroalgae *Sargassum Spp.*** Bioresource Technology. Volume 138: 22–29.
- Britton-Simmons, K. H. (2004). **Direct and indirect effects of the introduced alga *Sargassum Muticum* on benthic, subtidal communities of Washington State, USA**. Marine Ecology Progress Series. Volume 277: 61–78.
- Cameron, M. C.; Ross, A. G. & Percival, E. G. V. (1948). **Methods for the routine estimation of mannitol, alginic acid, and combined fucose in seaweeds**. Journal of the Society of Chemical Industry. Volume 67(4): 161–164.
- Coimbra, C. S. (2006). **Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sagarssum* C. Agardh do Atlântico Sul**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Collins, C. H.; Braga, G. L. & Bonato, P. S. (1997). **Introdução aos Métodos Cromatográficos**. Barão Geraldo: Ed. Estadual De Campinas. 299p.
- Daroch M., Geng S. & Wang G. (2013). Recent Advances **In liquid biofuel production from algal feedstocks**. Applied Energy. Volume 102: 1371 – 1381.
- Fasahati, P. & Liu, J. J. (2012). **Process simulation of bioethanol production from brown algae**. Symposium on Advanced Control of Chemical Processes. Ifac. 597–602.

...

- Fasahati, P. & Liu, J. J. (2012). **Process Simulation Of Bioethanol Production From Brown Algae**. Preprints of the 8th Ifac Symposium on Advanced Control of Chemical Processes. The International Federation of Automatic Control. Furama Riverfront. Singapore. 597-602.
- Ficocolóides e sua importância econômica**. 2012 in <http://amandawy.bio.br>. Acesso em 13 de dezembro de 2014.
- Franco, A. L. C.; Lôbo, I. P. & Cruz, R. S. (2013). **Biodiesel de microalgas: avanços e desafios**. Química Nova. Volume 36 (3): 437 – 448.
- Fuhr, C. (2014). **Turbo para algas: alga turbinada**. Schott Solutions. Volume 1 (14): 18 – 22.
- Gabriel, J. R. (2009). **Estudo da hidrólise de carboidratos em meio neutro, utilizando uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo: Instituto de Química de São Carlos.
- Garofalo, R. (2010). **Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd Generation Biofuels**. Aquafuels.
- Ge, L., Wang, P. & Mou, H. (2011). **Study on Saccharification Techniques of Seaweed Wastes for the transformation of ethanol**. Renewable Energy. Volume 36: 84 – 89.
- Goh, C.S., Lee & K.T. (2010). **A visionary and conceptual Macroalgae-Based-Third-Generation Bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia and underlay for renewable and sustainable development**. Renewable & Sustainable Energy Reviews. Volume 14: 842 – 848.
- Jang, J. S., Cho Y., Jeong, G. & Kim, S. K. (2012). **Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, Saccharina japonica**. Bioprocess Biosyst Eng. Volume 35: 11 – 18.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M. & Pandey, A. (2011). **Micro and Macroalgal Biomass: A Renewable Source For Bioethanol**. Bioresources Technological. Volume 102: 186 – 193.

...

- Josefsson, M. & Jansson, K. (2011). **Invasive alien species fact sheet – *Sargassum Muticum***. Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – Nobanis.
- Kosaric, N.; Wieczorek, A. & Cosentino, G. P. (1983), **Etanol Fermentation**. Ed. Biotechnology, Wheinheim: Verlag Chemie. 257-385.
- Kraan, S. (2013). **Mass cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for ustainable biofuel Production**. Mitigation and Adaptation Strategies for Global. Volume 18:47-26.
- Maceiras, R., Cancela, A., Rodríguez, M., Sánchez, A. & Urréjola, S. (2010). **An Innovative Biodiesel Production**. Cisap4 – 4th *International Conference On Safe Environmental*. Wepapper 13: 1- 6.
- Marín, A., Casas-Valdez, M., Carrillo, S., Hernández, H., Monroy, A., Sanginés, L. & Perez-Gil, F. (2009). **The Marine Algae *Sargassum spp.* (Sargassaceae) as feed for sheep in Tropical and Subtropical Regions**. Revista Biológica Tropical. Volume 57(4): 1271-1281.
- Mchugh D. J. (2003). **A Guide To The Seaweed Industry**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Fisheries Technical Paper. Volume 441. Rome.
- Meinita, D. N. M; Kang, J. Y.; Jeong G. T. & Koo, H. M. *et al.* (2013). **Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus Alvarezii* (Cottonii)**. Journal Of Applied Phycology. Volume 24: 857–862.
- Murugadas, T. L., Phang, S. M. & Tong, S. L. (1995). **Heavy metal accumulation cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum Tortile***. Chermical & Pharmaceutical Bulletin. Volume 39 (8): 2129 – 2131 *In* Montes, R. C. (2012). **Estudo fícoquímico da alga marinha *Sargassum Vulgare var. Nanum* E. de Paula (Sargassaceae) do Litoral Paraíba**. Dissertação de Pós-Graduação. Universidade Federal Da Paraíba.

...

- Mutripah, S.; Meinita, M. D. N. & Kang, J. Y. (2014). **Bioethanol Production From The Hydrolysate Of *Palmaria Palmata* Using Sulfuric Acid And Fermentation With Brewer's Yeast.** Journal Of Applied Phycology. Volume 26: 687 – 693.
- Nobre, T. De P.; Horii, J. & Alcarde, A. R. (2007). **Viabilidade Celular De *Saccharomyces Cerevisiae* Cultivada em associação com bactérias contaminantes de fermentação alcoólica.** Ciência E Tecnologia De Alimentos. Campinas. Volume 27 (1): 20 – 25.
- Palminha, F.P. (1971). **Exploração E Utilização De Algas Marinhas Na Plataforma Portuguesa E Nas Ilhas Do Arquipélago Dos Açores.** *Junta Nacional Do Fomento Das Pescas* 7: 25-36 In Pereira, L. (2008). As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. Monografias. Volume 913: 1-19.
- Pereira, L. (2008). **As Algas Marinhas E Respectivas Utilidades.** Monografias. Volume 913: 1-19.
- Raven, P. H. (2007). **Biologia Vegetal.** Editora Guanabara Koogan. Rio De Janeiro. Capítulo 15: 313 – 361.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Silva, A., Amorim, M., Pereira, L., Rocha-Santos, T. A. P., Gomes, A.M. P., Duarte, A. C. & Freitas, A. C. (2015). **Impact of Enzyme- and Ultrasound-Assisted Extraction Methods on Biological Properties of Red, Brown, and Green Seaweeds from the Central West Coast of Portugal.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. American Chemical Society.
- Rohfritsch, A., Payri, C., Stiger, V., Bonhomme, F. (2010). **Habitat-Related Allelic Variation Revealed By An Anonymous Dna Locus In Reef-Dwelling *Turbinaria Ornata* (Fucales, Phaeophyceae).** Botanica Marina. Volume 53: 189–192.
- Rousseau, B. (1999). **Towards a new classification of the brown algae, in “Progress in Phycological Research”.** Edited By F.E. Round And D.J. Chapman. Capítulo 7: 107-201.
- Santiago, P. A.; Marquez, L. D. S.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J. (2004). **Estudo da produção de β -Galactosidase por fermentação de soro de queijo com**

...

Kluyveromyces Marxianus. Revista de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Volume 24(4): 567-572.

Sargassum muticum (Yendo) Fensholt in <http://macoi.ci.uc.pt> (MACOI. Portuguese Seaweeds Website. University of Coimbra). 2008

Sousa-Pinto, I. & Araújo, R. (1998). **The Seaweed Resources Of Portugal**.

Sousa-Pinto, I. & Araújo, R. (2006). **The Seaweed Resources of Portugal**. In **Seaweed Resources of The World**. Ed Ohno & Critchley. Yokosuka

Stiger, V.; Horiguchi, T.; Yoshida, T., Coleman, A. W. & Masuda, M. (2003). **Phylogenetic relationships within the Genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae), inferred from Its-2 N-rDNA, with an emphasis on the taxonomic subdivision of the genus**. Phycological Research. Volume 51: 1–10.

Sun, Y. & Cheng, J. (2002). **Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for ethanol production: a review**. Bioresource Technological. Volume 83: 1 – 11.

Trono Jr., G.C. (1988). **Manual On Seaweed Culture 2. Pond Culture Of *Caulerpa* And 3. Pond Culture Of *Gracilaria***. Fao Corporate Document Repository. Manual Nº. 3

Vieira, V. V. & Santos, M. (1995). **Directório de Aquacultura e Biotecnologia Marinha**. Escola Superior De Biotecnologia Da Universidade Católica Portuguesa, Porto, 113 Pp In Pereira, L. (2008). As Algas Marinhas e Respectiveas Utilidades. Monografias. Volume 913: 1-19.

Wyman, C. E. (1994). **Ethanol From Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, And Opportunities**. Bioresource Technology Volume 50:3–16.

Zemke-White, W. L., Ohno, M. (1999). **World seaweed utilisation: an end-of-Century Summary**. Journal Of Applied Phycology. Volume 11: 369–376.

www.algaebase.org acesso em 02 de junho de 2015.

www.iba-hamburg.de acesso em 10 de março de 2015.

www.onu.org.br Acesso Em 13 De Janeiro De 2015.

...

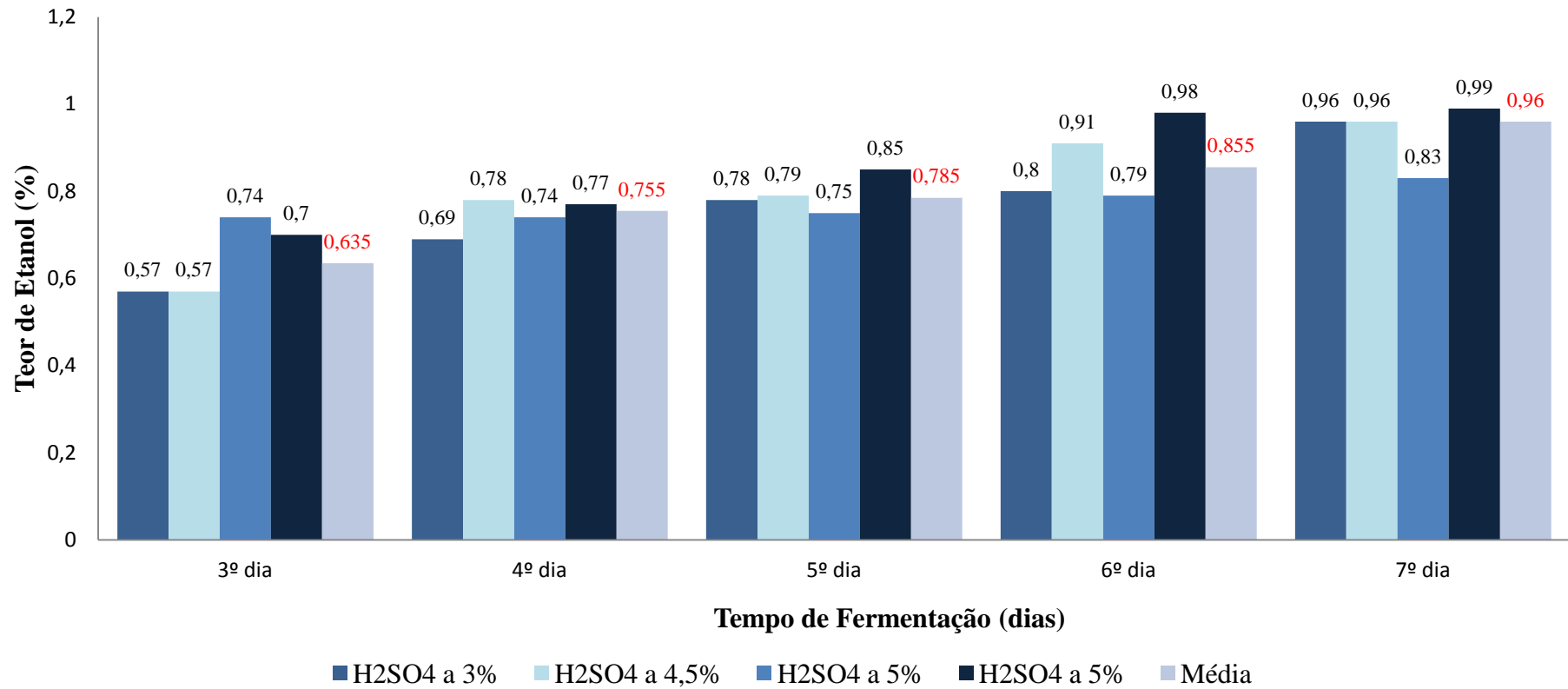


6

Anexos

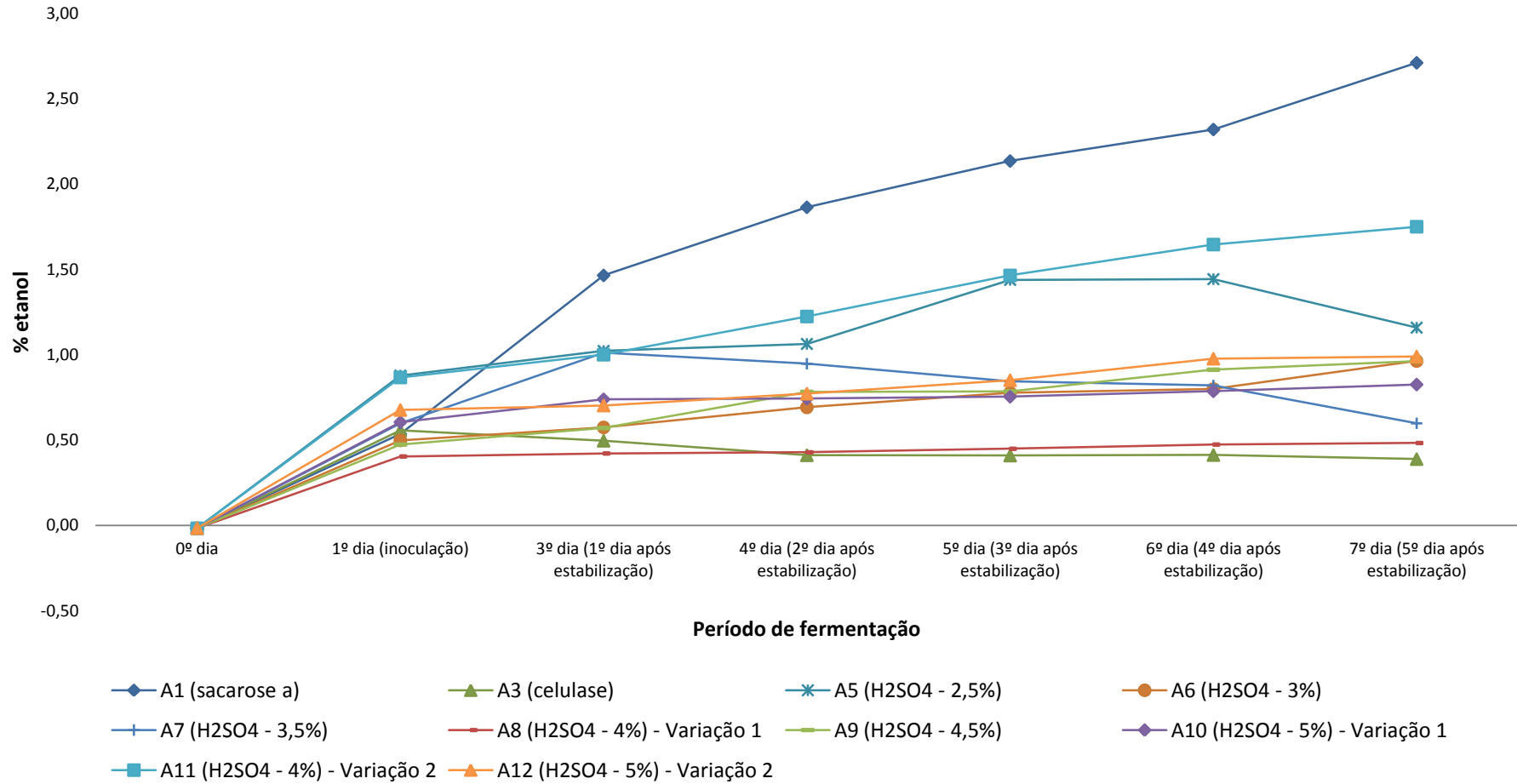
...

Anexo A: Gráfico do teor de etanol dos hidrolisados com H₂SO₄ 3%, 4,5% e 5%.



Anexo B: Gráfico da evolução da percentagem (%) diária de produção de etanol em cada amostra utilizada em fermentação.

Produção diária de etanol



...

Anexo C: Tabela de procedimentos realizados durante o pré-tratamento e fermentação dos hidrolisados.

Pré-tratamento		Açúcares (mg/mL)		Teor Obtido no fermentado
Tipo de Hidrólise	Temperatura	Totais	Glucose+Galactose	Etanol (W/W) %
Enzimática				
Celulase	40°C	180	4,34	0,41
Ácida				
<i>Varição 1(100°C / 1h)</i>				
H ₂ SO ₄ a 2,5%		62,5	26,33	1,44
H ₂ SO ₄ a 3%		50	22,06	0,96
H ₂ SO ₄ a 3,5%		37,5	18,09	0,82
H ₂ SO ₄ a 4%	100°C	50	9,65	0,48
H ₂ SO ₄ a 4,5%		62,5	7,40	0,96
H ₂ SO ₄ a 5%		50	28,99	0,83
<i>Varição 2 (115°C / 1h30)</i>				
H ₂ SO ₄ a 4%		75	-	1,75
H ₂ SO ₄ a 5%	115°C	75	-	0,99

...