



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Produção de bioetanol a partir da macroalga *Kappaphycus alvarezii* no Brasil.

Cristiane Azevedo Vaz

Orientador: Brener Magnabosco Marra

Ouro Branco—MG
Dezembro/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Produção de bioetanol a partir da macroalga *Kappaphycus alvarezii* no Brasil.

Cristiane Azevedo Vaz

Monografia apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del-Rei, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Brener Magnabosco Marra.

Ouro Branco-MG
Dezembro/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Produção de bioetanol a partir da macroalga *Kappaphycus alvarezii* no Brasil.

Cristiane Azevedo Vaz

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Brener Magnabosco Marra – Orientador

Bruno Meireles Xavier – Examinador 1

Alessandra Costa Vilaça – Examinador 2

Ouro Branco, 11/12/2015

“ Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força para enfrentar e superar as dificuldades encontradas durante todos esses anos de graduação.

Ao Professor Brener Magnabosco Marra pela orientação e apoio.

Aos meus pais e a minha irmã pelo amor, incentivo e apoio

Aos meus amigos que foram de extrema importância durante essa etapa da minha vida.

A todos os professores que me proporcionaram o conhecimento e que foram responsáveis pela minha formação acadêmica e pessoal.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta na minha formação, o meu muito obrigado!

RESUMO

Atualmente, novas formas renováveis de energia vem sendo discutidas devido aos riscos e danos socioambientais causados pelo petróleo. Uma alternativa renovável são os biocombustíveis, como o bioetanol. Neste trabalho foi realizado uma revisão da literatura sobre o etanol de terceira geração utilizando os polissacarídeos extraídos da macroalga *Kappaphycus alvarezii* como fonte de açúcar fermentescível. A utilização de algas marinhas na produção de etanol é promissora, pois as algas não competem com a área agriculturável, não requer a utilização de fertilizantes químicos, não danifica o solo, devido aos impactos ambientais causados pelo frequente monocultivo, e não requer de água potável para irrigação. O cultivo de algas marinhas requer somente, água do mar, luz solar e CO₂. Uma pesquisa de processos de patentes no banco de dados do INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) foi realizada. Essa pesquisa teve como principal objetivo verificar a produção de inovação tecnológica no ramo da produção de etanol a partir de macroalgas. Uma patente muito importante, no que diz respeito a produção de inovação tecnológica no Brasil, foi encontrada, ela pertence a Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde foi desenvolvido um processo inédito de produção de etanol utilizando macroalgas.

Palavras-chave: Algas, Biomassa, Combustível, Etanol, *Kappaphycus alvarezii*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVO.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Bioetanol no Brasil	12
3.2	Algas.....	14
3.3	<i>Kappaphycus Alvarezii</i>	19
3.3.1	Carragenana.....	22
3.4	Aplicações biotecnológicas.....	23
3.5	Processo de produção do Bioetanol de algas.....	27
3.5.1	Pré-tratamento	27
3.5.2	Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.5.3	Processo fermentativo	32
3.6	Inovação tecnológica no Brasil	34
4	CONCLUSÃO.....	39
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são produzidos a partir de fontes renováveis, ou seja, é qualquer combustível oriundo de produtos vegetais ou de compostos de origem animal. As fontes mais utilizadas são a cana-de-açúcar, milho, oleaginosas, como semente de girassol, madeira e celulose. Além dessas fontes, a biomassa proveniente de microalgas e macroalgas, também pode ser utilizada na produção dos biocombustíveis (BIODIESELBR, 2009). Segundo a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Bicombustíveis), cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil são de fontes renováveis. Esse fato, torna o Brasil pioneiro no uso de biocombustíveis, alcançando uma posição almejada por muitos países que buscam alternativas renováveis ao uso de petróleo (ANP, 2015).

A utilização de formas renováveis de energia vem sendo discutida devido aos potenciais riscos e danos socioambientais causados pelo petróleo, os biocombustíveis são uma alternativa energética renovável por diminuir a emissão de gases do efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO₂). Porém, a produção de biocombustíveis também possui limitações, uma delas é a exigência de extensas áreas de cultivo, que com o aumento de demanda pode competir com o setor agrícola. Uma maneira de contornar esse problema, é utilizar outras fontes de biomassa, como por exemplo, os resíduos agroindustriais. Eles são gerados em abundância, para utilizá-los é necessário o desenvolvimento de processos biotecnológicos (FERREIRA, 2015).

O etanol pode ser classificado como primeira, segunda e terceira geração. Os combustíveis de primeira geração são o biodiesel e o etanol, que podem ser produzidos a partir do óleo vegetal, gordura animal, amido ou açúcar (CARVALHO, *et al.*, 2013). O etanol de segunda geração utiliza resíduos lignocelulósicos como fonte de carboidratos, essa biomassa é constituída por celulose, hemicelulose e lignina. Para serem utilizados no processo de produção de etanol, a parede celular da biomassa lignocelulósica deve ser submetida a um processo eficiente que torne disponíveis os monômeros de glicose, para que assim possam ser transformados em etanol por meio da fermentação (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008). O etanol de terceira geração utiliza biomassa marinha como

fonte de açúcares para a produção de biocombustíveis. O processo de produção é um desafio, pois é necessário aprimorar as etapas de extração e fermentação dos polissacarídeos presentes na biomassa algal (WANDERLEY, 2013).

As algas podem ser usadas para a produção de biodiesel e etanol, o primeiro a partir de lipídeos e o outro de polissacarídeos extraídos das algas. Para obtenção do etanol de terceira geração é possível utilizar macroalgas e microalgas. Estudos mostram o potencial da macroalga *Kappaphycus alvarezii* como matéria-prima para a produção de bioetanol, esta espécie é fonte de carragenana, que possui diversa aplicação na indústria, principalmente alimentícia. É encontrada principalmente na região do Indo-Pacífico e foi introduzida no Brasil em 1995 pelo Instituto de Pesca de São Paulo em parceria com o Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (PAULA e PEREIRA, 1998). A espécie *Kappaphycus* é a primeira macroalga exótica liberada para ser produzida no Brasil. Ela foi introduzida com a finalidade de suprir o mercado local de kappa carragenana. Para introduzir uma espécie no litoral brasileiro foram necessários vários estudos com o intuito de avaliar os riscos ambientais (PAULA *et al.*, 1999; BULBOA *et al.*, 2007). Somente em 2008, pela Instrução Normativa N° 185 (IBAMA), foi permitido o cultivo da *Kappaphycus alvarezii* entre a Baía de Sepetiba (RJ) e a Ilha Bela (SP) (GOÉS, 2009).

A vantagem em se utilizar algas na produção de etanol é que não é necessário degradar a sua parede celular, enquanto que um dos principais desafios da produção de etanol de segunda geração é romper a estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica. Além disso, a utilização de algas marinhas é bastante promissora, pois não compete com a área agriculturável, não requer a utilização de fertilizantes químicos, não danifica o solo através dos impactos ambientais causados pelo frequente monocultivo e não requer de água potável para irrigação; o cultivo de algas marinhas utiliza somente, água do mar, luz solar e CO₂ (DEMIBRAS, 2010; JUNG *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2012; JOHN *et al.*, 2011).

As macroalgas são capazes de converter energia solar em energia química com uma eficiência maior quando comparada a de biomassa terrestre. Essa eficiência fotossintética faz com que sua taxa de crescimento seja superior à de outros vegetais, assim como sua taxa de absorção de CO₂, com isso, a utilização de macroalgas é uma opção mais sustentável (BORINES *et al.*, 2011;

JOHN *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2012). Com o passar dos anos e com a limitação dos recursos hídricos, o esgotamento dos combustíveis fósseis e o aumento do efeito estufa, faz com que o uso de biomassa marinha para produzir biocombustíveis se torne viável.

O objetivo principal deste trabalho é realizar uma revisão sobre a produção de bioetanol utilizando a biomassa da macroalga *Kappaphycus alvarezii* como fonte de açúcar fermentescível. E também, realizar uma busca de patentes com a finalidade de verificar a produção de inovação tecnológica no Brasil, no ramo de bioetanol de terceira geração.

2 OBJETIVO

Elaborar uma revisão bibliográfica sobre a produção de etanol a partir da macroalga *Kappaphycus alvarezii*.

Avaliar a produção de inovação tecnológica nos bancos de patente utilizando as palavras chaves: Algas, Biomassa, Combustível, Etanol, *Kappaphycus alvarezii*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bioetanol no Brasil

No início de 1920, ocorreram as primeiras experiências com o álcool combustível, tornando o mercado de cana mais estável. Nesse mesmo período o mercado brasileiro de cana perdia espaço no mercado externo, devido a introdução da cultura de cana em Cuba e o desenvolvimento de tecnologia para a produção de açúcar a partir de beterraba pelos franceses. (ANCIÕES, 1980; MICHEL Jr., 2010). Na década de 30, pelo decreto nº 197 17 de 20 de fevereiro de 1931, tornou-se obrigatório a adição de 5% de álcool à gasolina importada, com a intenção de regularizar a situação do setor açucareiro (PAMPLONA, 1984). Após algumas pesquisas, descobriu-se que a mistura ideal de álcool anidro, para usar nos motores existentes, era de 20% (BRANDÃO, 1984).

Na década de 70, com a crise do petróleo, a partir de uma iniciativa governamental, foi criado o programa nacional do álcool, chamado de ProÁlcool. O programa tinha como objetivo apoiar o desenvolvimento tecnológico das indústrias sucroalcooleiras, tendo como finalidade, substituir os combustíveis derivado do petróleo como a gasolina por etanol. O programa foi dividido em três fases, na primeira fase, de 1975 até 1979, o foco era na produção de etanol anidro para ser misturado à gasolina, aproveitando a infraestrutura existente, implantando destilarias anexas as usinas de açúcar. Na segunda fase, conhecida como o auge do Proálcool, compreende de 1980 até a metade da década de 80, o foco passou a ser na produção do etanol hidratado, para ser usado puro nos automóveis com motores adaptados a esse combustível. O declínio do Proálcool ocorreu na terceira fase, na segunda metade da década de 80 devido ao aumento da dívida interna e externa, a elevação das taxas de juros no mercado internacional, a redução do preço do petróleo e ao fim do subsídio do governo ao setor sucroalcooleiro (CARVALHO e CARRIJO, 2007)

Na década de 80, mais de 90% dos automóveis vendidos no Brasil utilizavam etanol como combustível, mas no final dessa mesma década o preço do petróleo voltou a cair e com isso, a produção de etanol hidratado diminuiu. Já no final da década 90, apenas 1% dos carros vendidos possuíam motores

movidos a etanol. E, mesmo com as oscilações do mercado pós ProÁlcool, o etanol manteve-se como um importante componente na matriz energética brasileira, uma vez que por exigência da legislação ambiental, o etanol anidro passou a ser misturado à gasolina em percentuais de até 25%. Além disso, as indústrias automotivas passaram a fabricar em grande escala os carros bicom bustíveis, também chamados de modelos flex, que utilizam tanto etanol quanto gasolina, garantindo assim a produção de etanol (ANP, 2011).

Mesmo com o fim do programa Proálcool, as pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias continuam sendo incentivadas pelo governo. A produção de etanol no Brasil possui algumas vantagens em relação a outros países, como exemplo, o domínio do processo de produção e a abundância de terra agricultável, devido a essas vantagens o Brasil possui o menor custo de produção de etanol do mundo (CARVALHO, 2013). Atualmente, vem sendo discutidas fontes alternativas de produção de etanol, com o intuito de aumentar a produção para atender a demanda mundial. Uma alternativa é a conversão de material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis, chamado de etanol de segunda geração. Há também o etanol de terceira geração que utiliza a biomassa algal ou plantas geneticamente modificadas (BUCKERIDGE *et al.*, 2010).

O etanol pode ser classificado como primeira, segunda ou terceira geração. O etanol de primeira geração pode ser produzido da cana-de-açúcar, beterraba doce, trigo, mandioca e milho. O maior produtor de etanol de milho é os Estados Unidos, seguido do Brasil que utiliza cana-de-açúcar e a União Europeia que utiliza batatas e beterrabas para produzir álcool. O processo de produção do etanol de cana-de-açúcar é simples, ocorre pela fermentação do caldo que possui aproximadamente 15% de sacarose, esse caldo é esterilizado e purificado, após essas duas etapas a fermentação é realizada por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e o etanol é separado do caldo fermentado por destilação (MACEDO, 2008; CARVALHO, 2013). Uma desvantagem da produção de combustíveis de primeira geração é a competição com a produção de alimentos, pela utilização de áreas agricultáveis; mas a vantagem de se produzir esse tipo de combustível é que estudos constataram uma redução significativa no consumo de combustíveis fósseis acarretando na queda das emissões globais (CARVALHO, 2013).

O etanol de segunda geração é produzido a partir de materiais lignocelulósicos presentes em resíduos de origem vegetal como, aparas de madeiras, bagaço e palha de cana, sabugo de milho, entre outros. Para produzir o etanol de segunda geração é necessário degradar a parede celular dos resíduos vegetais, ou seja, separar a celulose, hemicelulose e lignina, para utilizar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis (BUCKERIDGE *et al.*, 2010). A vantagem dessa abordagem é a redução da competição entre os biocombustíveis e os alimentos. O aproveitamento do bagaço gera mais etanol por área plantada, necessitando de menos área agricultável para a produção de etanol (MARQUES, 2009). O Brasil possui vantagens competitivas em relação aos outros países, como menor custo e a fácil disponibilidade de grandes quantidades de matéria-prima, outra vantagem é integrar essa tecnologia as estruturas das unidades produtoras já existentes, com a finalidade de reduzir os custos de instalação e operação. Além disso, com a proibição da queima da palha da cana e com a implantação da colheita mecanizada, resultará em excedentes de bagaço e palha que podem ser transformados em etanol de segunda geração (PACHECO, 2011).

Em 2014, a GranBio, empresa brasileira de biotecnologia industrial, inaugurou a primeira usina de etanol celulósico do Brasil no estado de Alagoas, após um mês de operação esperava-se que a planta produzisse 1 milhão de litros por mês de etanol, e passado um ano atingisse a sua capacidade máxima que é de 8 milhões de litros por mês. Até o momento, o melhor mês de produção alcançou 1,5 milhões de litros, o que era esperado para a fase inicial. Mesmo com todas essas frustrações, a GranBio acredita que possa alcançar o preço do etanol de primeira geração em um ano (NOVACANA, 2015).

3.2 Algas

A classificação mais recente dos seres vivos foi sugerida por Woese e seus colaboradores. Eles classificaram os seres vivos em três Domínios: Bacteria, Archaea e Eucarya. Essa classificação foi baseada na comparação do RNA ribossômico, com isso o domínio procarionte foi dividido em Archaea e Eucarya (WOESE *et al.*, 1990). Devido a essa nova classificação, as algas estão presentes em dois domínios, Bacteria e Eucarya.

As algas do domínio Bacteria são as cianobactérias, elas são procariontes (não possuem um núcleo organizado ou organelas rodeadas por membranas e seu DNA está disperso no citoplasma), unicelulares e autótrofas (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

As cianobactérias não possuem cloroplastos, porém, por serem organismos autótrofos fotossintetizantes, apresentam clorofila, principalmente do tipo a. A clorofila a é o principal pigmento da fotossíntese, ela possui uma absorção máxima em 680nm (MADIGAN, 2010). Outro pigmento fotossintetizante que se destaca é a ficobilina que confere cor azulada as cianobactérias (por isso também são chamadas de algas azuis), mas também podem apresentar coloração esverdeada, avermelhada ou enegrecida. Além dos pigmentos fotossintetizantes, as cianobactérias possuem carotenoides como o beta-caroteno (PAULA *et al.*, 2007). As cianobactérias armazenam amido como reserva energética, esse amido também é chamado de amido das cianofíceas. As cianobactérias podem viver em ambientes extremamente diversos, podendo sobreviver a temperaturas de até 74°C ou em temperaturas muito baixas. A maioria das algas azuis são de água doce, algumas formas marinhas resistem a altas salinidades, e algumas formas terrestres vivem sobre rochas ou solo úmido. Há também as que se associam com os fungos, formando os líquens (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; PAULA *et al.*, 2007).

As algas do Domínio Eucarya são divididas em dois reinos, Protista e Plantae. As algas do reino protista são unicelulares, autótrofas, possuem envoltório nuclear e organelas membranosas como mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, apresentam pigmentos no interior dos plastos como clorofilas, carotenos e xantofilas. São esses pigmentos que permitem a realização da fotossíntese. As algas do reino Protista são divididas em três filos, Euglenophyta, Pyrrophyta e Crysophyta (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

No filo Euglenophyta, a maioria das algas são unicelular, possuem um ou dois flagelos, não possuem parede celular. O que reveste a membrana plasmática, internamente, é uma película protéica. As algas do filo Euglenophyta são autótrofas, possuem muitos plastos contendo as clorofilas a e b e carotenos. A clorofila b, assim como a clorofila c e d, são pigmentos acessórios que ajudam a ampliar a faixa de luz utilizada na fotossíntese, a clorofila b possui uma

absorção máxima em 660 nm (MADIGAN, 2010). As euglenas armazenam grãos de paramilo, carboidrato como o amido que não apresenta reação com o iodo, como reserva energética. Essas algas ocorrem em ambientes marinhos ou de água doce. Sua reprodução ocorre de forma vegetativa, por meio da divisão longitudinal da célula. Em condições desfavoráveis, as euglenas se transformam em cistos que permanecem dormente até que as condições ambientais se tornem favoráveis (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; PAULA *et al.*, 2007).

No filo Pyrrophyta, os organismos apresentam dois flagelos: um flagelo longitudinal e um flagelo transversal, esses organismos são denominados de dinoflagelados, a maioria deles são fitoplanctônicos, mas também podem ser encontrados em água doce. As algas do filo Pyrrophyta são autótrofas, unicelulares, e quando presente, a parede celular é composta de celulose. Além disso, apresentam clorofilas a e c, caroteno e xantofilas exclusivas, como a peridininina. Elas armazenam amidos e óleos como reserva energética. As pirrófitas se reproduzem vegetativamente através de uma simples divisão celular ou reprodução sexuada através da formação de gametas. São responsáveis pelo fenômeno maré vermelha, que corresponde a proliferação excessiva de uma espécie, as mais comuns são as espécies *Prorocentrum*, *Ceratium*, *Cochlodinium*, *Gymnodinium* e *Alexandrium*, esse fenômeno ocorre em águas costeiras ricas em nutrientes, podendo causar a morte de peixes pelo consumo exagerado de oxigênio e produção de toxinas (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; PAULA *et al.*, 2007).

O filo Chrysophyta é composto pelas algas douradas e diatomáceas, são organismos marinhos e de água doce, fazem parte da composição dos fitoplâncton e também podem estar aderidas a um substrato. As algas douradas são organismos unicelulares, autótrofos, armazenam óleos como reserva e apresentam as clorofilas a e c, caroteno e fucoxantina (pigmento acessório carotenoide de cor castanho-dourado). Essas algas podem se deslocar com a ajuda de flagelos ou de pseudópodes. As algas douradas, geralmente, não apresentam parede celular, já as diatomáceas possuem parede celular formada de sílica e são responsáveis pela formação do sedimento “terra de diatomáceas”, bastante utilizado nas indústrias como filtros de líquidos, isolante térmico, abrasivo e também como indicador de petróleo e gás (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; PAULA *et al.*, 2007).

No reino plantae as algas pluricelulares, eucariontes e autótrofas, são chamadas de macroalgas e estão divididas nos Filos Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

As algas verdes estão presentes no filo Chlorophyta, são responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio disponível no planeta e são um dos componentes mais importantes do fitoplâncton. As algas verdes armazenam amido, dentro do cloroplasto, associados aos pirenoides (regiões diferenciadas dos cloroplastos, que correspondem a centros de formação de amido) e apresentam os pigmentos clorofila a e b, carotenos e xantofilas. As algas verdes são organismos de água doce ou salgada. Em simbiose com os fungos, as algas verdes formam os líquens. Além disso, essas algas podem apresentar flagelos nas fases vegetativa, reprodutiva ou em ambas. As algas verdes se reproduzem de forma vegetativa, esporica e gamética (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; PAULA *et al.*, 2007).

As algas pardas pertencem ao filo Phaeophyta, são organismos predominantemente marinhos, microscópicas ou macroscópicas, pluricelulares e tem a parede celular formada por uma camada interna de celulose e outra externa de alginato que confere resistência e flexibilidade para suportar choques mecânicos. A reprodução das algas pardas é sexuada por meiose gamética ou esporica. Os esporos e gametas masculinos apresentam flagelos, os quais são as únicas células flageladas do ciclo de vida das faeófitas. Essas algas armazenam polissacarídeos do tipo laminarina e manitol como material de reserva. Vivem fixadas em um substrato ou flutuando, são as maiores algas existentes. Os pigmentos encontrados nas células das algas pardas são as clorofilas a e c, carotenóides e fucoxantina (responsável pela coloração parda dessas algas) (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; PAULA *et al.*, 2007).

As algas vermelhas, que fazem parte do filo Rhodophyta são algas marinhas bentônicas. Na sua maioria são pluricelulares, existindo poucos gêneros unicelulares. A parede celular, dessas algas, é formada por uma camada interna rígida de celulose e uma externa formada por polímeros de galactanas, como o ágar e as carragenanas. Algumas algas apresentam deposição de carbonato de cálcio na parede, o que confere rigidez ao talo. As rodófitas são caracterizadas pela ausência de flagelos, durante seu ciclo de vida. A reprodução pode ser vegetativa, esporica e gamética. A reprodução vegetativa

3.3 *Kappaphycus Alvarezii*

A alga marinha do gênero *Kappaphycus alvarezii* pertence ao grupo das algas vermelhas, Filo Rhodophyta, Classe Floredeophyceae, Ordem Gigartinales e Família Solieriaceae. Descrita anteriormente como *Euchema alvarezii* foi separada por Doty em 1987 devido algumas características morfológicas e anatômicas, mas principalmente pela presença do polissacarídeo carragenana kappa (DOTY, 1988). Mesmo pertencendo ao grupo das algas vermelhas, a macroalga *Kappaphycus alvarezii* pode apresentar pigmentações variadas como vermelho, castanho, amarelo ou diferentes tons de verde, como mostrado na Figura 1, além disso pode atingir um metro de comprimento e pesar mais de um quilo (HAYASHI, 2007).



Figura 1: Diferentes cores da macroalga *Kappaphycus alvarezii*. Fonte: <http://seaweedconsulting.com/algas/>

A alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* é de grande importância comercial por ser a principal fonte de kappa carragena, um hidrocolóide bastante utilizado nas indústrias como agente espessante e estabilizante. Além disso, em alguns países, é utilizada como fonte alimentícia, principalmente em saladas e também como bioindicadores de poluentes de metais pesados como, chumbo e cádmio (TRONO, 1998).

A *Kappaphycus alvarezii* é uma espécie perene, com alternância de três gerações no seu ciclo de vida: esporofítica, gametofítica e carposporofítica, sendo as duas primeiras isomórficas e a última parasita do gametófito feminino. Os órgãos reprodutores masculinos não foram encontrados em plantas cultivadas pois são difíceis de serem reconhecidos no meio natural (ARECES,

1995). A *Kappaphycus alvarezii* é uma espécie com alta taxa de crescimento, cultivada em áreas rasas, se adaptam a altos níveis de iluminação, preferem temperaturas entre 20 a 32°C, águas limpas e claras, mas podem crescer também em águas turvas causadas por sedimentação (HAYASHI, 2007). Essa alga é encontrada na região Indo-Pacífico, principalmente em áreas de recifes de corais do Leste da África até Guam, China, Japão e Ilhas do Sudeste Asiático (DOTY, 1987; ARECES, 1995).

No Brasil, a espécie de macroalga *Kappaphycus alvarezii* foi introduzida experimentalmente em 1995, na baía de Ubatuba, São Paulo, com o objetivo de verificar a possibilidade de produzi-la comercialmente sem causar danos ambientais e suprir a demanda tornando o Brasil autossuficiente na produção de carragenana. Em 2008 o IBAMA, por meio da Instrução Normativa nº185, legalizou uma área do litoral brasileiro para o cultivo dessa alga que compreende desde a Baía de Sepetiba, localizada no estado do Rio de Janeiro, até o município de Ilha Bela no estado de São Paulo (PAULA, 2001). Essa Instrução exige que o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/MMA) executem o monitoramento ambiental da produção de *Kappaphycus alvarezii*.

Umas das técnicas de cultivo mais conhecidas é a “tie-tie” (Figura 2) onde porções do talo são amarrados em cabos de cultivos que, por sua vez, podem ser mantidos fixos ao fundo ou em sistemas flutuantes. Uma nova técnica foi desenvolvida para substituir a tradicional tie-tie, esse sistema de cultivo é utilizado no Brasil e consiste em utilizar balsas flutuantes. Os tubos de PVC são usados como flutuadores e as mudas de *Kappaphycus alvarezii* são colocadas dentro de redes tubulares (Figura 3) oferecendo uma maior proteção contra a ação mecânica das correntes marinhas. E, quando comparada com a técnica tradicional, a técnica de balsas flutuantes apresenta tempo de manejo reduzido e baixo custo, mas com relação a taxa de crescimento das mudas e na qualidade da carragenana não há diferença (GOES e REIS, 2011).

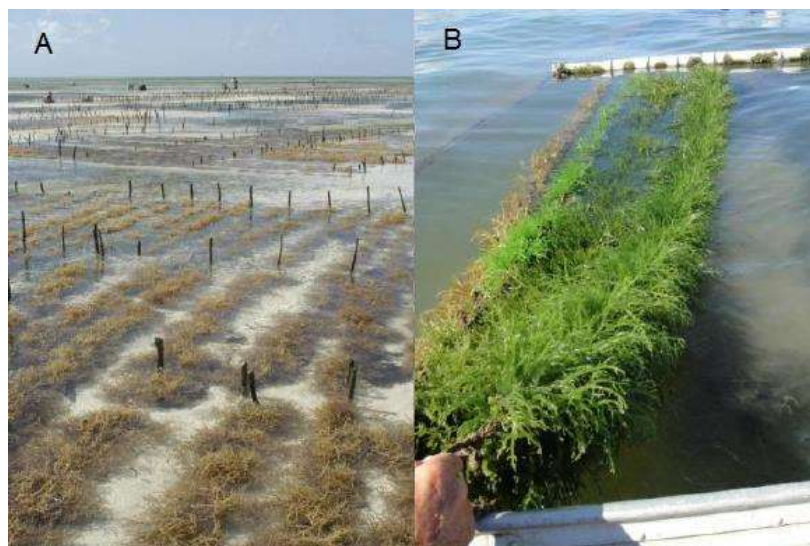


Figura 2: Sistemas de cultivos de macroalgas, estrutura fixa (A) e estrutura flutuante (B) (SANTOS, 2014).



Figura 3: Cultivo de algas no Brasil em redes tubulares. (COSTA, 2015; SANTOS, 2014)

A *Kappaphycus alvarezii*, atualmente é uma das espécies mais cultivadas no mundo, pois é responsável, juntamente com a *E. denticulatum*, por 70% de toda carragenana produzida (ARECES, 1995). A carragenana no Brasil era extraída da espécie nativa *H. musciformis*. Devido a sua pequena produção de carragenana propôs-se a introdução de espécies exóticas como a *K. alvarezii*, devido a facilidade de cultivo e com o intuito de diminuir a importação deste hidrocolóide (PAULA e PEREIRA, 1998; PAULA *et al.*, 1998). Além disso, a *Kappaphycus alvarezii*, pode melhorar a qualidade da água retirando os nutrientes e servir de abrigo a várias espécies de peixes, crustáceos e outros organismos aquáticos (PAULA *et al.*, 1998, HAYASHI *et al.*, 2008).

3.3.1 Carragenana

A carragenana é um polissacarídeo não-ramificado sulfatado extraído das Rhodophytas (algas vermelhas). Assim como os alginatos e agares, a carragenana faz parte de um grupo de substâncias complexas biopoliméricas denominadas ficocolóides, sua estrutura básica é constituída por sequências repetidas de resíduos de D-galactose e resíduos de 3,6-D-galactose ligados em $\alpha(1\rightarrow3)$, como na Figura 4 (PICULLEL, 1995).

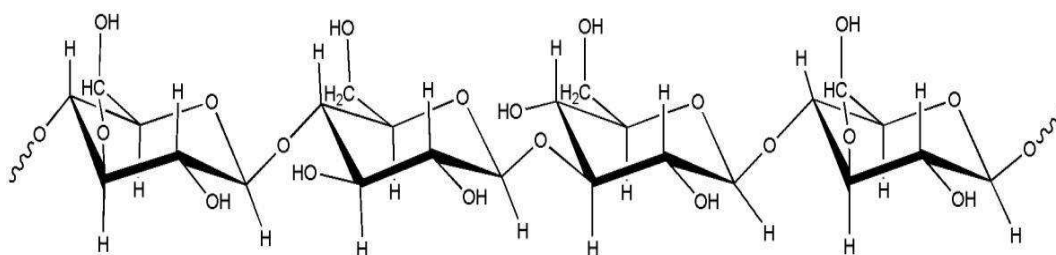


Figura 4: Estrutura básica das carragenanas (HARGREAVES, 2013)

Comercialmente a carragenana pode ser dividida em três tipos, kappa, iota e lambda, eles se diferenciam conforme a quantidade de 3,6-anidro-D-galactose e do grau de sulfatação (DAWES *et.al.*, 1977, CRITCHLEY, 1993). As carragenas do tipo kappa e iota são as mais utilizadas comercialmente, os dois produzem um gel. O primeiro é mais rígido e quebradiço e o segundo mais elástico e macio, já a carragena do tipo lambda é viscosa e de difícil obtenção (PARKER, 1993). A carragenana pode ser usada como espessante, gelificante ou estabilizante nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. É usado principalmente na fabricação de produtos alimentícios pois, aumenta a estabilidade física e melhora a sensação do alimento na boca. Além disso, a carragenana não tem cheiro, cor e nem sabor. A macroalga *Kappaphycus alvarezii* apresenta basicamente carragenana do tipo kappa, sendo assim a principal fonte deste tipo de hidrocolóide. A carragenana do tipo kappa é a que apresenta maior demanda no mercado mundial (KHAMBHATY *et al.*, 2012).

Existem dois métodos de produção de carragenana. No primeiro método, chamado de original, a carragenana é extraída da alga utilizando uma solução aquosa aquecida, o resíduo é removido por filtração e a carragenana é recuperada da solução por precipitação com álcool ou por congelamento e descongelamento, obtendo assim, a carragenana refinada. O método original é

mais caro devido ao processo de recuperação. No segundo método a carragenana não é extraída, a alga é lavada para remover tudo que se dissolva em solução alcalina e água, deixando a carragenana e outros compostos insolúveis inalterados. Essa fração insolúvel composta por carragenana e celulose, é seca e vendida como carragenana semi-refinada. O segundo método, comparado ao método original, é mais rápido e barato (MCHUGH, 2003).

A metodologia utilizada para a produção de carragenana não influencia na sua característica gelificante, espessante, estabilizante, pois a estrutura básica é mantida. Porém, quando utilizada como matéria-prima na produção de biocombustíveis ou de outros bioprocessos é necessário tornar os monossacarídeos disponíveis por meio de processos mais rigorosos (HARGREAVES, 2013).

Na produção de carragenana, a partir de *Kappaphycus alvarezii*, são gerados resíduos que podem ser utilizados na agricultura como fonte adicional de minerais, pois possuem altas concentrações de potássio, e concentrações menores de sódio e fósforo (MARIO e BALLESTERO, 2004).

A carragenana é constituída de monômeros de D-galactose, portanto, esse hidrocoloide pode ser degradado a esses monômeros, podendo assim ser utilizados em processos fermentativos. O produto de extração da *Kappaphycus alvarezii* é mais atrativo para os processos fermentativos do que as espécies que possuem ágar como polissacarídeo principal, pois o ágar é constituído de D-galactose e L-galactose. O monômero L-galactose age como inibidor do processo fermentativo, porque as leveduras não fermentam este tipo de açúcar (DARoch *et al.*, 2013). Enquanto que a *Kappaphycus alvarezii* é composta, em sua maioria, por um polissacarídeo, carragenana, que após ser degradado gera açúcares que podem ser utilizados no processo de produção de bioetanol.

3.4 Aplicações biotecnológicas

As macroalgas são divididas em três grupos, de acordo com os pigmentos fotossintéticos. São eles, os grupos das macroalgas vermelhas (Rhodophytas), macroalgas marrons (Phaeophytas) e macroalgas verdes (Chlorophytas) (JOHN, 2011; KRAAN, 2013). As macroalgas são cultivadas, atualmente, para a produção de alimentos, fertilizantes e extração de hidrocolóides (ROESIJADI,

2010). A macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* possui um grande potencial biotecnológico, podendo ser empregada em várias indústrias, como de cosméticos e farmacêuticas, devido ao seu amplo espectro de compostos bioativos. Além disso, o extrato de alga pode ser usado na agricultura como bioestimulante e também na produção de bioetanol (MEENA *et al.*, 2009; HOLDT e KRAAN, 2011; MATANJUN *et al.*, 2010; NISIZAWA, 2006).

O crescimento da produção agrícola, faz com que haja o uso excessivo de fertilizantes, pesticidas e herbicidas, essas substâncias causam impactos ambientais que devem ser evitados e uma possível solução é a utilização de algas na agricultura como biofertilizantes ou bioestimulantes (STIRK *et al.*, 2003). O extrato de alga vem se popularizando pelo seu potencial uso na agricultura orgânica e sustentável. O que difere dos fertilizantes químicos é o fato de serem biodegradáveis, não tóxicos, não poluem e não causam risco a saúde dos seres humanos e animais. Além disso, o extrato de algas melhora o solo, pois promover o crescimento de microrganismos benéficos e também melhora a absorção de minerais pelas plantas (AZIZ *et al.*, 2003; RATHORE *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2009; KUMAR e SAHOO, 2011).

O uso de macroalgas como fertilizantes agrícolas tem como objetivo melhorar a taxa de germinação de sementes, crescimento do sistema radicular, produção de flores, frutificação e indução de resistência a pragas e doenças, além de estimular respostas às condições de estresse hídrico, salinidade e geada (NORRIE, 2008). As macroalgas são compostas de nutrientes, aminoácidos, vitaminas, citocinas, auxinas e ácido abscísico, tendo a capacidade de promover a produção de moléculas bioativas que são capazes de induzir resistência nos vegetais (STIRK *et al.*, 2003; TALAMINI e STANDNIK, 2004). De acordo com a legislação brasileira de fertilizantes, regida pela Instrução Normativa nº 23 de 2007 e a nº 25 de 2009, o extrato de alga marinha, para ser registrado como fertilizante mineral, orgânico ou organomineral, tem que atingir exigências mínimas. Assim, o extrato líquido de alga é reconhecido e autorizado pelo MAPA somente como aditivo estabilizante e complexante. Um dos requisitos mínimos exigidos pelo MAPA, no que diz respeito a classificação em fertilizante orgânico, é o conteúdo de carbono orgânico, que é a soma de todos os derivados de carbono presentes no meio. Assim, o conteúdo mínimo de carbono orgânico para registro como fertilizante orgânico fluido é de 8%.

A espécie de alga marinha mais utilizada na agricultura é a *Ascophyllum nodosum*, que pertence ao filo Phaeophyta, encontrada principalmente na costa do Canadá. Essas macroalgas se adaptam a temperaturas extremamente baixas, a imersão total na maré alta e a exposição solar na maré baixa (RODRIGUES, 2008). O extrato dessa macroalga é rico em macro e micronutrientes, aminoácidos, carboidratos e hormônios que estimulam o crescimento vegetal (ANASAC, 2006). Outras algas são estudadas para a utilização na agricultura como a *Kappaphycus alvarezii* (HONG *et al.*, 2007).

Na agricultura, vários estudos comprovam o potencial bioestimulante do extrato líquido algal. A utilização de *Kappaphycus alvarezii* na agricultura foi relatado por Rathore *et al.* (2009), que realizaram teste de campo com a finalidade de avaliar o efeito do extrato de alga no crescimento, qualidade e consumo de nutrientes na cultura de soja, concluindo que, nas condições do experimento, a utilização do extrato líquido aumentou os parâmetros de crescimento, o rendimento dos grãos, além de melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas. Um estudo feito por Costa (2015) com o intuito de avaliar o uso da mistura de biomassa sólida com o extrato líquido obtido da *Kappaphycus alvarezii* no tratamento de sementes e pulverização foliar na cultura de soja, mostrou que o uso do extrato líquido puro para o tratamento de semente de soja é interessante no desenvolvimento inicial da planta, na pulverização foliar, com dosagens maiores do extrato líquido puro, demonstrando um aumento de produtividade. Na mistura contendo o extrato líquido e a biomassa sólida, no tratamento de sementes houve um aumento no crescimento, e na pulverização foliar ocorreram aumento da produtividade. O uso do extrato líquido ou da mistura do extrato líquido com a biomassa sólida hidrolisada, que possui um alto conteúdo de polissacarídeos, possui eficiência nutricional na cultura de soja, sendo assim um potencial fertilizante orgânico, mas ainda se faz necessário mais estudos.

Uma outra aplicação da *Kappaphycus alvarezii* é a sua utilização como matéria prima para a produção de bioetanol. O bioetanol pode ser produzido a partir de biomassa proveniente da agricultura ou de biomassa algal. A produção de biocombustíveis a partir de algas marinhas é mais vantajosa pois não competem com a área agricultável, não necessita de água potável para irrigação e nem dependem de solos férteis para a sua produção, além disso,

dispensa o uso de fertilizantes, necessitando apenas de água do mar, luz solar e dióxido de carbono para o seu cultivo (JOHN *et al.*, 2011).

As macroalgas se destacam pela capacidade superior em converter energia solar em energia química quando comparadas aos vegetais terrestres. Essa característica faz com que a sua taxa de crescimento e de absorção de CO₂ atmosférico também sejam superiores. Além disso, as macroalgas, se desenvolvem em um tempo menor, refletindo numa produção mais eficiente (BORINERS *et al.*, 2011; JOHN *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2012). Quando comparada a biomassa lignocelulósica, as macroalgas possuem estruturas mais simples devido à ausência ou baixo teor de lignina, essa macromolécula proporciona resistência a degradação, e essa ausência de lignina faz com que os catalisadores, como as enzimas, possuam um acesso mais fácil aos polissacarídeos (JONES e MAYFIELD, 2012). Todas essas características e vantagens justificam o foco das pesquisas em viabilizar o uso da biomassa de macroalgas para a produção de bioetanol.

O processo de obtenção de bioetanol a partir de macroalgas é semelhante ao processo convencional de etanol, produzido de matérias-primas como cana-de-açúcar, milho, entre outras (CHEN *et al.*, 2015). Como descrito anteriormente, a parede celular das macroalgas vermelhas é formada por uma camada de celulose e por polímeros de galactanas, no caso da *Kappaphycus alvarezii* é a partir desses polímeros que são obtidos os açúcares que podem ser utilizados no processo de produção de bioetanol.

O pré-tratamento é a primeira etapa de produção do bioetanol de macroalgas, nessa etapa são disponibilizados os hidratos de carbono, como a carragenana, para serem usados nos processos seguintes. Um dos métodos mais utilizados é o pré-tratamento ácido que torna os açúcares dos polissacarídeos mais acessíveis as enzimas hidrolíticas facilitando o processo de hidrólise (HAN *et al.*, 2007). Os métodos mais utilizados para converter os polissacarídeos em açúcares redutores são o químico e enzimático. Na hidrólise química, o catalisador mais utilizado são os ácidos diluídos, e na enzimática o catalisador utilizado são as enzimas. A celulose, presente nas algas vermelhas, pode ser reduzida a glicose através da hidrólise enzimática utilizando uma mistura de enzimas (celulase e β -glucosidase) (TAN e LEE, 2014). Um dos problemas em utilizar ácido no pré-tratamento é a geração de compostos tóxicos

como o ácido 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) que influencia na eficiência do processo de produção de etanol. A hidrólise enzimática também possui desvantagens como, a dificuldade em recuperar as enzimas dos produtos, além disso, requer um tempo maior de hidrólise quando comparada a ácida (TAN *et al.*, 2013; KLINKE *et al.*, 2004). Após a hidrólise dos polissacarídeos em monossacarídeos a próxima etapa é a fermentação, realizada, geralmente, por leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, que transformam a glicose, um dos produtos da hidrólise dos polissacarídeos da biomassa algal, em piruvato, que por sua vez é transformado em etanol. Um outro produto da hidrólise da biomassa algal é a galactose, obtida da carragenana, apesar da estrutura semelhante a glicose, a galactose difere da glicose pela troca de posição do grupo hidroxila no carbono quatro, devido a essa diferença a levedura não é capaz de utilizar a galactose como substrato da fermentação. Para viabilizar o uso da galactose no processo fermentativo é necessário que a levedura expresse enzimas que convertam a galactose em açúcar fermentescível, como a glicose (OSTERGAARD *et al.*, 2000; VAN DEN BRINK *et al.*, 2009).

3.5 Processo de produção do Bioetanol de algas

3.5.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento serve para solubilizar a carragenana obtida do processo de extração com a finalidade de hidrolisar esse polissacarídeo em monômeros de galactose e, além disso, separá-lo da estrutura celulósica, o método mais utilizado é o químico com ácido diluído. O ácido sulfúrico é o mais utilizado, pois proporciona melhor eficiência de hidrólise (KIM *et al.*, 2011; DAROCH *et al.*, 2013). Antigamente utilizava-se condições mais severas visando a hidrólise completa da celulose e hemicelulose, nessas condições mais drásticas era possível obter os açúcares na forma monomérica, mas em contrapartida eram formados sub-produtos, a maioria, tóxicos e inibidores dos processos metabólicos como o hidroximetilfurfural (HMF) (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000). Em condições mais brandas a formação dos compostos tóxicos e inibidores é minimizada (HARGREAVES, 2013). A toxicidade desses

compostos afeta as enzimas, principalmente, da via glicolítica, inibindo-as na presença de HMF, assim as enzimas mais afetadas são a hexoquinase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (NICHOLS, 2010; BETANCUR, 2010)

O pré-tratamento com ácido diluído promove a separação em duas fases, líquida e sólida. Na líquida estão os monômeros de galactose provenientes da hidrólise da carragenana e na fase sólida encontram-se o conteúdo celulósico. A fase sólida é submetida ao processo de sacarificação, que hidrolisa a estrutura celulósica em monômeros de glicose. Este açúcar, por sua vez, pode ser utilizado como substrato para a produção de etanol (HARGREAVES *et al.*, 2013). Na hidrólise ácida da carragenana ocorre a formação do hidroximetilfurfural (HMF), um composto inibidor formado a partir da desidratação de hexoses como a galactose (BETANCUR, 2010; NICHOLS, 2010; MEINITA *et al.*, 2012). O hidroximetilfurfural pode ser degradado a ácido levulínico quando submetido a condições de temperatura mais elevada, esse ácido formado é mais tóxico que o HMF, pois mesmo presente em baixas concentrações causa o efeito inibitório. (MEINITA; HONG; JEONG, 2012)

Algumas estratégias estão sendo adotadas para diminuir a toxicidade dos compostos inibitórios presentes nos hidrolisados de diferentes tipos de biomassa. As técnicas mais utilizadas são coluna de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, adsorção em carvão ativo, alteração do pH do hidrolisado, entre outros (BETANCUR, 2010; NICHOLS, 2010). Para o hidrolisado de carragenana, a estratégia que proporciona maior rendimento quando se fala em concentração de etanol após a fermentação é a destoxificação com carvão ativo (HARGREAVES *et al.*, 2013).

A utilização de biocatalisadores é um método alternativo de hidrólise da carragenana. Para que ocorra a reação, as enzimas que possuem maior especificidade pelo substrato, requerem uma temperatura mais baixa, assim, evitam a formação de compostos tóxicos (SCHELIGA, 2012). Algumas bactérias marinhas têm sido isoladas por secretarem diferentes tipos de carragenases, específica para cada um dos três tipos de carragenana (MICHEL *et al.*, 2001) Nas carragenanas do tipo kappa, a enzima carragenase atua catalisando a hidrólise da ligação $\beta(1-4)$, liberando kappa-neocarrabiose e D-galactose como produto. (SCHELIGA, 2012) A enzima carragenase não está disponível

comercialmente, o que dificulta a sua aplicação em processos fermentativos (GOH e LEE, 2010).

A fração sólida ou fração celulósica, também pode sofrer hidrólise enzimática a partir da ação sinérgica das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase (Figura 5). Essas enzimas apresentam atividade em condições brandas de temperatura e pressão, portanto não geram compostos inibidores do processo fermentativo (HARGREAVES, 2013; LYND *et al.*, 2002). As endoglucanases hidrolisam as ligações β -1,4-glicosídicas da celulose, causando rupturas nas fibras. Nas extremidades redutoras e não redutoras, as exoglucanases se ancoram e liberam celobioses ou glicoses solúveis, as celobioses liberadas são hidrolisadas pelas enzimas β -glucosidases a monômeros de glicose (ZHANG e LYND, 2004).

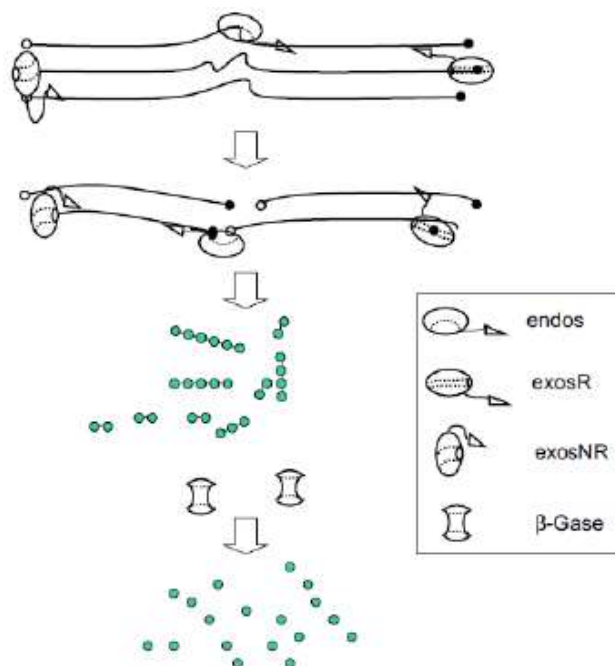


Figura 5: Ação das celulasas, endos: endoglucanases, exosR: exoglucanases (terminal redutor), exosNR: exoglucanases terminal não redutor e β -Gase: beta glucosidase (ZHANG *et al.*, 2006 apud. HARGREAVES, 2013)

A utilização de celulasas, quando comparada aos catalisadores químicos, requer uma temperatura menor para que a reação ocorra, o que gera menos compostos tóxicos e inibidores, além disso, pode ser considerada uma estratégia mais sustentável por gerar uma quantidade menor de resíduos (SINGHANIA *et al.*, 2010). Porém, essas enzimas ainda possuem um custo elevado o que impede o seu uso na produção de etanol. Para tornar a hidrólise enzimática economicamente viável é necessário produzir enzimas com substratos mais

baratos e com maior grau de estabilidade e atividade específica (MOREIRA, 2005).

3.5.2 Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são mais indicadas para a produção de bioetanol devido a algumas vantagens, como tolerar altas concentrações de etanol e fermentar altas concentrações de açúcares. Para o crescimento celular requer condições nutricionais simples; toleram pH ácido a neutro; não são patogênicos; são termotolerantes e são resistentes a inibidores (FERREIRA, 2010).

A primeira etapa do metabolismo de açúcares a etanol, por meio da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é a oxidação da glicose a ácido pirúvico, pela via glicolítica (TORTORA *et al.*, 2010). Essa via é dividida em duas fases, na primeira fase, preparatória, uma molécula de glicose é quebrada e convertida em duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, a partir de uma série de reações enzimáticas. Na segunda fase ocorre uma série de reações de oxidação, e então as duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são transformadas em duas moléculas de ácido pirúvico. Os dois ATPs gasto na primeira fase são recuperados na fase de pagamento, resultando em um saldo energético de 2 ATPs, além disso há formação dos cofatores NADH. A segunda etapa da produção de etanol é a chamada fermentação alcoólica, onde ocorre a descarboxilação do ácido pirúvico formando duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO₂. As duas moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol (MADIGAN *et al.*, 2003; TORTORA *et al.*, 2005). A fermentação ocorre anaerobicamente, assim o piruvato é convertido a etanol com desprendimento de CO₂. Além disso, a produção de etanol está relacionada ao crescimento das leveduras que utilizam os ATPs produzidos na via glicolítica para a sua biossíntese. O acúmulo de ATP inibe uma das enzimas mais importantes da via glicolítica, a fosfofrutoquinase-1, e conseqüentemente ocorre a interrupção dessa via (BAI, ANDERSON E MOO-YOUN, 2008).

Apesar de possuir estrutura semelhante a glicose, nem todas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de metabolizar a galactose, pois as

enzimas responsáveis pela via glicolítica não metabolizam esse açúcar. Para que ocorra a fermentação a partir de galactose, é necessário que a linhagem de levedura expresse um conjunto de enzimas responsáveis pelo transporte deste açúcar até a sua conversão em glicose-6-fosfato, que é um intermediário da via glicolítica. (OSTERGAARD *et al.*, 2000; VAN DEN BRINK *et al.*, 2009)

A via de Leloir (Figura 6) é responsável pela transformação de galactose em glicose intracelularmente, esse processo ocorre da seguinte maneira, a galactose é transportada para o interior da célula por meio da galactose permease (transportador protéico presente na parede celular), uma vez dentro da célula o açúcar é fosforilado a galactose-1-fosfato pela enzima galactoquinase, e então é isomerizada a glicose-1-fosfato pela galactose-1-fosfato uridiltransferase. A enzima fosfoglucomutase converte a glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato, assim esse açúcar pode ser direcionado para a via glicolítica (metabolismo fermentativo ou oxidativo) ou via das pentoses fosfato (biossíntese de precursores importantes para o crescimento e multiplicação celular) (SCHELIGA, 2012; HARGREAVES, 2013).

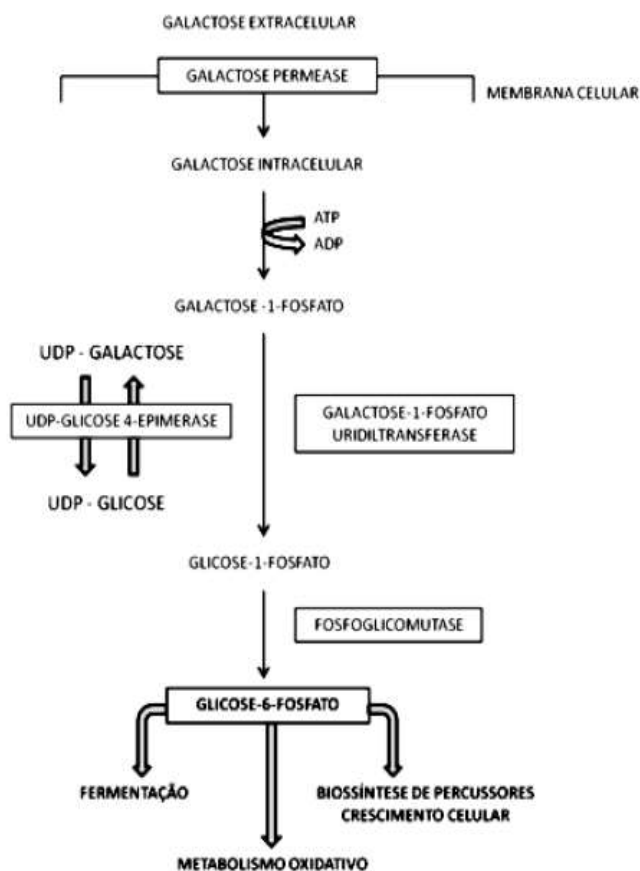


Figura 6: Esquema da Via de Leloir (OSTERGAARD *et al.*, 2000 apud SCHELIGA, 2013).

3.5.3 Processo fermentativo

Uma das melhores maneiras de controlar os parâmetros da fermentação é variar o modo de condução do bioprocesso, que possibilita uma melhora no processo fazendo com que ele ocorra em níveis mais adequados de concentração de açúcar e de células, evitando que o metabolismo da levedura seja desviado para outra via (FERREIRA, 2010; PACHECO, 2010). O processo fermentativo pode ser conduzido de três formas: processo descontínuo (batelada simples), descontínuo alimentado (batelada alimentada) e contínuo (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

No processo descontínuo (batelada simples) a suspensão celular é adicionada ao meio de fermentação sem adições de meio novo, nem retiradas de meio reacional durante o processo. Na batelada simples as condições ambientais são alteradas o tempo todo, isso se explica devido as concentrações de nutrientes serem reduzidas ao longo do tempo e as concentrações de células, produtos e sub-produtos aumentadas. Esse tipo de condução de bioprocessos pode desfavorecer o crescimento celular e o processo fermentativo devido aos fenômenos de inibição pelo substrato, produto e outros metabólitos. A batelada alimentada pode contornar esses problemas de inibição, ela possibilita a manutenção da concentração desses inibidores/repressores em níveis sub-inibitórios/sub-repressores, com implicações diretas no desempenho da célula. No processo descontínuo alimentado (batelada alimentada) um ou mais nutrientes necessários para o crescimento celular são adicionados de modo intermitente ou contínuo ao biorreator sem a retirada de material durante a operação. (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

Na condução contínua a alimentação de nutrientes e substrato e a retirada de produto, ocorre de forma contínua. O processo ocorre em condições estacionárias que podem ser determinadas previamente para o melhor desempenho do microrganismo. Sua principal vantagem, quando comparada aos outros modos de condução, é que nesse processo é possível operar por períodos extensos de tempo, resultando em um aumento de produtividade (PEREIRA JR *et al.*, 2008; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

As estratégias de condução de bioprocessos para a produção de etanol a partir da biomassa algal foram adaptadas das estratégias utilizadas para a

biomassa lignocelulósica. A biomassa utilizada na produção de etanol de segunda geração apresenta diferentes açúcares, provenientes da celulose e hemicelulose, portanto é necessário o emprego de enzimas simultaneamente a ação de microrganismos. As quatro estratégias para a obtenção de etanol de material lignocelulósico são: Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF), Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF), Sacarificação com Co-Fermentação Simultânea (SSCF) e Bioprocesso Consolidado (CBP) (FERREIRA, 2010).

Na Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF), a hidrólise, ou pré tratamento, da biomassa ocorre em um estágio separado da fermentação. A etapa de hidrólise pode utilizar um agente químico como catalisador, formando compostos inibidores, o que requer etapas de detoxificação. Por conta disso, não é possível realizar uma fermentação simultânea. Outra alternativa é a hidrólise enzimática, que geralmente ocorre em condições ótimas de pH e temperatura das celulasas, uma dificuldade desse processo é o acúmulo de glicose e polissacarídeos que atuam como inibidores enzimáticos, tornando a hidrólise incompleta. Após a hidrólise, há formação de duas fases, a fase sólida e a fase líquida, essa fração líquida é direcionada para a fermentação com microrganismos (WINGREN *et al.* 2003; McMILLAN, 2004).

Na Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF), como o próprio nome diz, a sacarificação e fermentação da fração celulósica ocorrem na mesma etapa, a hidrólise é realizada enzimaticamente, evitando assim a formação de compostos inibidores, possibilitando o sinergismo com o microrganismo fermentador. A fração hemicelulósica é hidrolisada em uma etapa diferente, assim como a produção de enzimas do complexo celulásico (WINGREN *et al.*, 2003).

Na Sacarificação com Co-Fermentação Simultânea (SSCF) a fermentação das pentoses e hexoses ocorrem em um mesmo reator junto com a sacarificação da celulose, já a hidrólise da hemicelulose e a produção de celulasas ocorre separadamente (TEIXEIRA *et al.*, 2000). No processo SSF, visto anteriormente, somente as hexoses são convertidas a etanol e as pentoses são fermentadas em outro reator por um organismo diferente. No SSCF tanto as pentoses quanto as hexoses são fermentadas no mesmo reator por um único microrganismo, isso é possível devido à biologia molecular que permite o

desenvolvimento de um microrganismo capaz de fermentar esses dois açúcares (HAMELINCK *et al.*, 2005).

No Bioprocesso Consolidado (CBP) a produção de enzimas e de etanol ocorrem em um único reator pelo mesmo microrganismo. Para isso, é necessário recorrer à engenharia genética, visando a modificação do microrganismo para que ele consiga produzir diversas enzimas, tornando-o capaz de clivar os complexos hemicelulósicos e celulósicos, além de possuir uma alta habilidade fermentativa de hexoses e pentoses (FERREIRA, 2010).

Para a biomassa algal, uma estratégia possível é a sacarificação com co-fermentação simultânea, pois como descrito anteriormente, algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* podem fermentar os dois açúcares obtidos no processo de produção que são a glicose e galactose (HARGREAVES, 2013).

3.6 Inovação tecnológica no Brasil

Segundo o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), a patente é um título de propriedade temporária sobre uma invenção ou modelo de utilidade, concedido pelo Estado aos inventores ou autores ou outras pessoas físicas ou jurídicas detentoras de direitos sobre a criação. Com isso, o inventor ou detentor da patente tem o direito de impedir terceiros de produzir, usar, colocar à venda, vender ou importar o objeto da sua patente, seja ele um produto ou processo. Em contrapartida, é disponibilizado ao público todo o conteúdo técnico da matéria protegida pela patente (INPI, 2015).

O Instituto Nacional de Propriedade Industrial, criado em 1970, é uma autarquia federal vinculada ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), responsável pelo aperfeiçoamento, disseminação e gestão do sistema brasileiro de concessão e garantia de direitos de propriedade intelectual para a indústria. Portanto, no Brasil, o órgão responsável pela concessão de patentes é o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, 2015). Há dois tipos de patentes: A patente de Invenção (PI) que é concedida os produtos ou processos que atendem aos requisitos de atividade inventiva, novidade e aplicação industrial, tem validade de vinte anos contados da data de depósito; e a Patente de Modelo de Utilidade (MU) que é concedida aos objetos de uso prático, que apresente nova forma de disposição, envolvendo ato

inventivo, que resulte em melhoria funcional no seu uso ou em sua fabricação, tem validade de 15 anos contando da data de depósito (INPI, 2015).

Uma vez concedido o direito de exclusividade temporário de algum invento, o chamado Documento de Patente é publicado e incluído no Banco de Patentes do INPI, assim a informação se torna pública, permanecendo, disponível para a consulta e a pesquisa de todos os interessados. A posse de uma patente gera estímulos no crescimento econômico, e possibilita a elevação nos padrões de vida (FERREIRA et al., 2009). Além disso, é um importante recurso para pesquisadores e inventores, pois evita a duplicação de iniciativas em pesquisa e desenvolvimento e amplia a capacidade de inovação, permitindo compreender as principais tendências em determinados setores tecnológicos. As vantagens das patentes, além de incentivar o desenvolvimento tecnológico, é encorajar a pesquisa científica, disseminar o conhecimento prático e econômico, criar novos mercados e satisfazer as necessidades dos consumidores. A desvantagem das patentes, reflete significativamente nos consumidores, pois torna os produtos mais caros (FERREIRA et al., 2009).

Ao realizar uma pesquisa no banco de dados no site do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) obteve-se os resultados presente na figura 7. A busca foi realizada utilizando combinações de palavras-chave: Etanol e Algas; Etanol e Biomassa; Etanol e Combustível; Etanol e *Kappaphycus alvarezii*; e, por fim, a combinação de todas as palavras-chave, obtendo um total de 81 processos de patentes. Assim, é possível verificar a quantidade de processos de patentes para cada combinação de palavras-chaves.

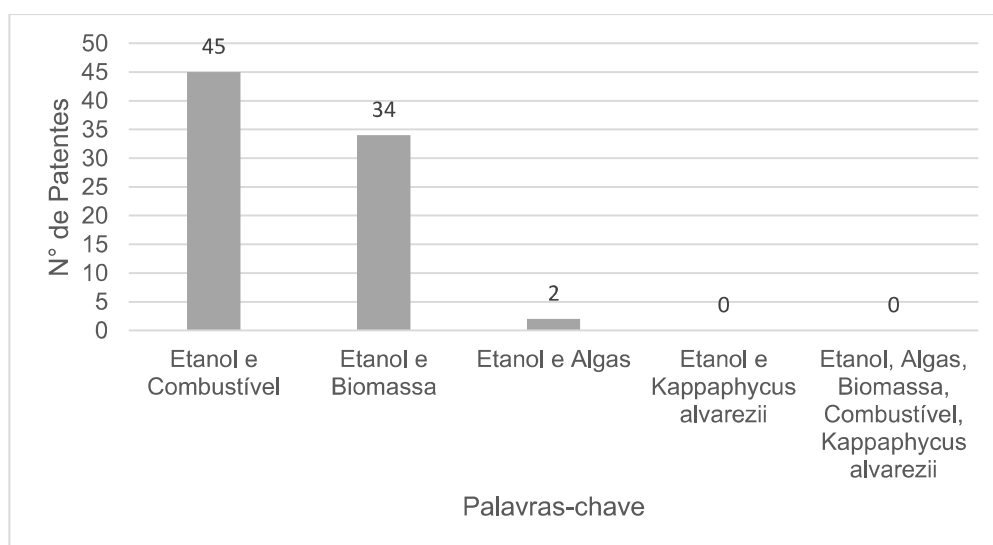


Figura 7: Relação de processos de patente utilizando o banco de dados do INPI.

Fazendo uma análise da palavra-chave, Etanol e Combustível, verificou-se que o primeiro processo de patente é datado de 1979. O interesse pelo etanol, nesta época, pode ser explicado pela crise do petróleo na década de 70 e pela criação do ProÁlcool, programa do governo de incentivo à produção de etanol em substituição a gasolina (CARVALHO e CARRIJO, 2007). O auge do ProÁlcool explica o aumento significativo no número de processos de patentes no período de 1979-1983. Na segunda metade da década de 80, ocorreu a crise do ProÁlcool devido a redução do preço do petróleo e ao fim dos subsídios do governo no setor sucroalcooleiro, acarretando na queda da produção de etanol (CARVALHO e CARRIJO, 2007). Neste período observou-se a diminuição de pedidos de patente, podendo ser explicada pela crise do Programa Nacional do Álcool. (CARVALHO e CARRIJO, 2007).

Na análise da palavra-chave Etanol e biomassa, observou-se o aumento de pedidos de patente a partir de 2001. Esse fato pode ser explicado pela necessidade em ampliar a produção de etanol no Brasil, que neste mesmo período lançou os automóveis movidos tanto a álcool como a gasolina, aumentando a demanda de etanol no mercado brasileiro (LOT, 2013). Como se sabe, o etanol proveniente de biomassa é o chamado etanol de segunda geração, obtido a partir de resíduos agroindustriais como, por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar (MARQUES, 2009). A fim de evitar a expansão de áreas de cultivo da cana-de-açúcar, vários processos biotecnológicos, para utilizar essa biomassa, têm sido desenvolvidos (SILVA, 2010). Um dos focos em se desenvolver novos métodos de produção do etanol lignocelulósico é a redução de custos da produção em escala industrial.

Na combinação de palavras-chave, como mostrado na Figura 7, a única que corresponde ao tema deste trabalho é a combinação “etanol e algas”. A partir dela obteve-se dois processos de patentes, sendo que somente uma delas corresponde à produção de etanol a partir de algas.

Vale salientar a importância da patente da Universidade Federal do Rio de Janeiro, cujo um dos inventores é o Professor Maulori Curié Cabral do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O processo de patente tem como título “Processo para a obtenção de etanol a partir de algas”, o registro do pedido no âmbito nacional é datado de 26/11/2007 e o número do pedido é PI 0819746-6 A2. Além do pedido de patente no âmbito

nacional, no ano de 2008 foi feita a aplicação do depósito internacional no PCT (Tratado de Cooperação de Patentes) que visa a proteção internacional. A patente se refere a um processo inédito de transformação de polissacarídeos gelificantes obtidos de algas em etanol. As algas mais utilizadas são as do gênero *Gelidium*, *Gigardina*, *Gracilária*, *Encheuma* e *Pterocladia*, mais especificamente das espécies, *Gracilária*, *Kappahycus* e *Hypnea*. O processo consiste em hidrolisar os polímeros de carboidratos das algas, após essa etapa é possível utilizá-los como substrato na etapa de fermentação.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) desenvolve um projeto pioneiro no que diz respeito ao etanol de terceira geração, mais especificamente, a partir de macroalgas marinhas. O projeto é chamado de ProAlga, ele visa o aperfeiçoamento do processo de produção do etanol pela hidrólise e fermentação da biomassa de macroalgas (CRUZ, 2009). O processo de obtenção do bioetanol é iniciado com a coleta e secagem das macroalgas, após essa etapa a biomassa é triturada e hidrolisada, com a finalidade de degradar a cadeia de carboidratos obtendo os açúcares que serão usados na próxima etapa que é a fermentação, obtendo assim, após a destilação, o etanol. (CRUZ, 2009).

Com a finalidade de comparar a produção de inovação tecnológica no Brasil, realizou-se uma pesquisa no banco de patentes internacional. O Espacenet é uma base de dados internacional que permite pesquisar informações dos pedidos de patentes publicados por mais de 72 países e regiões. A organização Européia de Patentes (EPO) foi criada em outubro de 1977 com base na Convenção de Patentes Européia (EPC) assinada em Munique em 1973. O Espacenet contém mais de 90 milhões de documentos de patentes de diversos países (ESPACENET, 2015).

Na Figura 8 é possível observar o resultado da busca de processos de patentes utilizando as palavras-chave combinadas conforme a Figura 7. Ao final da consulta obteve-se um total de 984 processos de patentes. Demonstrando uma quantidade de processos de patente significativa, quando comparada ao banco de dados do INPI.

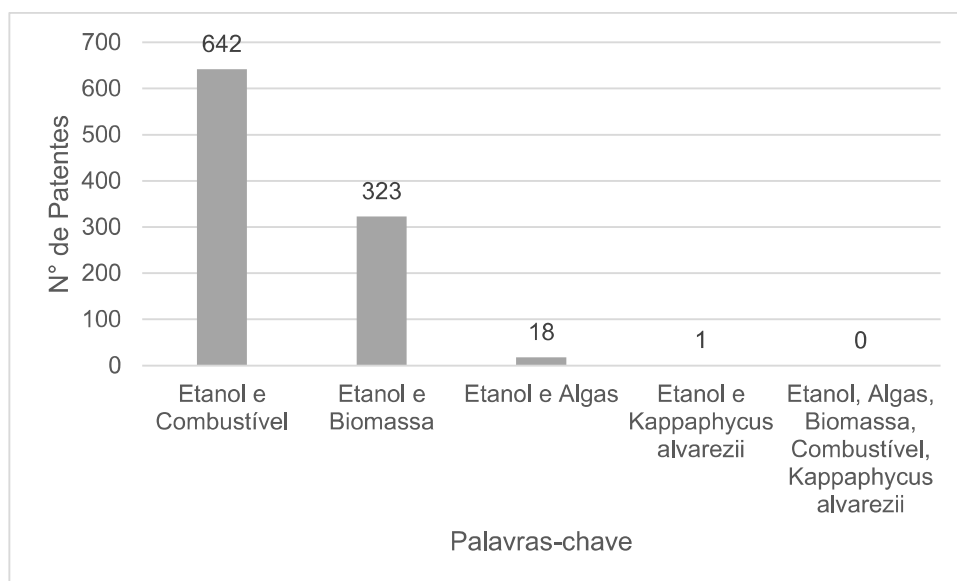


Figura 8: Relação de processos de patente utilizando o banco de dados Internacional Espacenet.

Utilizando o Espacenet obteve-se um processo de patente a partir da palavra-chave “Etanol e *Kappaphycus alvarezii*”. A patente indiana, registrada na data de 18/07/2012 e com número de pedido CN102597251, tem como objetivo integrar o processo de produção de etanol e fertilizantes utilizando a alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. Essa patente nos mostra o potencial dessa macroalga tanto na produção de etanol quanto na produção de biofertilizantes.

Um outro dado importante, obtido da Figura 8, é com relação a palavra-chave “Etanol e algas” que foram obtidos 18 processos de patentes, dentre elas está a patente da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A partir desses resultados é possível verificar que a inovação tecnológica no Brasil, quando se fala em produção de etanol a partir de algas, pode ser comparada a outros países. Esse fato pode ser confirmado por meio desta pesquisa, que mostra que no mundo há apenas dezoito processos de patentes visando a produção de etanol a partir de algas e o Brasil está presente contribuindo com uma patente de propriedade da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4 CONCLUSÃO

A revisão sobre a produção de bioetanol a partir da macroalga *Kappaphycus alvarezii* no Brasil mostra que são necessários mais estudos na área para otimizar o processo de produção, requerendo uma atenção ao processo fermentativo que ainda não é bem estabelecido, havendo apenas suposições de processos, pelo que pode ser visto, há poucos estudos nessa área. Mas a utilização da biomassa de macroalgas em substituição a biomassa lignocelulósica mostrou ser bastante vantajosa com relação a fácil hidrólise da parede celular, que na macroalga *Kappaphycus alvarezii* é formada por uma camada de celulose que possui menos lignina que o material lignocelulósico.

Com relação a produção de inovação tecnológica no Brasil, foi possível observar, com relação a produção de etanol a partir de algas, que o país contribui de forma significativa com a inovação tecnológica no mundo. Porém, quando comparado a outros resultados ainda se faz necessário mais investimentos e incentivos para desenvolver processos inovadores.

A produção de etanol de terceira geração no Brasil, utilizando biomassa proveniente de macroalgas, é vantajosa devido à grande extensão litorânea do país, mas para que toda a costa brasileira possa produzir as macroalgas, se fazem necessários estudos para que a introdução de espécies exóticas não interfira no ambiente de forma negativa. Por isso, é necessário o investimento em P&D (Pesquisa e Desenvolvimento), para que mais pesquisadores e instituições se interessem por esse processo tão promissor.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCIOES, A. W. F. Avaliação tecnológica do álcool etílico. In: CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 2ed, Brasília-DF, 1980.

ANASAC- Agrícola Nacional. In: MARTINS, D. A.. Uso de extratos à base de algas para controlar a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) do feijoeiro. 41f. Monografia de conclusão - Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. O Etanol combustível (Atualizado em 2011). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=57994&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1449234087256>>. Acesso em 02 de Dezembro de 2015.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=470>>. Acesso em 20 de maio de 2015.

ARECES A.J. Cultivo comercial de carragenófitas del gênero *Kappaphycus* Doty. In: ALVEAL, K.; FERRARIO, M.E.; OLIVEIRA, E.C. & SAR, E. (eds). Manual de Metodos ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 529-549, 1995.

AZIZ, A. et al. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Molecular Plant Microbe Interaction, v. 16, n. 12, p. 1118-1128, 2003.

BAI, F. W., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology Advances, volume 26, pg. 89-105, 2008.

BETANCUR, G. J. V. Otimização do pré-tramamento ácido do 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.

BIODIESELBR, 2009. Sobre os biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/definicao/biocombustiveis.htm>>. Acesso em 25 de Novembro de 2015.

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 Phillippines, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Volume 15 (9), Pg. 4432-4435, 2011.

BRANDÃO, A. A cana-de-açúcar, Álcool e açúcar na história e no desenvolvimento social do Brasil: Séc. 16-20. Ed. Horizonte INL, 269p. 1984, Brasília-DF.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. Bioetanol de cana-de-açúcar: P & D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010.

BULBOA, C.R.; PAULA, E.J.; CHOW, F. Laboratory germination and sea out-planting of tetraspore progeny from *Kappaphycus striatum* (Rhodophyta) in subtropical waters of Brazil. Journal of Applied Phycology, v.19, p.357-363, 2007.

CARVALHO, S. P., CARRIJO, E. L. O. A produção de álcool: do PROÁLCOOL ao contexto atual. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Londrina-PR, 2007.

CARVALHO, L. C., BUENO, R. C. O. F., CARVALHO, M. M., FAVORETO, A. L., GODOY, A. F. Cana-de-açúcar e Álcool combustível: Histórico, sustentabilidade e segurança energética. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 536, 2013.

CHEN, H.; ZHOU, D.; LUO, G.; ZHANG, S.; CHEN, J. Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. Shanghai Key Laboratory of Atmospheric Particle Pollution and Prevention (LAP3), Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University, Shanghai, China. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 47, p. 427-437, 2015.

COSTA, M. A. Avaliação do Potencial do extrato da macroalga marinha *Kappaphycus alvarezii* como fertilizante orgânico, para uso via tratamento de semente e pulverização foliar na cultura de soja. Dissertação de mestrado Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel – PR, 2015.

CRITCHLEY, A. T. Introduction: Seaweed resources. In: OHNO, M.; Critchley, C., Seaweed cultivation and marine ranching, p. 1-6, 1993.

CRUZ, P. ProAlga, a nova geração de biocombustível. Olhar Virtual, ed.160, 2009. Disponível em:< http://www.olharvital.ufrj.br/2006/?id_edicao=160&codigo=2>. Acesso em 02 de Dezembro de 2015.

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

DAWES, C. J., Stanley N. F. , STANCIOFF, D. J., Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry and iota Carrageenan from *Floridian Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales) Bot. Mar. 20, 137–147, 1977.

DEMIBRAS, Q. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*. Vol. 51 (12). Pg. 2738-2749. 2010.

DOTY, M. S. Prodomus ad systematica Eucheumatodeorum: a tribe of commercial seaweeds related to *Eucheuma* (Solieriaceae, Gigartinales). In: Abbot A. I. (ed.). *Taxonomy of Economic Seaweeds with References to some Pacific and Caribbean Species*. La Jolla, California Sea Grant College Program. USA. 12: 159-207. 1988.

DOTY, M.S. 1987. The production and use of *Eucheuma*. In: DOTY, M.S.; CADDY, J.F. & SANTELICES, B. (eds). *Case Studies of Seven Commercial Seaweed Resources*. FAO Fisheries Technical Paper. 281: 123-161.

ESPAZENET. 2015. Disponível em: < <http://worldwide.espacenet.com/>>. Acesso em 14 de Dezembro de 2015.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United State Nations. 2014. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome. P. 243. 2014.

FERREIRA, A. A., GUIMARÃES, E. R., CONTADOR, J. C. Patente como instrumento competitivo e como fonte de informação tecnológica. *Gest. Prod.*, São Carlos, V. 16, n.2, p. 209-221, 2009.

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 (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro, 2010.

FERREIRA, J. Etanol de segunda geração: definição e perspectivas. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) – Campus São José do Rio Preto-SP. *Revista Conexão Eletrônica*, v. 12, 1 ed. 2015. Três Lagoas-MS.

GÓES, H. G. Monitoramento da produção e do rendimento de carragenana da macroalga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva e avaliação de técnicas de produção, em cultivo comercial na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. Dissertação (Mestrado em Botânica). Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ, 2009.

GÓES H. G, REIS R. P. Uma comparação inicial da rede tubular contra métodos tie-tie de cultivo de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) na costa sul do Rio de Janeiro, Brasil *J Appl Phycol*, v. 23. p. 607-613, 2011.

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. 843-848, 2010.

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.V.; FAAIJ, A.P.C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and longterm. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384–410.

HAN, K. H.; KO, J.H.; YANG, S.H. Optimizing lignocellulosic feedstock for improved biofuel productivity and processing. *Biofuels Bioprod Biorefin* 2007;1:135–46

HARGREAVES, P. L. Produção de etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii*: Biocombustível de terceira geração. 2013. 102f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2013.

HARGREAVES, P. L., BARCELOS, C. A., DA COSTA, A. C., PEREIRA JR., N. Production etanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evalution of diferente process strategies. *Bioresource Technology*, Volume 134, pg. 257-283. 2013.

HAYASHI, L. Contribuição à Maricultura da alga Vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rodophyta, Solieriaceae) para Produção de Carragenana. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2007.

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., YAKOYA, N. S., OSTINI, S., PEREIRA, R. T. L., BRAGA, E. S., OLIVEIRA, E. C. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in re-circulating water. *Aquaculture (Amsterdam)*, 277, 185-191, 2008.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Compostos bioativos em algas: aplicações em alimentos funcionais e legislação. *J Appl Phycol*, v. 23, p. 543-597, 2011.

HONG, D. D. et al. Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. *J Appl Phycol*, v.19, p. 817–826, 2007.

INPI, Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/>>. Acesso em 15 de novembro de 2015.

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

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

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

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.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. Plant Growth Regulation, v. 28, p. 386-399, 2009.

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

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. Appl Microbiol Biotechnol 2004;66:10–26.

KRAAN, S. Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production. Mitig Adapt Strateg Glob Change v.18, p.27–46, 2013.

KUMAR, G.; SAHOO, D. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. Journal of Applied Phycology, v. 23, p. 251- 255, 2011.

LYND, L. R., WEIMER, P.J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S., Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology Molecular Biology, 66, p. 506-577, 2002.

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

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., DUNLAP, P. V, CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. Décima segunda edição. Editora: Artmed, 2010.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R.; greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brasil: the 2005/2006 averages and the prediction for 2020. Biomass and Bioenergy. DOI: 10.1016/j. biombioe. 2007.12.2006. 2008.

MARIO, M. DE.; BALLESTERO, S. D. Aplicação de resíduo Do processamento industrial de alga marinha ao solo. Revista Biociências de Taubaté, 10: 177-188, 2004.

MARQUES, FABRÍCIO. O alvo é o bagaço. Pesquisa FAPESP, ed. 163, Setembro, 2009.

MATANJUN, P.; MOHAMED, S.; MUHAMMAD, K.; MUSTAPHA, N. M. Comparação dos efeitos protetores cardiovasculares de algas tropicais, *Kappaphycus alvarezii*, *Caulerpa lentilifera* e *Sargassum polycystum* em lighcholesterol / dieta rica em gordura em ratos. J. Med Food, v. 13, p. 792-800, 2010.

MCHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 105pp, 2003.

MCMILLAN, J. (2004) Biotechnological Routes to Biomass Conversion. Disponível em: www.nrel.gov/docs/gen/fy04/36831g.pdf. Acesso: fev./2006.

MEENA, R.; PRASAD, K.; SIDDHANTA, A. K. Desenvolvimento de uma rede de hidrogel estável à base de agar-kappa carragenano mistura reticulada com genipina. Alimentação hidrocolóide, v. 26, p. 497-509, 2009.

MEINITA, M.D.N., KANG, J.-Y., JEONG, G.-T., KOO, H., PARK, S., HONG, Y.-K., Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenanophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). J. Appl. Phycol., 1–6, 2012.

MEINITA, M.D.N., HONG, Y.-K., JEONG, G.-T., Detoxification of acidic catalyzed hydrolysate of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). Bioprocess Biosystem Engineering. 35, 93–98, 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.

MICHEL JR, R. J. S. Obtenção do álcool etílico hidratado, com graduação alcoólica para uso automotivo: validação de um processo em batelada. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Santa Maria. 146p. 2010.

MOREIRA, N., Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop. Scientific News online, 168 (14), 209-224, 2005.

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

NISIZAWA, K. Algas kaiso: colheita abundante do mar. SBN 90 75000 80 4, Reino Unido, 2006.

NORRIE, J. Advances in the use of *Ascophyllum nodosum* seaplant extracts for crop production. Laboratory and Field Research. Acadian Seaplants Ltd., Dartmouth, Nova Scotia, Canada. 2008.

NOVACANA. GranBio um ano depois: a evolução da primeira usina de etanol celulósico do Brasil (2015). Disponível em: < <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/granbio-ano-evolucao-primeira-usina-etanol-celulosico-brasil-101115/>>. Acesso em 02 de Dezembro de 2015.

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.

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.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: Primeira ou segunda geração? Circular Técnica 04. EMBRAPA, Brasília, DF. Abril, 2011. ISSN 2177-4420.

PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition, Bioresource Technology 74 25-33, 2000.

PAMPLONA, C. Proálcool: Impactos em termos técnico-econômico e sociais do programa no Brasil. Piracicaba: Setor de comunicação Planasucar, 93p. 1984

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

PARKER, A. Using elasticity/temperature relationships to characterize gelling carragenans. Hydrobiologia 260/261: 583-588, 1993.

PATENTE N° PI0819746-6A2. CABRAL, M. C., ELEUTHERIO, E. C. A., HAGLER, A. N., LIBERTO, M. I. M., LOUZADA, J. M., PEREIRA JR., N., TEIXEIRA, I. A., VALLADARES, G. M. Processo para obtenção de etanol a partir de algas. Brasil. Data de depósito: 26/11/2008.

PAULA, E. J; PEREIRA, R. T. L. Da “marinomia” maricultura da alga exótica *Kappaphycus alvarezii* para a produção de carragenanas no Brasil. Panorama da Aquicultura, v.8, p.10-15, 1998.

PAULA, E. J., PEREIRA, R. T. L., OSTINI, S. Introdução de espécies exóticas de *Eucheuma* e *Kappaphycus* (Gigartinales, Rhodophyta) para fins de maricultura no litoral brasileiro: abordagem teórica e experimental. In: Paula, E. J., Cordeiro-Marinho, M., Santos, D. P., Fujii, M., Plastino, E. M., Yokoya, N. (Eds.), Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião

IberoAmericana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Caxambú, MG. pp. 340-357, 1998.

PAULA, E. J.; PEREIRA, R. T. L.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *Journal of Applied Phycology*, v.11, p.111-121, 1999.

PAULA, E.J., Marínomia da alga exótica, *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta), para produção de carragenas no Brasil. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo. 39pp, 2001.

PAULA, J. E.; PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. DE; BERCHEZ, F. CHOW, F.; OLIVEIRA, M. C. DE. Introdução à Biologia das Criptógamas. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2007. 184p.

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, v. 2, 45p. 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 pg., 2008.

PICULELL, L. Gelling carrageenans. In: Stephen A. M. (ed) *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York. 205-244.1995.

RATHORE, S. S.; CHAUDHARY, D. R.; BORICHA, G. N.; GHOSH, A.; BHATT, B. P.; ZODAPE, S. T.; PATOLIA, J. S. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African Journal of Botany*, v. 75, p. 351-355, 2009.

ROESIJADI, G. Macroalgae as a biomass feedstock: a preliminary analysis. U.S. Department of Energy under contract, Pacific Northwest National Laboratory; 2010.

RODRIGUES, J. D. Biorreguladores, aminoácidos e extratos de algas: verdades e mitos. *International Plant Nutrition Institute (INPI), Jornal Informações Agrônomicas*, n. 122, p. 15-17, jun.2008.

SANTOS, A. A. Potencial de cultivo da Macroalga *Kappaphycus alvarezii* no litoral de Santa Catarina. 2014. 151f. Tese (Doutorado Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014.

SCHELIGA, C. G. 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. 2012. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo, Edgard Blucher Ltd, volume 2, capítulo 8. Pg 185, 2001.

SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. Dissertação (Mestrado) – Tecnologia de Processos químicos e bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

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.

Seaweed Consulting: Maricultura de Algas Marinas. Algas. Disponível em: < <http://seaweedconsulting.com/algas/>>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

SOUZA, V. F. de. Análise da cadeia produtiva do etanol e do biodiesel. Monografia (Especialização em Formas Alternativas de Energia) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

STIRK, W. A.; NOVAK, O.; STIMM, M.; VAN STADEN, J. Cytokinins in macroalgae. Plant Growth Regul. 41:13–24, 2003.

TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, cap. 3, 2004, p.45-62.

TAN, I. S.; LEE, K.T. Hydrolysis of macroalgae using heterogeneous catalyst for bioethanol production. Carbohydr Polym 2013; 94:561–6.

TAN, I. S.; LEE, K.T. Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: an optimization study. Energy 78, 53–62. 2014.

TEIXEIRA, L.C.; LINDEN, J.C.; SCHROEDER, H.A. (2000). Simultaneous Saccharification and Cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84-86, n. 1-9, p. 111-127.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2005). Microbiologia. 8 ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, 894 p.

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.

TRONO, G.C. The seaweed resources of the Philippines. *In*: OHNO, M. & CRITCHLEY, A.T. (eds). Seaweed Cultivation and Marine Ranching. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, Japan. 47-60. 1998.

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.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. Departamento de Química – Universidade Estadual de Maringá – PR. Quimica Nova, Vol. 27, No. 1, 139-145, 2004.

ZHANG, Y.-H. P., LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. Biotechnology Bioengineering, 88, p. 797-824, 2004.

ZHANG, Y.-H. P., HIMMEL, M. E., MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances, 24, p. 452-481, 2006.

ZEMKE-WHITE, W.L. & OHNO, M. World seaweed utilization: An end-of-century summary. Journal of Applied Phycology 11:369-376. 1999.

WANDERLEY, A. As gerações de bioetanol. (2013). Disponível em: <<http://amandawy.bio.br/2013/09/as-geracoes-de-bioetanol/>>. Acesso em 25 de Novembro de 2015.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood – a comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. Biotechnology Program, v. 19, n. 4, p. 1109-1117. 2003.

WHITTAKER, R.H. New Concepts of Kingdoms of Organisms. Science 163: 150-160. 1969.

WOESE, C. R., KANDLER, O., WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4576-4579. 1990.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 17, p. 75-90, 1988.

