

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Loisleini Fontoura Saldanha

**CONVERSÃO FERMENTATIVA DE MICROALGA *Chlorella* sp. EM
GOMA GELANA POR *Sphingomonas paucimobilis***

**Santa Maria, RS
2020**

Loisleini Fontoura Saldanha

**CONVERSÃO FERMENTATIVA DE MICROALGA *Chlorella* sp. EM GOMA
GELANA POR *Sphingomonas paucimobilis***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química – Área de Concentração em Química Analítica**.

Orientador: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

**Santa Maria, RS
2020**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Saldanha, Loisleini Fontoura
Conversão fermentativa de microalga *Chlorella* sp. em goma gelana por *Sphingomonas paucimobilis* / Loisleini Fontoura Saldanha.- 2020.
72 p.; 30 cm

Orientador: Ayrton Figueiredo Martins
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2020

1. Biorrefinaria 2. Quimiometria 3. Cultivo com *S. paucimobilis* 4. Microalga 5. Biopolímero I. , Ayrton Figueiredo Martins II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LOISLEINI FONTOURA SALDANHA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

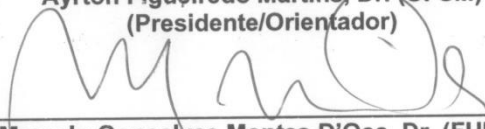
Loisleini Fontoura Saldanha

**CONVERSÃO FERMENTATIVA DE MICROALGA *CHLORELLA* SP. EM
GOMA GELANA POR *SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química – Área de Concentração em Química Analítica**.



Ayrton Figueiredo Martins, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Marcelo Gonçalves Montes D'Oca, Dr. (FURG)



Laura Bedin Denardi, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Ayrton Figueiredo Martins, pelas orientações e também pela oportunidade de fazer parte do LATER.

Aos meus colegas do LATER pela amizade, compreensão e troca de conhecimento no decorrer dos anos que estive no laboratório. Em especial menciono meus companheiros de sala e experiências Giovanni B. Pedroso, Raiara B. Araujo e Leandro O. da Silva.

Aos meus amigos pelo cuidado, longas conversas e incentivo quando o cansaço se sobressaía ao amor à pesquisa. Um agradecimento especial à minha amiga Dinara Rodrigues que foi como uma segunda mãe.

Aos meus familiares, sobretudo minha mãe Iara, meu pai Acioli e minhas irmãs Crisciani e Schaienni pela paciência e apoio, principalmente nos momentos em que a saudade de casa falava mais alto. Amo muito vocês.

A minha gata, Brigitti, por ter sido uma companheira incansável ao longo de todo este período, sempre me recebendo no fim do dia com um carinho renovador.

Ao universo pelas situações que enfrentei e foram essenciais ao meu crescimento.

*“O espírito que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

CONVERSÃO FERMENTATIVA DE MICROALGA *Chlorella* sp. EM GOMA GELANA POR *Sphingomonas paucimobilis*

AUTOR: Loisleini Fontoura Saldanha

ORIENTADOR: Ayrton Figueiredo Martins

As microalgas (MAs) são potenciais matérias-primas na produção de monossacarídeos fermentescíveis, devido ao apreciável teor de carboidratos. A espécie usada neste trabalho foi *Chlorella* sp., uma das variedades de MA mais resistentes ao cultivo. Assim sendo, este trabalho objetivou a conversão desta biomassa em goma gelana (GG) por fermentação com *Sphingomonas paucimobilis*. O tratamento físico-químico usado foi hidrólise ácida à pressão, cuja atuação enfraquece a estrutura da biomassa e libera açúcares fermentescíveis das frações celulósicas dessa matriz. Os melhores resultados para a microalga (MA) *in natura* foram 12,3 g açúcares L⁻¹, usando-se H₂SO₄ (150 °C, 2,5% v v⁻¹ e 36,6 min), e 12,5 g açúcares L⁻¹, com o uso de HCl (155 °C, 1,5% v v⁻¹ e 40 min). Carbono ativado comercial (50 °C, 10% m v⁻¹ e 60 min) foi empregado na etapa de destoxificação do hidrolisado de MA, tornando possível o uso deste hidrolisado enquanto meio fermentativo para *Sphingomonas paucimobilis*. Com abordagem multivariada às condições de cultivo, avaliou-se a temperatura (20–30 °C) e a agitação orbital (120–240 rpm) da etapa fermentativa. Nas condições otimizadas (pH 7,0, 7,0 g de extrato de levedura L⁻¹, 30 °C e 240 rpm) a produção de GG (após extração com álcool etílico resfriado), foi de até 53,3 g L⁻¹ de hidrolisado, em 60 h de cultivo. A técnica analítica utilizada foi Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Índice de Refração (HPLC-RID), submetida a estudo de figuras-de-mérito e de validação de método. A caracterização da GG foi feita por técnicas de Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). A viabilidade do aproveitamento de MA para produção de açúcares foi demonstrada, em escala de laboratório, bem como a viabilidade da bioconversão em GG (91,7% de pureza), por meio de rota produtiva inovadora. Adicionalmente, fez-se uma análise econômica preliminar do processo.

Palavras-chave: Microalga. Hidrólise ácida à pressão. *Sphingomonas paucimobilis*. Goma gelana. Otimização multivariada.

ABSTRACT

FERMENTATIVE CONVERSION OF *Chlorella* sp. MICROALGAE IN GELLAN GUM BY *Sphingomonas paucimobilis*

AUTHOR: Loisleini Fontoura Saldanha

ADVISER: Ayrton Figueiredo Martins

Microalgae (MA) are potential feedstock for the production of fermentable monosaccharide, due to the appreciable carbohydrate fraction. The species used in this dissertation was *Chlorella* sp., one of the most resistant kind of MA. Thus, this research work aimed to convert MA biomass in gellan gum (GG) by fermentation with *Sphingomonas paucimobilis*. The physical-chemical treatment applied was pressurized acid hydrolysis, to weakening the biomass structure and making available fermentable sugars from the cellulosic fractions. The best results for microalgae (MA) *in natura* were 12.3 g of sugar L⁻¹ for the pressurized sulfuric hydrolysis (150 °C, 2.5% v v⁻¹, 36.6 min) and 12.5 g of sugars L⁻¹ for the pressurized hydrochloric hydrolysis (155 °C, 1.5% v v⁻¹, 40 min). Activated carbon (50 °C, 10% m v⁻¹, 60 min) was used to detoxify MA hydrolyzate, making possible the use of this hydrolyzate as fermentative medium for *Sphingomonas paucimobilis*. Using multivariate approach to optimize the culture conditions, temperature (20-30 °C) and orbital agitation (120-240 rpm) of the fermentation stage were evaluated. Under optimized conditions (pH 7.0, 7.0 g yeast extract L⁻¹, 30 °C, 240 rpm) the production of GG, extracted with cooled ethyl alcohol, resulted in 53.3 g L⁻¹ of hydrolyzate, after 60 h of cultivation. The analytical method make use of a High Performance Liquid Chromatograph coupled to Refractive Index Detector (HPLC-RID), applying figure-of-merit and method validation studies. The characterization of GG was done by Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-IR) and Gel Permeation Chromatography (GPC). The viability of using MA for sugar production was demonstrated on lab scale, and, the viability of bioconversion into GG (91.7% purity), throughout an innovative production route. Adittionally, a preliminary economic evaluation of the process was provided.

Keywords: Microalgae. Pressurized acid hydrolysis. *Sphingomonas paucimobilis*. Gellan gum. Multivariate optimization.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema resumido das etapas que levam da biomassa ao bioproductos. | 17 |
| Figura 2 - Aplicações de MAs em biorrefinaria..... | 21 |
| Figura 3 - Microfotografia da MA <i>Chlorella</i> | 22 |
| Figura 4 - Estrutura química da GG produzida por metabolismo bacteriano..... | 26 |
| Figura 5 - Amostra da MA <i>Chlorella</i> sp. <i>in natura</i> usada no processo de hidrólise ácida à pressão. | 28 |
| Figura 6 - Sistema Berghof usado na hidrólise ácida à pressão da MA. Componentes: (a) reator de aço inox; (b) bloco de aquecimento/resfriamento; (c) programador de aquecimento. | 29 |
| Figura 7 - Cromatograma obtido da injeção de soluções-padrão dos açúcares glicose e xilose e dos subprodutos ácido fórmico e acético, em HPLC-RID. | 39 |
| Figura 8 - Diagramas de Pareto obtidos a partir de DCCR empregando-se H ₂ SO ₄ , contendo os fatores-resposta para liberação de glicose e xilose, em hidrólises ácidas à pressão da MA. | 44 |
| Figura 9 - Diagramas de Pareto obtidos a partir de DCCR empregando-se HCl, contendo os fatores-resposta para liberação de glicose e xilose, em hidrólises ácidas à pressão da MA. | 45 |
| Figura 10 - Efeito sinérgico das variáveis significativas para a produção de glicose e xilose nas hidrólises de MA com H ₂ SO ₄ , expressas na forma de superfícies de contorno. | 46 |
| Figura 11 - Efeito sinérgico das variáveis significativas para a produção de glicose e xilose nas hidrólises de MA com HCl, expressas na forma de superfícies de contorno. | 47 |
| Figura 12 - Acompanhamento cinético do consumo de açúcares no ensaio fermentativo com <i>S. paucimobilis</i> para avaliação da etapa de destoxificação do hidrolisado sulfúrico de MA. | 50 |
| Figura 13 - Diagrama de Pareto obtido a partir de planejamento Doehlert da destoxificação do hidrolisado sulfúrico de MA com carbono ativado comercial. | 51 |
| Figura 14 - Efeito sinérgico das variáveis significativas para a destoxificação do hidrolisado sulfúrico de MA, expressas na forma de superfícies de contorno. | 51 |
| Figura 15 - Curva de crescimento da <i>S. paucimobilis</i> , em meio caldo nutriente, à 30 °C e 200 rpm, por 40 h. | 53 |
| Figura 16 - Acompanhamento cinético do consumo de açúcares, após 72 h de cultivo com <i>S. paucimobilis</i> , para avaliação da influência da temperatura e da agitação orbital. | 55 |
| Figura 17 - Diagrama de Pareto obtido a partir do planejamento Doehlert aplicado ao estudo da temperatura e à agitação orbital do processo fermentativo após 72h de cultivo com <i>S. paucimobilis</i> | 56 |
| Figura 18 - Efeito sinérgico das variáveis significativas para o estudo da influência da temperatura e da agitação orbital após 72 h de processo fermentativo com <i>S. paucimobilis</i> , expressas na forma de superfícies de contorno. | 56 |
| Figura 19 – Goma gelana produzida no cultivo do hidrolisado de MA com <i>S. paucimobilis</i> | 57 |
| Figura 20 - Determinação FT-IR dos grupos funcionais presentes na molécula de GG produzida em cultivo com <i>S. paucimobilis</i> no hidrolisado sulfúrico de MA..... | 58 |
| Figura 21 - Espectro de FT-IR de GG comercial. | 59 |
| Figura 22 - Determinação por GPC da massa molar média da GG (91,7% de pureza) produzida por <i>S. paucimobilis</i> | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição química das microalgas (b.s.)..... | 19 |
| Tabela 2 - Microrganismos produtores de goma gelana (GG). | 24 |
| Tabela 3 - Valores usados no planejamento DCCR para otimização do rendimento da glicose e xilose no processo de hidrólise ácida à pressão da MA..... | 30 |
| Tabela 4 - Valores usados no planejamento Doehlert para otimização da condição de destoxificação do hidrolisado ácido da MA..... | 32 |
| Tabela 5 - Valores usados no planejamento Doehlert para otimização do cultivo do hidrolisado de MA com <i>S. paucimobilis</i> | 34 |
| Tabela 6 - Condições cromatográficas (HPLC-RID) utilizadas na determinação de produtos e subprodutos da hidrólise ácida e processo fermentativo..... | 36 |
| Tabela 7 - Figuras-de-mérito para a determinação dos analitos e subprodutos por HPLC-RID. | 39 |
| Tabela 8 - Resultados do DCCR aplicado à etapa de hidrólise ácida à pressão da MA, usando-se H ₂ SO ₄ , com vistas à produção de monossacarídeos..... | 41 |
| Tabela 9 - Resultados do DCCR aplicado à etapa de hidrólise ácida à pressão da MA, usando-se HCl, com vistas à produção de monossacarídeos. | 42 |
| Tabela 10 - Equações polinomiais a valores de ANOVA para os modelos ajustados das hidrólises ácidas à pressão da MA. | 44 |
| Tabela 11 - Resultados do planejamento Doehlert aplicado à etapa de destoxificação, monitorado pelo consumo de açúcares (g L ⁻¹) do hidrolisado sulfúrico de MA, após 60 h de cultivo com <i>S. paucimobilis</i> | 49 |
| Tabela 12 - Resultados do planejamento Doehlert aplicado ao estudo da temperatura e agitação orbital do processo fermentativo, monitorado pelo consumo de açúcares (g L ⁻¹), após 72 h de cultivo com <i>S. paucimobilis</i> | 54 |
| Tabela 13 - Avaliação econômica preliminar da produção de GG, em escala de laboratório, a partir do hidrolisado de MA (cálculos baseados no uso de reagentes grau analítico P.A.)..... | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------|--|
| ANOVA | Análise de variância, do inglês <i>Analysis of Variance</i> |
| DCCR | Delineamento Composto Central Rotacional, do inglês <i>Central Composite Rotatable Design</i> |
| FT-IR | Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectrometry</i> |
| FURG | Universidade Federal do Rio Grande |
| GG | Goma gelana |
| GPC | Cromatografia de Permeação em Gel, do inglês <i>Gel Permeation Chromatography</i> |
| HPLC-RID | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Índice de Refração, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detector</i> |
| LD | Limite de detecção |
| LQ | Limite de quantificação |
| MA | Microalga |
| MAR | Microalga Residual |
| UFSC | Universidade Federal de Santa Maria |
| RMN H^1 | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVO | 16 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 BIORREFINARIA | 18 |
| 3.2 BIOMASSAS | 19 |
| 3.2.1 Microalga | 19 |
| 3.2.1.1 Microalga <i>Chorella</i> sp..... | 21 |
| 3.3 TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO..... | 22 |
| 3.3.1 Hidrólise ácida à pressão | 22 |
| 3.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GG E FERMENTAÇÃO BACTERIANA | 24 |
| 3.5 GOMA GELANA..... | 25 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 4.1 MICROALGA <i>Chlorella</i> sp..... | 27 |
| 4.2 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA À PRESSÃO | 28 |
| 4.3 TRATAMENTO DO HIDROLISADO..... | 30 |
| 4.3.1 Otimização da destoxificação do hidrolisado de MA | 30 |
| 4.4 MANUTENÇÃO E PREPARO DE INÓCULO DE <i>S. paucimobilis</i> | 32 |
| 4.5 FERMENTAÇÃO A PARTIR DA MA | 33 |
| 4.5.1 Otimização do processo fermentativo | 33 |
| 4.5.2 Extração de GG | 34 |
| 4.5.3 Caracterização da GG | 35 |
| 4.5.3.1 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)..... | 35 |
| 4.5.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)..... | 35 |
| 4.5.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de H ¹ (RMN H ¹)..... | 35 |
| 4.6 MÉTODO CROMATOGRÁFICO | 36 |
| 4.7 CÁLCULOS DE RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE | 36 |
| 4.8 GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS | 37 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS | 38 |
| 5.1.1 Método cromatográfico..... | 38 |
| 5.1.2 Determinação com HPLC-RID | 38 |
| 5.2 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA À PRESSÃO | 40 |
| 5.2.1 Microalga <i>Chlorella</i> sp. | 40 |
| 5.3 TRATAMENTO DO HIDROLISADO..... | 48 |
| 5.3.1 Otimização da destoxificação do hidrolisado de MA | 48 |
| 5.4 FERMENTAÇÃO A PARTIR DA MA | 52 |
| 5.4.1 Ensaio fermentativos preliminares | 52 |
| 5.4.2 Otimização do processo fermentativo..... | 53 |
| 5.5 CARACTERIZAÇÃO DA GG | 57 |
| 5.5.1 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)..... | 58 |
| 5.5.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)..... | 59 |
| 5.6 AVALIAÇÃO ECONÔMICA PRELIMINAR DO PROCESSO..... | 60 |
| 6 CONCLUSÕES | 62 |
| 7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS | 64 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |

1 INTRODUÇÃO

A biomassa vem sendo usada como fonte renovável alternativa aos combustíveis fósseis (FOLEY, BEACH & ZIMMERMAN, 2011; CHIU et al., 2015). A necessidade de conversão desta biomassa em insumos químicos e energia tem alavancado o conceito de biorrefinaria, tornando-o um dos mais relevantes da atualidade (RODRIGUES, 2011; CHOI et al., 2015).

Atualmente, considera-se biomassa qualquer material ou rejeito sustentável, rico em carbono e que apresente potencial para a bioconversão quando submetido a tratamentos físico-químicos e biotecnológicos, que alterem sua natureza em compostos químicos de interesse (RODRIGUES, 2011; CHOI et al., 2015;).

Neste cenário, a biomassa de microalga (MA) é considerada um dos recursos mais importantes e abundantes da Terra (CHIU et al., 2015). Composta basicamente por lipídeos e carboidratos, as MAs são apontadas como fábricas microscópicas de diversos insumos industriais (FOLEY, BEACH & ZIMMERMAN, 2011; RIDLEY, 2016). Essa biomassa de MA compõe a biorrefinaria de terceira geração e apresenta como vantagem o fato de ser cultivável continuamente ao longo de todo o ano, além de não competir com a produção de alimentos (BORGES, 2010; PARAJULI et al., 2015; GIFUNI et al., 2019).

Alguns processos, na sua maioria físico-químicos, vêm sendo usados para fragmentar a celulose e a hemicelulose, presentes nas MAs, disponibilizando assim os açúcares fermentescíveis resultantes desta fragmentação. A hidrólise com ácidos diluídos é um dos processos mais usados, visto sua maior eficiência de conversão de compostos celulósicos em açúcares fermentescíveis (glicose, xilose e arabinose) (ZHANG et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2013); o que resulta em relação custo-benefício positiva (TAHERZADEH & KARIMI, 2008).

Entre os bioprodutos de destaque tem-se a goma gelana (GG), um exopolissacarídeo produzido a partir de açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose, etc.), por fermentação aeróbica com a bactéria *Sphingomonas paucimobilis* (O'NEILL, SELVENDRAN & MORRIS, 1983; COELHO et al., 2019). A GG é apontada como um dos bioprodutos mais usados industrialmente, devido às propriedades físico-químicas, como agente emulsionante, estabilizante, aglutinante, gelificante, coagulante, etc. (KARTHIKA, VISHALAKSHI & NAIK, 2016; DOLAN et al.,

2016), sendo encontrada em alimentos, medicamentos e cosméticos (BANERJEE, RAVI & BHATTACHARYA, 2013; PRAJAPATI et al., 2013).

Assim, levando em conta o elevado crescimento populacional mundial e a consequente necessidade de geração de insumos, a biorrefinaria aparece como uma alternativa à indústria atual (PARADA, OSSEWEIJER & DUQUE, 2017). Neste sentido, o uso de biomassas ricas em carbono na geração de bioprodutos, biocombustíveis e, também, energia, é de grande interesse, pois que promove o desenvolvimento de processos e, conseqüentemente, o avanço científico e industrial (PEDROSO et al., 2019).

2 OBJETIVO

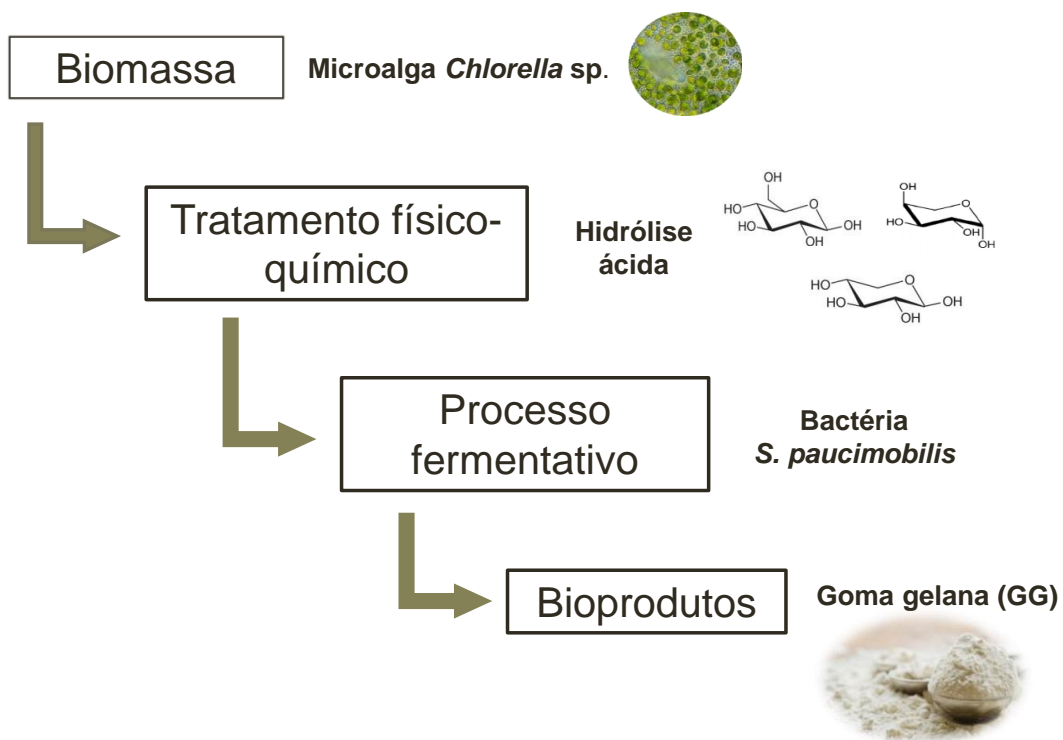
2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi estudar a bioconversão fermentativa da biomassa de MA em GG a partir de hidrolisado desta biomassa (Figura 1).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições de hidrólise ácida à pressão, como tratamento da biomassa MA, visando o maior rendimento de açúcares fermentescíveis;
- Otimizar a etapa de destoxificação do hidrolisado gerado usando carbono ativado comercial, visando o emprego deste hidrolisado como meio fermentativo;
- Otimizar as condições da etapa fermentativa com cepa *Sphingomonas paucimobilis*, objetivando a maior produção de GG;
- Caracterizar e quantificar a GG produzida no processo fermentativo;
- Aplicar metodologia analítica cromatográfica (HPLC-RID), já usada pelo LATER, e definir figuras-de-mérito e validação, para a determinação de açúcares e subprodutos dos processos hidrolíticos e fermentativo;
- Usar planejamento experimental multivariado e ferramentas estatísticas de interpretação de dados, de modo a encontrar a condição de maior produtividade dos produtos de interesse;
- Desenvolver processo de produção de GG, em escala de bancada, visando à redução do consumo de reagentes, bem como dos resíduos gerados;
- Fazer balanço econômico preliminar que demonstre a viabilidade do processo, baseado nos custos com materiais e reagentes em contraponto ao valor comercial do produto obtido;
- Encaminhar pedido de registro de invenção/patente junto à Agittec/UFSM.

Figura 1 - Esquema resumido das etapas que levam da biomassa ao bioprodutos.



Fonte: Autor.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIORREFINARIA

A demanda por alternativas aos combustíveis fósseis tem inspirado a pesquisa à cerca do uso de recursos renováveis e menos poluentes. Neste contexto, a biorrefinaria vem sendo desenvolvida, mundialmente, com vistas à conversão de biomassas em um leque de bioprodutos, através de processos mais sustentáveis (PARADA, OSSEWEIJER & DUQUE, 2017; GIFUNI et al., 2019).

A biorrefinaria é conceituada, segundo a Agência Internacional de Energia (AIE), como um processo, uma instalação ou um conjunto de instalações que abrange etapas de *upstream*, *midstream* e *downstream* das biomassas na geração de produtos químicos, combustíveis e energia (de JONG & JUNGMEIER, 2015). Assim sendo, biomassa pode ser caracterizada como qualquer rejeito ou subproduto com elevado teor de carbono e potencial para bioconversão, tanto por sua abundância, quanto pelo baixo valor agregado característico (RODRIGUES, 2011).

Classifica-se a biorrefinaria como de primeira, segunda, terceira ou quarta geração, de acordo com a biomassa utilizada. Na biorrefinaria de primeira geração usam-se matérias-primas que competem com alimentos (milho, trigo, cana-de-açúcar). Na de segunda geração, utilizam-se matérias-primas residuais, ou não usadas na alimentação (resíduos agrícolas e produtos não comestíveis) (ÖZDENKÇI et al., 2017). Na biorrefinaria de terceira geração exploram-se as MAs (PARAJULI et al., 2015) e, por fim, na biorrefinaria de quarta geração, dióxido de carbono e culturas não comestíveis (SERNA-LOAIZA, CARMONA-GARCIA & CARDONA, 2018).

A biorrefinaria de terceira geração apresenta algumas vantagens, consequentes do uso de MA como matéria-prima frente a outras biomassas, como capacidade de reprodução rápida durante todo ano, captura de dióxido de carbono, não competição pelo uso da terra, e pelo fato de serem totalmente renováveis, além do potencial de aproveitamento das frações da biomassa para a geração de diferentes produtos (BORGES, 2010; GIFUNI et al., 2019). As MAs apresentam ainda elevado teor de lipídeos, vantagem adicional em se tratando de classe química igualmente passível de aproveitamento (BORGES, 2010).

Assim, o objetivo da biorrefinaria é a conversão mais sustentável de biomassas abundantes em um grande número de bioprodutos com valor agregado, sendo esta uma das principais características desta abordagem processual (MONCADA, ARISTIZÁBAL & CARDONA, 2016). A exploração de biomassas, em todas as suas frações, vem se difundindo no Brasil dada a sua possível aplicabilidade industrial (DEMIRBAS, 2011).

3.2 BIOMASSAS

3.2.1 Microalga

As MAs, organismos unicelulares, encontrados em diferentes ambientes aquáticos e úmidos, incluindo rios, lagos, oceanos e solos (FOLEY, BEACH & ZIMMERMAN, 2011), são um dos recursos naturais mais importantes da Terra, colaborando com cerca de 50% da atividade fotossintética global (CHIU et al., 2015).

Devido ao grande número de espécies e às condições de cultivo distintas, a composição química das MAs é variável, conforme pode-se observar na Tabela 1 (ZHU, 2015). Ademais, a parede celular da biomassa algal é formada de diversos compostos como celulose, quitina, mureína, proteína, sílica e carbonato de cálcio (OKUDA, 2002), demandando, de acordo com a composição dessa parede celular, aplicação de vários processos para quebra, que podem ser baseados em moagem e homogeneização à pressão, além de emprego de ultrassom e micro-ondas (D'OCA et al., 2011).

Tabela 1 - Composição química das microalgas (b.s.).

| Composição (% massa seca) | | | |
|----------------------------------|---------------------|-----------------|------------------|
| Microalgas | Carboidratos | Lipídios | Proteínas |
| | 5-23 | 7-23 | 6-52 |

Fonte: Adaptado de ZHU, L. (2015).

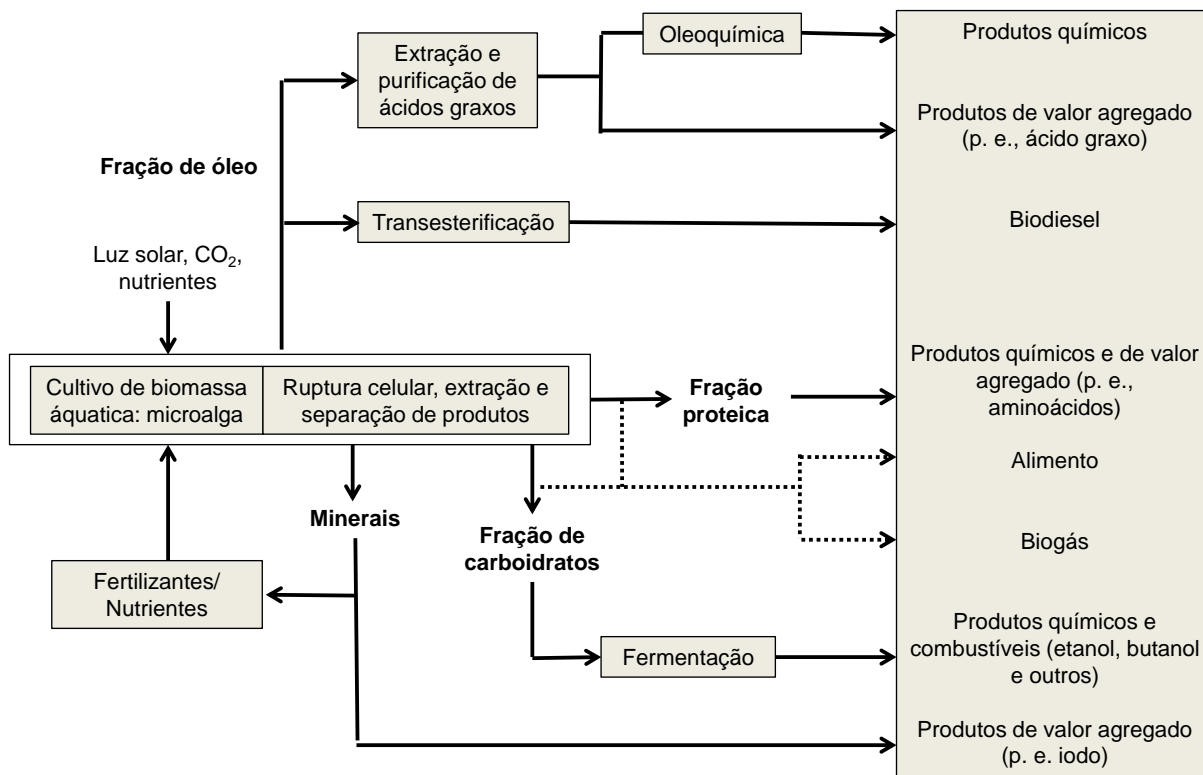
As biorrefinaria têm usado biomassa de MAs, crescentemente, visto que, além de ser rica em lipídios e carboidratos, esta biomassa apresenta vantagens frente a outras matérias-primas, como, por exemplo, alta eficiência fotossintética e

taxa de crescimento, possibilidade de cultivo no mesmo local e ao longo de todo ano, cultivo não competitivo com a produção de alimentos, possibilidade de cultivo em terras áridas, semiáridas, poluídas ou inférteis, solos salinos e, também, cultivo em efluentes líquidos, possibilitando o tratamento destes (BRASIL, SILVA & SIQUEIRA, 2017; ZHU et al., 2017).

Atualmente, a produção comercial de MAs é feita por diversas empresas, em diferentes países, usando sistemas de cultivo que podem ser classificados como abertos ou fechados (AQUACULTURE BRASIL, 2017), tendo como principais insumos necessários para o crescimento das MAs, luz solar, água, dióxido de carbono e nutrientes (CANTRELL et al., 2008). Os tanques de cultivo aberto são considerados menos sofisticados, com a cultura em contato com o ar atmosférico e baixo controle das variáveis ambientais, apresentando produtividade mais baixa ($0,05\text{--}0,5\text{ g L}^{-1}$); enquanto que os tanques de cultivo fechado são considerados mais sofisticados, visando controle das condições e, conseqüentemente, maior produtividade volumétrica ($> 1,0\text{ g L}^{-1}$). A escolha do sistema de cultivo é feita considerando-se o produto a ser obtido (AQUACULTURE BRASIL, 2017).

Assim, as MAs, devido à sua composição e forma de cultivo, são consideradas fábricas microscópicas, que podem gerar grande número de insumos (RIDLEY, 2016). A biomassa algal está presente nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, na suplementação de organismos aquáticos como aditivos em rações animais e na suplementação humana como fonte de lipídeos, proteínas, antioxidantes, compostos bioativos e pigmentos. Além disso, servem como matéria-prima na obtenção de biocombustíveis (CHIU et al., 2015). Desta maneira, sua aplicação na biorrefinaria é ampla, com aproveitamento das várias frações e redução de desperdícios, através de uma múltipla cadeia de etapas (ROUX, LAMOTTE & ACHARD, 2017) (Figura 2).

Figura 2 - Aplicações de MAs em biorrefinaria.



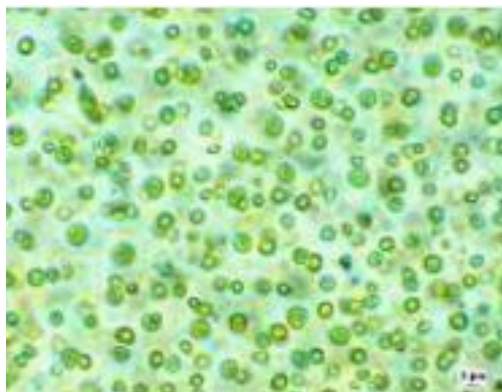
Fonte: Adaptado de GONZÁLEZ, L. et al. (2015).

3.2.1.1 Microalga *Chorella* sp.

As MAs do gênero *Chlorella* são algas verdes, unicelulares, esféricas e não móveis (sem flagelos), com diâmetro de 2,0 a 10,0 μm . Ocorrem tanto em água doce quanto marinha, podendo ser encontradas em lagoas e também solos e outros ambientes úmidos, como a superfície de troncos de árvores e paredes úmidas (PHUKAN et al., 2011; KRIENITZ, HUSS & BOCK, 2015).

As *Chlorellas* pertencem ao grupo das clorófitas (algas que possuem cloroplastos verdes envoltos por duas membranas) e, similarmente às plantas terrestres, possuem parede celular composta por pectina, celulose, sílica e, ainda, proteínas ligadas aos monossacarídeos xilose e manose (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001; OKUDA, 2002). São compostas 45% de proteínas, 20% de lipídeos, 20% de carboidratos e 10% de vitaminas e minerais (PHUKAN et al., 2011; ZHU, 2015), apresentando ainda 2% de clorofila, teor de pigmento responsável pela alta taxa de crescimento, tendo em vista que o metabolismo principal destas MAs é a fotossíntese (VONSHAK, 1997) (Figura 3).

Figura 3 - Microfotografia da MA *Chlorella*.



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG, 2009.

Essa MA foi usada inicialmente pelos japoneses, tornando-se, em 1961, o primeiro gênero de MA a ser cultivado em larga escala para fim de comercialização como suplemento alimentar (LOURENÇO, 2006; HENRARD, 2009). Uma das espécies que se destacam, é a *Chlorella* sp., considerada resistente ao cultivo em tanques abertos - devido à resistência à contaminações e à grande capacidade de adaptação às condições de cultivo - crescendo autotrófica, heterotroficamente e também em situação intermediária (XU, MIAO & WU, 2006). Hoje, é bastante utilizada para a obtenção comercial de lipídeos (HUNTLEY & REDALJE, 2007; ZHU et al., 2017), bem como em pesquisas de produção de biocombustível (RASOUL-AMINI et al., 2011; CHIU et al., 2015).

3.3 TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO

3.3.1 Hidrólise ácida à pressão

Sabe-se que os carboidratos estão inseridos na parede celular das MAs (HU et al., 1998), devendo ser liberados e convertidos em açúcares mais simples através de algum tratamento para poderem ser usados por microrganismos na produção de bioprodutos (NGUYEN et al., 2009; GHANAVATI, NAHVI & KARIMI, 2015).

O tratamento com ácido diluído é o que proporciona maior eficiência de conversão de compostos celulósicos (celulose e hemicelulose) em açúcares fermentescíveis, tais como glicose, xilose e arabinose (TAHERZADEH & KARIMI,

2008; ZHANG et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2013). Em solução aquosa, isso se deve à dissociação dos ácidos em íons H_3O^+ , que protonam os oxigênios das ligações glicosídicas da celulose e hemicelulose, enfraquecendo estas estruturas e liberando os monômeros fermentescíveis (LOOW et al., 2016).

Para que se obtenha resultados satisfatórios ao longo do processo de hidrólise ácida à pressão, alguns parâmetros como concentração ácida, temperatura (diretamente ligada à pressão) e a relação sólido/líquido (biomassa/solução ácida) devem ser avaliados, já que podem afetar consideravelmente os resultados do tratamento (HARUN & DANQUAH, 2011; PARK et al., 2013).

Os ácidos mais usados nos processos de hidrólise são os ácidos sulfúrico, clorídrico, nítrico e fosfórico, com concentrações variando de 1 a 10% $v v^{-1}$ (RUIZ et al., 2013; CORTEZ et al., 2014), em condições de baixa severidade, ou seja, processos que podem ir de alguns minutos até cerca de uma hora, à temperaturas entre 140 e 200 °C, atingindo pressões de até 70 bar durante o processo hidrolítico (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A hidrólise de MA gera, principalmente, glicose, uma das principais matérias-primas em processos biotecnológicos. São gerados, também, xilose, arabinose, produtos de decomposição da hemicelulose (ácidos acético e fórmico) e, ainda, compostos derivados da decomposição de monossacarídeos [furfural e 5-HMF (hidroxi-metil-furfural)], sendo estes últimos potenciais inibidores de microrganismos fermentativos (GÁMEZ et al., 2006; PANAGIOTOPOULOS et al., 2012). Assim, uma etapa de destoxificação do hidrolisado é necessária para a remoção dos compostos nocivos à fermentação, tornando, então, o hidrolisado adequado ao uso (HUANG et al., 2011).

Ademais, a relação custo-benefício positiva deste processo também contribui para que o mesmo seja apontado como o processo mais aplicado na obtenção de açúcares fermentescíveis (TAHERZADEH & KARIMI, 2008), visto que dispensa o uso de equipamentos sofisticados, podendo ser usado para diferentes biomassas (ANWAR, GULFRAZ & IRSHAD, 2014), com baixo consumo de reagentes e gerando pouco resíduo (HEREDIA-OLEA, PÉREZ-CARRILLO & SERNA-SALDÍVAR, 2012).

3.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GG E FERMENTAÇÃO BACTERIANA

A bactéria produtora de GG foi isolada do tecido de uma planta do gênero *Elodea* (KANELEO & KANG, 1979), sendo então classificada como uma nova cepa da espécie *Pseudomonas*, denominada *Pseudomonas elodea* (MILES, MORRIS & O'NEILL, 1984). Em 1994, a bactéria *Sphingomonas paucimobilis* foi identificada como produtora de GG (TAKEUCHI et al., 1994) e, hoje em dia, é usada industrialmente para a produção deste exopolissacarídeo (ZHU, SHENG & TONG, 2013).

As *Sphingomonas* são um grupo de bactérias Gram-negativas, na forma de bastonetes, estritamente aeróbicas, que contém glicoesfingolipídeos (GSLs) nos seus invólucros celulares, produzindo colônias de pigmentação amarelada (YABUUCHI & YANO, 1990). Diferentes cepas já foram usadas na produção de GG, tais como *S. paucimobilis* NK2000 (JIN et al., 2003), *S. paucimobilis* ATCC 31461 (BAJAJ & SAUDAGAR, 2006) e *S. paucimobilis* QHZJUJW CGMCC2428 (ZHANG et al., 2015) (Tabela 2).

Tabela 2 - Microrganismos produtores de goma gelana (GG).

| Microrganismo | Fonte de carbono | GG (g L⁻¹) |
|---|-------------------------|------------------------------|
| <i>S. paucimobilis</i> NK2000 | Glicose | 7,3 |
| <i>S. paucimobilis</i> ATCC 31461 | Amido | 43,6 |
| <i>S. paucimobilis</i> QHZJUJW CGMCC2428 | Sacarose | 19,9 |

Em se tratando de fermentação bacteriana, o meio de crescimento da *S. paucimobilis* consiste, preferencialmente, em ágar nutriente, podendo se estender a caldo nutriente, ambos em pH 7,0. O meio fermentativo é composto de fonte de carbono, fonte de nitrogênio e sais inorgânicos. Variáveis como pH, temperatura e taxa de agitação/aeração do meio, também influenciam na produção da goma (PRAJAPATI et al., 2013; ZHU, SHENG & TONG, 2013).

A concentração da fonte de carbono se apresenta como um dos fatores mais importantes na produção de GG (FIALHO et al., 1999; BAJAJ et al., 2007). Diversos carboidratos tais como sacarose, glicose, frutose, maltose e manitol são usados,

isolados ou combinados, como fonte de carbono, em quantidades que variam de 2 e 4% em massa (KANG & COLEGROVE, 1982; KANG & VEEDER, 1982). A concentração da fonte de nitrogênio, em termos de importância, vem logo após a do carbono, podendo ser de origem orgânica ou inorgânica (PRAJAPATI et al., 2013). Algumas das fontes de nitrogênio mais usadas são ureia, triptona, peptona, extrato de levedura, nitrato de sódio e potássio, sulfato, fosfato, nitrato e cloreto de amônio (ZHANG et al., 2015). Maior concentração de fonte de carbono e, menor, de fonte de nitrogênio, são favoráveis à produção do exopolissacarídeo (BAJAJ et al., 2007). Sais inorgânicos como o sulfato de potássio e fosfato de potássio monobásico são usados para elevar o rendimento de goma (ZHANG et al., 2015).

O pH é uma variável importante no processo fermentativo, já que influencia consideravelmente o crescimento celular e a formação do bioproduto. O pH ideal do meio fermentativo varia de 6,5 a 7,0 (JIN et al., 2003; BAJAJ et al., 2007; ZHANG et al., 2015). Geralmente, a temperatura usada na produção de GG é de 30 °C (JIN et al., 2003; ZHANG et al., 2015), porém, há relatos de produção máxima de goma a 20–25 °C (MARTIN & SA-CORREIA, 1993). Taxas de agitação de 200 a 250 rpm são as mais comumente usadas (JIN et al., 2003; BAJAJ et al., 2007; ZHANG et al., 2015).

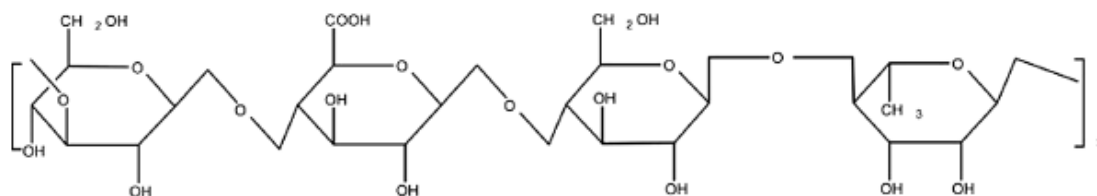
3.5 GOMA GELANA

A GG é um exopolissacarídeo bacteriano aniônico (JANSSON, LINDBERG & SANDFORD, 1983), de peso molecular médio chegando a 500 kDa (BAJAJ et al., 2007), que apresenta em sua cadeia principal quatro unidades repetidas dos tetrassacarídeos D-glicose, L-ramnose e D-ácido glicurônico na proporção de 2:1:1 (JANSSON, LINDBERG & SANDFORD, 1983; MORRIS, NISHINARI & RINAUDO, 2012) (Figura 4). Sua composição é, aproximadamente, 60% de glicose, 20% de ramnose e 20% de ácido glicurônico (JANSSON, LINDBERG & SANDFORD, 1983; YUGUCHI et al., 1993).

É produzida industrialmente a partir de açúcares fermentescíveis, como a sacarose e a glicose, por fermentação aeróbica da bactéria *S. paucimobilis* (O'NEILL, SELVENDRAN & MORRIS, 1983; ZHU, SHENG & TONG, 2013). Foi comercializada com os nomes S-60 e PS-60 (PRAJAPATI et al., 2013) e, hoje, está disponível comercialmente em duas formas: Gelrite™, que é conhecida como GG

acilada, e Kelcogel™, conhecida como GG desacilada, ou de baixa acilação (ZIA et al., 2018).

Figura 4 - Estrutura química da GG produzida por metabolismo bacteriano.



Fonte: Adaptado de ZIA, K. M. et al. (2018).

A GG é um dos produtos de fermentação mais usados industrialmente devido às suas propriedades físico-químicas, estando presente em alimentos, materiais de revestimento, medicamentos e cosméticos (BANERJEE, RAVI & BHATTACHARYA, 2013; PRAJAPATI et al., 2013). Dentre suas principais propriedades, apresenta resistência à ação enzimática e baixos pHs (NAG, HAN & SINGH, 2011), é termicamente estável e maleável (LEE, CHEN & TSAO, 2010), forma géis semi-sólidos e películas de gel (CARMONA-MORAM et al., 2016), sendo atóxica (SONJE & MAHAJAN, 2016; SALUNKE & PATIL, 2016). Na indústria alimentícia é usada como agente emulsionante, estabilizante, aglutinante, gelificante, coagulante, lubrificante e filmogênico (KARTHIKA, VISHALAKSHI & NAIK, 2016; DOLAN et al., 2016). Por ser biocompatível e biodegradável, é utilizada em pesquisas farmacêuticas e biomédicas, no transporte de proteínas, sinalização biológica, material de regeneração óssea guiada, entre outras (NOVAC et al., 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em escala de laboratório tendo como base a química verde e seus princípios. Planejamentos multivariados, juntamente com análise estatística dos dados, foram usados na otimização de etapas do processo, uma vez que um número significativo de variáveis foram avaliadas. Com isto, pretendeu-se a redução do número de experimentos, bem como do volume de reagentes utilizado e de resíduos gerados.

Os reagentes usados foram todos de grau analítico ou P.A.: ácido acético (J.T.Baker, Xalostoc, México); ácido clorídrico (Neon, São Paulo, Brasil); ácido fórmico e xilose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); ácido sulfúrico (Moderna, São Paulo, Brasil); glicose anidra (Synth, São Paulo, Brasil); álcool etílico, carbono ativado, clorofórmio e hidróxido de sódio (Dinâmica, São Paulo, Brasil); metanol (Honeywell, Michigan, USA); caldo nutriente (Kasvi, Paraná, Brasil) e extrato de levedura (Acumedia, Michigan, USA). As soluções injetadas no sistema cromatográfico foram preparadas com água ultrapura (Millipore – Direct-Q 3, Darmstadt, Alemanha).

4.1 MICROALGA *Chlorella* sp.

A matéria-prima MA *Chlorella* sp. foi obtida de uma parceria com o Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS.

A MA *Chlorella* sp. apresentou partículas de 120 mesh (105–125 μm) e composição de 50% de proteína, 21% de carboidrato e 2,3% de clorofila. Anteriormente aos processos, a biomassa foi seca em estufa a 60 °C até peso constante (SOBRINHO et al., 2015) (Figura 5).

Figura 5 - Amostra da MA *Chlorella sp. in natura* usada no processo de hidrólise ácida à pressão.



Fonte: Autor.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA À PRESSÃO

O processo de hidrólise ácida à pressão da MA foi feito em sistema de abertura de amostras Berghof (Berghof, Eningen, Alemanha). O procedimento consistiu em hidrolisar a MA, na proporção de 10% $v v^{-1}$ do sistema, utilizando-se 1,0 g de biomassa e 10,0 mL de catalisador ácido diluído, colocados em vaso de Teflon®TFM, com capacidade de 250 mL (PEDROSO et al., 2017), independente da natureza do ácido utilizado (H_2SO_4 ou HCl). O recipiente, fechado hermeticamente, foi acondicionado em reator de aço inox e posicionado em sistema de aquecimento (Figura 6). Os experimentos foram feitos sob exaustão, em capela.

A pressão (P) exercida no interior do vaso de Teflon®TFM foi calculada através do emprego da equação de Van der Waals para os gases reais (Equação 1),

$$\left[P + a \left(\frac{n}{V} \right)^2 \right] (V - nb) = nRT \quad (1)$$

onde n é o número de mols, V é o volume do recipiente (litros), R é a constante dos gases ($0,0082 \text{ L atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T é a temperatura (na escala Kelvin). As constantes de Van der Waals a ($5,464 \text{ L}^2 \text{ atm mol}^{-2}$) e b ($0,03043 \text{ L mol}^{-1}$) são correções para a equação dos gases reais, neste caso estabelecidos para o vapor d'água. A

constante a está relacionada com as forças de atração intermoleculares, enquanto a constante b está relacionada com o volume molecular.

Figura 6 - Sistema Berghof usado na hidrólise ácida à pressão da MA. Componentes: (a) reator de aço inox; (b) bloco de aquecimento/resfriamento; (c) programador de aquecimento.



Fonte: Autor.

Concluído o processo de hidrólise, o sistema foi resfriado com circulação de água na jaqueta do bloco de aquecimento e, depois, desmontado. O hidrolisado obtido foi passado em filtro qualitativo de celulose (45 μm) e armazenado a 4–8 °C, para posterior análise dos produtos e subprodutos formados.

Planejamentos experimentais multivariados foram usados nesta etapa visando-se atingir maior liberação de monossacarídeos através do estudo dos efeitos de variáveis e suas interações no processo. Os fatores estudados foram: concentração de ácido, H_2SO_4 ou HCl (0,8–4,2 % $v v^{-1}$), tempo (36,6–53,4 min) e temperatura (150–174 °C), sendo que as pressões variaram entre 50 (150 °C) e 58 (174 °C) bar (parâmetros experimentais definidos com base em PEDROSO et al., 2017). Foram executados dois planejamentos multivariados no formato Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com três variáveis independentes, totalizando 17 experimentos em cada planejamento (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores usados no planejamento DCCR para otimização do rendimento da glicose e xilose no processo de hidrólise ácida à pressão da MA.

| | Variáveis | Níveis | | | | |
|----|---|--------|-----|-----|-----|------|
| | | -1,68 | -1 | 0 | 1 | 1,68 |
| MA | Temperatura (°C)* | 150 | 155 | 162 | 169 | 174 |
| | Tempo (min) | 36,6 | 40 | 45 | 50 | 53,4 |
| | Concentração ácida (% v v ⁻¹) | 0,8 | 1,5 | 2,5 | 3,5 | 4,2 |

*Temperatura com variação de ± 2 °C.

Os dados gerados nos planejamentos foram avaliados com o auxílio do *software* Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) com uso da ferramenta Experimental Design (DOE) para a análise de variância, construção dos diagramas de Pareto, superfícies de respostas e demais diagramas e, posteriormente, comparados e discutidos entre si com auxílio de quimiometria.

4.3 TRATAMENTO DO HIDROLISADO

A partir dos resultados dos planejamentos multivariados para produção de hidrolisado, selecionou-se o experimento que apresentou maior liberação de açúcares fermentescíveis, a serem usados no processo fermentativo, e menor quantidade de subprodutos inibidores. Cada batelada do processo hidrolítico rendeu aproximadamente 6,0 mL por vaso de teflon, ou seja, 12,0 mL visto a execução em duplicata. Devido a esta limitação na produção por batelada, fez-se necessária à execução de hidrólises consecutivas na condição otimizada para obtenção de volume suficiente para a condução da fermentação, considerada a exigência de volume e as perdas nas etapas de filtração e destoxificação subsequentes (cerca de 10%).

4.3.1 Otimização da destoxificação do hidrolisado de MA

Com o intuito de eliminar alguns dos subprodutos provenientes da etapa hidrolítica, os quais atuam como inibidores na fermentação, o hidrolisado foi submetido ao processo de destoxificação, sem o qual o meio não é passível de uso como substrato fermentativo (MONTIPÓ et al., 2016; PEDROSO et al., 2017).

Para ensaios fermentativos preliminares, o hidrolisado de H_2SO_4 da MA foi tratado conforme condição otimizada anteriormente pelo grupo, que consistiu em ajuste do pH do hidrolisado para 7,0 usando-se NaOH sólido, adição de 4,0% ($m v^{-1}$) de carbono ativado comercial ao hidrolisado e aquecimento a 80 °C em chapa de aquecimento, com agitação de 400 rpm por 60 min (RAMBO et al., 2013; PEDROSO et al., 2017). Na sequência, o hidrolisado foi passado em filtro qualitativo de celulose (45 μm) e, então, filtrado a vácuo com membrana filtrante de nitrato de celulose (47 mm x 0,45 μm). O pH final do hidrolisado foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1,0 mol L^{-1} (Peagâmetro MS TECNOPON, São Paulo, Brasil) e estocado a 4–8 °C, até a sua utilização.

A otimização desta etapa foi feita usando-se planejamento experimental multivariado, a fim de definir a melhor condição experimental de destoxificação do hidrolisado, tendo como fator de resposta a cinética do consumo de glicose (monossacarídeo preferencialmente consumido pelas cepas bacterianas) e a consequente elevação de fermentabilidade do meio de cultivo durante ensaio fermentativo. Para isto, o agente destoxicante avaliado foi carbono ativado comercial, sabida a eficiência deste na adsorção de inibidores em sua superfície (MONTIPÓ et al., 2016). Os fatores estudados foram: temperatura (40–80 °C), concentração de carbono ativado comercial (2,0–10,0 % $m v^{-1}$) e tempo (30–90 min). Foi executado um planejamento multivariado no formato Doehlert, com três variáveis independentes, totalizando 15 experimentos em cada planejamento (Tabela 4).

Todos os experimentos foram feitos a 400 rpm (IKA, Staufen, Alemanha) (RAMBO et al., 2013; PEDROSO et al., 2017). Na sequência, a solução foi passada em filtro qualitativo de celulose (45 μm) e, então, filtrada a vácuo com membrana filtrante de nitrato de celulose (47 mm x 0,45 μm). O pH final do hidrolisado foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1,0 mol L^{-1} (Peagâmetro MS TECNOPON, São Paulo, Brasil) e estocado a 4–8 °C, até a sua utilização.

Tabela 4 - Valores usados no planejamento Doehlert para otimização da condição de destoxificação do hidrolisado ácido da MA.

| Variáveis | Valores reais (Valores codificados) | | | | | | |
|---|-------------------------------------|------------------|------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Temperatura (°C)* | 40(-1) | 50(-0,5) | 60(0) | 70(0,5) | 80(1) | | |
| Concentração carbono ativado (% m v ⁻¹) | 2,0 (-0,866) | 3,34 (-0,577) | 4,67 (-0,289) | 6,0 (0) | 7,33 (0,289) | 8,66 (0,577) | 10,0 (0,866) |
| Tempo (min) | | 30 (-0,817) | 60(0) | 90 (0,817) | | | |

*Temperatura com variação de ± 5 °C.

Os dados gerados nos planejamentos foram avaliados com o auxílio do *software* Statistica 10.0, com construção dos diagramas de Pareto, superfícies de respostas e demais diagramas e, posteriormente, comparados e discutidos entre si com auxílio de quimiometria.

4.4 MANUTENÇÃO E PREPARO DE INÓCULO DE *S. paucimobilis*

O microrganismo empregado nos ensaios foi *S. paucimobilis* CCT 7809 (bactéria Gram-negativa, estritamente aeróbica) adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil). A cultura liofilizada foi reativada conforme procedimento padrão e inoculada conforme metodologia CLSI M07-A9 (CLSI, 2012). O inóculo foi padronizado por meio de leitura da absorbância em espectrofotômetro Shimadzu – UV-1800 (Quioto, Japão), empregando-se *software* UVProbe, em $\lambda=600$ nm e transmitância de 74,3%, correspondendo à concentração celular de, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Para que se conseguir manter a cepa da *S. paucimobilis*, em laboratório, após padronização, esta foi repicada de meio salino para meio caldo nutriente previamente autoclavado e fez-se estudo do tempo de incubação necessário através de curva de crescimento. O ensaio foi feito em incubadora shaker (Novainstruments, São Paulo, Brasil), a 30 °C e 200 rpm, usando-se um volume de inóculo de 10% do volume total de cultivo (definido anteriormente). O tempo de inoculação foi definido entre 18 e 24 h, tempo em que a concentração do inóculo permanece estável, com leitura de absorbância em espectrofotômetro (620 nm) de, aproximadamente, 1,200.

A manipulação de qualquer sistema contendo a cultura bacteriana foi feita em caixa-de-luvas, adaptada com lâmpada bactericida (luz UV) e fluxo de N₂, como no caso da inoculação dos meios de cultivo e da retirada de alíquotas durante os ensaios fermentativos (MONTIPÓ, 2012).

4.5 FERMENTAÇÃO A PARTIR DA MA

Visando consumo reduzido de reagentes e produção mínima de resíduos, bem como, menor gasto energético, os ensaios fermentativos foram feitos em escala de bancada. Para isto, usou-se incubadora shaker, erlenmeyers de 125,0 mL, 16,0 mL de hidrolisado de H₂SO₄ da MA e 10% do volume total de inóculo de *S. paucimobilis*. Os ensaios preliminares foram feitos em tempo de até 96 h, com retirada de alíquotas de 100,0 µL a cada 12 h, para monitoramento do consumo de açúcares e da liberação de ácido acético no meio de cultivo. Ao fim de cada ensaio fermentativo, antes do processo de extração da GG (seção 4.5.2), os erlenmeyers foram autoclavados a fim de eliminar riscos de contaminação.

4.5.1 Otimização do processo fermentativo

A otimização do processo fermentativo foi feita com o uso de planejamentos multivariados no formato Doehlert, com duas variáveis independentes, totalizando 7 experimentos em cada planejamento. Inicialmente, avaliou-se a melhor condição de destoxificação do hidrolisado (seção 4.3.1). Na sequência, iniciou-se a otimização do processo fermentativo com um planejamento que avaliou temperatura (20–30 °C) e agitação orbital (120–240 rpm) - diretamente ligada à aeração - do meio de cultivo (FIALHO et al., 1999; BAJAJ et al., 2007; COELHO et al., 2019). Após, um segundo planejamento avaliaria a concentração de fonte de N (neste caso, extrato de levedura – uma fonte de nitrogênio comumente usada na produção de GG) (1,0– 4,0 g L⁻¹) e pH (6,5–7,5) (BAJAJ et al., 2007; PRAJAPATI et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Ambos planejamentos tiveram como fator de resposta o consumo de açúcares no meio e a consequente elevação de fermentabilidade do meio de cultivo durante ensaio fermentativo. A Tabela 5 mostra os valores que foram usados nos planejamentos Doehlert para otimização das variáveis temperatura, agitação orbital, fonte de nitrogênio e pH.

Tabela 5 - Valores usados no planejamento Doehlert para otimização do cultivo do hidrolisado de MA com *S. paucimobilis*.

| Variáveis | | Valores reais (Valores codificados) | | | | |
|-----------|--|-------------------------------------|-------------|--------|------------|--------|
| 1ª etapa | Agitação orbital (rpm) | 120(-1) | 150(-0,5) | 180(0) | 210(0,5) | 240(1) |
| | Temperatura (°C) | - | 20(-0,866) | 25(0) | 30(0,866) | - |
| 2ª etapa | Fonte de nitrogênio (g L ⁻¹) | 1,0(-1) | 1,75(-0,5) | 2,5(0) | 3,25(0,5) | 4,0(1) |
| | Ph | - | 6,5(-0,866) | 7,0(0) | 7,5(0,866) | - |

Os dados gerados nos planejamentos foram avaliados com o auxílio do *software* Statistica 10.0, com construção dos diagramas de Pareto, superfícies de respostas e demais diagramas e, posteriormente, comparados e discutidos entre si com auxílio de quimiometria.

Os ensaios fermentativos foram feitos conforme procedimento citado na seção 4.5, com a cepa *S. paucimobilis* em erlenmeyers com 16,0 mL de meio de cultivo, por 60 h (após otimização), com retirada de alíquotas de 100,0 µL a cada 12 h, para monitoramento do consumo de açúcares e liberação de ácido acético no meio de cultivo.

Devido à problemas técnicos com o Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência acoplado a Detector de Índice de Refração (HPLC-RID), usado para a determinação da concentração dos açúcares (glicose e xilose) e subprodutos, consumidos e produzidos, respectivamente, durante os ensaios fermentativos com *S. paucimobilis*, o planejamento de avaliação final da concentração da fonte de N e do pH ótimo, não pôde ser melhorado a tempo de ser incluído na defesa desta dissertação, mais além da condição utilizada até então.

4.5.2 Extração de GG

Após o ensaio fermentativo, o meio hidrolisado foi autoclavado (seção 4.5) e centrifugado a 12.000 g por 15 min, para retirada das células bacterianas. O sobrenadante foi recolhido e fez-se a adição de 2/3 de álcool etílico (resfriado a 4–8 °C). O sistema foi mantido em overnight a -10 °C e, após isto, fez-se uma nova centrifugação a 12.000 g por 15 min, seguida de filtração à vácuo (filtro quantitativo estéril, 0,45 µm), para retirada da GG. A goma foi mantida a -10 °C, por 12 h e,

então, liofilizada até peso constante (BAJAJ et al., 2007; PRAJAPATI et al., 2013). Etapa adicional de lavagem com clorofórmio (razão 10:1) foi feita a fim de elevar a pureza da GG (PEDROSO et al., 2019).

4.5.3 Caracterização da GG

Visando caracterizar a GG produzida no cultivo do hidrolisado de MA com *S. paucimobilis*, foram conduzidas análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e determinações por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).

4.5.3.1 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A análise de FT-IR foi feita para elucidar a presença dos principais grupos funcionais na molécula de GG. O sistema usado foi um espectrômetro FT-IR Bruker, modelo VERTEX 70, equipado com acessório para ATR de cristal de diamante, pertencente à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A região de varredura usada foi de 3500 a 50 cm^{-1} .

4.5.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A análise por GPC serviu para a determinação da massa molar média da GG baseada no comprimento da cadeia polimérica. O sistema cromatográfico usado foi um cromatógrafo de exclusão de tamanho Viscotek, equipado com um módulo de GPCmax VE-2001 (bomba, desgaseificador e auto-sampler) e detector de índice de refração (RID), com o sistema operando em meio aquoso.

4.5.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de H^1 (RMN H^1)

Para complementação da caracterização do bioproduto cultivado por *S. paucimobilis*, análise de RMN H^1 foi feita. Os resultados obtidos, até a defesa do trabalho, foram inconclusivos devido à ausência de sinais no espectro gerado. Uma nova análise, com concentração maior do bioproduto e supressão do sinal de água, será feita.

4.6 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A concentração dos açúcares (glicose e xilose) produzidos no processo hidrolítico ácido da MA, o consumo destes por *S. paucimobilis* durante a etapa fermentativa, bem como os subprodutos fermentativos, foram determinadas por HPLC-RID. As amostras foram diluídas em água ultrapura (1:10 v v⁻¹) e passadas em filtro para seringa com membrana politetrafluoretileno (PTFE 13 mm x 0,22 µm). A Tabela 6 descreve as condições cromatográficas.

Tabela 6 - Condições cromatográficas (HPLC-RID) utilizadas na determinação de produtos e subprodutos da hidrólise ácida e processo fermentativo.

| Condições cromatográficas | |
|----------------------------------|--|
| Coluna | Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm – 9 µm partícula) |
| Temperatura | 50 °C |
| Fase móvel | Água ultrapura contendo 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ |
| Vazão | 0,5 mL min ⁻¹ |
| Modo de Eluição | Isocrático |
| Volume de injeção | 20 µL |
| Tempo de retenção | 10,7 min (Glicose), 11,5 min (Xilose), 16,9 min (Ácido fórmico) e 18,5 min (Ácido acético) |

O sistema cromatográfico usado foi um equipamento Shimadzu (Tokio, Japão) equipado com desgaseificador DGU-20A5, bomba quaternária LC-20AT, controlador do sistema CBM-20A, amostrador automático SIL-20A, forno para coluna CTO-20A, detector de índice de refração RID-10A e *software* LCsolution.

4.7 CÁLCULOS DE RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE

Após a conclusão dos planejamentos hidrolíticos ácidos e determinação das concentrações de glicose e xilose, o rendimento (R) desses sacarídeos foi calculado a partir da massa de açúcares no hidrolisado (mg) pela massa de MA usada (g), relação essa ilustrada na Equação 2.

$$R = \frac{\text{mg açúcar}}{\text{g MA}} \quad (2)$$

Os cálculos de rendimento da GG (R_{GG}) envolveram a razão entre a massa de GG produzida (mg) e a massa de açúcares utilizada (g) na fermentação (considerando-se a fração líquida de hidrolisado), conforme a Equação 3, bem como a relação entre GG produzida (mg) e a massa de MA (g) usada, mostrada na Equação 4.

$$R_{GG} = \frac{\text{mg GG}}{\text{g açúcar}} \quad (3)$$

$$R_{GG} = \frac{\text{mg GG}}{\text{g MA}} \quad (4)$$

4.8 GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS

Resíduos gerados nos processos hidrolíticos das MAs, resíduos derivados da análise cromatográfica, bem como resíduos sólidos, foram segregados e encaminhados ao Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da UFSM, responsável pela destinação final (via empresa autorizada). Já os resíduos biológicos da etapa fermentativa, foram previamente esterilizados em autoclave (121 °C por 15 min) e recolhidos por empresa autorizada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

5.1.1 Método cromatográfico

Fez-se uso de abordagens analíticas e quimiométricas nos procedimentos envolvendo as análises cromatográficas visando as melhores condições de análise. Esta sistemática foi aplicada antes da execução das análises de amostras dos processos hidrolítico e fermentativo. Com o intuito de assegurar a qualidade da informação analítica gerada ao longo deste trabalho, foram avaliados no método analítico a faixa linear da curva de calibração, o coeficiente de determinação (r^2), bem como os limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente), para cada um dos analitos estudados.

O preparo de amostras, conforme mencionado na seção 4.6, trata-se de operações unitárias de filtração e diluição. Este enfoque simples permitiu trabalhar dentro da faixa de linearidade dos métodos analíticos, bem como preservar o sistema cromatográfico e a coluna analítica.

5.1.2 Determinação com HPLC-RID

O método de determinação dos açúcares por HPLC-RID foi desenvolvido com o auxílio de soluções-padrão de glicose e xilose (seção 4.6). As figuras-de-mérito obtidas para os açúcares e subprodutos se encontram na Tabela 7. Os coeficientes de determinação obtidos para as curvas de calibração (faixa linear) evidenciam linearidade satisfatória, possibilitando a quantificação dos analitos pertencentes à complexa matriz hidrolítica.

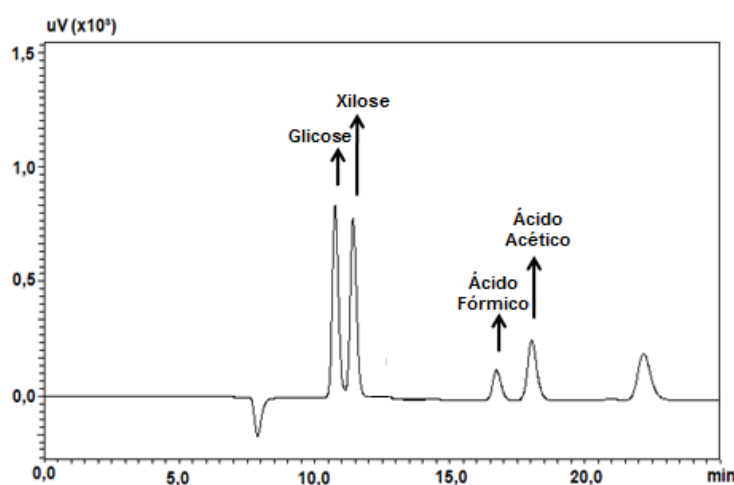
O modelo de regressão linear mostrou-se adequado para as determinações analíticas, uma vez que os coeficientes de determinação foram superiores a 0,99 para todos os analitos. O INMETRO recomenda que o r^2 seja igual ou superior a 0,90 (INMETRO, 2018). Os LQs estão adequados para a quantificação dos analitos e acompanhamento do bioprocessamento. Os limites do método são os mesmos do instrumento para os analitos em estudo, uma vez que não há etapas de preparo e pré-concentração das amostras, apenas diluição em água ultrapura (1:10 v v⁻¹) e filtração com filtro de seringa 0,22 μm .

Tabela 7 - Figuras-de-mérito para a determinação dos analitos e subprodutos por HPLC-RID.

| Analitos | Equação da reta | Faixa linear (mg L ⁻¹) | r ² | LD (mg L ⁻¹) | LQ (mg L ⁻¹) |
|----------------------|------------------------|------------------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| Glicose | $y = 334,31x - 1396,3$ | 10,0 – 1500,0 | 0,999 | 3,3 | 10,0 |
| Xilose | $y = 320,85x - 3191,5$ | 10,0 – 1500,0 | 0,994 | 3,3 | 10,0 |
| Ácido fórmico | $y = 52,18x - 843,11$ | 10,0 – 1500,0 | 0,998 | 3,3 | 10,0 |
| Ácido acético | $y = 150,53x - 815,04$ | 10,0 – 1500,0 | 0,999 | 3,3 | 10,0 |

A Figura 7 mostra um cromatograma HPLC-RID de soluções-padrão dos açúcares glicose e xilose, e dos subprodutos, ácido fórmico e acético.

Figura 7 - Cromatograma obtido da injeção de soluções-padrão dos açúcares glicose e xilose e dos subprodutos ácido fórmico e acético, em HPLC-RID.



Fonte: Autor.

Devido à interferência da matriz, as determinações feitas empregaram curva com adição de padrão para a quantificação de glicose, enquanto que, os demais analitos foram quantificados em curva analítica construída em solução aquosa.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA À PRESSÃO

Foram usadas estratégias de planejamento multivariado que pudessem ser aplicadas ao estudo das variáveis de processo e que envolvessem número reduzido de experimentos, sem deixar de avaliar um amplo espaço amostral. Isso foi feito para os ácidos H_2SO_4 e HCl , que são os mais utilizados em processos hidrolíticos. Não somente a influência das variáveis foi avaliada, mas também o sinergismo entre tais variáveis independentes e suas influências na produção de glicose e xilose, comparando os resultados através de ferramentas estatísticas como a ANOVA (LI et al., 2017).

Os fatores estudados para as hidrólises ácidas diluídas, conforme seção 4.2, foram: concentração de ácido, H_2SO_4 ou HCl (0,8–4,2 % $v v^{-1}$), tempo (36,6–53,4 min) e temperatura (150–174 °C).

5.2.1 Microalga *Chlorella* sp.

Nas Tabelas 8 e 9 encontram-se os valores codificados dos ensaios experimentais feitos com H_2SO_4 e HCl , respectivamente, e os resultados obtidos para cada um, sendo que as concentrações dos açúcares foram determinadas por HPLC-RID.

De acordo com a Tabela 8, para o processo hidrolítico usando H_2SO_4 , as concentrações de glicose variaram de 3,2 a 8,2 $g L^{-1}$, correspondendo a um rendimento de 32,0 a 82,5 $mg glicose g^{-1} MA$; as concentrações de xilose variaram de 1,0 a 4,2 $g L^{-1}$, correspondendo a um rendimento de 10,0 a 42,4 $mg xilose g^{-1} MA$. A arabinose não foi quantificada porque a quantidade de hemicelulose na parede celular da MA é muito baixa, não gerando suficiente concentração deste açúcar para fornecer sinal detectável (passível de identificação e quantificação).

O experimento 10 da Tabela 8, empregando 174°C, 2,5% $v v^{-1}$ de H_2SO_4 e 45 min de reação, obteve o pior resultado dentro do planejamento executado, gerando apenas 4,2 g de açúcares L^{-1} , indicando um rendimento de 42,0 $mg açúcares g^{-1} MA$, o que demonstra que temperaturas mais elevadas, nesse planejamento, são indesejáveis no que se refere à liberação de açúcares fermentescíveis. Ademais, os experimentos 4 (169 °C, 1,5% $v v^{-1}$ de H_2SO_4 e 50 min) e 8 (169 °C, 3,5% $v v^{-1}$ de H_2SO_4 e 50 min) da Tabela 8, demonstraram que temperaturas e tempos maiores,

nesse planejamento, também são indesejáveis para a liberação de açúcares fermentescíveis e, por isso, geraram 6,4 e 6,2 g de açúcares L⁻¹, indicando rendimentos de 62,0 e 64,0 mg açúcares g⁻¹ MA, respectivamente.

Tabela 8 - Resultados do DCCR aplicado à etapa de hidrólise ácida à pressão da MA, usando-se H₂SO₄, com vistas à produção de monossacarídeos.

| Ensaio | Temp. (°C) | Tempo (min) | H ₂ SO ₄ (% v v ⁻¹) | H ₂ SO ₄ | | | | |
|--------|------------|-------------|---|--------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | | | | C _{Glicose} | R _{Glicose} | C _{Xilose} | R _{Xilose} | C _{Total} |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 8,2 | 82,2 | 4,2 | 42,4 | 12,4 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 4,8 | 48,4 | 1,9 | 19,0 | 6,7 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 7,9 | 78,8 | 3,4 | 34,4 | 11,3 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 4,7 | 47,3 | 1,7 | 16,6 | 6,4 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 7,2 | 71,6 | 3,5 | 34,9 | 10,7 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 5,3 | 52,8 | 1,7 | 17,2 | 7,0 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 7,4 | 73,7 | 2,8 | 27,9 | 10,2 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 4,8 | 48,5 | 1,4 | 14,2 | 6,2 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 7,8 | 78,2 | 4,2 | 42,1 | 12,0 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 | 3,2 | 32,0 | 1,0 | 10,0 | 4,2 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 8,2 | 82,5 | 4,1 | 40,8 | 12,3 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 | 6,2 | 61,7 | 2,7 | 26,9 | 8,9 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 6,2 | 62,3 | 2,8 | 28,1 | 9,0 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 | 5,6 | 55,9 | 2,0 | 20,2 | 7,6 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 5,6 | 56,3 | 2,2 | 21,7 | 7,8 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 5,8 | 57,8 | 2,5 | 24,7 | 8,3 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 6,0 | 59,9 | 2,7 | 27,0 | 8,7 |

C = Concentração (g L⁻¹); R = rendimento (mg g⁻¹ CA).

Desvio padrão (glicose) = ± 1,4 (g L⁻¹); Desvio padrão (xilose) = ± 1,0 (g L⁻¹)

A Tabela 9 mostra, para o planejamento com HCl, que as concentrações de glicose variaram de 2,4 a 8,5 g L⁻¹, correspondendo a um rendimento de 23,8 a 84,7 mg glicose g⁻¹ MA; as concentrações de xilose variaram de 0,5 a 4,0 g L⁻¹, correspondendo a um rendimento de 4,9 a 40,5 mg xilose g⁻¹ MA.

Os experimentos 6 (169 °C, 3,5% v v⁻¹ de HCl e 40 min), 8 (169 °C, 3,5% v v⁻¹ de HCl e 50 min) e 14 (162 °C, 4,2% v v⁻¹ de HCl e 45 min) da Tabela 9,

demonstraram que temperaturas e concentrações ácidas mais elevadas, nesse planejamento, geram uma baixa liberação de açúcares fermentescíveis e por isso apresentaram rendimentos de 3,1, 3,1 e 3,9 g de açúcares L⁻¹, indicando rendimentos de 30,8, 31,1 e 39,1 mg açúcares g⁻¹ MA, respectivamente.

Tabela 9 - Resultados do DCCR aplicado à etapa de hidrólise ácida à pressão da MA, usando-se HCl, com vistas à produção de monossacarídeos.

| Ensaio | Temp. (°C) | Tempo (min) | HCl (% v v ⁻¹) | HCl | | | | |
|--------|------------|-------------|----------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | | | | C _{Glicose} | R _{Glicose} | C _{Xilose} | R _{Xilose} | C _{Total} |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 8,5 | 84,7 | 4,0 | 40,5 | 12,5 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 4,8 | 48,3 | 2,1 | 20,9 | 6,9 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 7,4 | 73,8 | 3,6 | 35,6 | 11,0 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 5,6 | 56,4 | 2,2 | 21,9 | 7,8 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 2,4 | 23,8 | 1,2 | 11,8 | 3,6 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 2,5 | 25,2 | 0,6 | 5,6 | 3,1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 3,0 | 30,0 | 1,1 | 10,7 | 4,1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 2,6 | 26,2 | 0,5 | 4,9 | 3,1 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 7,3 | 72,8 | 3,4 | 33,7 | 10,7 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 | 3,2 | 31,7 | 1,1 | 11,1 | 4,3 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 5,3 | 52,9 | 2,1 | 20,7 | 7,4 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 | 3,5 | 35,4 | 1,0 | 10,3 | 4,5 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 8,4 | 83,8 | 3,7 | 37,5 | 12,1 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 | 3,0 | 30,2 | 0,9 | 8,8 | 3,9 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 4,9 | 49,1 | 1,5 | 15,1 | 6,4 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 5,0 | 50,1 | 1,9 | 19,3 | 6,9 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 5,5 | 55,5 | 2,0 | 20,7 | 7,5 |

C = Concentração (g L⁻¹); R = rendimento (mg g⁻¹ CA).

Desvio padrão (glicose) = ± 2,0 (g L⁻¹); desvio padrão (xilose) = ± 1,1 (g L⁻¹)

Em se tratando dos melhores resultados, o experimento 1 (155 °C, 1,5% v v⁻¹ de ambos os ácidos e 40 min) apresentou o melhor desempenho, tanto para as hidrólises com H₂SO₄ (12,4 g L⁻¹) quanto para as hidrólises com HCl (12,5 g L⁻¹),

evidenciando que condições mais brandas favorecem a liberação de açúcares fermentescíveis.

A partir dos resultados obtidos na etapa de hidrólise ácida da MA, fica evidente a equivalência em produtividade de glicose e xilose dos ácidos estudados, sobretudo em alguns experimentos. Um dos piores rendimentos, para ambos os ácidos, foi obtido com o experimento 8 (maior severidade), evidenciando que concentrações de ácido, temperatura e tempo de processo mais rigorosas, desfavorecem a liberação de açúcares fermentescíveis, podendo-se afirmar que ocorre degradação dos monossacarídeos em compostos de cadeias carbônicas menores (FAN et al., 2016).

Os resultados, pela análise de produtividade em cada experimento, mostram a influência das variáveis de processo no rendimento final. A execução de três pontos centrais é necessária para obtenção da informação quanto à reprodutibilidade do processo (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Na sequência, as matrizes contidas nas Tabelas 8 e 9 foram processadas com auxílio do *software* citado e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% ($p < 0,05$). As equações dos modelos que representam os tratamentos com cada ácido estão expostas na Tabela 10, descrevendo as concentrações dos monossacarídeos previstas pelos modelos matemáticos em função das variáveis independentes. Para tanto, cada modelo foi ajustado com vistas à retirada das variáveis e interações não significativas.

Os valores de R^2 ajustados dos modelos na Tabela 10, gerados por ANOVA, mostram que os modelos são eficazes em descrever corretamente as concentrações dos monossacarídeos obtidos no processo hidrolítico de cada ácido, em função das variáveis investigadas, com os parâmetros estatisticamente significativos. Os valores de r^2 , para as hidrólises com H_2SO_4 , garantem que 94% (para glicose e xilose) dos resultados gerados podem ser explicados pelo modelo matemático.

Para o processo hidrolítico com HCl, os valores de r^2 garantem que o modelo matemático explica 89% (para glicose) e 93% (para xilose) dos resultados gerados. Em relação ao valor obtido para o teste F, o valor calculado foi significativo ($p < 0,05$) em todos os casos, satisfazendo os requisitos para a construção das superfícies de resposta.

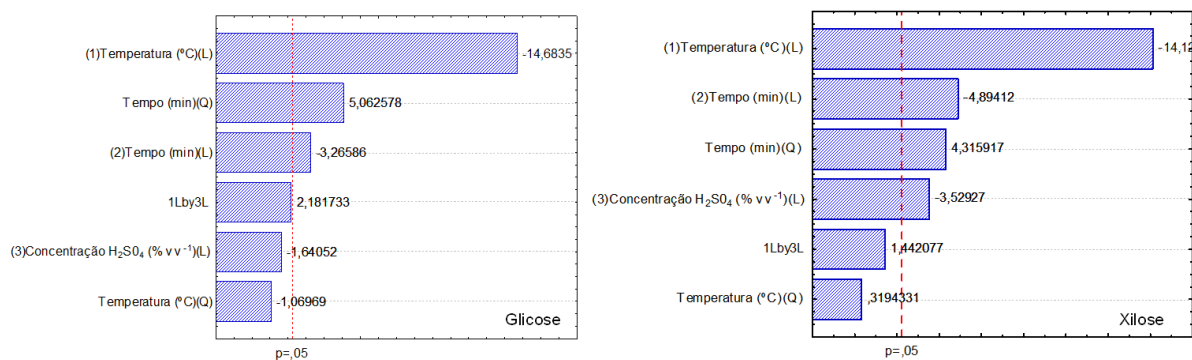
Tabela 10 - Equações polinomiais a valores de ANOVA para os modelos ajustados das hidrólises ácidas à pressão da MA.

| Ácido | Açúcar | p-valor | r ² | r ² Ajustado | Equação do modelo |
|--------------------------------|---------|---------|----------------|----------------------------|--|
| H ₂ SO ₄ | Glicose | < 0,05 | 0,963 | 0,942 | $y = 5,862 - 1,370x_1 - 0,305x_2 + 0,497x_2^2$ |
| H ₂ SO ₄ | Xilose | < 0,05 | 0,962 | 0,940 | $y = 2,378 - 0,926x_1 - 0,321x_2 + 0,297x_2^2 - 0,231x_3$ |
| HCl | Glicose | < 0,05 | 0,931 | 0,890 | $y = 5,182 - 0,920x_1 - 1,820x_3 + 0,641x_1x_3$ |
| HCl | Xilose | < 0,05 | 0,954 | 0,927 | $y = 2,100 - 0,610x_1 - 0,190x_2^2 - 0,982x_3 + 0,267x_1x_3$ |

x₁: Temperatura; x₂: Tempo; x₃: Concentração ácida; Nível de significância de 95%.

Os dados resultantes dos experimentos de hidrólise, avaliados através dos diagramas de Pareto (Figuras 8 e 9), demonstram os valores de significância para cada uma das variáveis independentes dos planejamentos multivariados, segundo matriz de 17 ensaios experimentais, sendo as variáveis estudadas: temperatura (°C), tempo (min) e concentração de ácido (% v v⁻¹).

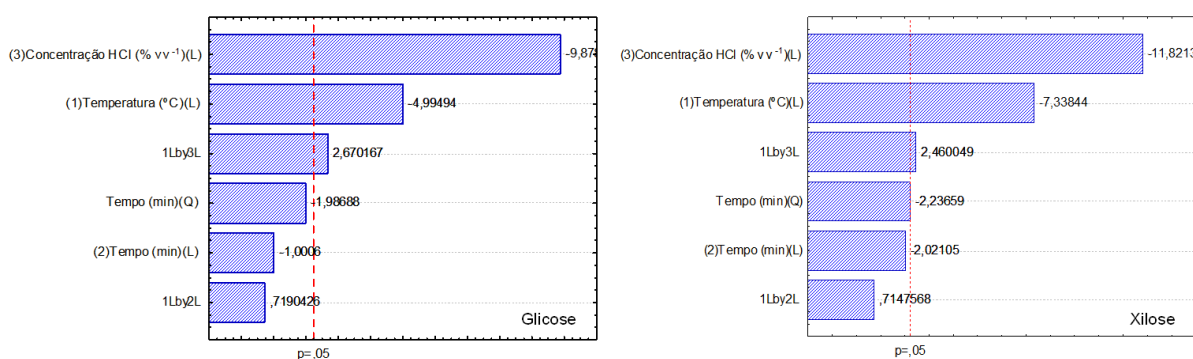
Figura 8 - Diagramas de Pareto obtidos a partir de DCCR empregando-se H₂SO₄, contendo os fatores-resposta para liberação de glicose e xilose, em hidrólises ácidas à pressão da MA.



Fonte: Autor.

Para as hidrólises com H_2SO_4 , tanto a produtividade de glicose quanto a de xilose se mostraram influenciadas pela variável tempo, no modelo linear (negativamente) e no modelo quadrático (positivamente). A temperatura de processo também afetou negativamente a produtividade de ambos os monossacarídeos, no modelo linear, sendo o valor expresso pelo diagrama de Pareto relativamente mais alto, destacando a importância da temperatura no processo. Ainda, para a produção de xilose, a concentração de H_2SO_4 se mostrou relevante, negativamente, no modelo linear (Figura 8). Assim, conforme a Tabela 8 e a Figura 8, temperaturas mais brandas e tempos de processo mais reduzidos são favoráveis à produção de glicose e xilose quando se usa H_2SO_4 .

Figura 9 - Diagramas de Pareto obtidos a partir de DCCR empregando-se HCl, contendo os fatores-resposta para liberação de glicose e xilose, em hidrólises ácidas à pressão da MA.



Fonte: Autor.

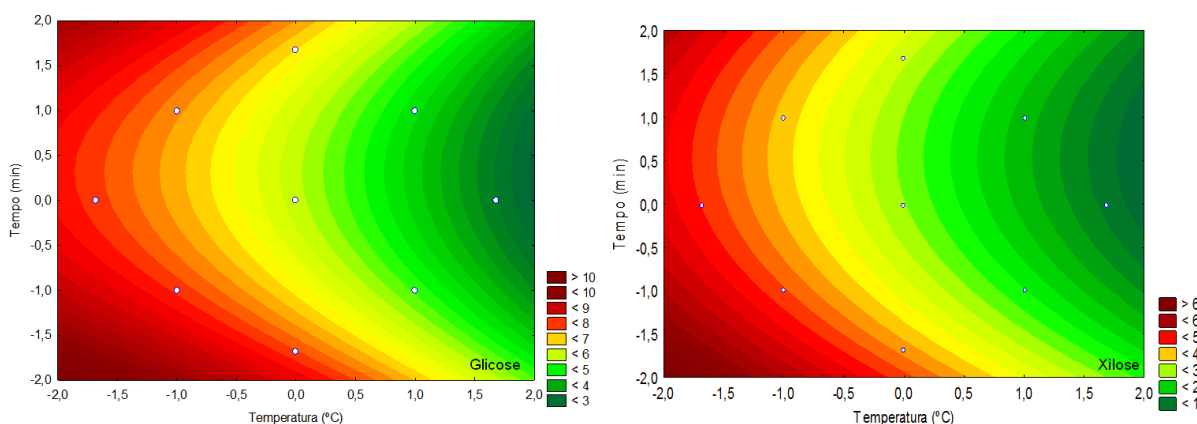
Para as hidrólises com HCl, tanto a produtividade de glicose quanto a de xilose se mostraram influenciadas negativamente pelas variáveis concentração de HCl e temperatura, no modelo linear, com valores mais altos, expressos no diagrama de Pareto, ressaltando a importância destas variáveis no processo. A interação positiva destas mesmas variáveis, no modelo linear, também se mostrou significativa na produção dos monossacarídeos (Figura 9). Ademais, o experimento 1 da Tabela 9, que usou concentrações de ácido e temperaturas mais baixas obteve o melhor rendimento de açúcares no planejamento, confirmando o exposto na Figura 9.

O efeito sinérgico das variáveis independentes dos planejamentos multivariados sobre a produtividade de glicose e xilose pode ser melhor visualizado

através de superfícies de contorno. As Figuras 10 e 11 ilustram os modelos para as hidrólises com H_2SO_4 e HCl , respectivamente.

Para as hidrólises com H_2SO_4 , os rendimentos mais altos foram obtidos com uso de condições brandas de temperatura, tempo e concentração de ácido, como no experimento 1 da Tabela 8, em que obteve-se $12,4 \text{ g de açúcares L}^{-1}$. Todavia, tomando como base a superfície de contorno para glicose (Figura 10), experimentos confirmatórios na condição otimizada liberaram $12,3 \text{ g de açúcares L}^{-1}$, rendimento similar ao do experimento 1, usando-se temperaturas (150°C) (-1,68) e tempos (36,6 min) (-1,68) ainda menores, indicando que a região ótima se encontra em processos ainda mais brandos. Apesar da concentração de ácido não ser uma variável significativa no diagrama de Pareto, para a glicose (monossacarídeo de interesse), foi otimizada em $2,5 \text{ \% v v}^{-1}$ (0).

Figura 10 - Efeito sinérgico das variáveis significativas para a produção de glicose e xilose nas hidrólises de MA com H_2SO_4 , expressas na forma de superfícies de contorno.

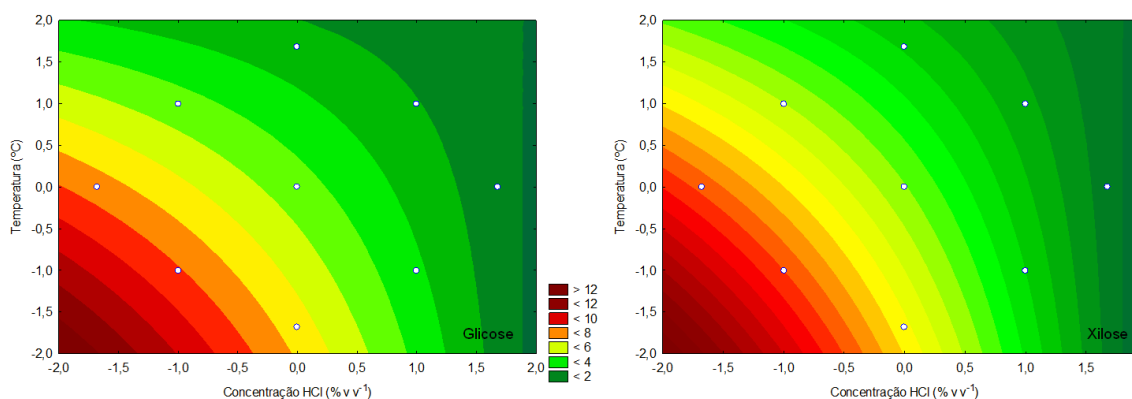


Fonte: Autor.

Da mesma forma, para hidrólises com HCl , condições brandas de temperatura, tempo e concentração de ácido, como no experimento 1 da Tabela 9, apresentaram os melhores resultados, gerando $12,5 \text{ g de açúcares L}^{-1}$. Contudo, a superfície de contorno ilustrada na Figura 11, para a glicose, indica que a condições mais brandas de temperatura e concentração de ácido podem vir a gerar uma maior liberação de açúcares. Experimentos confirmatórios, nestas condições, estavam em

andamento, porém não foi possível finalizar as determinações a tempo da defesa deste trabalho, devido à problemas técnicos com o equipamento de HPLC-RID.

Figura 11 - Efeito sinérgico das variáveis significativas para a produção de glicose e xilose nas hidrólises de MA com HCl, expressas na forma de superfícies de contorno.



Fonte: Autor.

Em posse dos dados e da correspondente avaliação estatística pode-se verificar que condições experimentais mais brandas favorecem a produção de glicose e xilose, tendo a glicose como o monossacarídeo de maior rendimento, tanto para o processo hidrolítico com H_2SO_4 quanto com HCl, obtendo-se rendimentos similares para as hidrólises com ambos os ácidos. Os rendimentos obtidos para cada ácido foram 12,3 g de açúcares L^{-1} (8,4 g glicose L^{-1}) usando H_2SO_4 e 12,5 g de açúcares L^{-1} (8,5 g glicose L^{-1}) usando HCl, atingindo-se produtividades consideráveis. A comprovação da região experimental ideal para a hidrólise com H_2SO_4 , obtida da superfície de contorno, foi feita através de experimentos confirmatórios bem sucedidos.

SALDANHA, L. F. (2017) relata hidrólise ácida à pressão de microalga *Chlorella* sp. residual (MAR), um subproduto da síntese de biodiesel a partir de MA, com rendimentos de 6,5 e 5,7 g açúcares L^{-1} , usando H_2SO_4 e HCl, respectivamente, em que verificou-se que condições mais brandas de processo favorecem a liberação dos açúcares fermentescíveis.

Assim, confirma-se a viabilidade da produção de monossacarídeos fermentescíveis, necessários para a continuação do trabalho proposto, a partir de MA.

5.3 TRATAMENTO DO HIDROLISADO

Durante processos de hidrólise ácida à pressão de uma matriz complexa como a MA, diversas reações secundárias ocorrem e geram subprodutos interferentes (ácidos acético e fórmico), que podem tornar o hidrolisado inviável enquanto meio fermentativo (PEDROSO et al., 2017).

Com o intuito de eliminar alguns dos subprodutos provenientes da etapa hidrolítica, o hidrolisado foi submetido a processo de destoxificação, sem o qual o meio não é passível de uso como substrato fermentativo, devido à toxicidade destes subprodutos para o microrganismo.

5.3.1 Otimização da destoxificação do hidrolisado de MA

Para otimização desta etapa, um planejamento experimental multivariado foi proposto usando-se carbono ativado comercial, como destoxicante para o processo fermentativo. Os fatores estudados foram: temperatura (40–80 °C), concentração de carbono ativado comercial (2,0–10,0% $m v^{-1}$) e tempo (30–90 min). O hidrolisado usado foi o de H₂SO₄, produzido a partir de condição otimizada exposta na seção 5.2.1, com suplementação de 3,0 g de glicose L⁻¹ (como garantia de padronização da concentração inicial de glicose), 7,0 g de extrato de levedura L⁻¹ e pH ajustado em 7,0. O fator de resposta considerado foi a cinética do consumo de glicose (monossacarídeo preferencialmente consumido pelas cepas bacterianas) e a elevação de fermentabilidade do meio de cultivo durante ensaio fermentativo, sendo que as concentrações dos açúcares foram determinadas por HPLC-RID.

A Tabela 11 e a Figura 12 mostram, respectivamente, o acompanhamento cinético do consumo de açúcares da fermentação (consumo g glicose L⁻¹) e os valores codificados dos ensaios experimentais (% consumo glicose) para cada ensaio da etapa de destoxificação, feita com carbono ativado comercial, para o hidrolisado sulfúrico de MA

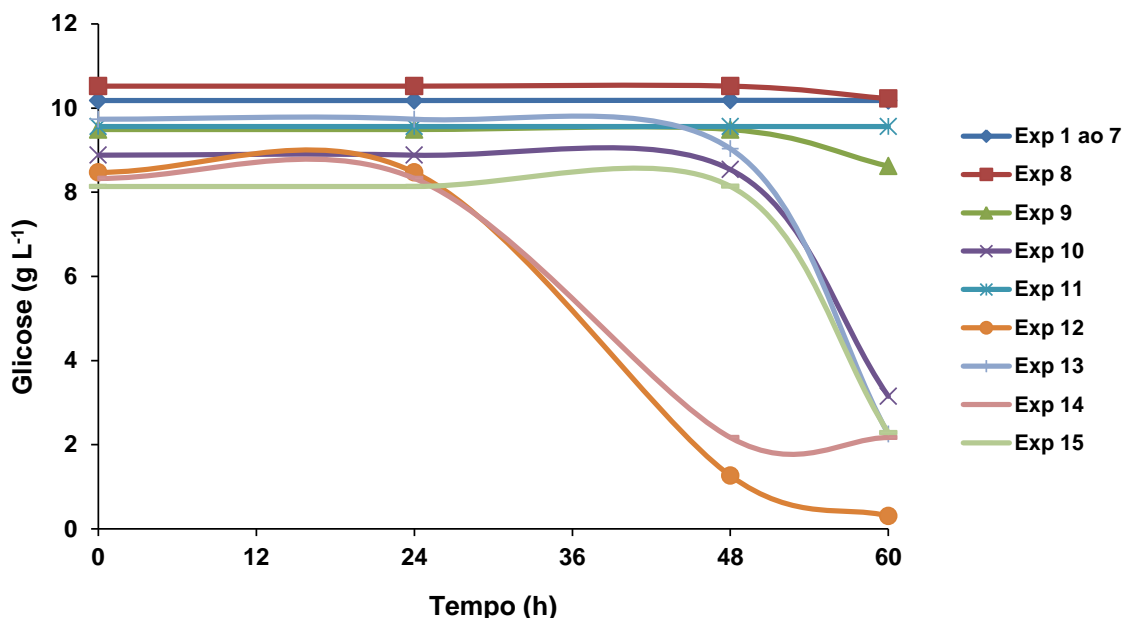
A matriz contida na Tabela 11 foi processada com auxílio do *software* citado e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% ($p < 0,05$), satisfazendo os requisitos para a construção do diagrama de Pareto e das superfícies de resposta. O modelo foi ajustado com vistas à retirada das

variáveis e interações não significativas, resultando em um r^2 ajustado de 0,865, com o modelo explicando 86,5 % dos resultados.

Tabela 11 - Resultados do planejamento Doehlert aplicado à etapa de destoxificação, monitorado pelo consumo de açúcares (g L^{-1}) do hidrolisado sulfúrico de MA, após 60 h de cultivo com *S. paucimobilis*.

| | Ensaio | Temperatura (°C) | Carbono ativado (% $m v^{-1}$) | Tempo (min) | Consumo (g L^{-1}) | Consumo (%) |
|------------------------|--------|---------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|
| Carbono ativado | 1 | 0 | 0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| | 4 | 1 | 0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| | 5 | 0,5 | 0,866 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| | 6 | 0,5 | 0,289 | 0,817 | 0,0 | 0,0 |
| | 7 | -1 | 0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| | 8 | -0,5 | -0,866 | 0 | 0,3 | 2,8 |
| | 9 | -0,5 | -0,289 | -0,817 | 0,9 | 9,2 |
| | 10 | 0,5 | -0,866 | 0 | 5,7 | 64,5 |
| | 11 | 0,5 | -0,289 | -0,817 | 0,0 | 0,0 |
| | 12 | -0,5 | 0,866 | 0 | 8,2 | 96,4 |
| | 13 | 0 | 0,577 | -0,817 | 7,5 | 76,9 |
| | 14 | -0,5 | 0,289 | 0,817 | 6,2 | 74,0 |
| | 15 | 0 | -0,577 | 0,817 | 5,8 | 71,9 |

Figura 12 - Acompanhamento cinético do consumo de açúcares no ensaio fermentativo com *S. paucimobilis* para avaliação da etapa de destoxificação do hidrolisado sulfúrico de MA.

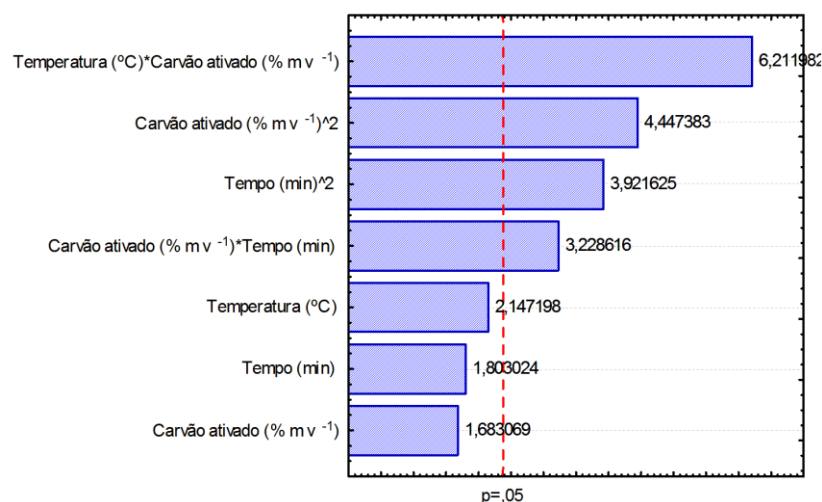


Fonte: Autor.

Segundo matriz de 15 ensaios experimentais, com as variáveis estudadas temperatura ($^{\circ}\text{C}$), concentração de carbono ativado comercial ($\% m v^{-1}$) e tempo (min), a Figura 13 demonstra o diagrama de Pareto com os valores de significância para cada uma das variáveis independentes do planejamento. O efeito sinérgico das variáveis independentes do planejamento sobre a destoxificação do hidrolisado sulfúrico de MA pode ser visualizado através de superfícies de contorno na Figura 14.

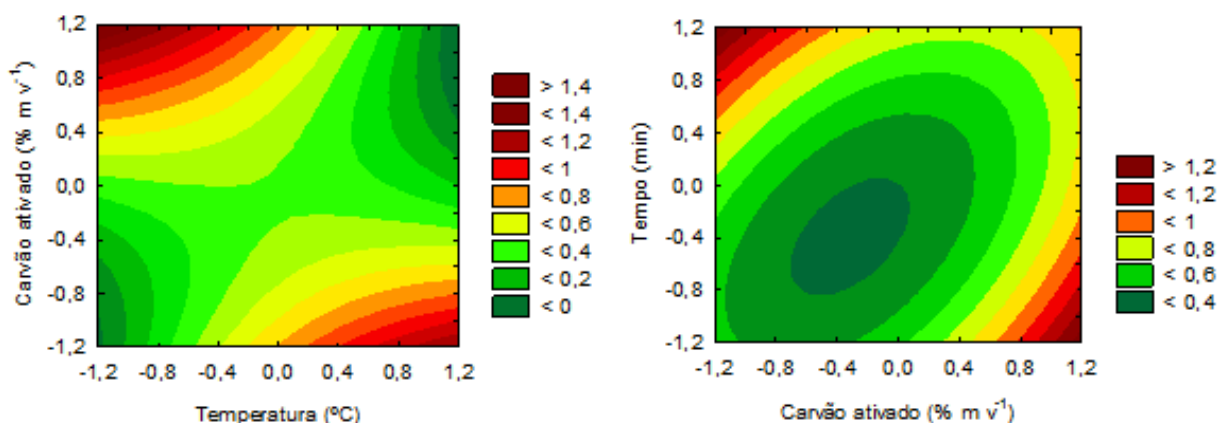
Na Figura 13, pode-se ver que as três variáveis estudadas se mostraram positivamente significativas no processo de destoxificação do hidrolisado de MA, com a interação da temperatura e concentração de carbono ativado sendo a influência de maior relevância. Essa tendência de condição é confirmada com as superfícies de contorno (Figura 14), que indicam que temperaturas, concentração de carbono ativado e tempos mais elevados favorecem a etapa de destoxificação do hidrolisado a ser usado no processo fermentativo.

Figura 13 - Diagrama de Pareto obtido a partir de planejamento Doehlert da destoxificação do hidrolisado sulfúrico de MA com carbono ativado comercial.



Fonte: Autor.

Figura 14 - Efeito sinérgico das variáveis significativas para a destoxificação do hidrolisado sulfúrico de MA, expressas na forma de superfícies de contorno.



Fonte: Autor.

Contudo, a condição que apresentou o melhor consumo de açúcares foi a do experimento 12 da Tabela 11 (50 °C, 10% m v⁻¹ carbono ativado e 60 min) (96,3% de consumo em 60 h), indicando que a destoxificação do hidrolisado em questão pode ser eficiente, mesmo quando feita em temperatura mais baixa e menor tempo de processo. Essa diferença entra a condição ótima indicada pelas superfícies de contorno e a condição do experimento 12 pode ter sido provocada pelo alto número de experimentos do planejamento em que o consumo de açúcares foi 0%. A

comprovação da condição do experimento 12, como ideal para a etapa de destoxificação do hidrolisado sulfúrico de MA, foi feita através de experimentos confirmatórios bem sucedidos.

Assim, fica evidente que a etapa de destoxificação é necessária para tornar o hidrolisado passível de uso como substrato fermentativo para *S. paucimobilis*. O uso de carbono ativado comercial se mostrou abordagem simples e de baixo custo, comparada ao de outros processos descritos na literatura (GRZENIA, SCHELL & WICKRAMASINGHE, 2012), viabilizando a fermentação do hidrolisado de MA.

5.4 FERMENTAÇÃO A PARTIR DA MA

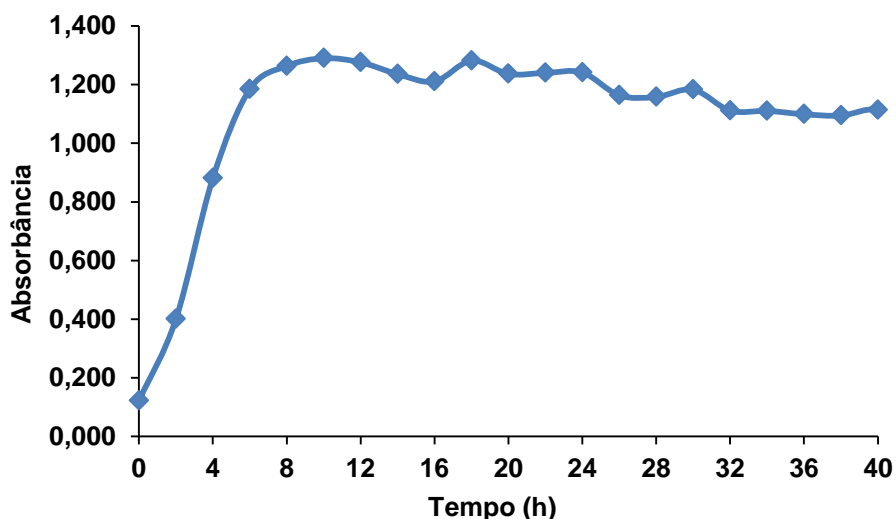
O processo fermentativo é uma etapa complexa e, para que se alcance uma condição ótima de desempenho do microrganismo (consumo de açúcar/produção de bioproduto), variáveis como tempo de inoculação, concentração de inóculo, temperatura, agitação orbital (aeração), pH e composição do meio devem ser avaliadas e otimizadas, particularmente, para cada microrganismo (BAJAJ et al., 2007; KAUR et al., 2014).

5.4.1 Ensaio fermentativos preliminares

Visando o uso do hidrolisado sulfúrico de MA como substrato fermentativo para *S. paucimobilis* para otimização do processo, antes do emprego de planejamentos experimentais multivariados, fez-se uma curva de crescimento bacteriano e ensaios fermentativos preliminares para avaliação da atividade bacteriana baseada na concentração de inóculo.

A curva de crescimento foi feita em caldo nutriente, com adição de 10% v/v de inóculo, em incubadora shaker à 30 °C e 200 rpm (ZHU, SHENG & TONG, 2013), tendo como fator resposta a absorbância do meio verificada em espectrofotômetro (620 nm). A retirada de alíquotas foi feita a cada 2 h, até que a absorbância do meio apresentasse decaimento, como se pode observar na Figura 15. O tempo de inoculação foi definido entre 18 e 24 h, tempo em que a concentração do inóculo permanece estável, com leitura de absorbância de, aproximadamente, 1,200.

Figura 15 - Curva de crescimento da *S. paucimobilis*, em meio caldo nutriente, à 30 °C e 200 rpm, por 40 h.



Fonte: Autor.

Para a avaliação da atividade bacteriana, testou-se a concentração de inóculo a ser usada. Foram feitos dois ensaios fermentativos, usando-se 10 e 20% de inóculo, respectivamente. O hidrolisado usado foi o de H_2SO_4 , produzido a partir de condição otimizada exposta na seção 5.2.1, com suplementação de 3,0 g de glicose L^{-1} , 7,0 g de extrato de levedura L^{-1} e pH ajustado em 7,0. O ensaio fermentativo usando 10% de inóculo consumiu 100% dos açúcares em 72 h de fermentação, sendo, então, esta a concentração definida para a otimização do processo fermentativo.

5.4.2 Otimização do processo fermentativo

Para tanto, foram feitos dois planejamentos multivariados; o primeiro avaliou a temperatura (20–30 °C) e a agitação orbital (120–240 rpm) e, o segundo, pretendia avaliar concentração de fonte de N (extrato de levedura) (1,0–4,0 g L^{-1}) e pH (6,5–7,5). Na etapa de otimização do processo de destoxificação, usou-se também o hidrolisado de H_2SO_4 produzido a partir da condição otimizada (seção 5.2.1). Ambos os planejamentos tiveram como fator de resposta a cinética do consumo de açúcares (principalmente, glicose) e a elevação de fermentabilidade do meio de

cultivo durante ensaio fermentativo, sendo que as concentrações dos açúcares foram determinadas por HPLC-RID.

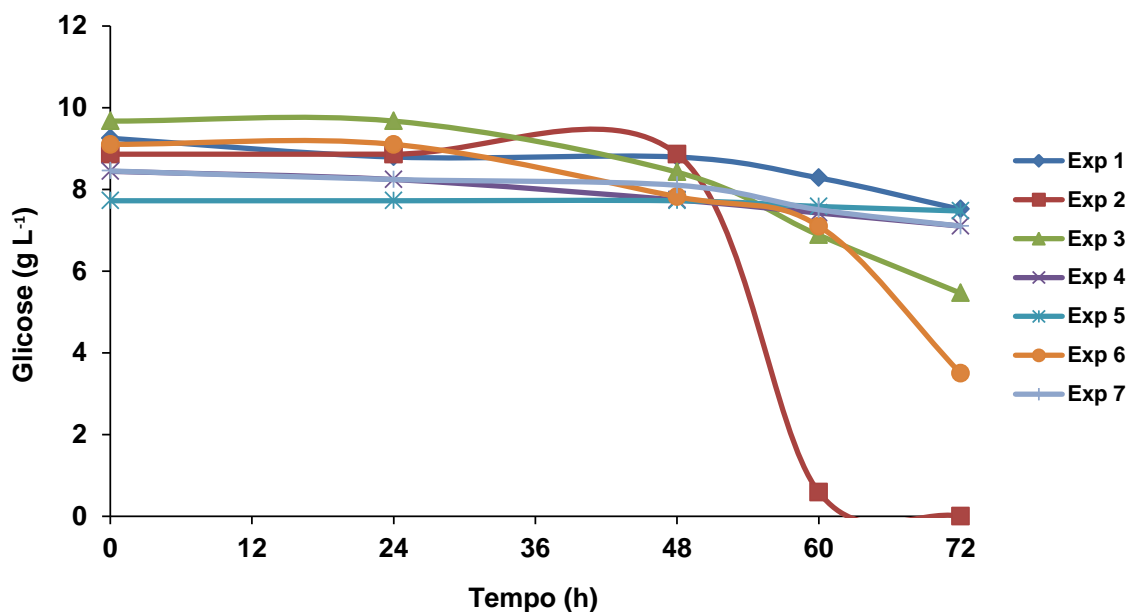
A Tabela 12 e a Figura 16 mostram, respectivamente, o acompanhamento cinético do consumo de açúcares durante a fermentação (consumo glicose, g L⁻¹) e os valores codificados dos ensaios experimentais (% consumo glicose) para cada ensaio da etapa de otimização da agitação orbital e da temperatura do processo fermentativo.

Tabela 12 - Resultados do planejamento Doehlert aplicado ao estudo da temperatura e agitação orbital do processo fermentativo, monitorado pelo consumo de açúcares (g L⁻¹), após 72 h de cultivo com *S. paucimobilis*.

| Ensaio | Agitação orbital (rpm) | Temperatura (°C) | Consumo (g L ⁻¹) | Consumo (%) |
|--------|------------------------|------------------|------------------------------|-------------|
| 1 | 0 | 0 | 1,7 | 18,7 |
| 2 | 1 | 0 | 8,9 | 100,0 |
| 3 | 0,5 | 0,866 | 4,2 | 43,5 |
| 4 | -1 | 0 | 1,3 | 15,9 |
| 5 | -0,5 | -0,866 | 0,2 | 3,2 |
| 6 | 0,5 | -0,866 | 5,6 | 61,7 |
| 7 | -0,5 | 0,866 | 1,3 | 16,0 |

Os experimentos 2 (1) e 6 (0,5) da Tabela 12, que fizeram uso de agitações orbitais maiores, 240 e 210 rpm, respectivamente, apresentaram os melhores resultados (consumo de 100,0 e 61,7% dos açúcares, respectivamente), indicando que esta variável é significativa para o resultado geral do processo.

Figura 16 - Acompanhamento cinético do consumo de açúcares, após 72 h de cultivo com *S. paucimobilis*, para avaliação da influência da temperatura e da agitação orbital.



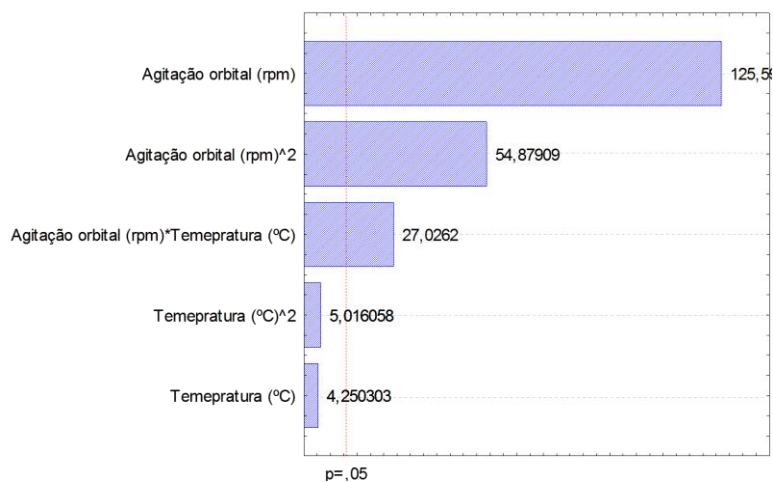
Fonte: Autor.

A matriz contida na Tabela 12 foi processada com auxílio do *software* citado e os dados estatísticos foram gerados com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95% ($p < 0,05$), satisfazendo os requisitos para a construção do diagrama de Pareto e das superfícies de resposta. O modelo resultou em um r^2 ajustado de 0,999, explicando 99,9 % dos resultados.

A Figura 17 mostra o diagrama de Pareto com os valores de significância para cada uma das variáveis independentes, sendo estas a agitação orbital (rpm) e a temperatura ($^{\circ}\text{C}$). O efeito sinérgico das variáveis independentes sobre o processo fermentativo com *S. paucimobilis* pode ser visualizado através de superfícies de contorno na Figura 18.

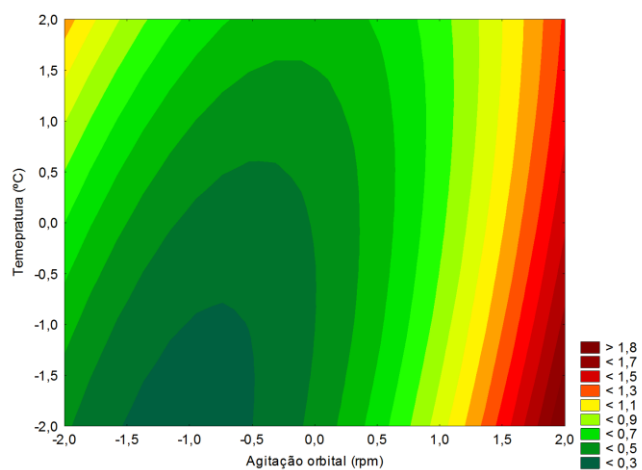
A variável agitação orbital se mostrou a mais significativa no processo, com um valor elevado e positivo no diagrama de Pareto, confirmando o que foi observado nos experimentos 2 e 6 da Tabela 12 (taxas de agitação orbital mais elevadas influem positivamente para o processo). A mesma tendência foi observada na superfície de contorno, indicando que as regiões ótimas são compostas de agitações orbitais maiores.

Figura 17 - Diagrama de Pareto obtido a partir do planejamento Doehlert aplicado ao estudo da temperatura e à agitação orbital do processo fermentativo após 72h de cultivo com *S. paucimobilis*.



Fonte: Autor.

Figura 18 - Efeito sinérgico das variáveis significativas para o estudo da influência da temperatura e da agitação orbital após 72 h de processo fermentativo com *S. paucimobilis*, expressas na forma de superfícies de contorno.



Fonte: Autor.

Apesar de a variável temperatura não ter se mostrado significativa no diagrama de Pareto, foi otimizada em 30 °C; e a comprovação da condição experimental ótima (30 °C e 240 rpm) foi feita através de experimentos confirmatórios bem sucedidos.

Os resultados obtidos são similares àqueles relatados em trabalhos usando cepa de *S. paucimobilis*, como os de ZHU, SHENG & TONG (2013) e ZHANG et al. (2015), ambos usando sacarose como fonte de carbono e meios ricamente suplementados, que relatam o uso de agitações orbitais de 200 rpm e temperaturas de 30 °C como condições ideais para o cultivo com *S. paucimobilis* e produção de GG.

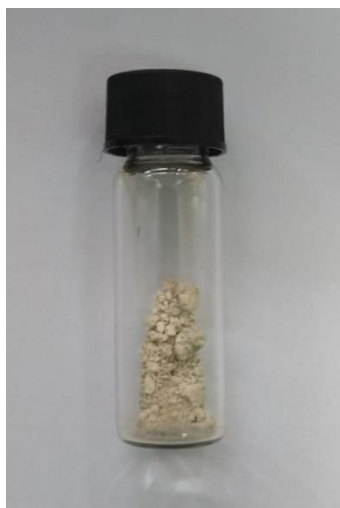
A otimização das variáveis fonte de N e pH estava em decurso, porém, não foi possível finalizar a otimização a tempo da defesa deste trabalho, devido à problemas técnicos com o HPLC-RID.

Assim, baseando-se nas condições otimizadas até o momento, é possível afirmar que o cultivo de *S. paucimobilis* é favorecido em processos feitos à 30 °C, 240 rpm, com pH ajustado para 7,0 e suplementação com 7,0 g de extrato de levedura L⁻¹.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DA GG

A caracterização da GG produzida no cultivo do hidrolisado de MA com *S. paucimobilis* e extraída conforme seção 4.5.2 (Figura 19) foi feita por análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e determinações por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).

Figura 19 – Goma gelana produzida no cultivo do hidrolisado de MA com *S. paucimobilis*.



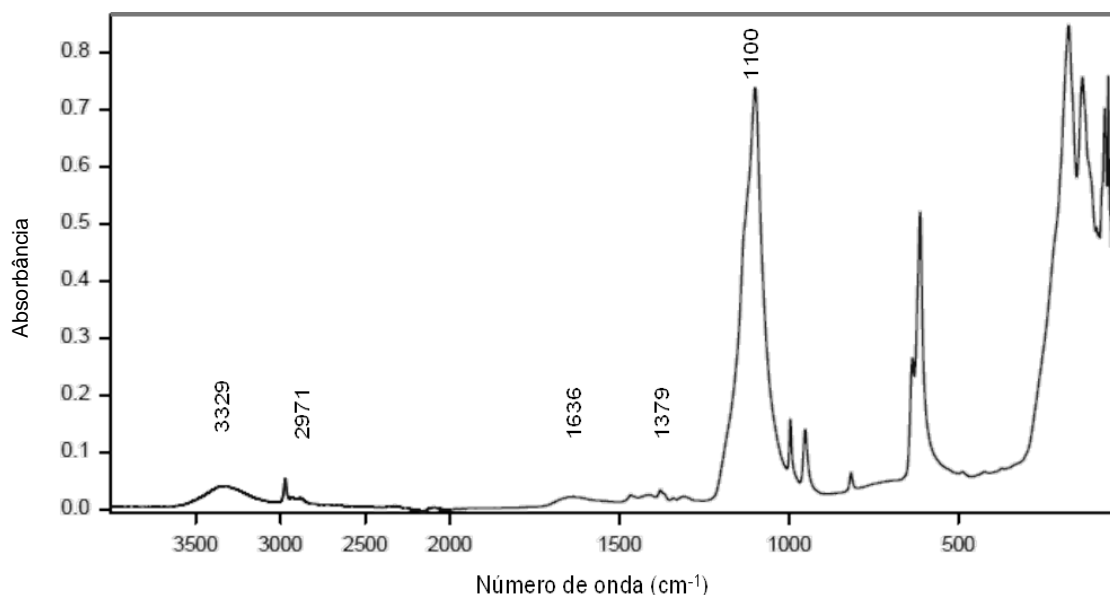
Fonte: Autor.

5.5.1 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Análises de FT-IR foram feitas visando elucidar os principais grupos funcionais presentes na molécula GG produzida no cultivo com *S. paucimobilis* (Figura 20). Algumas bandas características da GG auxiliam nas determinações por FT-IR, como as bandas de estiramento da ligação O–H em $\sim 3329\text{ cm}^{-1}$ (pouco intensa devido ao fato das amostras de GG serem liofilizadas), estiramento C–H de carbonos sp^3 em $\sim 2971\text{ cm}^{-1}$, vibração assimétrica e simétrica de [(C=O)–O] em $\sim 1636\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1379\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, e por fim, estiramento de O–H ligado à carbono primário em $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$.

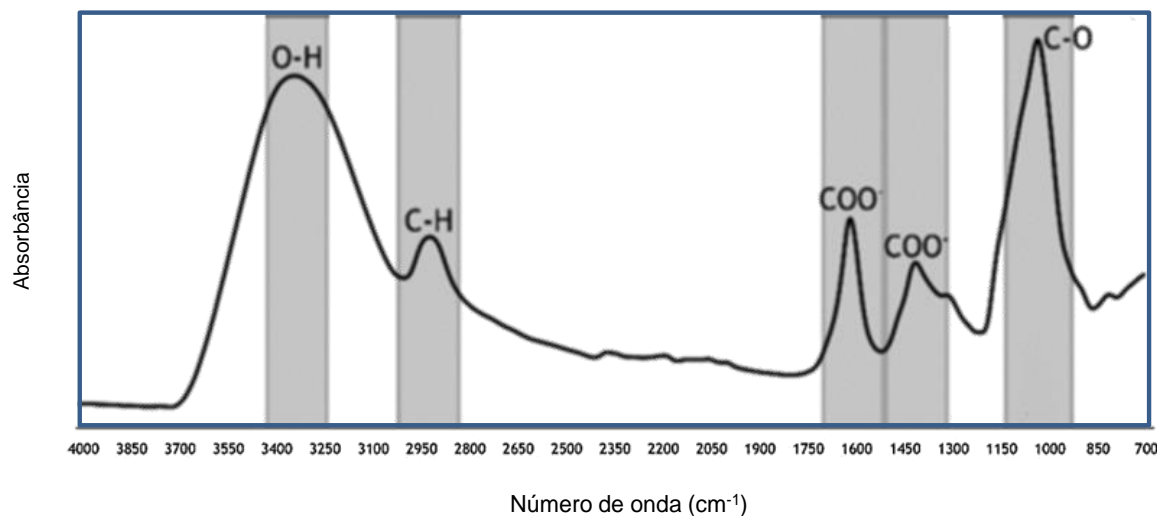
O espectro FT-IR é semelhante ao apresentado por COELHO et al. (2019) (Figura 21) que produziu, extraiu e caracterizou GG gerada de lactose em comparação com padrão comercial. Apesar da grande diferença de escala entre os dois espectros seguintes, pode-se reconhecer os picos atribuíveis à GG no espectro da Figura 20.

Figura 20 - Determinação FT-IR dos grupos funcionais presentes na molécula de GG produzida em cultivo com *S. paucimobilis* no hidrolisado sulfúrico de MA.



Fonte: Autor.

Figura 21 - Espectro de FT-IR de GG comercial.



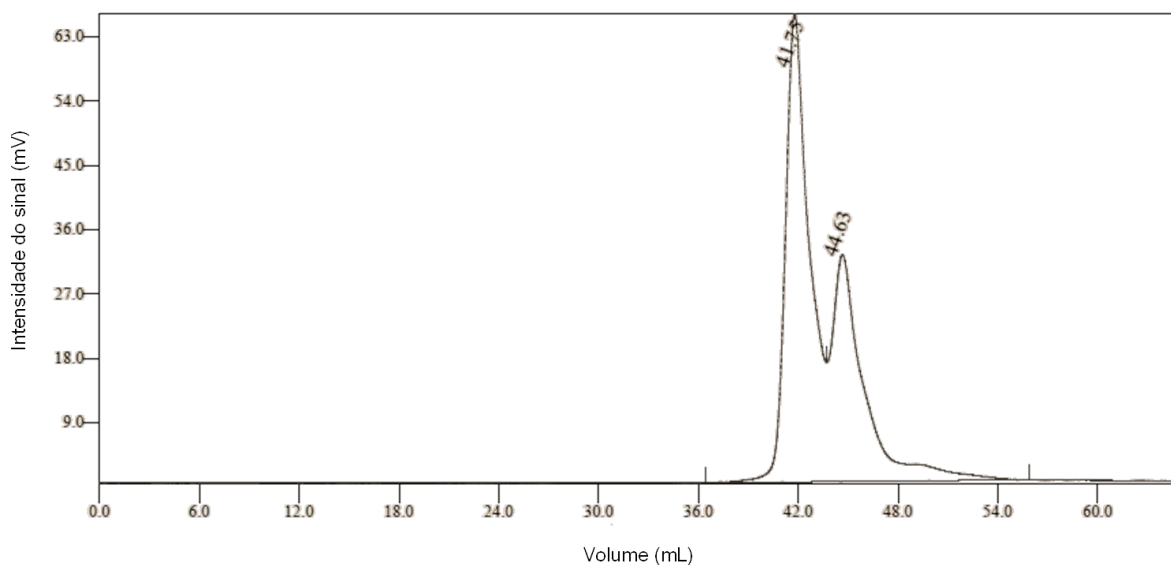
Adaptado de: COELHO, J. et al. (2019).

5.5.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A GPC é uma das técnicas analíticas geralmente empregadas para a determinação da massa molar de polímeros, com base no índice de polidispersão (PDI), definido como a razão entre a massa molar média e as massas molares dos monômeros presentes no sistema. Busca-se saber a massa molar do composto, relacionada com a massa molar média dos monômeros e o número de monômeros conectados, pois esta tem ligação direta com o comprimento da cadeia polimérica (RANE & CHOI, 2005).

A análise de GPC para a GG (91,7% de pureza) (Figura 22) apresentou como resultado volume de retenção (volume necessário de fase móvel para eluir o produto dissolvido na coluna) de 41,75 mL, com uma massa molar média de 1.235 Da. Esse valor é próximo à massa molar de duas moléculas do monômero de GG: um tetrassacarídeo com duas unidades de glicose, uma de ramnose e uma de ácido glicurônico, evidenciando a produção de GG a partir de hidrolisado de MA. O outro sinal referente à volume de retenção pode ser, possivelmente, de um subproduto polimérico presente na amostra.

Figura 22 - Determinação por GPC da massa molar média da GG (91,7% de pureza) produzida por *S. paucimobilis*.



Fonte: Autor.

5.6 AVALIAÇÃO ECONÔMICA PRELIMINAR DO PROCESSO

Visando assegurar-se da viabilidade econômica do processo de produção de GG a partir de MA, um balanço econômico aproximado foi feito, levando-se em consideração os custos necessários com reagentes comerciais bem como rendimentos brutos do processo e valor agregado do bioproduto, estimados.

Assim, considerando-se rendimento máximo de GG de 53,3 g L⁻¹ (com pureza de 91,7%) e tomando-se como base de cálculo 1000 kg de MA (valor comercial aproximado, Purifarma, São Paulo, Brasil), emprego de H₂SO₄ no processo hidrolítico, carbono ativado comercial na etapa de destoxificação, adição de extrato de levedura ao meio fermentativo, inóculo preparado em meio caldo nutriente e extração da GG com álcool etílico, pode ser visto na Tabela 13.

Tabela 13 - Avaliação econômica preliminar da produção de GG, em escala de laboratório, a partir do hidrolisado de MA (cálculos baseados no uso de reagentes grau analítico P.A.).

| Reagente/ Produto | Concentração | Quantidade processada (kg ou L) | Valor (R\$/kg) | Custo (R\$) | Valor agregado (R\$) |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------|----------------|----------------------------|
| MA | - | 1000 | 40,0 | 40.000,0 | - |
| H ₂ SO ₄ | 2,5% (v v ⁻¹) | 255,1 | 52,3 | 13.341,7 | - |
| HCl | 1,5% (v v ⁻¹) | 405,4 | 28,4 | 11.513,36 | - |
| Carbano ativado comercial | 10% (m v ⁻¹) | 600 | 76,0 | 45.600,0 | - |
| Açúcares* | Variável | - | Sem custo | Sem custo | - |
| Caldo nutriente | 13,0 g L ⁻¹ | 7,8 | 580,0 | 4.524,0 | - |
| Extrato de levedura | 7,0 g L ⁻¹ | 42 | 574,0 | 24.108,0 | - |
| Álcool etílico | Razão 3:1 | 18.000 | 21,1 | 379.800,0 | - |
| GG (91,7%) | 53,3 g L ⁻¹ | 319,8 | 3.083,0 | | 985.943,4 |

*Açúcares são liberados no hidrolisado de MA, portanto não constam como custo da proposta.

Saldo total: Valor agregado – Custos (MA + Hid. Ácida + Destoxificação + Meios de cultura + Extração)

$$\text{Saldo total: } 985.943,4 - (40.000,0 + 13.341,7 + 45.600,0 + 4.524,0 + 24.108,0 + 379.800,0) = \\ \text{R\$ } 478.569,7$$

Saldo final (por tonelada de MA) (R\$) 478.569,7

Ao considerar-se que o valor comercial da GG é R\$ 3.083,00/kg, o valor líquido aproximado, resultante por tonelada de MA processada, é de R\$ 478.569,70, o que demonstra grosseiramente a viabilidade econômica do processo de bioconversão de MA em GG, mesmo desconsiderando outros custos operacionais.

6 CONCLUSÕES

A biotecnologia engloba uma série de possibilidades no que se refere ao processamento de biomassas ricas em carbono e na produção de bioprodutos e insumos químicos por meio de processos mais limpos e inovadores, aparecendo como alternativa ao perfil industrial mais corrente. Neste sentido, o aproveitamento da biomassa algal, em todas as suas frações, mostra-se interessante na geração de produtos com valor agregado, biocombustíveis, entre outros, promovendo o desenvolvimento de novos processos e, conseqüentemente, o avanço científico e industrial.

A hidrólise ácida da biomassa MA, fazendo-se uso dos ácidos H_2SO_4 e HCl , confirmou novamente a viabilidade de produção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa algal. Os melhores resultados foram 12,3 g de açúcares L^{-1} , usando H_2SO_4 (150 °C, 2,5% $v v^{-1}$ e 36,6 min) e 12,5 g de açúcares L^{-1} , usando HCl (155 °C, 1,5% $v v^{-1}$ e 40 min), atingindo produtividade considerável de açúcares. Pode-se observar que condições mais brandas de hidrólise favoreceram a liberação dos açúcares, principalmente glicose.

A presença de compostos inibidores no hidrolisado de MA exigiu uma etapa de destoxificação para que fosse possível o uso deste como substrato fermentativo. Visando-se a redução da concentração dos inibidores no hidrolisado, carbono ativado comercial foi usado como agente destoxicante, conseguindo-se elevar a fermentabilidade do hidrolisado em processo conduzido à 50 °C, com 10,0% $m v^{-1}$ de carbono ativado, por 60 min.

No processo fermentativo com *S. paucimobilis*, a otimização das variáveis concentração de inóculo (10%), temperatura (30 °C) e agitação orbital (240 rpm), que interferem diretamente na produção de GG, permitiram rendimento de 53,3 g GG L^{-1} de hidrolisado, com pureza de 91,7%, em 60 h de ensaio fermentativo. O produto foi caracterizado por FT-IR e GPC, certificando-se a produção de GG. Um balanço econômico preliminar foi proposto, demonstrando a viabilidade do processo desenvolvido no presente trabalho.

A metodologia analítica usada durante esta dissertação foi previamente validade e considerada adequada à finalidade, conseguindo-se determinar facilmente os produtos e subprodutos dos processos hidrolítico e fermentativo.

Finalmente, baseando-se nos resultados deste trabalho, pode-se garantir a viabilidade do aproveitamento da biomassa de MA na conversão em GG, produto com alto valor agregado, a partir de rota produtiva inédita, comprovada em escala de laboratório.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar a fonte de N (peptona, extrato de levedura e ureia) e a concentração desta no ensaio fermentativo, visando a elevação da produtividade de GG;
- Propor a produção da GG como bioproduto de alto valor agregado por meio de parceria com a iniciativa privada.
- Obter registro de invenção/patente em parceria com a Agittec/UFSM.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Vol. 7, 163-173, 2014.

AQUACULTURE BRASIL. **Sistemas de cultivo de microalgas – Parte I**. Disponível em: <<http://www.aquaculturebrasil.com/2017/12/06/sistemas-de-cultivo-de-microalgas-parte-i/>>. Acesso em fevereiro de 2020.

BAJAJ, I. B. et al. Gellan Gum: Fermentative Production, Downstream Processing and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, Vol. 45, 341-354, 2007.

BAJAJ, I. B. & SAUDAGAR, P. S. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol. 102, 150-156, 2006.

BANERJEE, S., RAVI, R. & BHATTACHARYA, S. Textural characterisation of gellan and agar based fabricated gels with carrot juice. **LWT - Food Science and Technology**, Vol. 53, 255-261, 2013.

BORGES, F. C. **Proposta de um modelo conceitual de biorrefinaria com estrutura descentralizada**. 2010, 121p. Dissertação (Mestrado em Engenharia, Área de concentração: Projeto de Processos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

BRASIL, B. S. A. F., SILVA, F. C. P. & SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, Vol. 39, 90-98, 2017.

CANTRELL, K. B. et al. Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. **Bioresource Technology**, Vol. 99, 7941–7953, 2008.

CARMONA-MORAN, C. A. et al. Development of gellan gum containing formulations for transdermal drug delivery: Component evaluation and controlled drug release using temperature responsive nanogels. **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 509, 465-476, 2016.

CHIU, S-Y. et al. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, Vol. 184, 179-189, 2015.

CHOI, S. et al. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. **Metabolic Engineering**, Vol. 28, 223–239, 2015.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

COELHO, J. et al. Biosynthesis and isolation of gellan polysaccharide to formulate

- microspheres for protein capture. **Carbohydrate Polymer**, Vol. 220, 236-246, 2019.
- CORTEZ, D. V. et al. Evaluation of cellulosic and hemicellulosic hydrolysate fermentability from sugarcane bagasse hybrids with different compositions. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Vol. 4, 351-356, 2014.
- de JONG, E. & JUNGMEIER, G. Chapter 1 - Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**, 3–33, 2015.
- DEMIRBAS, A. Competitive liquid biofuels from biomass. **Applied Energy**, Vol. 88, 17-28, 2011.
- D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgallipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, Vol. 35, 1533-1538, 2011.
- DOLAN, L. C. et al. Two new nontoxic, non-pathogenic strains of *Sphingomonas elodea* for gellan gum production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Vol. 78, 37-44, 2016.
- FAN, S. et al. A review of lignocellulose change during hydrothermal pretreatment for bioenergy production. **Current Organic Chemistry**, Vol. 20, 1-11, 2016.
- FIALHO, A. M. et al. Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. **Applied and environmental microbiology**, Vol. 65, 2485-2491, 1999.
- FOLEY, P. M., BEACH, E. S. & ZIMMERMAN, J. B. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. **Green Chemistry**, Vol. 13, 1399-1405, 2011.
- GÁMEZ, S. et al. Study of the sugarcane bagasse hydrolysis by using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, Vol. 74, 78-88, 2006.
- GHANAVATI, H., NAHVI, I. & KARIMI, K. Organic fraction of municipal solid waste as a suitable feedstock for the production of lipid by oleaginous yeast *Cryptococcus aerius*. **Waste Management**, Vol. 38, 141-148, 2015.
- GIFUNI, I. et al. Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery. **Trends in Biotechnology**, Vol. 37, 242-252, 2019.
- GONZÁLEZ, L. E. et al. Biodiesel Production Based in Microalgae: A Biorefinery Approach. **Natural Science**, Vol. 7, 358-369, 2015.
- GRZENIA, D. L., SCHELL, D. J. & WICKRAMASINGHE, S. R. Membrane extraction for detoxification of biomass hydrolysates. **Bioresource Technology**, Vol. 111, 248-254, 2012.

HARUN, R. & DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, Vol. 46, 304-309, 2011.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.** 2009, 132p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2009.

HEREDIA-OLEA, E., PÉREZ-CARRILHO, E. & SERNA-SALDÍVAR, S. O. Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology. **Bioresource Technology**, Vol. 119, 216–223, 2012.

HU, Q. et al. Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 49, 655-662, 1998.

HUANG, X. et al. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource Technology**, Vol. 102, 9705-9709, 2011.

HUNTLEY, M. E. & REDALJE, D. G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, Vol. 12, 573-608, 2007.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Calibração e Validação**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/>>. Acesso em abril de 2019.

JANSSON, P-E., LINDBERG, B. & SANDFORD, P. A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, Vol. 124, 135-139, 1983.

JIN, H. et al. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace. **Biochemical Engineering Journal**, Vol. 16, 357-360, 2003.

KANELEO, T. & KANG, K. S. Agar like polysaccharide produced by a pseudomonas species: Taxonomical studies. **Abstracts of the 79th annual meeting of American Society for Microbiology**, Vol. 25, 1–37, 1979.

KANG, K. S. & COLEGROVE, G. T. Deacetylated polysaccharide S-60. **US Patent 9**, 385, 123, 1982.

KANG, K. S. & VEEDER, G. T. Polysaccharide S-60 and bacterial fermentation process for its preparation. **US Patent 43**, 377, 636, 1982.

KARTHIKA, J. S., VISHALAKSHI, B. & NAIK, J. Gellan gum-graft-polyaniline—An electrical conducting biopolymer. **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 82, 61-67, 2016.

KAUR, V. et al. Welan gum: Microbial production, characterization and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 65, 454-461, 2014.

KIM, M. K. & LEE, I. Y. Higher intercellular levels of uridine monophosphate under nitrogen limited conditions enhance the metabolic flux of curdlan synthesis in *Agrobacterium* species. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 62, 317-323, 1999.

KRIENITZ, L., HUSS, V. A. R. & BOCK, C. *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. **Trends in Plant Science**, Vol. 20, 67-69, 2015.

LEE, M-W., CHEN, H-J. & TSAO, S-W. Preparation, characterization and biological properties of Gellan gum films with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linker. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 82, 920-926, 2010.

LI, B. et al. Multivariate data analysis applied in alkali-based pretreatment of corn stover. **Resources, Conservation and Recycling**, Vol. 122, 301-318, 2017.

LOOW, Y. et al. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. **Cellulose**, Vol. 23, 1491-1520, 2016.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas**: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 588 p.

MARGULIS, L. & SCHWARTZ, K. V. **Cinco reinos**: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra. 3 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. 524 p.

MARTIN, L. O. & SA-CORREIA, I. Temperature profile of gellan gum synthesis and activities of biosynthetic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 20, 385-395, 1993.

MILES, M. J., MORRIS, V. J. & O'NEILL, M. A. Gellan gum: Gums and stabilizers used in food industry. **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 2, 485-497, 1984.

MONCADA, J., ARISTIZÁBAL, V. & CARDONA, C. A. Design strategies for sustainable biorefineries. **Biochemical Engineering Journal**, Vol. 116, 122-134, 2016.

MONTIPÓ, S. **Produção de ácido láctico a partir da casca do arroz**. 2012, 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

MONTIPÓ, S. et al. Building Block Lactic Acid from Rice Husks and Agave Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, Vol. 7, 1495-1507, 2016.

MORRIS, E. R., NISHINARI, K. & RINAUDO, M. Gelation of gellan – A review. **Food Hydrocolloids**, Vol. 28, 373-411, 2012.

NAG, A., HAN, K-S. & SINGH, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, Vol. 21, 247-253, 2011.

NGUYEN, M. T. et al. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Vol. 19, 161-166, 2009.

NOVAC, O. et al. Antibacterial quaternized gellan gum based particles for controlled release of ciprofloxacin with potential dermal applications. **Materials Science and Engineering: C**, Vol. 35, 291-299, 2014.

OKUDA, K. Structure and phylogeny of cell coverings. **Journal of Plant Research**, Vol. 115, 283-288, 2002.

O'NEILL, M. A., SELVENDRAN, R. R. & MORRIS, V. J. Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, Vol. 124, 123-133, 1983.

ÖZDENKÇİ, K. et al. A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. **Energy Conversion and Management**, Vol. 149, 974-987, 2017.

PALMQVIST, E. A. & HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, Vol. 74, 17-24, 2000.

PANAGIOTOPOULOS, I. A. et al. Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Journal of Cleaner Production**, Vol. 32, 45-51, 2012.

PARADA, M. P., OSSEWEIJER, P. & DUQUE, J. A. P. Sustainable biorefineries, an analysis of practices for incorporating sustainability in biorefinery design. **Industrial Crops and Products**, Vol. 106, 105-123, 2017.

PARAJULI, R. et al. Environmental life cycle assessment of producing willow, alfalfa and straw from spring barley as feedstocks for bioenergy or biorefinery systems. **Science of The Total Environment**, Vol. 586, 226–240, 2017.

PARK, J-H. et al. Optimization of batch dilute-acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, Vol. 38, 6130-6136, 2013.

PRAJAPATI, V. D. et al. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 93, 670-678, 2013.

PEDROSO, G. B. et al. Building block itaconic acid from left-over biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Vol. 7, 23-35, 2017.

PEDROSO, G. B. et al. An innovative approach for the biotechnological production of succinoglycan from rice husks. **Industrial Crops & Products**, Vol. 137, 615-627, 2019.

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, Vol. 88, 3307-3312, 2011.

PRAJAPATI, V. D. et al. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 93, 670-678, 2013.

RAMBO, M. K. D. et al. Xylitol from rice husks by acid hydrolysis and *Candida* yeast fermentation. **Química Nova**, Vol. 36, 634-639, 2013.

RANE, S. S. & CHOI, P. Polydispersity index: How accurately does it measure the breadth of the molecular weight distribution? **Chemistry of Materials**, Vol. 17, 926-926, 2005.

RASOUL-AMINI, S. et al. *Chlorella* sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. **Applied Energy**, Vol. 88, 3354-3356, 2011.

RIDLEY, C. **Can we save the algae biofuel industry?** The Conversation 2016. Disponível em: <<http://theconversation.com/>>. Acesso em março de 2019.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, Vol. 34, 1242-1254, 2011.

RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e AMOR, 2009, 358 p.

ROUX, J-M., LAMOTTE, H. & ACHARD, J-L. An Overview of Microalgae Lipid Extraction in a Biorefinery Framework. **Energy Procedia**, Vol. 112, 680-688, 2017.

RUIZ, E. et al. Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. **Bioresource Technology**, Vol. 140, 292-298, 2013.

SALDANHA, L. F. **Estudo e otimização de tratamentos hidrolíticos para o aproveitamento de biomassas**. 2017, 91p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

SALUNKE, S. R. & PATIL, S. B. Ion activated *in situ* gel of gellan gum containing salbutamol sulphate for nasal administration. **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 87, 41-47, 2016.

SERNA-LOAIZA, S., CARMONA-GARCIA, E. & CARDONA, C. A. Potential raw materials for biorefineries to ensure food security: The Cocoyam case. **Industrial Crops & Products**, Vol. 126, 92-102, 2018.

SOARES, B. M. et al. Investigation of major and trace element distribution in the extraction–transesterification process of fatty acid methyl esters from microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, Vol. 110, 730-734, 2012.

SOBRINHO, R. C. M. A. et al. FAME Production and Fatty Acid Profiles from Moist *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* Biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Vol. 92, 423-430, 2015.

SONJE, A. G. & MAHAJAN, H. S. Nasal inserts containing ondansetron hydrochloride based on Chitosan–gellan gum polyelectrolyte complex: *In vitro–in vivo* studies. **Materials Science and Engineering: C**, Vol. 64, 329-335, 2016.

TAHERZADEH, M. J. & KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 9, 1621-1651, 2008.

TAKEUCHI, M. et al. Phylogenetic evidence for *Sphingomonas* and *Rhizomonas* as non-photosynthetic members of α -4 subclass of proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Vol. 44, 308-314, 1994.

VASCONCELOS, S. M. et al. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, Vol. 135, 46-52, 2013.

VONSHAK, A. ***Spirulinaplantensis (Arthrospira)***: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

XU, H., MIAO, X. & WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, Vol. 126, 499-507, 2006.

YABUUCHI, E. I. & YANO, H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis*. **Microbial Immunology**, Vol. 34, 99-119, 1990.

YUGUCHI, Y. et al. Structural characteristics of gellan aqueous solutions. **Food Hydrocoll**, Vol. 7, 373-385, 1993.

ZHANG, G. Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. **Biomass Bioenergy**, Vol. 35, 734-740, 2011.

ZHANG, J. et al. Optimization of culture medium compositions for gellan gum production by a halobacterium *Sphingomonas paucimobilis*. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 115, 694-700, 2015.

ZIA, K. M. et al. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 109, 1068-1087, 2018.

ZHU, G., SHENG, L. & TONG, Q. A new strategy to enhance gellan production by two-stage culture in *Sphingomonas paucimobilis*. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 98, 829-834, 2013.

ZHU, L.-D. et al. Cultivation of *Chlorella* sp. with livestock waste compost for lipid production. **Bioresource Technology**, Vol. 223, 296-300, 2017.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Vol. 41, 1376- 1384, 2015.