

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis**

**Marina Lemos Sartori**

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus* sp. UTILIZANDO  
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO PROVENIENTE DO BAGAÇO DA CANA-DE-  
AÇÚCAR COMO FONTE DE CARBONO VISANDO A OBTENÇÃO DE  
BIOCOMBUSTÍVEIS DE TERCEIRA GERAÇÃO**

**Diamantina**

**2019**

**Marina Lemos Sartori**

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus* sp. UTILIZANDO  
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO PROVENIENTE DO BAGAÇO DA CANA-DE-  
AÇÚCAR COMO FONTE DE CARBONO VISANDO A OBTENÇÃO DE  
BIOCOMBUSTÍVEIS DE TERCEIRA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Lílian de Araújo Pantoja

Coorientador: Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup>. Alexandre Soares dos Santos

**Diamantina**

**2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S251p

Sartori, Marina Lemos

Produção de biomassa microalgal de *Desmodesmus* sp. Utilizando hidrolisado hemicelulósico proveniente do bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono visando a obtenção de biocombustíveis de terceira geração / Marina Lemos Sartori, 2019.

90 p. : il.

Orientadora: Lílian de Araújo Pantoja

Coorientador: Alexandre Soares dos Santos

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Biomassa lignocelulósica. 2. Xilose. 3. Pentoses. 4. Lipídios. 5. Carboidratos. I. Pantoja, Lílian de Araújo. II. Santos, Alexandre Soares dos. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 662.8**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa – CRB6/3468

MARINA LEMOS SARTORI


**PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus* sp.  
UTILIZANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO PROVENIENTE DO  
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE CARBONO  
VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS DE TERCEIRA  
GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biocombustíveis como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de Mestre.

Orientador: Prof.ª Dr.ª Lillian de  
Araújo Pantoja

Data da aprovação 22/03/2019

  
Prof.ª Dr.ª Lillian de Araújo Pantoja - UFVJM

  
Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista - UFU

  
Prof. Dr. Emerson Delano Lopes - IFNMG

  
Prof. Dr. Gustavo Molina - UFVJM

**DIAMANTINA**



## AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus por me dar força e coragem para a realização desse sonho. Se Ele encheu minha vida de obstáculos, é porque acredita em minha capacidade em superar cada um.

Dedico essa graça alcançada aos meus amados pais, Ceris Lemos Sartori e Eduardo Sartori, por serem minha motivação e a razão de querer me tornar sempre melhor! Vencemos mais uma!!

Um agradecimento especial à minha tia Celinha. Seus simples gestos são a definição mais pura de amor!

Aos meus orientadores, Dra. LÍlian de Araújo Pantoja e Dr. Alexandre Soares dos Santos, que me acolheram desde a graduação. Obrigada pelos anos de aprendizado, confiança e amizade. Levarei seus ensinamentos por toda minha trajetória.

Agradeço à toda minha família, que foram meu conforto quando me faltavam forças para continuar. Essa vitória é nossa!!

A todos os meus amigos do Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação (LabBBio) e do Laboratório de Microbiologia aplicada aos Biocombustíveis (LabMBio). Juntos nos tornamos mais fortes! Fernanda Monção, Dayane de Oliveira, Myrlene Ottone, Thais Pinheiro, Amanda Chaves, Anamaria Nogueira e Raquel Valinhas, foi um prazer trabalhar e conviver com vocês!

*Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos! E a melhor parte disso tudo é saber que essa caminhada apenas começou!*



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*(Madre Teresa de Calcutá)*





## RESUMO

As microalgas têm sido apresentadas como biomassas com larga vantagem para a produção de biocombustíveis quando comparadas com as biomassas agrícolas ou florestais. Foi avaliado o aproveitamento do hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar, um dos mais abundantes resíduos agroindustriais gerados no Brasil, como fonte de carbono para a produção de biomassa microalgal. O hidrolisado hemicelulósico é um subproduto da indústria do etanol de segunda geração e apresenta grande quantidade de açúcares livres, principalmente a xilose. Neste sentido, estudou-se a capacidade da linhagem unialgal de *Desmodesmus* sp. em utilizar a xilose presente no hidrolisado hemicelulósico e acumular óleo, carboidratos e proteínas. As condições autotrófica, mixotrófica e heterotrófica foram testadas e comparadas. A linhagem de *Desmodesmus* sp. estudada foi capaz de metabolizar xilose em meio sintético e, também, a xilose contida no hidrolisado hemicelulósico. Os maiores teores de proteína, carboidrato e óleo, expressos em peso seco, foram  $65,48 \pm 4,87\%$ ,  $29,61 \pm 3,47\%$  e  $15,81 \pm 0,15\%$ , respectivamente. Os dados de produtividade registrados sugerem que *Desmodesmus* sp. apresenta maior capacidade para a produção de proteínas e carboidratos na condição de cultivo mixotrófico. A partir das características observadas da microalga *Desmodesmus* sp. foi possível constatar que essa apresenta um melhor perfil para a produção de bioetanol de terceira geração.

**Palavras-chave:** Biomassa lignocelulósica. Xilose. Pentoses. Lipídios. Carboidratos.  
Microalgas.



## ABSTRACT

Microalgae have been presented as biomass with a great advantage for the production of biofuels when compared to agricultural or forest biomasses. The use of the hemicellulosic hydrolyzate from the acid pretreatment of sugarcane bagasse, one of the most abundant agroindustrial residues generated in Brazil, was evaluated as a source of carbon for the production of microalgal biomass. The hemicellulosic hydrolyzate is a byproduct of the second generation ethanol industry and has a large amount of free sugars, mainly xylose. In this sense, was studied the capacity of the unialgal strain of *Desmodesmus* sp. in using the xylose present in the hemicellulosic hydrolyzate and accumulating oil, carbohydrates and proteins. The autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions were tested and compared. The lineage of *Desmodesmus* sp. was able to metabolize xylose in synthetic medium and also the xylose contained in the hemicellulosic hydrolyzate. The best protein, carbohydrate and oil contents, expressed in dry weight, were  $65.48 \pm 4.87\%$ ,  $29.61 \pm 3.47\%$  and  $15.81 \pm 0.15\%$ , respectively. The productivity data presented suggest that *Desmodesmus* sp. shows higher capacity for the production of proteins and carbohydrates in the condition of mixotrophic culture using the free sugars present in the hemicellulosic hydrolyzate. From the observed characteristics of the microalga *Desmodesmus* sp. it was possible to verify that this presents a better profile for the production of third generation bioethanol.

**Keywords:** Lignocellulosic biomass; Xylose; Pentoses; Lipids; Carbohydrates; Microalgae.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação de um cenóbio com quatro células do tipo verrugosa de <i>Desmodesmus</i> . A) Aparência externa; B) Estrutura celular; C) Detalhes da célula e das paredes cenobial e epiestrutural.....	25
<b>Figura 2</b> - Rotas de transformação de microalgas em biocombustíveis.....	27
<b>Figura 3</b> - Processo de obtenção de etanol a partir de microalgas.....	28
<b>Figura 4</b> - Etapas de processamento para a produção de biodiesel de microalgas .....	29
<b>Figura 5</b> - Via metabólica de <i>D</i> -xilose proposta para a alga verde <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	37
<b>Figura 6</b> - Fluxograma simplificado de uma biorrefinaria de etanol considerando os processos integrados de primeira, segunda e terceira geração .....	40
<b>Figura 7</b> - Fluxograma das etapas da pesquisa relacionada à produção de biomassa microalgal de <i>Desmodesmus</i> sp. ....	42
<b>Figura 8</b> - Aspecto morfológico da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. cultivada no meio Bold's Basal Medium (BBM) modificado após dez dias de cultivo .....	56
<b>Figura 9</b> - Crescimento celular por densidade óptica nos cultivos mixotrófico e heterotrófico para diferentes concentrações de xilose .....	57
<b>Figura 10</b> - Crescimento celular e consumo de xilose e nitrato pela microalga <i>Desmodesmus</i> sp. em condição mixotrófica com sete dias de monitoramento. (A) Exp.0M; (B) Exp. 3M; (C) Exp. 6M; (D) Exp. 9M. ....	61
<b>Figura 11</b> - Crescimento celular e consumo de carbono e nitrato pela microalga <i>Desmodesmus</i> sp. em condição heterotrófica com sete dias de monitoramento. (A) Exp.0H; (B) Exp. 3H; (C) Exp. 6H; (D) Exp. 9H. ....	62
<b>Figura 12</b> - Crescimento celular da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. cultivada na presença de luz em meio de cultura contendo 3 g L <sup>-1</sup> de xilose (Exp. 3MH) e sem adição de xilose (Exp. 0M) .....	69
<b>Figura 13</b> - Crescimento celular e consumo de carbono e nitrato pela microalga <i>Desmodesmus</i> sp. cultivada na presença de luz em meio de cultura contendo 3 g L <sup>-1</sup> de xilose (Exp. 3MH). 70	



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Abordagem das principais fontes de carbono alternativas utilizadas no cultivo de microalgas atualmente.....	34
<b>Tabela 2</b> - Composição do meio de cultura BBM <sub>modificado</sub> utilizado para cultivo microalgal..	43
<b>Tabela 3</b> - Concentrações de <i>D</i> -xilose como única fonte de carbono orgânico, nitrogênio e relação C/N nos cultivos mixotróficos e heterotróficos de <i>Desmodesmus</i> sp. ....	44
<b>Tabela 4</b> - Parâmetros cinéticos do crescimento da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes concentrações de xilose e condições de cultivo.....	58
<b>Tabela 5</b> - Consumo de xilose e nitrato para produção de biomassa da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. para os cultivos mixotróficos e heterotróficos .....	59
<b>Tabela 6</b> - Caracterização bioquímica da biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. nos cultivos mixotróficos e heterotróficos.....	63
<b>Tabela 7</b> - Produtividade volumétrica dos compostos bioquímicos presentes na biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. nos cultivos mixotróficos e heterotróficos .....	64
<b>Tabela 8</b> - Composição físico-química do bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São João – Grupo Cargill comparado com dados obtidos na literatura.....	67
<b>Tabela 9</b> - Composição dos açúcares, inibidores e proteínas totais presentes no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São João (Grupo Cargill), comparada com dado obtido na literatura. ....	68
<b>Tabela 10</b> - Parâmetros cinéticos do crescimento da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. cultivada na presença de luz em meio de cultura contendo 3 g L <sup>-1</sup> de xilose (Exp. 3MH) e sem adição de xilose (Exp. 0M) .....	69
<b>Tabela 11</b> – Resultado dos parâmetros relacionados ao consumo de xilose e nitrato na produção de biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. nos Exp. 0M e 3MH .....	70
<b>Tabela 12</b> - Composição química do hidrolisado hemicelulósico utilizado no Exp. 3MH, conduzido sob condições mixotróficas em meio contendo xilose.....	71
<b>Tabela 13</b> - Caracterização bioquímica da biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. cultivada em hidrolisado hemicelulósico contendo 3 g L <sup>-1</sup> de xilose.....	71
<b>Tabela 14</b> - Produtividade volumétrica dos compostos bioquímicos presentes na biomassa de <i>Desmodesmus</i> sp. ....	72





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{E}$  – micro Einstein;  
 $\mu\text{L}$  – microlitros;  
 $\mu_x$  – velocidade específica de crescimento;  
1G – primeira geração;  
2G – segunda geração;  
3G – terceira geração;  
3-PGA: 3-fosfoglicerato;  
Abs – absorbância;  
Acetil-coA – Acetil-coenzima A;  
ADP – adenosina difosfato;  
ADSW – água residual de amido digeridos anaerobicamente;  
ANOVA – análise de variância;  
AR – açúcares redutores;  
AST – açúcares solúveis totais;  
atm – atmosférico;  
ATP – adenosina tri-fosfato;  
AW – água residual de álcool;  
BBM - Bold's Basal Medium;  
C/N – relação entre carbono e nitrogênio;  
C3 – moléculas com três átomos de carbono;  
COP 21 – 21<sup>a</sup> Conferência das Partes;  
d – dia;  
D.O – densidade óptica;  
DIC – carbono inorgânico dissolvido;  
DNS – ácido dinitrosalicílico;  
EUA – Estados Unidos da América;  
FAMES – ésteres metílicos de ácidos graxos;  
FDA – fibra em detergente ácido;  
FDN – fibra em detergente neutro;  
g – gramas;  
h – horas;  
HMF – hidroximetilfurfural

HPLC – cromatografia líquida de alta performance;  
Kg – quilograma;  
L – litros;  
LabBBio – Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação;  
LabMBio – Laboratório de Microbiologia para Biocombustíveis;  
LHC – complexo de coleta de luz;  
Lux – intensidade de iluminação;  
m – metros;  
M – Molar;  
min – minutos;  
m/m – massa/massa;  
MESH – unidade de abertura de peneiras;  
mg – miligramas;  
mL – mililitros;  
N – Normal;  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato;  
nm – nanômetros;  
p/p – peso/peso;  
p/v – peso/volume;  
PPP – via pentose fosfato;  
PSI – fotossistema I;  
PSII – fotossistema II;  
RCF – Força Centrífuga Relativa;  
s – segundos;  
TAG- triacilglicerol;  
 $t_g$  – tempo de geração;  
UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri;  
US\$ - Dólar americano;  
v/v – volume/volume;  
W – Watts;  
X5P – Xilulose-5-fosfato;  
XDH - enzima Xilitol Desidrogenase;  
XR – enzima Xilitol Redutase;  
Y<sub>x</sub>/s – rendimento de produção de biomassa microalgal

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Microalgas .....</b>	<b>24</b>
<i>3.1.1 Gênero <i>Desmodesmus</i> .....</i>	<i>24</i>
<b>3.2 Biocombustíveis de terceira geração.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Cultivo de microalgas.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Fontes alternativas de obtenção de nutrientes.....</b>	<b>33</b>
<i>3.4.1 Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o crescimento de microalgas .....</i>	<i>35</i>
<i>3.4.2 Metabolismo de D-xilose por microalgas.....</i>	<i>36</i>
<b>3.5 Perspectivas da integração do bioetanol de primeira, segunda e terceira geração .....</b>	<b>38</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Obtenção de cultura unialgal e preparo do inóculo .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Estudo preliminar: avaliação da utilização de D-xilose como fonte de carbono orgânico pela microalga <i>Desmodesmus</i> sp.....</b>	<b>43</b>
<i>4.2.1 Análise do crescimento celular .....</i>	<i>44</i>
<i>4.2.2 Quantificação da Biomassa microalgal .....</i>	<i>45</i>
<i>4.2.3 Quantificação dos Açúcares Redutores (AR).....</i>	<i>45</i>
<i>4.2.4 Quantificação de nitrato.....</i>	<i>46</i>
<b>4.3 Caracterização bioquímica da biomassa microalgal.....</b>	<b>46</b>
<i>4.3.1 Análise do teor de lipídios .....</i>	<i>46</i>
<i>4.3.2 Amido e açúcares solúveis totais (AST).....</i>	<i>47</i>
<i>4.3.3 Proteínas totais .....</i>	<i>48</i>
<i>4.3.4 Carboidratos totais .....</i>	<i>48</i>
<b>4.4 Aquisição da matéria-prima e preparo da biomassa lignocelulósica.....</b>	<b>48</b>
<i>4.4.1 Análise físico-química do bagaço de cana-de-açúcar.....</i>	<i>49</i>
<b>4.5 Preparo do hidrolisado a partir do bagaço de cana-de-açúcar.....</b>	<b>53</b>
<i>4.5.1 Análise química do hidrolisado ácido hemicelulósico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	<i>53</i>

<b>4.6 Avaliação do hidrolisado hemicelulósico como fonte de nutrientes</b> .....	<b>54</b>
4.6.1 <i>Análise do crescimento celular</i> .....	54
4.6.2 <i>Quantificação da biomassa microalgal</i> .....	54
4.6.3 <i>Quantificação dos açúcares redutores (AR) e nitrato</i> .....	54
<b>4.7 Caracterização bioquímica da biomassa microalgal</b> .....	<b>54</b>
<b>4.8 Análises estatística</b> .....	<b>55</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1 Utilização de D-xilose como fonte de carbono orgânico por <i>Desmodesmus</i> sp.</b> .....	<b>56</b>
5.1.1 <i>Caracterização bioquímica da biomassa microalgal utilizando xilose como fonte de carbono orgânico</i> .....	62
<b>5.2 Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar</b> .....	<b>65</b>
<b>5.3 Utilização do hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono orgânico por <i>Desmodesmus</i> sp.</b>	<b>66</b>
5.3.1 <i>Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico</i> .....	66
5.3.2 <i>Avaliação do crescimento de <i>Desmodesmus</i> sp. em hidrolisado hemicelulósico</i> .....	68
5.3.3 <i>Caracterização bioquímica da biomassa microalgal utilizando hidrolisado hemicelulósico</i>	71
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O elevado crescimento populacional e industrial atrelado aos avanços tecnológicos estimulam de forma crescente as demandas por energia, as quais deverão aumentar em 50% ou mais até o ano de 2030 (ISLAM *et al.*, 2017). Além disso, é ampla a discussão sobre os prejuízos ambientais relacionados à queima dos combustíveis fósseis, como por exemplo, sua contribuição nos gases do efeito estufa com a emissão de CO<sub>2</sub> (CALIXTO *et al.*, 2018; SHUBA; KIFLE, 2018). É fato que a independência do uso destes combustíveis ainda não é uma realidade, uma vez que a energia renovável compreende menos de um quarto do suprimento energético mundial (CHEN *et al.*, 2015). De acordo com o Shuba e Kifle (2018), o petróleo natural não pode compensar a taxa atual de consumo, que já é relatada como sendo 105 vezes mais rápida do que a natureza pode fornecer. Pensando nisso, a busca por energia renovável passou a ser foco de estudo de pesquisadores de todo o mundo.

Segundo Elrayies (2018), os biocombustíveis são vistos como alternativas realistas para substituir os combustíveis fósseis em curto prazo. Estes biocombustíveis podem ser categorizados em quatro diferentes gerações dependendo da tecnologia de produção empregada (SALAMA *et al.*, 2017). A primeira geração (1G) é caracterizada por apresentar tecnologias bem estabelecida e desenvolvida e são produzidas a partir de culturas alimentícias como o milho, cana-de-açúcar, soja e colza (NAQVI; YAN, 2015). Contudo, sua produção ainda é vítima de críticas, uma vez que há uma competição potencial com a produção de alimentos. A segunda geração (2G) é denominada àquelas produzidas a partir de matérias-primas lignocelulósicas como resíduos florestais e agrícolas, resíduos do petróleo e do óleo de cozinha residual (DOSHI *et al.*, 2016; STANISLAV; CHRISTINA, 2016; ELRAYIES, 2018). Essa geração apesar de ser mais sustentável e menos competitiva com a produção alimentícia, ainda carece de tecnologias mais eficientes para o tratamento e conversão dos materiais lignocelulósicos, além de requerer procedimentos que minimizem os gastos excessivos de energia com a coleta e transporte dos resíduos (ELRAYIES, 2018). A terceira geração (3G), compreende a utilização de micro-organismos fotossintéticos (DOSHI *et al.*, 2016) como as microalgas, que são consideradas fonte de biomassa com maior capacidade para atender às necessidades mundiais de energia (ISLAM; HEIMANN; BROWN, 2017). Os biocombustíveis da quarta geração (4G) encontram-se em fase experimental e não são definidos com clareza. As tecnologias de quarta geração incluem a decomposição de biocombustíveis em altas temperaturas, reações fotossintéticas artificiais e organismos geneticamente modificados (DEMIRBAS, 2011).

Neste contexto será dado destaque aos biocombustíveis de terceira geração (3G) por ser alvo desse estudo. Nessa categoria, a biomassa microalgal é indicada como matéria-prima para a produção de biocombustível devido à sua capacidade em acumular uma quantidade substancial de biocompostos, como lipídios, carboidratos e proteínas. Além disso, estes microorganismos possuem alta taxa de crescimento, são capazes de fixar CO<sub>2</sub> atmosférico e crescem em águas residuais e em resíduos agroindustriais (SALAMA *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2017). No entanto, o cenário do processo de produção de microalgas encontra-se em estágio de desenvolvimento por ainda apresentar gargalos de produção que interferem na eficiência do processo industrial (ONUMAEGBU *et al.*, 2018), e por ser um biocombustível oneroso.

Industrialmente, a produção de biomassa microalgal enfrenta como principais entraves o elevado custo de cultivo, recuperação da biomassa e seu processamento (LAURENS; CHEN-GLASSER; MCMILLAN, 2017; GUE *et al.*, 2017). Todavia, segundo Santana *et al.* (2017), os custos podem ser reduzidos se o CO<sub>2</sub>, os nutrientes e a água necessários para seu cultivo forem obtidos a baixo custo. Neste contexto, pesquisadores estão focados em pesquisas que busquem fontes alternativas de nutrientes para o cultivo de microalgas, tais como os resíduos municipais e industriais (SALAMA *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2017; JUÁREZ *et al.*, 2016; ARORA *et al.*, 2016; RATTANAPOLTEE; KAEWKANNETRA, 2014).

Um dos resíduos industriais que vêm ganhando destaque na minimização do alto custo de cultivo das microalgas são as biomassas lignocelulósicas, que quando hidrolisadas, fornecem açúcares como a glicose e a xilose. Essa biomassa é renovável, produzida em grandes quantidades e, sobretudo, servem de substrato para o crescimento das microalgas, uma vez que essas são capazes de assimilar facilmente os açúcares extraídos (ARORA *et al.*, 2016). A utilização da glicose como fonte de carbono para microalgas (EZE *et al.*, 2017; RÍOS *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2016) já é estabelecida, no entanto, o uso da xilose, proveniente dos hidrolisados hemicelulósicos, ainda é pouco explorado. Portanto, estudos envolvendo a capacidade da utilização desse substrato é de fundamental importância para a minimização dos custos de produção de biomassa algal.

Neste estudo o bagaço de cana-de-açúcar foi escolhido como matéria-prima lignocelulósica, pois deriva de uma das *commodities* mais importantes do mundo, o açúcar, e possui um importante peso econômico no Brasil (PAZUCH *et al.*, 2017), o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Segundo PUGLIESE; LOURENCETTI; RIBEIRO (2017) estima-se que a cada tonelada de cana colhida são produzidos 250 kg de bagaço, fato que o torna disponível para exploração em larga escala e atrativo para o cultivo de microalgas.

Neste sentido, essa pesquisa teve por finalidade a avaliação do uso da xilose pura e da xilose presente no hidrolisado hemicelulósico obtido a partir do bagaço da cana-de-açúcar conforme delineados nos objetivos a seguir.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a produção de biomassa, lipídios, proteínas e carboidratos, a partir de microalga do gênero *Desmodesmus* utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar preliminarmente a capacidade de produção de biomassa de *Desmodesmus* sp. em meio de cultura adicionado de diferentes concentrações de *D*-xilose;
- Avaliar o efeito das diferentes concentrações de *D*-xilose na produção de lipídios, carboidratos e proteínas presentes na biomassa microalgal;
- Determinar as características físico-químicas do bagaço de cana-de-açúcar e do hidrolisado hemicelulósico;
- Avaliar a capacidade de produção de biomassa de *Desmodesmus* sp. em meio de cultura adicionado de hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono;
- Avaliar a influência do hidrolisado hemicelulósico na produção de lipídios, carboidratos e proteínas presentes na biomassa microalgal;





### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Microalgas

As algas são organismos fotossintéticos que podem ser divididos em três grupos: microalgas, cianobactérias e macroalgas (PIRES, 2017). As microalgas são micro-organismos unicelulares eucarióticos, e representam o grupo de algas mais estudado para a produção de biocombustíveis.

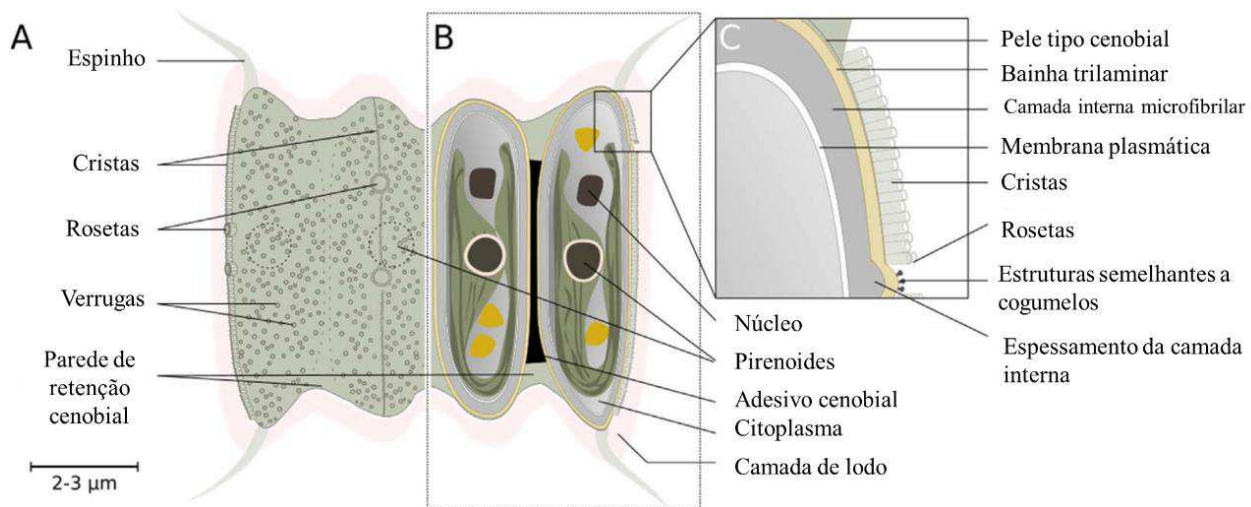
Microalgas são organismos microscópicos (5-50  $\mu\text{m}$ ) autotróficos que utilizam energia luminosa e nutrientes inorgânicos, como  $\text{CO}_2$ , nitrogênio e fósforo, para produzir biomassa e sintetizar metabólitos de interesse (YU *et al.*, 2015). Esses micro-organismos são encontrados em ambientes dulcícolas ou marinhos, apresentando-se em colônias, isolados ou em filamentos. A biomassa de microalgas é composta basicamente por proteínas (6 a 52%), lipídios (5% a 23%) e carboidratos (7% a 23%) (JUÁREZ *et al.*, 2016; CHIA *et al.*, 2018), onde este conteúdo pode variar entre as espécies e de acordo com as condições do cultivo, como por exemplo, na privação de nutrientes (MILANO *et al.*, 2016; JUÁREZ *et al.*, 2016). Quanto à estrutura celular, as microalgas são protegidas por uma membrana plasmática rica em lipídios e, na maioria das espécies, por uma parede celular de complexa composição, contendo celulose, proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos (ARNOLD *et al.*, 2015). Dentre as divisões de microalgas, a divisão *Chlorophyta*, mais conhecida como microalgas verdes, são consideradas como fontes renováveis de produtos químicos valiosos, e estão inseridas as cepas mais produtivas, apresentando crescimento acelerado em sistemas abertos, acúmulo de lipídios em baixas temperaturas e alta tolerância de  $\text{CO}_2$  (BAUDELET *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2017).

##### 3.1.1 Gênero *Desmodesmus*

O gênero das microalgas *Desmodesmus* pertence à divisão *Chlorophyta* e família *Scenedesmaceae*, considerada a maior família das algas verdes cocoides que habitam os ambientes aquáticos continentais (RAMOS; BICUDO; MOURA, 2015). As espécies constituintes são formadas por cenóbios planos, livre-flutuantes, contendo duas, quatro, oito ou dezesseis células fusiformes, elipsoidais ou cilíndricas, dispostas lado a lado em série linear, mais raramente em séries alternantes, unidas por sua face dorsal (FRANCESCHINI *et al.*, 2009). Contudo, de acordo com Baudélet *et al.* (2017) em cultivos onde há uma baixa densidade celular, a forma unicelular de *Desmodesmus* mostra-se dominante. As células de *Desmodesmus* são uninucleadas e contêm um cloroplasto parietal com um pirenóide. A reprodução assexuada dá-se pela formação de autósporos, as quais são liberadas pela ruptura da parede da célula-mãe, não sendo observada reprodução sexuada (FRANCESCHINI *et al.*, 2009; RAMOS; BICUDO;

MOURA, 2015). O gênero *Desmodesmus*, antigo subgênero de *Scenedesmus*, foi criado a partir de análises de sequências gênicas do rDNA, e diferencia-se da *Scenedesmus* por apresentar uma quarta camada de esporopolenina na parede celular, o que possibilita a formação dos espinhos e das demais ornamentações (HENTSCHKE; TORGAN, 2010). Os espinhos são compostos por longas espiguetas firmemente organizadas em agrupados e cobertos por uma "pele" cristalina adicional (BAUDELET *et al.*, 2017). Na Figura 1 encontra-se representado um cenóbio com quatro células do tipo verrugosa do gênero *Desmodesmus*. As espécies desse gênero podem sobreviver e ser eficientes em uma ampla gama de temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de CO<sub>2</sub> e níveis de pH (CHIU; SOONG; CHEN, 2016; HO *et al.*, 2014; RÍOS *et al.*, 2015), tornando-as ideais para a produção de biomassa em larga escala, com por exemplo, para a produção de biocombustíveis de terceira geração.

**Figura 1** - Representação de um cenóbio com quatro células do tipo verrugosa de *Desmodesmus*. A) Aparência externa; B) Estrutura celular; C) Detalhes da célula e das paredes cenobial e epiestrutural



Fonte: BAUDELET *et al.*, 2017. Adaptado.

### 3.2 Biocombustíveis de terceira geração

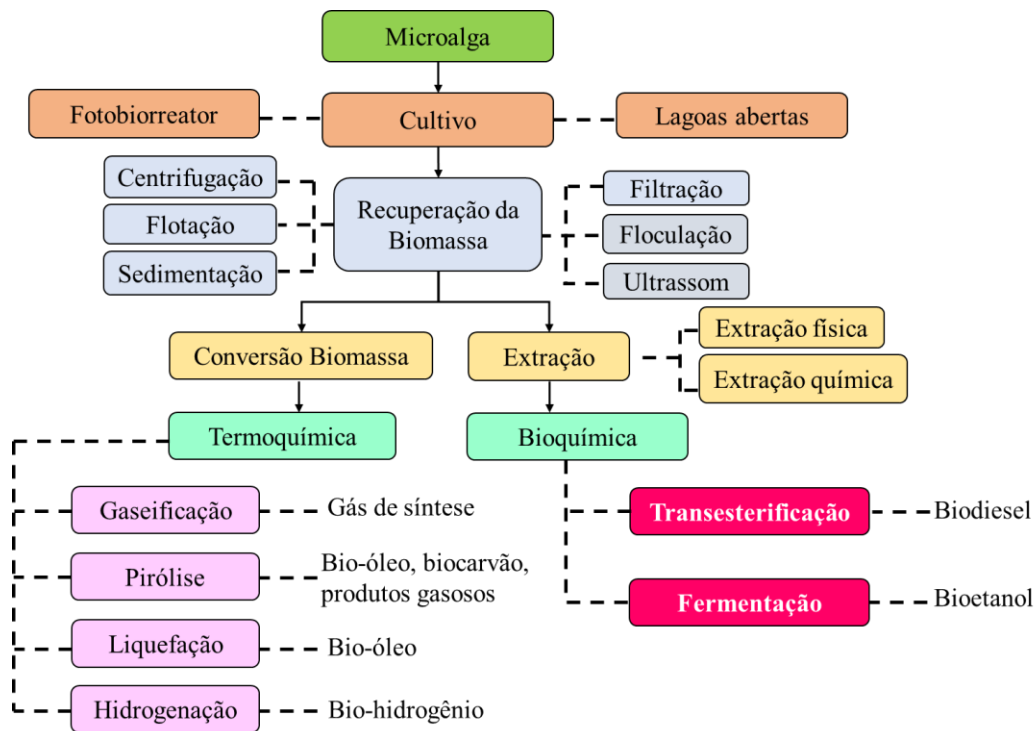
Os biocombustíveis derivados de microalgas são vistos como uma alternativa energética sustentável, uma vez que uma das metas estipuladas pelos países na Conferência do Clima (COP 21) é o corte das emissões dos gases do efeito estufa, ocasionados principalmente da queima de combustíveis fósseis (PAZUCH *et al.*, 2017). Frente a este cenário, a cultura algal pode desempenhar um duplo papel, uma vez que são organismos fotossintéticos capazes de capturar CO<sub>2</sub> e sua biomassa pode ser utilizada na produção de biocombustíveis com zero ou

mesmo saldo de carbono líquido negativo (PIRES, 2017). Estima-se que cada quilograma de microalgas corresponde cerca de 1,83 kg de CO<sub>2</sub> fixados (PIRES, 2017).

A produção de biocombustíveis utilizando microalgas atualmente é comercializada principalmente nos Estados Unidos da América, na Austrália e em alguns países europeus, onde as condições climáticas permitem o cultivo de microalgas ao ar livre. No entanto, a contribuição do biocombustível microalgal ainda é baixa no mix energético total (menos de 5%), que inclui energia derivada de combustível fóssil, energia solar, eólica, entre outras (CHIA *et al.*, 2018). O Brasil também é considerado um país com condições favoráveis para o cultivo de microalgas, uma vez que possui uma grande área costeira tropical, contribui com 12% do abastecimento de água doce mundial, recebe altos e constantes níveis de insolação ao longo do ano e possui mais de 3,5 mil espécies de algas catalogadas (AGROENERGIA, 2016).

A biomassa microalgal pode ser convertida em diversas fontes alternativas de energia, como o hidrogênio, metano, bio-óleo, biomassa para combustão e gaseificação, e sobretudo, o biodiesel e o bioetanol (MILANO *et al.*, 2016; PRABHAKARAN *et al.*, 2017), como ilustrado na Figura 2.

No que diz respeito à produção de bioetanol de microalgas, essas possuem o potencial de superar os problemas enfrentados na fermentação pelas matérias-primas convencionais de produção, fornecendo carboidratos e proteínas que podem ser utilizados como fonte de carbono (HARUN; DANQUAH; FORDE, 2010). Uma das vantagens da produção de etanol por microalgas é a ausência ou quase ausência de lignina em sua biomassa, o que torna a hidrólise enzimática da celulose mais simples, mitigando o uso de pré-tratamentos (JOHN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2015; SALAMA *et al.*, 2017).

**Figura 2** - Rotas de transformação de microalgas em biocombustíveis

Fonte: SUALI; SARBATLY, 2012. Adaptado.

Segundo Farias e Bertucco (2016), são descritas três rotas envolvendo o uso de biomassa microalgal para a produção de bioetanol. A primeira rota envolve o processo tradicional de produção de etanol, onde a biomassa é submetida a etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação (Figura 3). A segunda via faz uso de vias metabólicas em condições escuras, redirecionando a fotossíntese para produção de hidrogênio, ácidos e álcoois, como o etanol. A terceira via, também chamada de “fotofermentação”, requer o uso da engenharia genética para redirecionar as vias bioquímicas preexistentes de microalgas para uma produção mais subjetiva e eficiente de bioetanol.

Considerando a primeira rota de produção de etanol destacada acima, pode-se obtê-lo a partir do amido, celulose, e açúcares livres presentes nas microalgas. Dependendo das condições de cultivo e da espécie de microalga, o conteúdo de carboidratos é de aproximadamente 70 a 72%, com predominância do amido (SUALI; SARBATLY, 2012). Os gêneros de microalgas verdes utilizados na produção de bioetanol incluem a *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas* e *Scenedesmus* (ÖZÇIMEN; İNAN, 2015), uma vez que mais de 50% de seu peso seco é constituído de amido e glicogênio (JOHN *et al.*, 2011).

**Figura 3-** Processo de obtenção de etanol a partir de microalgas



Fonte: LEE; LEE, 2016. Adaptado.

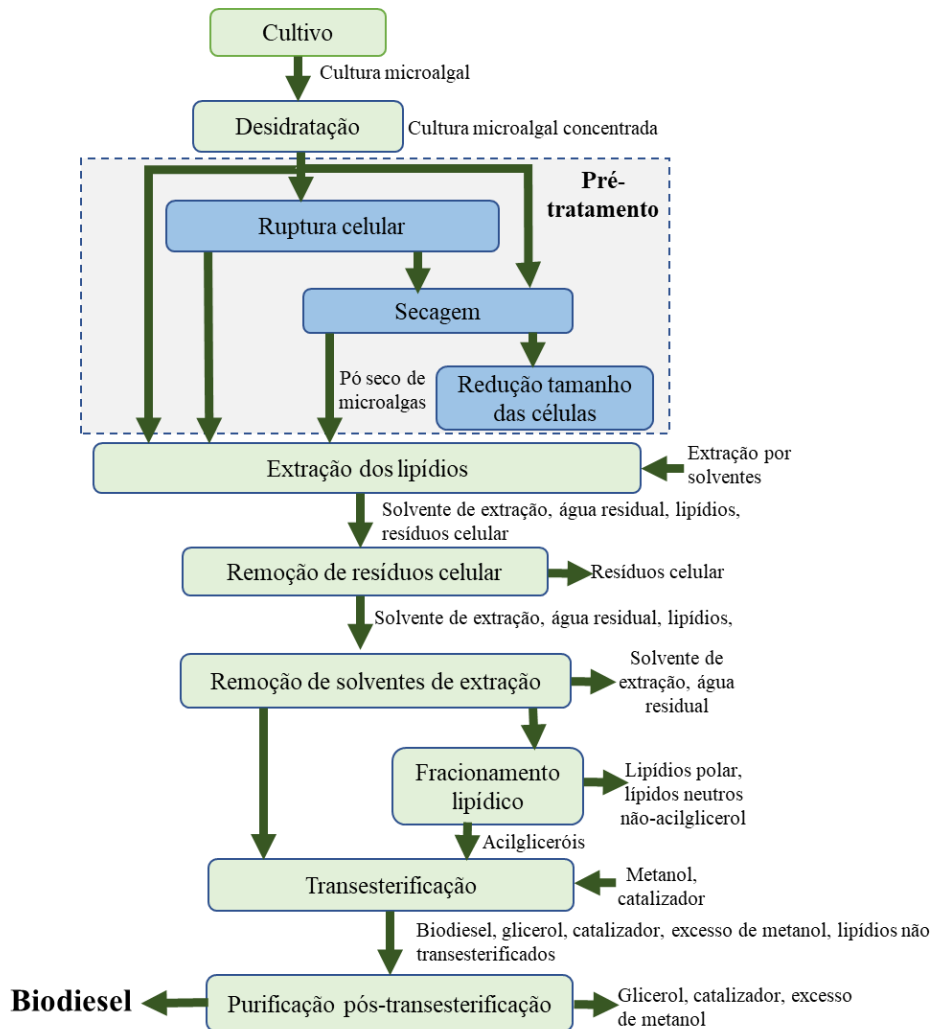
O biodiesel também pode ser produzido por micro-organismos como as microalgas, que possuem composições de ácidos graxos semelhantes aos óleos vegetais tradicionais (MU *et al.*, 2015). Segundo Yeh *et al.* (2010), o conteúdo lipídico total das microalgas varia entre 1 a 70% do peso seco das células, e compreendem os ácidos graxos saturados e insaturados estocados na forma de triacilglicerol (TAG) (CHIA *et al.*, 2018).

De acordo com Maranduba *et al.* (2016), a colheita de microalgas pode ser feita o ano todo quando localizadas em regiões apropriadas, obtendo um maior rendimento de óleo por área, que pode exceder 10 vezes a produtividade de culturas terrestres, tal como o óleo de palma. Contudo, o conteúdo lipídico presente nas microalgas é fortemente influenciado pelos parâmetros de crescimento. Segundo Chia *et al.* (2018), as microalgas em condições de privação de nitrogênio produzem maiores quantidades de lipídios, além de outros fatores ambientais, como temperatura, pH e salinidade, que mostrou afetar negativamente a produção lipídica.

A extração do óleo presente nas células de microalgas pode ser realizada por métodos comuns como a extração de óleo e bagaço, extração por hexano e extração com fluido supercrítico, e, após o refino do óleo, são formados hidrocarbonetos de alto grau como o biodiesel e bio-gasolina (CHIA *et al.*, 2018). O método convencional de produção do biodiesel a partir de óleo de microalgas envolve a extração dos lipídios presentes na biomassa de microalgas e sua posterior conversão em FAMES (LEMÕES *et al.*, 2016). De acordo com Huang *et al.* (2010), as vias de síntese de triglicerídeos em microalgas consiste em três passos: a formação de acetil-coenzima A (acetil-coA) no citoplasma; o alongamento e dessaturação da

cadeia de carbono dos ácidos graxos; e a biossíntese de triglicerídeos em microalgas. Na Figura 4 encontra-se as etapas de processamento para a obtenção do biodiesel de microalgas através da transesterificação.

**Figura 4-** Etapas de processamento para a produção de biodiesel de microalgas



Fonte: HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012. Adaptado.

Inúmeras são as vantagens do uso de microalgas na produção de biocombustíveis. Contudo, a barreira mais importante e mais crítica para a implantação do mercado de produção comercialmente viável de algas continua a ser o alto custo de cultivo, recuperação e processamento da biomassa em relação à biomassa de plantas terrestres (LAURENS; CHEN-GLASSER; MCMILLAN, 2017; SANTANA *et al.*, 2017).

De acordo com Laurens *et al.* (2017), a relação inversa entre produtividade e conteúdo lipídico também é considerado um desafio para a otimização do processo e viabilidade econômica da produção de biodiesel microalgal. Entretanto, apesar dos problemas enfrentados, os avanços na biotecnologia sugerem que a produção industrial de biodiesel a partir de óleo de microalgas pode ser viável em um futuro próximo (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

### 3.3 Cultivo de microalgas

O crescimento das microalgas e a composição da biomassa são influenciados pela interdependência de parâmetros biológicos, físicos e químicos, como a qualidade e concentração dos nutrientes (especialmente fontes de carbono e nitrogênio), pH, temperatura, suprimento de luz, oxigênio dissolvido e CO<sub>2</sub> (PRABHAKARAN *et al.*, 2017; YEH *et al.*, 2010). De acordo com Salama *et al.* (2017), os macronutrientes essenciais para o crescimento das algas são o carbono, nitrogênio, fósforo, hidrogênio, oxigênio, enxofre, magnésio, potássio, sódio, e cálcio, enquanto os micronutrientes compreendem o ferro, cobre, manganês, zinco, cloro, vanádio, molibdênio, boro, cobalto e silício.

O nitrogênio é utilizado pelas algas na produção de proteínas, peptídeos, enzimas, fragmentos de transferência de energia (ATP/ADP), clorofilas e constituintes genéticos, e possui forte influência no perfil dos lipídios e ácidos graxos. Esses micro-organismos são capazes de assimilar formas inorgânicas desse nutriente, como nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (RÍOS *et al.*, 2015; SALAMA *et al.*, 2017). Segundo Pires (2017), em baixas concentrações de nitrogênio, ou seja, em condição de estresse, as microalgas podem acumular lipídios intracelulares, tornando-as interessante para produção de biodiesel. De acordo com Rattanapoltee e Kaewkannetra (2014), o teor de lipídios das microalgas pode ser aumentado em condições ambientais ou de estresse desfavoráveis, tais como a depleção de nitrogênio, limitação de fosfato, alta salinidade, alta concentração de ferro e alto teor de carbono orgânico.

A fonte de carbono envolve formas inorgânicas e orgânicas, e é considerado o macronutriente mais importante para o crescimento, uma vez que a biomassa microalgal é constituída por aproximadamente 50% de carbono (GROBBELAAR; BORNMAN, 2004). Parte do carbono fixado pelas microalgas é utilizado na manutenção celular e crescimento, e parte é estocada na célula em diferentes formas de armazenamento dependendo do tipo da espécie e das condições ambientais (SANTANA *et al.*, 2017).

O carbono inorgânico é encontrado na forma de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> sendo o CO<sub>2</sub> a fonte preferida pelas microalgas, pois, através da difusão passiva, difunde-se rapidamente da água para o interior das células (SALAMA *et al.*, 2017). As microalgas também possuem a capacidade de produzir biomassa na presença de fontes de carbono orgânicas, tais como a glicose, xilose, glicerol e sacarose (CHEIRSILP; TORPEE, 2012; LEITE; PARANJAPE; HALLENBECK, 2016; ABOMOHRRA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). Apesar disso, a inserção desses compostos encarece ainda mais a produção da biomassa microalgal. Pensando nisso, uma alternativa encontrada pelos pesquisadores foi a utilização de



resíduos industriais e águas residuais como fonte de nutrientes (principalmente carbono) para o crescimento de microalgas (ZHANG *et al.*, 2018; DENG *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2017).

Um dos fatores ambientais fundamentais na composição bioquímica das microalgas é a temperatura. De acordo com Gressler *et al.* (2012), uma diminuição na temperatura do cultivo aumenta o grau de instauração na membrana lipídica das células, afetando o conteúdo lipídico da biomassa microalgal. De acordo com Su *et al.* (2017), o aumento da temperatura acarreta o acréscimo no teor de proteínas e uma diminuição no teor de lipídios e carboidratos nas células de microalgas.

Quanto à quantidade de energia luminosa, em cultivos fotoautotróficos e mixotróficos, essa irá influenciar na quantidade de carbono que será fixado, sendo considerada um fator limitante na produção de biomassa e na taxa de crescimento das culturas microalgais (GRESSLER *et al.*, 2012). A alta intensidade luminosa em cultivos fotoautotróficos causa o fenômeno da fotoinibição, que se caracteriza como a redução do crescimento celular em função do excesso de luz que cessa a fotossíntese, fato que está relacionado com a saturação do fotossistema II do aparato fotossintético, causando danos reparáveis nas células. Segundo Ângelo *et al.* (2014), os cultivos mixotróficos não sofrem com a fotoinibição. A explicação estaria ligada à duas hipóteses: (i) a fonte de carbono orgânico apresenta um efeito fotoprotetor; (ii) a presença de carbono orgânico desloca a intensidade luminosa máxima.

O pH possui influência sobre a solubilidade de vários compostos metálicos, e seu aumento no meio de cultura pode ocasionar em uma deficiência em alguns elementos traços. O crescimento fotossintético das microalgas provoca variações no pH do meio, e se este aumenta a um pH de 9, o carbono pode precipitar, implicando na não disponibilidade dos nutrientes (DERNER *et al.*, 2006). De acordo com Jacob-Lopes, Zepka e Queiroz (2018), extremos de pH ocasionam o rompimento de muitos processos celulares, o que pode levar ao colapso da cultura. O pH é responsável na solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio e possui influência no metabolismo de microalgas. O pH ainda depende de vários fatores, como a composição e capacidade tamponante do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura e atividade metabólica das células (KARAM; SOCCOL, 2007).

As microalgas são diversificadas pela sua capacidade de mudar as atividades de remoção metabólica em resposta a mudanças nas condições ambientais, sendo classificadas como autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. Segundo Ângelo, Andrade e Colozzi (2014), a compreensão destas formas de metabolismo permite aplicar às microalgas estratégias de cultivos visando o aumento da produção de biomassa algal, e seus coprodutos em grande escala.

Os organismos fotoautotróficos utilizam luz como fonte de energia e  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono para as reações anabólicas através da fotossíntese (SALAMA *et al.*, 2017). As microalgas adquirem o carbono inorgânico dissolvido (DIC) nas formas de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ , onde tais formas estão diretamente relacionadas com as diferentes espécies de microalgas (ZHOU *et al.*, 2017). Através das reações de fotossíntese, as microalgas captam a energia solar e a armazenam na forma de adenosina tri-fosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH). Tais compostos serão utilizados como fonte de energia para a síntese de carboidratos e outros compostos orgânicos a partir da água e da redução do  $\text{CO}_2$  (ZHOU *et al.*, 2017). De acordo com Suali e Sarbatly (2012) em condição fotoautotrófica, as microalgas acumulam menos lipídios em comparação à cultura heterotrófica devido aos limitados grupos acil entre os lipídios dos cloroplastos.

Os cultivos heterotróficos e mixotróficos ocorrem na presença de uma fonte de carbono orgânica. Em condições heterotróficas, as microalgas não necessitam de energia luminosa e  $\text{CO}_2$  para seu crescimento (SANTANA *et al.*, 2017; SUALI; SARBATLY, 2012), e tanto a fonte de carbono como de energia são fornecidas por uma fonte de carbono orgânica. Em culturas mixotróficas, as algas realizam fotossíntese através da energia luminosa e utilizam tanto o  $\text{CO}_2$  quanto compostos orgânicos como fonte de carbono (ARORA *et al.*, 2016). Estes cultivos representam uma alternativa viável aos sistemas de cultivo autotróficos mais tradicionais, que normalmente apresentam baixa produtividade de biomassa e alto custo de produção (MARUDHUPANDI; SATHISHKUMAR; KUMAR, 2016). De acordo com Lee (2004), o cultivo mixotrófico pode ser o processo mais eficiente na produção de biomassa de microalgas, uma vez que sua implementação implica em economia energética gasta na síntese de todo o aparato fotossintético e para a fixação do carbono. Contudo, para que estes cultivos sejam economicamente viáveis, a fonte de carbono deve ser proveniente de resíduos orgânicos, uma vez que a fonte de carbono representa cerca de 50% do custo total dos nutrientes presentes no meio de cultura (SALAMA *et al.*, 2017).

Os compostos orgânicos que servirão como fonte de nutrientes devem ser pequenos o suficiente para se deslocar pelas paredes celulares, para serem então convertidos em lipídios e outros metabólitos através de caminhos de respiração, como a via de fosfato de pentose (PPP) (ZHOU *et al.*, 2017).

A relação inicial de carbono e nitrogênio (C/N) no meio tem impacto significativo na biossíntese de lipídios em microalgas (HUANG *et al.*, 2010). Para tanto, tal relação é descrita como ideal em uma faixa de 7 a 60, dependendo da espécie (RÍOS *et al.*, 2018; SAMORI *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2015). Contudo, há uma relação inversa entre produção de biomassa e

acúmulo de lipídios. De acordo com Samori *et al.* (2013), para altas relações C/N, a produção de lipídios é favorecida e a produção de biomassa é prejudicada.

### 3.4 Fontes alternativas de obtenção de nutrientes

As microalgas possuem a capacidade de absorver nutrientes orgânicos ou inorgânicos de águas residuais ou resíduos agroindustriais para a produção de biomassa para a geração de biocombustíveis (SALAMA *et al.*, 2017). Os resíduos já estudados na implementação dos meios de cultura de microalgas incluem: vinhaça (SANTANA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2016), soro de leite (GIRARD *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017), águas residuais (JUÁREZ *et al.*, 2016), dejetos suínos (DENG *et al.*, 2018), água de lavagem de biodiesel (SASSI *et al.*, 2017), glicerol (KATIYAR *et al.*, 2017; PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016), biomassas lignocelulósicas (RATTANAPOLTEE; KAEWKANNETRA, 2014; ARORA *et al.*, 2016), entre outros. Na Tabela 1 estão listadas as fontes de carbono alternativas estudadas atualmente para o cultivo de microalgas e os principais resultados obtidos.

Nos últimos anos, há um crescente interesse em acoplar tratamentos de resíduos biológicos à produção de bioenergia (SALAMA *et al.*, 2017). Pesando nisso, pesquisadores têm avaliado fontes de carbono provenientes de matérias-primas lignocelulósicas, que, quando hidrolisadas, podem fornecer os nutrientes necessários para o crescimento das microalgas.

Os materiais lignocelulósicos podem ser amplamente encontrados distribuídos no reino vegetal, gimnospermas (pinheiros, cedros, ciprestes, araucárias), angiospermas (palmeiras, eucalipto, bambu, cana-de-açúcar, trigo) e, igualmente, nos resíduos agrícolas e florestais (MIAZEK *et al.*, 2014). A biomassa lignocelulósica é composta por cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas) unidas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses (polissacarídeos ramificados formados principalmente por *D*-xilose com pequenas quantidades de *L*-arabinose, *D*-glicose, *D*-manose, *D*-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico) e ligninas (redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas). Minerais como Ca, K, Mg, Na, P, Fe, Mn e Si combinados com moléculas orgânicas ou em forma de sais inorgânicos também são encontrados em biomassas lignocelulósicas (MIAZEK *et al.*, 2014).

**Tabela 1** - Abordagem das principais fontes de carbono alternativas utilizadas no cultivo de microalgas atualmente

Microalga	Substrato orgânico	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Q <sub>B</sub> (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Lipídios (%)	Q <sub>L</sub> (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Chlorella vulgaris</i>	Dejeto suíno <sup>a</sup>	1,68 - 3,47	234,1 - 532,2	-	183,7	DENG <i>et al.</i> , 2018
<i>Micractinium sp.</i> / <i>Chlamydomonas bioconvexa</i>	Vinhaça <sup>b</sup>	-	164,44 / 222,22	2,5 / 1,26	3,99 / 2,79	SANTANA <i>et al.</i> , 2017
<i>Chlorella sp.</i>	Glicerol <sup>c</sup>	-	446,5	34,36	165,15	KATIYAR <i>et al.</i> , 2017
<i>Chlorella sorokiniana</i> / <i>Chlorella vulgaris</i>	Glicerol <sup>d</sup>	1,556 / 1, 784	222,29 / 254,86	27,0 / 20,0	41,0 / 14,0	PARANJAPE <i>et al.</i> , 2016
<i>Scenedesmus sp.</i> mutante	Melaço <sup>e</sup>	3,4	-	33,5	125	MA <i>et al.</i> , 2017
<i>Chlorella sorokiniana</i> / <i>Scenedesmus sp.</i>	Resíduo de lixo de cozinha <sup>f</sup>	0,42 / 0,55	-	30,27 - 41,69 / 35,97 - 47,39	-	ZHANG <i>et al.</i> , 2018
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Água residual da produção de álcool <sup>g</sup>	8,43	562,08	15,73	47,63	TAN <i>et al.</i> , 2018

a: Sistema de cultivo com reciclagem diária do caldo de cultura para reutilização de água e nutrientes; b: Cultivo em fotobiorreatores do tipo airlift (12 h/12 h regime claro/escuro; intensidade luminosa de 400  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; aeração com ar atmosférico a 64L.h<sup>-1</sup> suplementado com 5% de CO<sub>2</sub>) por 3 dias utilizando vinhaça 100% clarificada; c: Cultivo heterotrófico em fotobiorreator PBR utilizando glicerol bruto em 7 dias; d: Cultivo mixotrófico com 40 W.m<sup>-2</sup> de intensidade luminosa, 25 mM de glicerol bruto e 250 mg.L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>; e: Cultivo mixotrófico (iluminação contínua com intensidade luminosa de 3000 lux; 12 h/12 h regime claro/escuro), e temperatura de 25°C; f: Cultivo mixotrófico (iluminação contínua com intensidade luminosa de 81  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e diluição de 1/15 do efluente de resíduo de lixo de cozinha; g: Cultivo mixotrófico (iluminação contínua com intensidade luminosa de 127  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 12 h/12 h regime claro/escuro), temperatura de 25°C, 15 dias; Razão AW/ADSW (v:v) = 1:15, onde AW: água residual de álcool e ADSW: águas residuais de amido digeridas anaerobicamente; Q<sub>B</sub>: Produtividade volumétrica de biomassa (mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>); Q<sub>L</sub>: Produtividade volumétrica de lipídios (mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)

Segundo Yang *et al.* (2014), a utilização de hidrolisados como, por exemplo, de milho, melaço, sorgo, cana-de-açúcar, palha de arroz e farelo de trigo em cultivos heterotróficos e mixotróficos, em termos econômicos, podem reduzir em até 50% os custos de produção dos biocombustíveis de terceira geração (MIAZEK *et al.*, 2014).

CHEN *et al.* (2015) avaliaram a utilização do hidrolisado do bagaço de mandioca como fonte de nutrientes no cultivo da microalga *Chlorella protothecoides*, e produziram 7,9 g L<sup>-1</sup> de biomassa microalgal e 34,3% de ácidos graxos. O hidrolisado utilizado possuía mais de 30 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores que serviram como fonte de carbono orgânico em cultivo mixotrófico.

Segundo Santos *et al.* (2016), o Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor mundial de bioetanol. Neste contexto, o presente estudo deu ênfase à aplicação do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de nutrientes para o crescimento de micro-organismos fotossintéticos como as microalgas.

### ***3.4.1 Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o crescimento de microalgas***

O bagaço de cana-de-açúcar é considerado uma biomassa disponível e atrativa para o cultivo de microalgas em larga escala. No ano de 2015, CHENG *et al.* (2015) reportaram uma estimativa de produção de 250 kg de bagaço de cana-de-açúcar para cada tonelada de cana-de-açúcar processada. Dados relativos a 2018 mostram que, de cada tonelada de cana moída na indústria obtêm-se 700 litros de caldo de cana e 300 kg de bagaço (50% matéria seca), portanto, das 250 milhões de toneladas de cana moída nas usinas e destilarias do Brasil, a cada ano, 75 milhões de toneladas de bagaço de cana são obtidos (SANTOS; DOS SANTOS, 2018).

Essa biomassa lignocelulósica é considerada um substrato de fermentação adequada para o acúmulo de lipídios em decorrência de sua alta relação C/N e baixo teor de cinzas (BANDHU *et al.*, 2017). Além do mais, sua hidrólise ácida é um método rápido e eficaz de despolimerização da fração hemicelulósica da parede celular em monômeros de açúcar principalmente xilose, arabinose e outros açúcares, juntamente com alguns produtos inibitórios (ANTUNES *et al.*, 2017).

A glicose e a xilose são considerados os açúcares mais abundantes em hidrolisados hemicelulósicos. Enquanto a glicose pode ser facilmente utilizada por muitas microalgas, a xilose pertence a substratos pouco utilizáveis (YANG *et al.*, 2014). Logo, encontrar espécies de microalgas capazes de assimilar tal açúcar se torna cada vez mais importante, sob o ponto de vista tecnológico. O primeiro relato de cultivo de algas com xilose mostrou que algumas

cepas eram tolerantes e presumivelmente assimiladas através de crescimento mixotrófico, e algumas cepas apresentaram alta toxicidade a essa fonte de carbono (LEITE; PARANJAPE; HALLENBECK, 2016).

Os hidrolisados hemicelulósicos possuem inibidores que podem ser classificados em três grupos: os ácidos fracos, como ácido acético, levulínico e fórmico; os derivados de furano, sendo os principais o 5-hidroxiacetilfrufural (5-HMF) e o furfural; e os compostos fenólicos, como a vanilina, siringaldeído e ácido 4-hidroxibenzoico (JONSSON; ALRIKSSON; NIVEBRANT, 2013). Embora outros compostos inibitórios sejam liberados durante a hidrólise ácida, neste estudo foram analisados o efeito apenas de alguns inibidores gerados da fração hemicelulósica, como o ácido acético, o furfural e o 5-HMF. De acordo com Rattanapoltee e kaewkannetra (2014), inibidores como o ácido acético podem influenciar negativamente o crescimento de microalgas, uma vez que este inibidor é capaz de atravessar a membrana celular diminuindo o pH intracelular, influenciando o metabolismo das células

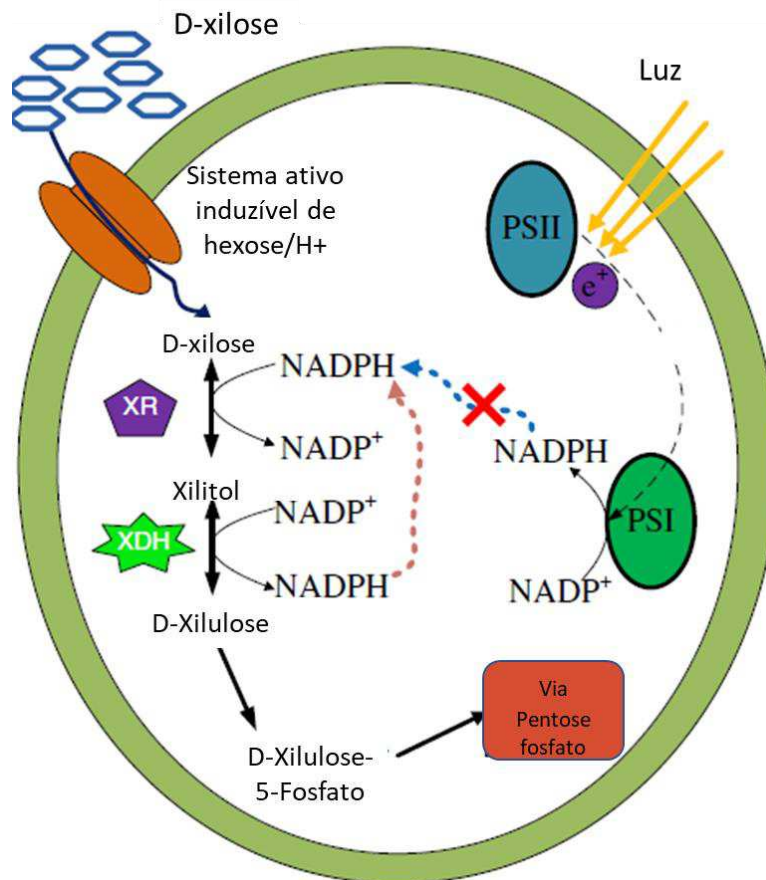
De acordo com Freitas *et al.* (2016), a incorporação de pentoses, como a xilose ajuda a reduzir os custos de produção de biomassa microalgal, considerando a ampla disponibilidade desses açúcares, componentes naturais das hemiceluloses, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose.

#### **3.4.2 Metabolismo de D-xilose por microalgas**

A xilose (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) é considerada um monossacarídeo do tipo aldopentose, ou seja, contém cinco átomos de carbono e inclui um grupo funcional formilo. A via metabólica de D-xilose proposta para a microalga *Chlorella sorokiniana* está representado na Figura 5.

A primeira etapa do metabolismo da xilose pelas microalgas ocorre com transporte desta pentose para o citoplasma celular. O transporte ocorre da membrana celular para dentro das células das microalgas através de um sistema ativo induzível de hexose/H<sup>+</sup>. O transporte é realizado por um sistema de alta afinidade específico para a xilose ou pelo compartilhamento de um sistema de transporte com a glicose, em um sistema de baixa afinidade. Segundo Zheng *et al.* (2014), os fatores limitantes na utilização do carbono orgânico incluem a permeabilidade celular à fonte de carbono orgânico, o transporte ativo da fonte de carbono e os fatores enzimáticos presentes no interior da célula.

**Figura 5** - Via metabólica de *D*-xilose proposta para a alga verde *Chlorella sorokiniana*



Fonte: ZHENG *et al.*, 2014. Adaptado.

XR: enzima Xilitol Redutase; XDH: enzima Xilitol Desidrogenase; PSI: Fotossistema I; PSII: Fotossistema II

Após penetrar na célula, a *D*-xilose será reduzida a xilitol pela enzima Xilitol Redutase (XR) e posteriormente desidrogenada em *D*-xilulose pela enzima Xilitol Desidrogenase (XDH). Finalmente, a *D*-xilulose será convertida em *D*-xilulose 5-fosfato e entrará na via das pentoses fosfato (PPP). O produto xilose-5-fosfato (X5P) formado na PPP é então convertido a 3-fosfoglicerato (3-PGA) e piruvato, precursores da biossíntese lipídica. Contudo, para que tais processos ocorram de maneira mais eficiente, estes precisam da energia e da coenzima NADPH gerados durante a fotossíntese a partir da energia luminosa, como ocorre em cultivos mixotróficos (SONG; PEI, 2018).

No cultivo mixotrófico e fotoautotrófico de microalgas, o complexo de coleta de luz (LHC) (clorofilas e carotenóides) absorve os fótons da luz solar como energia eletromagnética. Essa energia é utilizada pelo fotossistema II (PS II) para a oxidação catalítica da água, formando prótons, elétrons e oxigênio molecular. Os elétrons de baixo potencial são transferidos para a cadeia de transporte de elétrons para a redução da ferredoxina e, em seguida,

a formação de NADPH. Um gradiente eletroquímico é formado, e a liberação ocorre após a oxidação da água no lúmen dos tilacóides, que é usado para produzir ATP pela ATP sintase. Os produtos da fotossíntese (NADPH e ATP) servirão de substratos para o ciclo de Calvin-Benson, onde o CO<sub>2</sub> é fixado como moléculas C<sub>3</sub> que são assimiladas para formar açúcares, lipídios e outras biomoléculas essenciais para o crescimento celular (FARIAS; BERTUCCO, 2016).

### **3.5 Perspectivas da integração do bioetanol de primeira, segunda e terceira geração**

A utilização de um resíduo agroindustrial proveniente da produção de etanol como fonte de nutrientes para a produção de biocombustíveis de terceira geração pode ser inserida no contexto de biorrefinaria. Tal conceito compreende os processos necessários para a produção de biocombustíveis, energia e produtos de alto valor através da transformação de biomassas e equipamentos de processos, sendo considerado uma maneira promissora de mitigar os gases do efeito estufa (CHEW *et al.*, 2017; MARANDUBA *et al.*, 2016)

Segundo Klein, Bonomi e Maciel (2018), a integração de processos como o cultivo de microalgas em instalações industriais oferece como vantagens diretas a minimização de água, vapor de processo e requisitos de energia, redução de efluentes enviados para tratamento e redução de cargas contaminantes dispostas no meio ambiente como as emissões de NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub> e metais pesados (CHIA *et al.*, 2018).

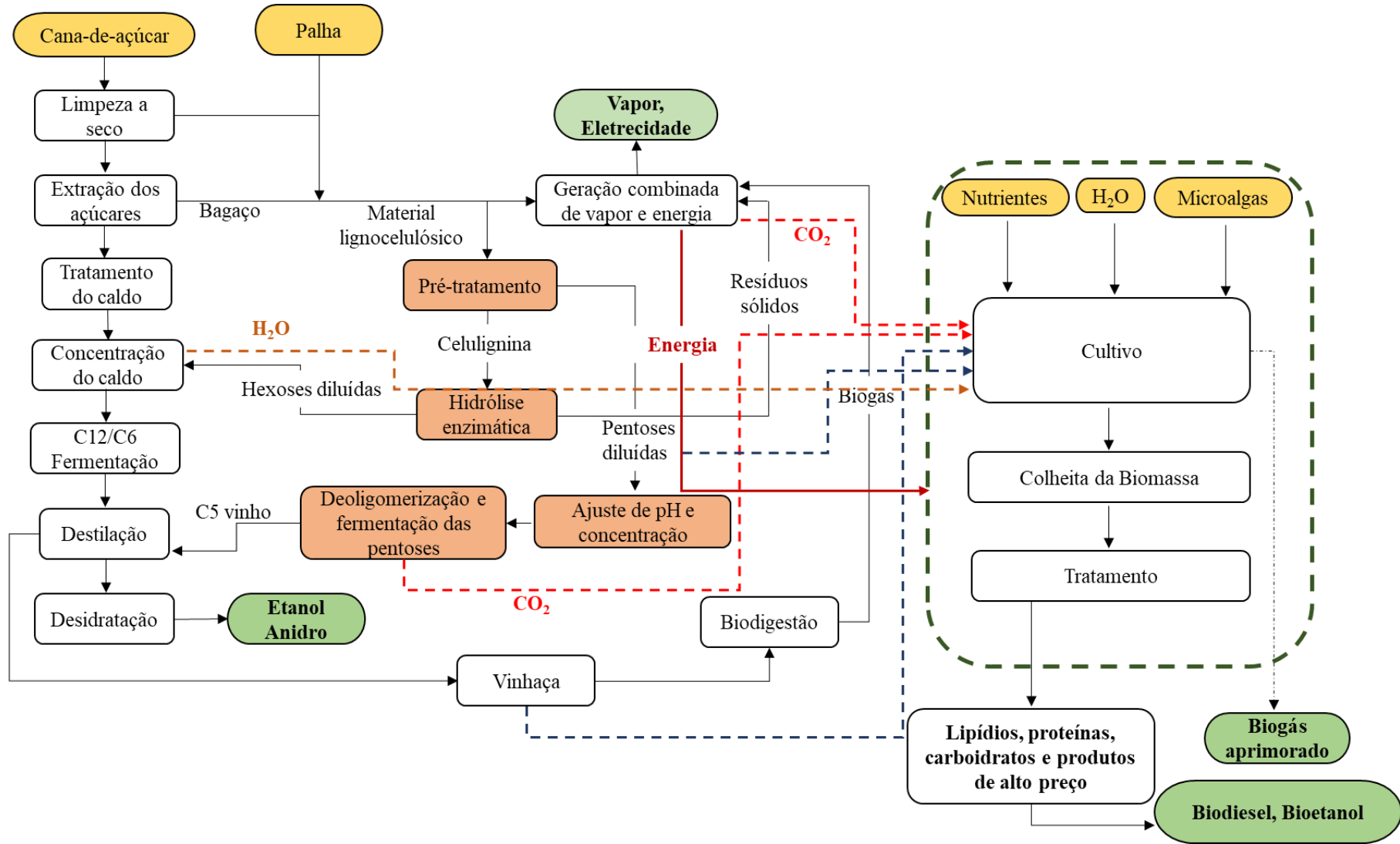
Uma das soluções encontradas para combater o alto custo de cultivo de microalgas em larga escala foi proposta por Gue *et al.* (2017), concentrando-se na integração do processo de produção das microalgas com a integração às usinas de cana-de-açúcar. No entanto, na integração proposta, somente o CO<sub>2</sub> é reaproveitado para o crescimento de microalgas, e o bagaço remanescente da produção de etanol é utilizado apenas para queima, e não como fonte de nutrientes (GUE *et al.*, 2017).

Na Figura 6 está um fluxograma simplificado de uma biorrefinaria de etanol de cana-de-açúcar considerando os processos integrados de primeira, segunda e terceira geração. Neste esquema de biorrefinaria, o cultivo de microalgas pode ser suplementado com a água proveniente da concentração do caldo da cana, o CO<sub>2</sub> gerado na produção de vapor e eletricidade e no processo de deoligomerização e fermentação das pentoses, além da utilização da vinhaça e das pentoses provenientes da hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar. A geração de vapor e eletricidade também é capaz de fornecer energia para todas as etapas de produção dos biocombustíveis de terceira geração (CAVALETT *et al.*, 2016; KLEIN; BONOMI; MACIEL, 2018; MONÇÃO *et al.*, 2018).



Tendo em vista este cenário, a integração da terceira geração de biocombustíveis em biorrefinaria 1G2G seria uma alternativa atraente para o reaproveitamento de rejeitos que poderiam influenciar de forma positiva na diminuição dos custos de tais biocombustíveis, além de minimizar os danos ambientais.

Figura 6 - Fluxograma simplificado de uma biorrefinaria de etanol considerando os processos integrados de primeira, segunda e terceira geração



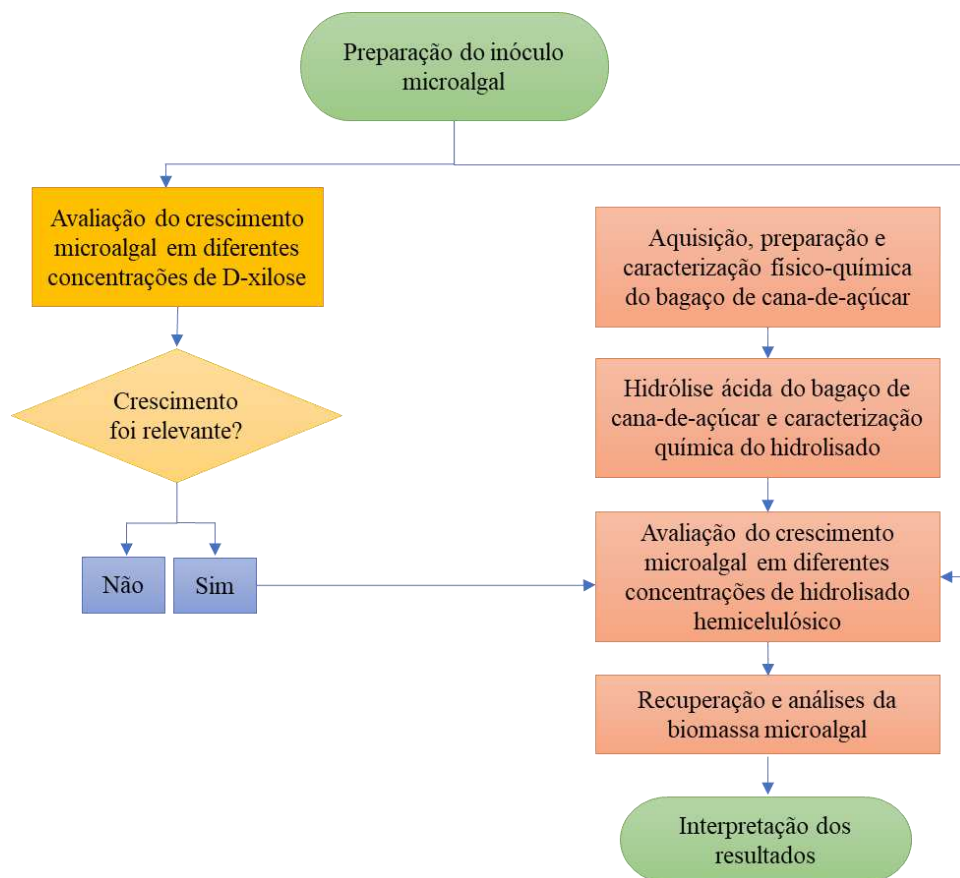
Fonte: Autor.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Microbiologia para Biocombustíveis (LabMBio) e no Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação (LabBBio) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Na Figura 7, a seguir, encontra-se o esquema das etapas empregadas na elaboração dessa pesquisa.

**Figura 7-** Fluxograma das etapas da pesquisa relacionada à produção de biomassa microalgal de *Desmodesmus* sp.



Fonte: Autor.

### 4.1 Obtenção de cultura unialgal e preparo do inóculo

A microalga do gênero *Desmodesmus*, pertencente ao banco de microrganismos do LabMBio, codificada por UFVJM-MBio15, foi utilizada como cultura para o estudo. Antecedendo os estudos, a cultura disponibilizada foi avaliada quanto a sua condição unialgal, por meio da técnica de *spread plate* empregando meio ágar Bold's Basal Medium (BBM) modificado (Tabela 2). O inóculo utilizado nos experimentos para produção de biomassa microalgal foi previamente cultivado nas mesmas condições utilizadas nos experimentos, ou

seja, cultivado em câmara de germinação (NEW LAB modelo NL-41/01) com iluminação constante, na temperatura de 28°C em meio BBM<sub>modificado</sub>. A microalga em estudo, proveniente do inóculo, foi caracterizada quanto seu estado de cultura pura, se unialgal, aspecto morfológico e tamanho com o auxílio de microscópio óptico (BEL Photonics) utilizando lentes objetivas de 100x.

**Tabela 2** - Composição do meio de cultura BBM<sub>modificado</sub> utilizado para cultivo microalgal

Componente	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	100,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	58,30
NaCl	25,00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	25,00
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	50,00
KOH	31,00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,82
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,44
MoO <sub>3</sub>	0,71
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,49

Fonte: PCHARA, 2016.

BBM: Bold's Basal Medium

Baseado em meio de cultura proposto por Nichols e Bold (1965).

#### 4.2 Estudo preliminar: avaliação da utilização de *D*-xilose como fonte de carbono orgânico pela microalga *Desmodesmus* sp.

A capacidade da microalga *Desmodesmus* sp. em metabolizar a *D*-xilose como fonte de carbono para seu crescimento foi inicialmente testada empregando concentrações diferentes de *D*-xilose (0, 3, 6 e 9 g L<sup>-1</sup>), em condições fotoautotrófica, mixotrófica e heterotrófica, como apresentado na Tabela 3. O meio de cultura utilizado foi o BBM<sub>modificado</sub> conforme descrito anteriormente com inóculo inicial de aproximadamente 0,9 g L<sup>-1</sup> de biomassa microalgal. Os experimentos foram realizados em biorreatores de vidro com capacidade total de 1500 mL, com volume útil de cultivo de 1000 mL, e relação C/N de 20 (Tabela 3). A incubação seguiu por sete dias em câmara germinadora (NEW LAB modelo NL-41/01) sob aeração com auxílio de um compressor de ar (BIG AIR A470 / 5W), com temperatura de 28°C, iluminação constante para os cultivos mixotróficos e fotoautotróficos (lâmpadas incandescentes FLC 90W), e na ausência de luz para os cultivos heterotróficos. O crescimento celular foi monitorado diariamente por densidade óptica (D.O) conforme descrita a seguir. O consumo de

xilose e nitrato de sódio foram monitorados diariamente conforme descrito nos itens 4.2.3 e 4.2.4, respectivamente. Ao final dos sete dias de cultivo, as biomassas obtidas foram centrifugadas a  $7,13 \times 10^3$  RCF por 10 min. e submetidas à desidratação em estufa (SP LABOR SP-400) a  $60^\circ\text{C}$  para posteriores análises. Os cultivos foram realizados em três repetições com o intuito de garantir a reprodutibilidade. Os sistemas testados foram codificados conforme as condições descritas Tabela 3.

**Tabela 3** - Concentrações de *D*-xilose como única fonte de carbono orgânico, nitrogênio e relação C/N nos cultivos mixotróficos e heterotróficos de *Desmodesmus* sp.

Condição cultivo	Experimento (Exp.)	Concentração de <i>D</i> -xilose (g L <sup>-1</sup> )	Concentração de nitrato de sódio (g L <sup>-1</sup> )	Relação C/N
Fotoautotrófico	0M	0,0	1,0	-
Mixotrófico	3M	3,0	0,4	20
Mixotrófico	6M	6,0	0,7	20
Mixotrófico	9M	9,0	1,1	20
Autotrófico	0H	0,0	1,0	-
Heterotrófico	3H	3,0	0,4	20
Heterotrófico	6H	6,0	0,7	20
Heterotrófico	9H	9,0	1,1	20

Fonte: Autor.

C/N: Relação Carbono/Nitrogênio

#### 4.2.1 Análise do crescimento celular

O crescimento celular avaliado pelo método de densidade óptica foi realizado a partir de 1,0 mL do cultivo microalgal, que foi transferido para microtubos tipo *Eppendorf*®, seguido de centrifugação a  $1,29 \times 10^4$  RCF por 10 min. O sobrenadante foi recolhido em microtubo tipo *Eppendorf*® e reservado para as posteriores determinações dos açúcares redutores (AR) e nitrato. O precipitado (*Pellet*) foi lavado com 1,0 mL de água destilada, e posteriormente submetido à leitura em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP22®) a 580 nm. A velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) foi calculada de acordo com a Equação 1, e o tempo de geração ( $t_g$ ) conforme a Equação 2.

$$\mu_x = \frac{\ln N_2 - N_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

onde:

$\mu_x$ : velocidade específica de crescimento (h<sup>-1</sup>)

$N_1$ : absorvância no início da fase exponencial

$N_2$  absorvância no final da fase exponencial

$t_1$ : tempo no início da fase exponencial ( $h^{-1}$ )

$t_2$ : tempo no final da fase exponencial ( $h^{-1}$ )

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_x} \quad (2)$$

onde:

$t_g$ : tempo de geração (h)

$\mu_x$ : velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

#### 4.2.2 *Quantificação da Biomassa microalgal*

Ao final do período de monitoramento do cultivo, as amostras foram transferidas para tubos *Falcon* de 50 mL e centrifugadas em centrífuga (MPW-350R) a  $7,13 \times 10^3$  RCF por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a biomassa microalgal obtida transferida para placas de Petri previamente desumidificadas em estufa a  $105^\circ\text{C}$ , seguidas de pesagem. As placas de Petri contendo as amostras foram mantidas em estufa a  $60^\circ\text{C}$  até peso constante. Em seguida, procedeu-se a pesagem para fins da determinação da biomassa microalgal (Equação 3) e seu rendimento (Equação 4). A produtividade volumétrica de biomassa ( $Q_B$ ) foi obtida dividindo-se a produção de biomassa pelo tempo total de cultivo.

$$\text{Biomassa microalgal} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{placa de Petri contendo amostra (g)} - \text{placa de Petri vazia (g)}}{\text{volume do cultivo centrifugado (L)}} \quad (3)$$

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Biomassa microalgal produzida (g)}}{\text{Açúcares consumidos (g)}} \quad (4)$$

Onde:

$Y_{X/S}$ : Rendimento de produção de biomassa microalgal ( $\text{g g}^{-1}$ ).

#### 4.2.3 *Quantificação dos Açúcares Redutores (AR)*

A quantificação dos açúcares redutores (*D*-xilose) presente nos cultivos foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). A quantificação foi realizada em microplacas, onde foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da amostra (sobrenadante proveniente da análise do crescimento celular) com a devida diluição e 100  $\mu\text{L}$  do reagente DNS. A reação contida em microplacas foi submetida à banho-maria (Novus N1040) por 30 min, seguido de resfriamento em banho de água com gelo e posterior leitura em leitora de microplacas (ASYS UVM 340) em uma absorvância de 540 nm. Uma curva analítica foi preparada utilizando *D*-xilose como padrão nas concentrações de 0 a  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , seguindo as

mesmas condições de preparo das amostras. Os resultados foram expressos  $\text{g L}^{-1}$  de xilose no cultivo.

#### **4.2.4 Quantificação de nitrato**

A quantificação de nitrato foi determinada por meio da reação colorimétrica desse íon com sulfato de brucina conforme proposto por Dos Santos, Pereira e Freire (2016). Para tanto, 1,0 mL da solução de sulfato de brucina ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$  de brucina em ácido sulfúrico 80%) foi adicionada a 0,25 mL dos sobrenadantes, seguida de incubação por 15 min. em banho-maria a  $100^\circ\text{C}$ , resfriamento em banho de água com gelo e leitura dos valores de absorvância a 410 nm. A curva de calibração foi preparada utilizando nitrato de sódio como padrão nas concentrações de 0 a  $0,05 \text{ g L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em  $\text{g L}^{-1}$  de nitrato no cultivo.

### **4.3 Caracterização bioquímica da biomassa microalgal**

A biomassa microalgal proveniente dos processos de desidratação dos cultivos da microalga descrita no item 4.2.2 foi macerada em cadinho de porcelana até obtenção de um fino pó para posterior quantificação dos teores de lipídios totais, amido solúvel, açúcares solúveis totais (AST), proteínas totais e carboidratos totais, conforme descrito a seguir.

#### **4.3.1 Análise do teor de lipídios**

Os lipídios totais foram quantificados segundo metodologia de Bligh e Dyer (1959). Em tubo Falcon contendo 50 mg da biomassa microalgal foram adicionados 1,6 mL de água destilada, 4 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio. Logo a seguir, os tubos contendo a reação foram envoltos em papel alumínio e submetidos à homogeneização em vórtex por aproximadamente 15 min., seguidos de repouso por 24 h. Após à reação foram adicionados 2 mL de clorofórmio e 2 mL de solução de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 1,5%, com posterior homogeneização por 2 min. As fases obtidas foram separadas através de centrifugação a  $7,13 \times 10^3$  RCF por 10 min., sendo a fase orgânica transferida para uma placa de Petri previamente desumidificada, com peso constante e conhecido. Após essa etapa, procedeu-se a secagem em estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 24 h seguidos de determinação gravimétrica da massa da fração lipídica. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de acordo com a Equação 5. A produtividade volumétrica lipídica ( $Q_L$ ) foi determinada multiplicando-se a produtividade volumétrica de biomassa ( $Q_B$ ) pelo teor de lipídios. Os resultados foram expressos em  $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{\text{Pf-Pi}}{\text{peso da amostra (g)}} * 100 \quad (5)$$

onde:

Pf: Peso da placa de Petri desumidificada e contendo os lipídios (g);

Pi: Peso inicial da placa de Petri vazia (g)

#### 4.3.2 Amido e açúcares solúveis totais (AST)

O teor de amido e açúcares solúveis totais presentes na biomassa microalgal foram determinados de acordo com a metodologia descrita por McCready *et al.* (1950). Em microtubos tipo *Eppendorf*® foram adicionados 0,02 g de biomassa microalgal e 1,5 mL de etanol 80%, seguidos de incubação em banho-maria a 90°C por 15 min. e posterior centrifugação a  $1,29 \times 10^4$  RCF por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o processo de lavagem da biomassa com etanol 80% foi realizado por mais duas vezes. Ao final das lavagens o sobrenadante foi avolumado com água destilada em balão volumétrico para posterior quantificação dos açúcares solúveis totais (AST). O precipitado remanescente das lavagens foi utilizado para a extração do amido conforme descrito abaixo.

A extração do amido foi realizada pela adição de 1,5 mL da solução de ácido perclórico 30% ao precipitado seguido de agitação vigorosa em vortex e repouso por 30 min. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a  $1,29 \times 10^4$  RCF por 10 min., e o sobrenadante, recuperado e transferido para balão volumétrico de 50 mL. O processo foi repetido por mais duas vezes, e ao final, o sobrenadante, contido no balão volumétrico, foi avolumado com água destilada para 50 mL.

As quantificações de amido e AST foram realizadas com solução de antrona 0,1% dissolvida em uma solução de ácido sulfúrico 76%. A determinação foi realizada em tubos de ensaio a partir de 0,5 mL do sobrenadante avolumado em balão volumétrico, adicionados de 2,5 mL da solução de antrona. Em seguida, os tubos contendo a reação foram incubados em banho-maria a 100°C por 10 min., seguidos de resfriamento em banho de água com gelo e posterior leitura a 620 nm. A curva analítica foi preparada utilizando *D*-glicose como padrão nas concentrações de 0 a 0,1 g.L<sup>-1</sup> adicionados da solução de antrona seguindo o mesmo procedimento empregado na amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem de AST e amido. A produtividade volumétrica de amido ( $Q_A$ ) e de AST ( $Q_{AST}$ ) foi determinada a partir da multiplicação dos valores da produtividade volumétrica de biomassa ( $Q_B$ ) pelo teor de amido e AST, respectivamente.

### 4.3.3 Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método do biureto descrita por Gornall, Bordawill e David (1949). Em microtubos tipo *Eppendorf*® contendo 5 mg da biomassa microalgal desumidificada e triturada foram adicionados 2 mL de NaOH 1,0 N para a hidrólise alcalina, seguido de banho-maria durante 1 h a 100°C. Após o resfriamento à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a  $1,29 \times 10^4$  RCF durante 10 min., e o sobrenadante reservado para a quantificação do teor de proteínas. O ensaio consistiu da adição de 1,0 mL do extrato alcalino e 4,0 mL do reagente de biureto ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,15% p/v; tartarato duplo de sódio e potássio 0,60% p/v; KI 1,00% p/v em NaOH 1,00 mol L<sup>-1</sup>), seguido de repouso por 30 min. na ausência de luz e leitura em espectrofotômetro a 550 nm. A curva analítica foi preparada utilizando uma solução padrão de albumina (2 g L<sup>-1</sup>) com gradiente de concentração de 0 a 2 g L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em porcentagem de proteínas por massa desumidificada de biomassa microalgal. A produtividade volumétrica de proteínas totais ( $Q_p$ ) foi determinada pela multiplicação do valor da produtividade volumétrica de biomassa ( $Q_B$ ) pelo teor de proteínas totais obtido.

### 4.3.4 Carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais seguiu a metodologia proposta por Dubois *et al.* (1956). O doseamento foi realizado a partir da amostra submetida ao processo de hidrólise alcalina conforme descrito no item 4.3.3. O ensaio consistiu na adição de 500 µL do extrato alcalino e 500 µL de fenol a 4 % em tubos de ensaio, seguido de repouso por 30 min. e posterior acréscimo de 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se a leitura de absorvância a 485 nm. A curva analítica foi preparada utilizando como padrão a glicose anidra com concentração igual a 300 µg mL<sup>-1</sup> com um gradiente de concentração de 0 a 240 µg mL<sup>-1</sup>. A produtividade volumétrica de carboidratos totais ( $Q_c$ ) foi determinada multiplicando-se a produtividade volumétrica de biomassa ( $Q_B$ ) pelo teor de carboidratos totais obtidos.

## 4.4 Aquisição da matéria-prima e preparo da biomassa lignocelulósica

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi doado pela Usina de Açúcar, Etanol e Geração de Energia Elétrica (USJ) – Unidade de Cachoeira Dourada – GO. O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido à lavagem com água destilada a fim de remover os açúcares residuais e posteriormente acondicionado em sacos de papel para a secagem a 65°C

em estufa (SP LABOR SP-400) com circulação de ar forçado por 48 h. Após esta etapa, este foi triturado em moinho tipo facas (SOLAB), e em seguida peneirado em peneiras de aço inoxidável com malha de 32 MESH para homogeneização do tamanho das partículas. Em seguida, a biomassa lignocelulósica obtida foi armazenada em recipientes plásticos cuidadosamente vedados e mantidos à temperatura ambiente ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ).

#### **4.4.1 Análise físico-química do bagaço de cana-de-açúcar**

A caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada a partir do bagaço processado (desidratado, triturado e peneirado) por meio da determinação dos teores de umidade, cinzas, lipídios totais (AOAC, 1992), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose, lignina, hemicelulose (VAN SOEST, 1967), amido (McCREADY *et al.*, 1950) e açúcares solúveis totais (DUBOIS *et al.*, 1956). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

##### **4.4.1.1 Umidade**

O teor de umidade foi determinado a partir de 1,0 g de bagaço processado contido em placas de Petri, previamente desumidificadas em estufa ( $105^\circ\text{C}$ ) e com massa conhecida. As placas de Petri contendo as amostras foram submetidas à desidratação em estufa a  $105^\circ\text{C}$ , até peso constante. O resultado foi calculado conforme a Equação 6 e expresso em porcentagem de umidade por massa desumidificadas de bagaço.

$$U\% = \frac{(P_{mi} - P_{mf})}{P_{mi}} * 100 \quad (6)$$

Onde:

$U\%$  = teor de umidade;

$P_{mi}$  = massa da placa Petri contendo a amostra úmida (g);

$P_{mf}$  = massa da placa Petri contendo a amostra desumidificadas (g).

##### **4.4.1.2 Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria com auxílio de balança analítica. Para tanto, em cadinhos de porcelana previamente calcinados em mufla (SP LARBOR modelo SP-1200DM/B) a  $550^\circ\text{C}$  por aproximadamente 1 h, seguidos de resfriamento em dessecador e posterior pesagem, foram adicionados 0,25 g do bagaço de cana-de-açúcar. Logo após, as

amostras contidas nos cadinhos foram carbonizadas em chama de bico de Bunsen e incineradas em mufla a 550°C por aproximadamente 5 h. Após completa incineração, os cadinhos contendo as amostras foram resfriados em dessecador e submetidos a pesagem. Os resultados foram expressos em gramas de cinzas por 100 g de matéria integral e posteriormente convertido em porcentagem conforme a Equação 7 a seguir.

$$C\% = \frac{(M_c - M_v)}{M_a} * 100 \quad (7)$$

Onde:

C% = teor de cinzas;

M<sub>c</sub> = massa do cadinho contendo as cinzas (g);

M<sub>v</sub> = massa do cadinho vazio (g);

M<sub>a</sub> = massa da amostra (g).

#### 4.4.1.3 Fibra solúvel em detergente ácido (FDA)

A quantificação do teor de FDA foi feita a partir de 0,25 g de amostra contidas em tubo de ensaio Tecnal, juntamente com 25 mL de solução de detergente ácida. As amostras contidas nos tubos foram digeridas em bloco digestor por 60 min. a 125°C e em seguida filtradas em filtros sinterizados, previamente desumidificados em estufas a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente seguida de lavagem com acetona para retirada total do detergente, e posteriormente submetidos à secagem em estufa a 105°C até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente ácido foi expresso em gramas de FDA por 100 g de bagaço de cana-de-açúcar e convertido em porcentagem conforme a Equação 8.

$$FDA\% = \frac{(F_{lv} - F_{vazio})}{\text{peso da amostra}} * 100 \quad (8)$$

Onde:

FDA % = teor de fibra bruta solúvel em detergente ácido, em porcentagem

F<sub>lv</sub> = massa do filtro com resíduo depois de lavado e desumidificado (g)

F<sub>vazio</sub> = massa do filtro vazio (g)

#### 4.4.1.4 Fibra solúvel em detergente neutro (FDN)

A quantificação do teor de FDN foi realizada a partir da digestão de 0,25 g de amostra contida em tubo Tecnal adicionada de 25 mL de solução de detergente neutro, e em bloco digestor por 60 min. a 125°C. Em seguida, o material foi filtrado em filtros de vidro sinterizados, previamente desumidificados em estufa a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente e posteriormente, com acetona para retirada

total do detergente. Em seguida, os filtros de vidro sinterizados contendo a amostra foram desumidificados em estufa a 105°C até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente neutro foi expresso em gramas de FDN por 100 gramas de torta, e posteriormente convertido em porcentagem conforme a Equação 9.

$$\text{FDN}\% = \frac{(\text{Fs} - \text{Fvazio})}{\text{peso da amostra}} * 100 \quad (9)$$

Onde:

FDN % = teor de fibra bruta solúvel em detergente neutro em porcentagem;

Fs = massa do filtro com resíduo depois de lavado e desumidificado (g);

Fvazio = massa do filtro vazio (g)

#### 4.4.1.5 Celulose

A determinação do teor de celulose foi realizada após a pesagem dos filtros sinterizados provenientes da análise de FDA, aos quais foram adicionados 30 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p) sob agitação vigorosa com auxílio de um bastão de vidro por aproximadamente 1 min. Após o escoamento completo do ácido, as amostras contidas nos filtros foram lavadas com água destilada fervente (95°C), por três vezes consecutivas, e, em seguida submetidas à secagem em estufa a 105°C, até peso constante. A massa de celulose foi obtida pela diferença da massa do filtro sinterizado antes e depois da adição da solução de ácido sulfúrico 72%. O resultado foi calculado de acordo com a Equação 10 descrita a seguir e expresso em porcentagem de celulose em 100 g de biomassa lignocelulósica desumidificada.

$$\text{Cel \%} = \frac{(\text{Fa} - \text{Fd})}{\text{peso da amostra de FDA}} * 100 \quad (10)$$

Onde:

Cel % = teor de celulose em porcentagem;

Fa = massa do filtro com resíduo antes da adição do ácido sulfúrico (g);

Fd = massa do filtro com resíduo depois da adição do ácido sulfúrico (g)

#### 4.4.1.6 Lignina

A quantificação do teor de lignina foi realizada a partir das amostras remanescentes da análise de celulose, as quais foram incineradas em mufla a 550°C. Após a completa incineração, os cadinhos de filtros sinterizados foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente (22±3°C). O teor de lignina foi calculado pela diferença entre a massa do cadinho de filtro sinterizado contendo amostra antes e após a incineração. Os resultados foram calculados

de acordo com a Equação 11 e expresso em porcentagem de lignina em 100 g de biomassa lignocelulósica desumidificada.

$$\text{Lig \%} = \frac{(F_a - F_m)}{\text{peso da amostra}} * 100 \quad (11)$$

Onde:

Lig % = teor de lignina em porcentagem;

F<sub>a</sub> = massa do cadinho de filtro sinterizado depois da adição do ácido sulfúrico (g);

F<sub>m</sub> = massa do cadinho de filtro sinterizado com resíduo depois da mufla (g)

#### 4.4.1.7 Hemicelulose

O teor de hemicelulose foi determinado pela diferença entre a massa da amostra remanescente da análise de FDN e a massa da amostra remanescente da análise de FDA. Os resultados foram calculados de acordo com a Equação 12 e expresso em porcentagem de hemicelulose em 100 g de biomassa lignocelulósica desumidificada.

$$\text{Hem \%} = m(\text{FDN}) - m(\text{FDA}) * 100 \quad (12)$$

Onde:

Hem % = teor de hemicelulose, em porcentagem;

m(FDA) = massa da amostra remanescente da análise de FDA (g);

m(FDN) = massa da amostra remanescente da análise de FDN (g).

#### 4.4.1.8 Lipídios ou extrato etéreo

A determinação do teor de lipídios foi realizada a partir de 1,0 g de bagaço de cana-de-açúcar previamente desidratado, triturado e peneirado, contido em cartucho de papel filtro qualitativo com porosidade de 12,5 µm. Em seguida, o cartucho contendo a amostra foi colocado na câmara do extrator tipo Soxhlet (TECNAL) acoplado a um balão de fundo chato de 250 mL, previamente desumidificados a 105°C e com massa conhecida. A extração foi conduzida por aproximadamente 8 h utilizando o éter etílico como solvente extrator. Após a extração, os balões contendo os lipídios foram submetidos à secagem a 105°C por aproximadamente 1 h, a fim de evaporar o solvente remanescente. Na sequência, os balões foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados em balança analítica. Os resultados foram expressos em g de lipídios por 100 g de biomassa lignocelulósica desumidificada e posteriormente convertido em porcentagem de lipídios conforme a Equação 13.

$$\text{LIP}\% = \frac{\text{M-P}}{\text{A}} * 100 \quad (13)$$

Onde:

LIP %= teor de lipídio, em porcentagem;

M = massa (g) do balão após a extração e secagem;

P = massa (g) do balão vazio;

A = massa (g) da amostra inicial.

#### 4.4.1.9 Amido e açúcares solúveis totais (AST)

Os teores de amido e açúcares solúveis totais presentes no bagaço de cana-de-açúcar foram determinados segundo a metodologia descrita por McCready (1950) conforme apresentado no item 4.3.2.

### 4.5 Preparo do hidrolisado a partir do bagaço de cana-de-açúcar

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada utilizando uma solução de 8% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (m/m) e uma razão sólido:líquido de 1:4 (m/m). A reação foi conduzida em autoclave vertical (STERMAX) à pressão constante de 1 atm e 100°C por 90 min. Em seguida, o hidrolisado foi neutralizado até pH próximo de 6,0 com hidróxido de cálcio e posteriormente filtrado em funil de *Buchner* utilizando papel de filtro qualitativo com porosidade de 12,5 µm sob vácuo. O hidrolisado foi caracterizado quanto à presença e concentração de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural por cromatografia de alta performance (HPLC) conforme descrito no item 4.5.1. O hidrolisado hemicelulósico também foi analisado quanto ao teor de proteínas totais como descrito no item 4.3.3.

#### 4.5.1 Análise química do hidrolisado ácido hemicelulósico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As concentrações de *L*-arabinose, *D*-xilose, *D*-glicose, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (5-HMF) e glicerol foram determinados através de cromatografia líquida com uso do sistema Shimadzu Prominence FPLC 20A, equipado com coluna Rezex ROA-Shodex® (300 x 7.5 mm) mantida a 60°C, usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0025 mol L<sup>-1</sup> como eluente a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A detecção por índice de refração (40°C) foi usada para a determinação dos açúcares, glicerol e ácido acético. O 5-HMF e furfural foram detectados por UV (254 nm). O volume de amostra injetado no cromatógrafo foi de 5 µL.

#### **4.6 Avaliação do hidrolisado hemicelulósico como fonte de nutrientes**

A capacidade da microalga *Desmodesmus* sp. em metabolizar a xilose presente no hidrolisado hemicelulósico proveniente do bagaço de cana-de-açúcar foi analisada utilizando a melhor condição encontrada anteriormente no item 4.2, utilizando diferentes concentrações de D-xilose. Para tanto, foi realizada uma análise dos açúcares redutores presentes no hidrolisado (ver item 4.2.3) para a determinação do volume de hidrolisado a ser utilizado no cultivo. O meio de cultura utilizado foi o BBM<sub>modificado</sub> na presença de hidrolisado hemicelulósico, com inóculo inicial de aproximadamente 0,9 g L<sup>-1</sup> de biomassa microalgal. Os experimentos foram realizados em biorreatores de vidro com capacidade total de 1500 mL, com volume útil de cultivo de 1000 mL, e relação C/N de 20. A incubação seguiu por sete dias em câmara germinadora (NEW LAB modelo NL-41/01) sob aeração com auxílio de um compressor de ar (BIG AIR A470 / 5W), com temperatura de 28°C e iluminação constante. Foi realizado o monitoramento diário do crescimento celular da microalga e do consumo de xilose e nitrato presente no meio de cultura. Ao final dos sete dias de cultivo, as amostras foram centrifugadas e submetidas à desidratação em estufa (SP LABOR SP-400) a 60°C para posteriores análises conforme descrito a seguir. Os cultivos foram realizados em três repetições com o intuito de garantir a reprodutibilidade.

##### **4.6.1 Análise do crescimento celular**

O crescimento celular foi acompanhado por aproximadamente sete dias por densidade óptica como descrito no item 4.2.1.

##### **4.6.2 Quantificação da biomassa microalgal**

A biomassa de microalgas foi quantificada seguindo a metodologia descrita no item 4.2.2.

##### **4.6.3 Quantificação dos açúcares redutores (AR) e nitrato**

A quantificação dos açúcares redutores e de nitrato presente nos meios de cultura foram realizados de acordo com os itens 4.2.3 e 4.2.4, respectivamente.

#### **4.7 Caracterização bioquímica da biomassa microalgal**

A análise do teor de lipídios, amido e AST, proteínas totais e carboidratos totais foram realizadas de acordo com os itens 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4, respectivamente.



#### **4.8 Análises estatística**

Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) empregando teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software Action Stat 3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção dos novos inóculos da microalga *Desmodesmus* sp. cultivada no meio BBM<sub>modificado</sub> em condição fotoautotrófica adquiridas a partir de culturas mais antigas disponíveis no laboratório, se apresentaram em culturas puras, unialgal, com características morfológicas de células solitárias e agrupadas em colônias de 2, 4 e 6 células dispostas linearmente, na mesma cultura. Quanto ao tamanho, foi observado diâmetro 2,90-8,24  $\mu\text{m}$  e comprimento de 5,44-17,79  $\mu\text{m}$ . Após dez dias de cultivo, foi possível visualizar a presença de espinhos nas extremidades de algumas colônias, conforme ilustrado na Figura 8, principal característica deste gênero.

**Figura 8** - Aspecto morfológico da microalga *Desmodesmus* sp. cultivada no meio Bold's Basal Medium (BBM) modificado após dez dias de cultivo

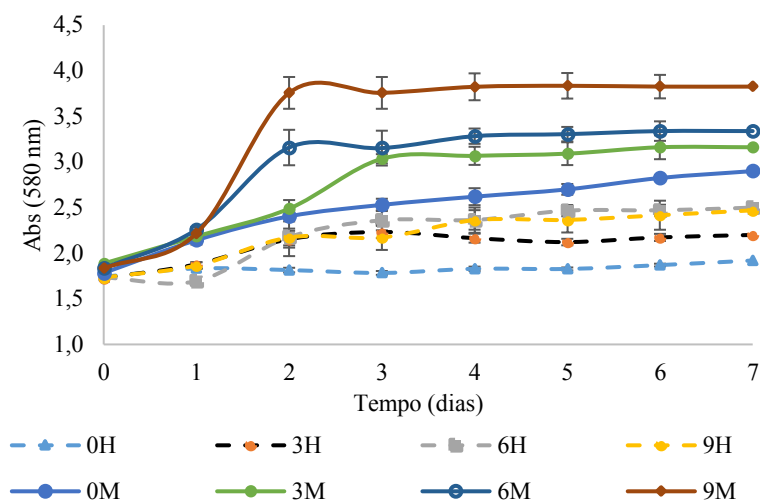


Fonte: Autor.  
*Desmodesmus* sp. (UFVJM-MBio15), observações feitas com lentes objetivas de 100x, com 10 dias de cultivo em meio BBM<sub>modificado</sub>. Barra de escala = 2,0  $\mu\text{m}$ .

### 5.1 Utilização de *D*-xilose como fonte de carbono orgânico por *Desmodesmus* sp.

O crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. cultivada em meio BBM<sub>modificado</sub> com diferentes concentrações de xilose após sete dias de cultivo em condições mixotrófica, heterotrófica e fotoautotrófica está representado na Figura 9. Quanto ao crescimento algal, foi observado que nas culturas mixotróficas cultivadas em meio BBM<sub>modificado</sub>, independente da concentração de xilose, houve ausência da fase *lag*. Esse fato pode estar atrelado às prévias condições de cultivo a qual foi submetido o microrganismo, ou seja, a condição de aclimação contribuiu de forma positiva para um melhor crescimento. Em contrapartida, todas as culturas heterotróficas contendo xilose apresentaram uma fase *lag* de 24 h., sugerindo ter ocorrido também influência da fonte luminosa nas condições de crescimento.

**Figura 9** - Crescimento celular por densidade óptica nos cultivos mixotrófico e heterotrófico para diferentes concentrações de xilose



Fonte: Autor.

0M: cultivo mixotrófico sem xilose; 3M: cultivo mixotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose; 6M: cultivo mixotrófico contendo 6 g L<sup>-1</sup> de xilose; 9M: cultivo mixotrófico contendo 9 g L<sup>-1</sup> de xilose; 0H: cultivo heterotrófico sem xilose; 3H: cultivo heterotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose; 6H: cultivo heterotrófico contendo 6 g L<sup>-1</sup> de xilose; 9H: cultivo heterotrófico contendo 9 g L<sup>-1</sup> de xilose.

Segundo Zheng *et al.* (2014), através das reações de fotossíntese são gerados NADPH, coenzima fundamental para a conversão da *D*-Xilose em xilitol que será posteriormente convertida em Xilulose-5-fosfato e utilizada na via das pentoses. O cultivo realizado sem adição de xilose (Exp. 0H), não apresentou crescimento satisfatório, pois até o sétimo dia de cultivo a concentração celular inicial se mostrou inalterada.

A fase inicial dos cultivos mixotróficos pode ser entendida como uma fase de transição para a fase exponencial, a qual é caracterizada pelo início da reprodução celular microbiana propriamente dita, refletindo em um aumento gradual, tanto da velocidade de reprodução como na velocidade de crescimento específico. Foi possível observar que essa fase perdurou por 24 h., seguida da fase logarítmica ou exponencial que perdurou por 48 h. Essa fase de crescimento celular é caracterizada pelo período de maior atividade metabólica com intensa reprodução celular. As condições de cultivos com 6 e 9 g L<sup>-1</sup> de xilose, Exp. 6M e 9M, (Figura 9) apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ )  $0,0132 \pm 0,0039$  h<sup>-1</sup> e  $0,0175 \pm 0,0031$  h<sup>-1</sup>, com tempos de geração ( $t_g$ )  $56,63 \pm 20,06$  h e  $40,45 \pm 07,17$  h, respectivamente, sendo essas estatisticamente semelhantes conforme apresentado na Tabela 4. O cultivo fotoautotrófico, Exp 0M, apresentou um  $\mu_x$  de  $0,0062 \pm 0,0012$  h<sup>-1</sup> sendo este menor em 2,82 vezes quando comparado com os resultados obtidos no Exp. 9M. O resultado obtido foi semelhante ao relatado por Leite *et al.* (2015) que obtiveram valores de 2,80 vezes nas mesmas condições experimentais utilizando a microalga do gênero *Chlorella* sp. Esse resultado

pode ser decorrente da utilização da xilose que desempenha um papel fundamental no metabolismo microalgal para produção de lipídios, ácidos nucleicos, nucleotídeos e diversos aminoácidos (ZHENG *et al.*, 2014).

A fase estacionária foi observada a partir do terceiro dia de crescimento nos cultivos heterotróficos e mixotróficos conduzidos com a fonte de carbono orgânico (xilose). Essa fase estendeu-se pelos sete dias de monitoramento, fato que pode estar relacionado à disponibilidade dos nutrientes no meio, como exemplo, a redução da fonte de carbono orgânico e nitrogênio.

**Tabela 4** - Parâmetros cinéticos do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. em diferentes concentrações de xilose e condições de cultivo

Exp.	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	$t_g$ (h)
0M	0,0062±0,0012 <sup>c</sup>	114,67±21,46 <sup>b</sup>
3M	0,0068±0,0005 <sup>c</sup>	102,36±8,29 <sup>b</sup>
6M	0,0132±0,0039 <sup>a,b</sup>	56,63±20,06 <sup>c,d</sup>
9M	0,0175±0,0031 <sup>a</sup>	40,45±7,17 <sup>d</sup>
0H	*	*
3H	0,0033±0,0002 <sup>c</sup>	213,73±13,95 <sup>a</sup>
6H	*	*
9H	*	*

Fonte: Autor.

0M: cultivo mixotrófico sem xilose; 3M: cultivo mixotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose; 6M: cultivo mixotrófico contendo 6 g L<sup>-1</sup> de xilose; 9M: cultivo mixotrófico contendo 9 g L<sup>-1</sup> de xilose; 0H: cultivo heterotrófico sem xilose; 3H: cultivo heterotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose; 6H: cultivo heterotrófico contendo 6 g L<sup>-1</sup> de xilose; 9H: cultivo heterotrófico contendo 9 g L<sup>-1</sup> de xilose.  $\mu_x$ : velocidade específica de crescimento;  $t_g$ : tempo de geração. \*: devido aos dados experimentais obtidos, não foi possível realizar o cálculo destes parâmetros cinéticos. Resultados com médias não seguidas pela mesma letra na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A inserção da fonte de carbono no meio de cultura favoreceu o crescimento dos cultivos mixotróficos e heterotróficos quando comparados aos cultivos realizados em meios isentos de xilose nas mesmas condições (Tabela 5). Contudo, os cultivos na presença de luz destacaram-se por apresentar maiores concentrações de biomassa microalgal ao final do cultivo.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados da produtividade volumétrica de biomassa, produção de biomassa, rendimento de produção de biomassa e consumo de xilose e nitrato para a microalga *Desmodesmus* sp. O cultivo fotoautotrófico (Exp. 0M) apresentou um consumo de nitrogênio de 6,32±3,90% com produção de 0,43±0,19 g L<sup>-1</sup> de biomassa microalgal e produção volumétrica de biomassa de 2,55±1,13 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. No cultivo conduzido na ausência de luz e de xilose (Exp. 0H), o consumo de nitrato foi de 11,95±7,90% com produção 0,17±0,02 g L<sup>-1</sup> de biomassa microalgal e produção volumétrica de biomassa de 1,02±0,14 mg.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Ao comparar os Exp. 0M e 0H, foi possível observar um aumento de 2,53 vezes na produção de biomassa microalgal na presença da fonte luminosa.

Numericamente, a maior produção ( $1,48 \pm 0,30 \text{ g L}^{-1}$ ) e produtividade volumétrica de biomassa microalgal ( $8,81 \pm 1,78 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foram encontrados no Exp. 9M. Entretanto, estes valores não diferiram significativamente dos encontrados nos Exp. 3M e 6M. O maior rendimento de produção de biomassa microalgal ( $0,46 \pm 0,03 \text{ g g}^{-1}$ ) foi obtido no Exp. 3M, uma vez que uma menor quantidade de xilose foi utilizada para produzir biomassa microalgal ( $1,44 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$ ). Em condições mixotróficas, a inserção da fonte de carbono orgânica aumentou a taxa de produção de biomassa microalgal em aproximadamente 3,35 vezes em comparação ao cultivo fotoautotrófico (Exp. 0M). A menor produção de biomassa de *Desmodesmus* sp. ( $0,17 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ ) foi encontrada no Exp. 0H na ausência de luz e de carbono orgânico. Na ausência de luz, menos coenzimas NADH são formadas nas células de microalgas, dificultando assim a conversão de *D*-xilose em xilitol.

**Tabela 5** - Consumo de xilose e nitrato para produção de biomassa da microalga *Desmodesmus* sp. para os cultivos mixotróficos e heterotróficos

Exp.	Xilose consumida (%)	Nitrato consumido (%)	Produção de Biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )	$Q_B$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	$Y_{x/s}$
0M	-	$6,32 \pm 3,90^c$	$0,43 \pm 0,19^c$	$2,55 \pm 1,13^b$	-
3M	$100,00 \pm 0,01^a$	$100,00 \pm 0,01^a$	$1,44 \pm 0,12^b$	$8,55 \pm 0,71^a$	$0,46 \pm 0,03^b$
6M	$100,00 \pm 0,01^a$	$95,95 \pm 0,97^a$	$1,40 \pm 0,62^b$	$8,30 \pm 3,68^a$	$0,23 \pm 0,10^c$
9M	$85,53 \pm 6,65^{a,b}$	$97,30 \pm 1,30^a$	$1,48 \pm 0,30^{a,b}$	$8,81 \pm 1,78^a$	$0,20 \pm 0,04^{c,d}$
0H	-	$11,95 \pm 7,90^c$	$0,17 \pm 0,02^c$	$1,02 \pm 0,14^b$	-
3H	$97,18 \pm 0,60^a$	$99,59 \pm 0,58^a$	$0,46 \pm 0,13^c$	$2,74 \pm 0,77^b$	$0,16 \pm 0,04^{c,d,e}$
6H	$89,35 \pm 1,43^{a,b}$	$99,53 \pm 0,67^a$	$0,36 \pm 0,15^c$	$2,12 \pm 0,88^b$	$0,07 \pm 0,03^{d,e}$
9H	$74,04 \pm 16,90^b$	$88,77 \pm 13,64^a$	$0,35 \pm 0,21^c$	$2,09 \pm 1,23^b$	$0,05 \pm 0,03^e$

Fonte: Autor

0M: cultivo mixotrófico sem xilose; 3M: cultivo mixotrófico contendo 3  $\text{g L}^{-1}$  de xilose; 6M: cultivo mixotrófico contendo 6  $\text{g L}^{-1}$  de xilose; 9M: cultivo mixotrófico contendo 9  $\text{g L}^{-1}$  de xilose; 0H: cultivo heterotrófico sem xilose; 3H: cultivo heterotrófico contendo 3  $\text{g L}^{-1}$  de xilose; 6H: cultivo heterotrófico contendo 6  $\text{g L}^{-1}$  de xilose; 9H: cultivo heterotrófico contendo 9  $\text{g L}^{-1}$  de xilose.  $Q_B$ : Produtividade volumétrica de biomassa;  $Y_{x/s}$ : Rendimento de produção de biomassa. Resultados com médias não seguidas pela mesma letra na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Yang *et al.* (2014) em seus estudos, utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus*, pertencente ao mesmo gênero da microalga em estudo, obtiveram uma produtividade volumétrica de biomassa de  $1,67 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em regime mixotrófico empregando meio BG-11 suplementado com 4  $\text{g L}^{-1}$  de xilose. A produtividade alcançada por estes autores foi cerca de 5,0 vezes inferior à encontrada no presente estudo utilizando 3  $\text{g L}^{-1}$  de xilose na presença de luz (Exp. 3M).

Leite, Paranjape e Hallenbeck (2016) estudando a microalga *Scenedesmus* sp. em cultivo mixotrófico com fotoperíodo de 12:12 h claro:escuro, com intensidade luminosa de

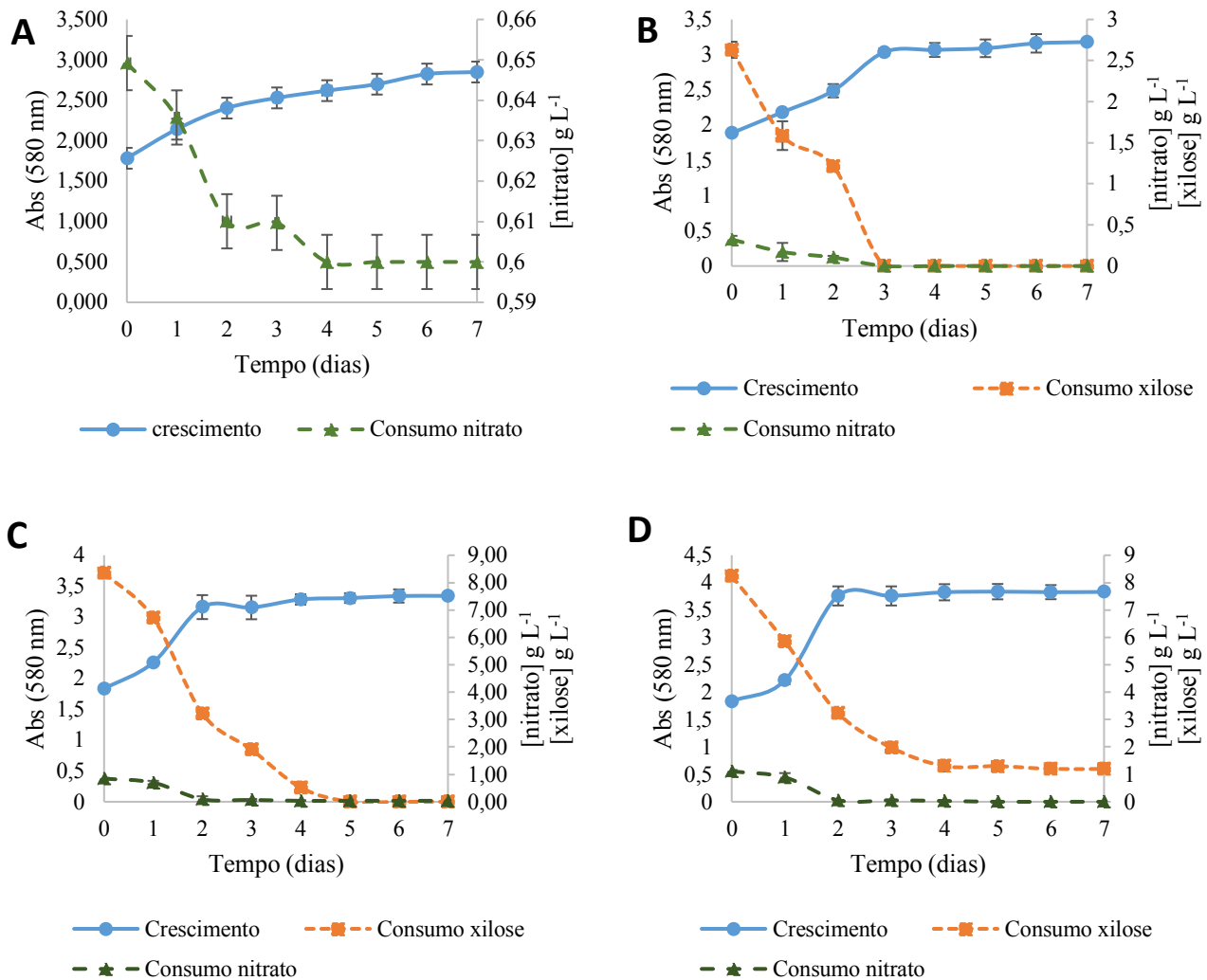
166  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , em meio BBM suplementado com 5  $\text{g L}^{-1}$  de xilose, obtiveram uma concentração de biomassa de  $0,191 \pm 0,029 \text{ g L}^{-1}$  e produtividade volumétrica de biomassa de  $1,45 \pm 5,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Os valores obtidos pelos autores foram inferiores em 7,3 e 5,7 vezes, respectivamente, em relação ao cultivo contendo 6  $\text{g L}^{-1}$  realizado no presente estudo.

A microalga *Desmodesmus* sp. foi capaz de consumir satisfatoriamente a xilose e o nitrato presentes no meio de cultura. Em todas as condições testadas, a fonte de carbono se esgotou antes do término do cultivo, exceto no cultivo heterotrófico contendo 9  $\text{g L}^{-1}$  de xilose (Exp. 9H), onde o consumo foi de  $74,04 \pm 16,90\%$ . Em relação à fonte de nitrogênio, houve o consumo total deste em todos os cultivos conduzidos em meio contendo a xilose (Exp. 3M, 6M, 9M, 3H, 6H e 9H).

Nas Figuras 10 e 11 foi possível observar a relação entre o crescimento da microalga e o consumo da fonte de carbono e nitrogênio em condições mixotróficas e heterotróficas, respectivamente. Foi observado que o esgotamento da fonte de nitrogênio influenciou diretamente no crescimento microalgal, fato que pode ser evidenciado pelo comportamento do crescimento refletido na fase estacionária, que se inicia independente da concentração de xilose, com o esgotamento dessa fonte.

Apesar da utilização da fonte de nitrogênio e carbono pela microalga, não houve a geração de biomassa microalgal em quantidades expressivas nos Exp. 3H, 6H e 9H. Nos experimentos heterotróficos, 3H, 6H e 9H, a fase estacionária se deu no terceiro dia de cultivo em decorrência do esgotamento da fonte de nitrogênio (Figura 11). Contudo, a fonte de carbono ainda não havia esgotado, indicando a importância da luz na absorção do carbono orgânico. Sugere-se para trabalhos futuros a otimização da relação C/N para o cultivo de *Desmodesmus* sp. contendo xilose e, que, a condução do bioprocessamento ocorra, utilizando a fonte de nitrogênio, em batelada alimentada.

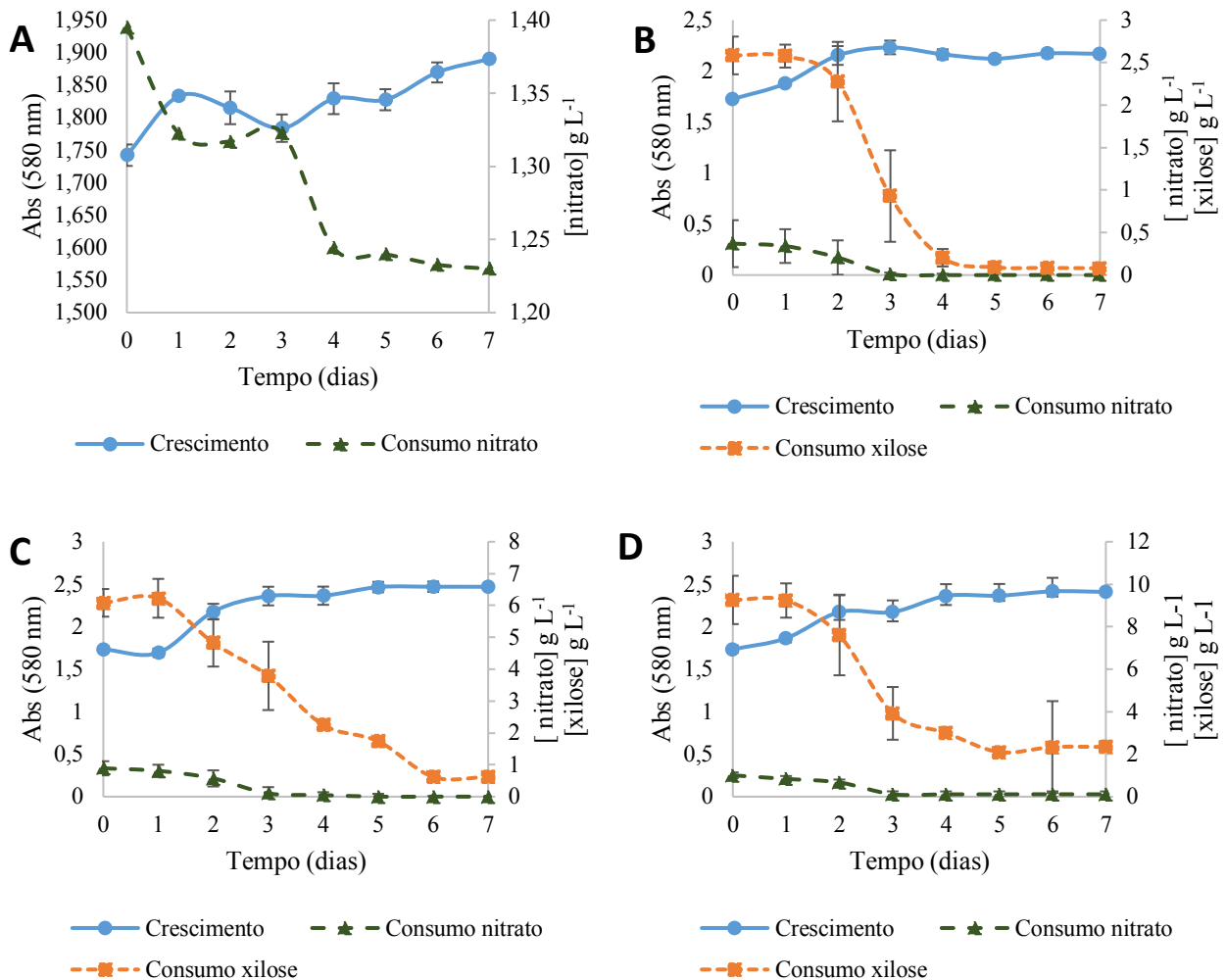
**Figura 10** - Crescimento celular e consumo de xilose e nitrato pela microalga *Desmodesmus* sp. em condição mixotrófica com sete dias de monitoramento. (A) Exp.0M; (B) Exp. 3M; (C) Exp. 6M; (D) Exp. 9M.



Fonte: Autor.

0M: cultivo mixotrófico sem xilose; 3M: cultivo mixotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose; 6M: cultivo mixotrófico contendo 6 g L<sup>-1</sup> de xilose; 9M: cultivo mixotrófico contendo 9 g L<sup>-1</sup> de xilose; Abs: absorbância.

**Figura 11** - Crescimento celular e consumo de carbono e nitrato pela microalga *Desmodesmus* sp. em condição heterotrófica com sete dias de monitoramento. (A) Exp.0H; (B) Exp. 3H; (C) Exp. 6H; (D) Exp. 9H.



Fonte: Autor.

0H: cultivo heterotrófico sem xilose; 3H: cultivo heterotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose; 6H: cultivo heterotrófico contendo 6 g L<sup>-1</sup> de xilose; 9H: cultivo heterotrófico contendo 9 g L<sup>-1</sup> de xilose; Abs: absorbância.

### 5.1.1 Caracterização bioquímica da biomassa microalgal utilizando xilose como fonte de carbono orgânico

A Tabela 6 apresenta os teores de lipídios, carboidratos totais, proteínas totais, amido e açúcares solúveis totais (AST) presentes na biomassa da microalga *Desmodesmus* sp. cultivada em meio com diferentes concentrações de xilose (0, 3, 6 e 9 g L<sup>-1</sup>) e condições de cultivo (fotoautotrófico, mixotrófico e heterotrófico).



**Tabela 6** - Caracterização bioquímica da biomassa de *Desmodesmus* sp. nos cultivos mixotróficos e heterotróficos

Exp.	Lipídios (%)	Amido (%)	AST (%)	Proteínas totais (%)	Carboidratos totais (%)
0M	10,44±0,22 <sup>a</sup>	6,91±1,44 <sup>a,b</sup>	8,26±1,18 <sup>a</sup>	15,54±3,89 <sup>b</sup>	12,08±2,31 <sup>b</sup>
3M	11,19±0,95 <sup>a</sup>	9,05±1,41 <sup>a</sup>	6,74±0,39 <sup>a,b</sup>	58,59±5,97 <sup>a</sup>	12,11±3,75 <sup>b</sup>
6M	11,11±0,28 <sup>a</sup>	7,39±0,62 <sup>a,b</sup>	4,87±1,09 <sup>b,c</sup>	56,16±10,34 <sup>a</sup>	12,01±0,68 <sup>b</sup>
9M	15,81±0,15 <sup>a</sup>	8,84±0,12 <sup>a</sup>	4,92±0,70 <sup>b,c</sup>	54,03±11,26 <sup>a</sup>	12,55±0,06 <sup>b</sup>
0H	13,65±1,63 <sup>a</sup>	2,83±0,59 <sup>c</sup>	3,01±0,40 <sup>c</sup>	14,25±8,09 <sup>b</sup>	7,90±0,01 <sup>b</sup>
3H	13,00±1,71 <sup>a</sup>	3,06±0,37 <sup>c</sup>	0,65±0,26 <sup>d</sup>	9,57±6,39 <sup>b</sup>	8,78±5,83 <sup>b</sup>
6H	13,32±1,46 <sup>a</sup>	3,17±0,14 <sup>c</sup>	0,64±0,07 <sup>d</sup>	21,92± 18,53 <sup>b</sup>	13,59±3,06 <sup>b</sup>
9H	12,56±1,43 <sup>a</sup>	3,09±0,04 <sup>c</sup>	0,64±0,402 <sup>d</sup>	20,26±13,03 <sup>b</sup>	9,50±1,81 <sup>b</sup>

Fonte: Autor.

0M: cultivo mixotrófico sem xilose; 3M: cultivo mixotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose; 6M: cultivo mixotrófico contendo 6 g L<sup>-1</sup> de xilose; 9M: cultivo mixotrófico contendo 9 g L<sup>-1</sup> de xilose; 0H: cultivo heterotrófico sem xilose; 3H: cultivo heterotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose; 6H: cultivo heterotrófico contendo 6 g L<sup>-1</sup> de xilose; 9H: cultivo heterotrófico contendo 9 g L<sup>-1</sup> de xilose. AST: Açúcares solúveis totais; Resultados com médias não seguidas pela mesma letra na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os resultados obtidos revelaram que a concentração de lipídios não diferiu significativamente dentre os cultivos testados. Numericamente, a maior produção lipídica (15,81±0,15%) foi obtida no Exp. 9M, utilizando 9 g L<sup>-1</sup> de xilose em condições mixotróficas. Os maiores teores de amido presentes nas biomassas microalgais foram obtidos nos cultivos mixotróficos (Exp. 0M, 3M, 6M e 9M) apresentando valores estatisticamente semelhantes. Dentre estes cultivos mixotróficos, o Exp. 3M obteve uma maior quantidade de amido (9,05±1,41%) e apresentou um aumento de cerca de 2,6 vezes no teor de amido em condições mixotróficas, quando comparado aos cultivos heterotróficos. A maior concentração de açúcares solúveis totais (8,26±1,18%) foi encontrada em condições fotoautotróficas (Exp. 0M). Contudo, tal concentração não diferiu significativamente do Exp. 3M.

Os cultivos mixotróficos na presença de xilose apresentaram um maior teor de proteínas totais quando comparados aos demais cultivos. O maior teor de proteínas (58,59±5,97%) foi encontrado no Exp. 3M, não diferindo significativamente dos Exp. 6M e 9M. A fração proteica das microalgas não são utilizadas para a produção de biocombustíveis, apesar de apresentarem outras finalidades.

Quanto à produção de carboidratos totais, essa não diferiu significativamente dentre os cultivos testados. Numericamente, o maior teor de carboidratos totais (13,59±3,06%) foi encontrado no Exp. 6H. Na dosagem dos carboidratos totais estão inseridos o amido, os açúcares solúveis totais e os carboidratos presentes na membrana das células de microalgas como, por exemplo, a celulose e a hemicelulose. Segundo Reshma e Arumugam (2017), a parede celular de *Scenedesmus quadricauda*, micro-organismo morfologicamente semelhante

ao estudado, é constituída por três camadas, sendo a camada exterior rígida e composta por pectina, a camada interior constituída por celulose, e uma fina camada intermediária. De acordo com Takeda (1996), os açúcares encontrados na parede rígida de espécies do gênero *Scenedesmus* são a glicose (principal), manose e galactose, não sendo encontrada a glucosamina.

O cultivo mixotrófico de *Scenedesmus obliquus* em xilose ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ) relatado por Yang *et al.* (2014) apresentou um teor (p/p) de lipídios de  $19,2 \pm 0,6\%$ ; teor de carboidratos de  $6,1 \pm 0,3\%$  e teor de proteína de  $6,2 \pm 0,4\%$ . Comparando o cultivo fotoautotrófico, estes autores relataram um aumento de 1,25 vezes no teor de lipídios e 1,1 vezes no teor de proteína em cultivo mixotrófico. Para o teor de carboidratos, estes observaram que houve um decréscimo de 0,68 vezes nas mesmas condições de cultivo.

Embora os teores dos compostos presentes na biomassa microalgal sejam importantes para determinar sua viabilidade como matéria-prima para produção de biocombustíveis, é necessário também ponderar os teores com relação a produtividade volumétrica de biomassa obtida em cada experimento. A Tabela 7 mostra as produtividades volumétricas dos compostos bioquímicos analisados.

**Tabela 7** - Produtividade volumétrica dos compostos bioquímicos presentes na biomassa de *Desmodesmus* sp. nos cultivos mixotróficos e heterotróficos

Exp.	$Q_L$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	$Q_A$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	$Q_{AST}$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	$Q_{Prot}$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	$Q_C$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
0M	$0,266 \pm 0,008^{d,e}$	$0,176 \pm 0,045^b$	$0,211 \pm 0,030^b$	$0,396 \pm 0,099^c$	$0,308 \pm 0,059^c$
3M	$0,956 \pm 0,115^c$	$0,773 \pm 0,170^a$	$0,576 \pm 0,045^a$	$5,009 \pm 0,001^b$	$1,036 \pm 0,320^b$
6M	$0,922 \pm 0,028^c$	$0,614 \pm 0,073^a$	$0,447 \pm 0,118^a$	$4,461 \pm 0,858^b$	$0,997 \pm 0,057^b$
9M	$1,393 \pm 0,028^a$	$0,779 \pm 0,015^a$	$0,434 \pm 0,075^a$	$4,760 \pm 0,992^b$	$1,106 \pm 0,005^b$
0H	$0,139 \pm 0,020^e$	$0,029 \pm 0,006^b$	$0,031 \pm 0,005^c$	$0,145 \pm 0,083^c$	$0,081 \pm 0,001^c$
3H	$0,356 \pm 0,089^d$	$0,084 \pm 0,015^b$	$0,018 \pm 0,009^c$	$0,262 \pm 0,175^c$	$0,139 \pm 0,079^c$
6H	$0,282 \pm 0,038^{d,e}$	$0,067 \pm 0,004^b$	$0,014 \pm 0,002^c$	$0,600 \pm 0,398^c$	$0,288 \pm 0,065^c$
9H	$0,262 \pm 0,037^{d,e}$	$0,065 \pm 0,000^b$	$0,013 \pm 0,010^c$	$0,424 \pm 0,272^c$	$0,199 \pm 0,038^c$

Fonte: Autor.

0M: cultivo mixotrófico sem xilose; 3M: cultivo mixotrófico contendo  $3 \text{ g L}^{-1}$  de xilose; 6M: cultivo mixotrófico contendo  $6 \text{ g L}^{-1}$  de xilose; 9M: cultivo mixotrófico contendo  $9 \text{ g L}^{-1}$  de xilose; 0H: cultivo heterotrófico sem xilose; 3H: cultivo heterotrófico contendo  $3 \text{ g L}^{-1}$  de xilose; 6H: cultivo heterotrófico contendo  $6 \text{ g L}^{-1}$  de xilose; 9H: cultivo heterotrófico contendo  $9 \text{ g L}^{-1}$  de xilose.  $Q_L$ : Produtividade volumétrica lipídica;  $Q_A$ : Produtividade volumétrica de amido;  $Q_{AST}$ : Produtividade volumétrica de açúcares solúveis totais;  $Q_{Prot}$ : Produtividade volumétrica de proteínas totais;  $Q_C$ : Produtividade volumétrica de carboidratos totais. Resultados com médias não seguidas pela mesma letra na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Analisando a Tabela 7, percebeu-se que as maiores produtividades de cada composto bioquímico foram encontradas em condições mixotróficas. A maior produtividade de lipídios ( $1,393 \pm 0,028 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) deu-se no Exp. 9M, e a menor ( $0,139 \pm 0,020 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) no Exp. 0H, com valores estatisticamente semelhantes aos Exp. 0M, 6H e 9H. A maior

produtividade de amido ( $0,779\pm 0,015$  mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) também foi encontrada no Exp. 9M, com valores semelhantes aos Exp. 3M e 6M. A maior produtividade de AST foi observada no Exp. 3M, com valores estatisticamente semelhantes ao Exp. 6M e 9M. A maior produtividade de proteínas e de carboidratos deu-se nos cultivos mixotróficos na presença de xilose (Exp. 3M, 6M e 9M), apresentando uma produtividade máxima de proteínas ( $5,009\pm 0,001$  mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) no Exp. 3M e de carboidratos ( $1,106\pm 0,005$  mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) no Exp. 9M.

Os maiores valores de produtividade de biomassa microalgal e de compostos bioquímicos foram obtidos nos Exp. 9M e 3M, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Nesse sentido, a condição de cultivo contendo a menor concentração de xilose (Exp. 3M) foi selecionada para averiguar a capacidade da microalga *Desmodesmus* sp. em metabolizar os açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico nessa concentração. Tal cultivo foi codificado como Exp. 3MH.

## 5.2 Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar

Na Tabela 8 encontra-se a composição físico-química do bagaço de cana-de-açúcar reportado por diferentes autores, bem como os dados obtidos neste estudo. Os dados referentes à fração hemicelulósica ( $33,58\pm 0,22\%$ ) e celulósica ( $43,09\pm 0,18\%$ ) encontrados neste trabalho foram próximos aos obtidos pelos autores relacionados na Tabela 8. O resultado obtido para a fração hemicelulósica foi satisfatório, uma vez que o açúcar de interesse, a *D*-xilose, está presente em maior quantidade nessa fração.

Quanto ao teor de lignina, na biomassa lignocelulósica estudada, foi observado que este apresentou uma fração de  $10,20\pm 0,52\%$ , corroborando com os estudos de Soares *et al.* (2015), Gomes *et al.* (2013) e Oliveira (2011). Este resultado foi oportuno, uma vez que se trata de um componente estrutural que se configura em uma das barreiras enfrentadas para a obtenção dos açúcares fermentescíveis presentes na celulose e hemicelulose. Sendo assim, quanto menor a fração de lignina presente no bagaço, mais facilmente ocorrerá a conversão da fração hemicelulósica em *D*-xilose. Embora a fração celulósica não seja o foco deste estudo, essa também deve ser levada em consideração, uma vez que contém açúcares como a glicose, os quais são utilizados como fonte de carbono no cultivo de microalgas.

A fração de cinzas encontrada no presente trabalho ( $4,01\pm 0,12\%$ ) foi superior aos reportados na literatura, conforme descrito na Tabela 8, exceto quando comparado aos dados obtidos por Freitas *et al.* (2016), que obteve um teor de cinzas de 4,34%, o que representa cerca de 1,1 vezes maior ao valor aqui encontrado. De acordo com Cacuro e Waldman (2015), a

composição química das cinzas pode variar em função dos parâmetros aplicados no processo de incineração como a temperatura e o tempo.

De acordo com Soares *et al.* (2015), a variação na composição físico-química do bagaço de cana-de-açúcar pode ainda ser influenciada pelo seguintes parâmetros: variedade de cana-de-açúcar, condições ambientais, como o tipo de solo, técnicas de colheita e manuseio empregado durante o crescimento, maturação das canas e eficiência de extração do caldo.

### **5.3 Utilização do hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono orgânico por**

#### ***Desmodesmus sp.***

O hidrolisado obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar apresentou-se livre de partículas, coloração amarelada, límpido e translúcido. O volume total de hidrolisado obtido foi de 500 mL a partir de 200 gramas de bagaço triturado. A seguir, encontra-se a caracterização química do hidrolisado hemicelulósico e o efeito dos seus componentes no crescimento da microalga *Desmodesmus sp.*

#### ***5.3.1 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico***

A Tabela 9 apresenta as concentrações dos teores de açúcares e compostos inibitórios presentes no hidrolisado hemicelulósico obtido no presente estudo em comparação ao encontrado na literatura.

Os resultados dos açúcares obtidos, em especial a xilose, evidenciaram que a hidrólise ácida realizada foi capaz de hidrolisar satisfatoriamente a hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar.

Rattanapoltee e Kaewkannetra (2014) realizaram a hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar utilizando ácido sulfúrico 0,5% (v/v). A concentração de ácido utilizada por estes autores foi 16 vezes menor do que a empregada neste estudo, o que certamente gerou baixos teores de inibidores, todavia, também proporcionou baixos teores de açúcares.

**Tabela 8** - Composição físico-química do bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São João – Grupo Cargill comparado com dados obtidos na literatura.

Parâmetros (%)	Autor	ROCHA; MULINARI, 2017	PANDEY <i>et al.</i> , 2000	MORAIS; ALSINA; GOMES, 2007	SOARES <i>et al.</i> , 2017	CANILHA <i>et al.</i> , 2007	FREITA <i>et al.</i> , 2016	SOARES <i>et al.</i> , 2015	GOMES <i>et al.</i> , 2013	OLIVEIRA, 2011
Umidade	0,04± 0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipídios	1,48±0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cinzas	4,01±0,12	2,70	2,40	-	1,89	1,61	4,34	1,66	-	-
AST	1,62±0,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	3,81±0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FDA	51,69±0,46	-	-	-	-	-	-	52,60	51,17	46,36
FDN	85,82±0,73	-	-	-	-	-	-	80,25	80,02	66,58
Celulose	43,09±0,18	45,40	50,00	26,60 - 54,30	-	46,86	42,62	37,92	40,45	35,65
Hemicelulose	33,58±0,22	28,70	25,00	14,30 - 24,40	-	27,50	26,20	25,40	28,85	23,51
Lignina	10,20±0,52	23,40	25,00	22,70 - 29,70	15,72 - 20,88	26,27	22,54	11,00	10,72	9,47

Fonte: Autor

AST: Açúcares solúveis totais; FDA: Fibra solúvel em detergente ácido; FDN: Fibra solúvel em detergente neutro.

**Tabela 9** - Composição dos açúcares, inibidores e proteínas totais presentes no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São João (Grupo Cargill), comparada com dado obtido na literatura.

Composição (g L <sup>-1</sup> )	Autor	Rattanapoltee e Kaewkannetra (2014)
Glicose	1,71	16,32±0,27
Xilose	23,52	10,29±0,23
Arabinose	4,05	1,22±0,10
Açúcares totais	58,6	49,18±0,25
Ácido acético	4,68	5,40±0,05
Furfural	0,02	0,12±0,10
5-HMF	0,12	ND
Proteínas totais	10,29±0,64	ND

Fonte: Autor.

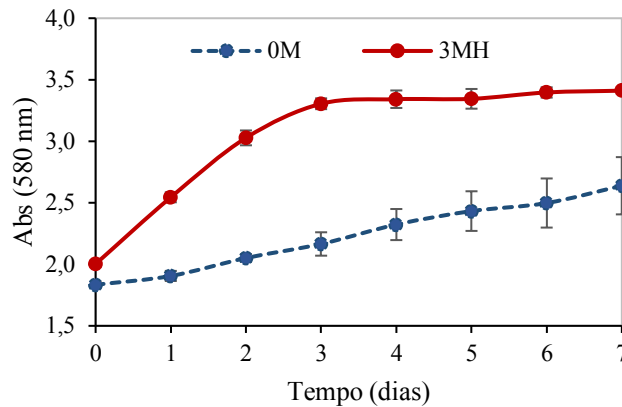
5-HMF: hidroximetilfurfural; ND: não detectado

Dentre os inibidores encontrados, a maior concentração obtida foi de ácido acético, produto da hidrólise do grupo acetila da hemicelulose, o qual pode influenciar negativamente no metabolismo das microalgas em concentrações entre 4 a 10 g L<sup>-1</sup> (RATTANAPOLTEE; KAEWKANNETRA, 2014). Vale ressaltar que o valor obtido de ácido acético (4,68 g L<sup>-1</sup>) foi inferior ao citado na literatura (Tabela 9) mesmo empregando uma maior concentração de ácido sulfúrico no processo de hidrólise. Os compostos furfural e 5-HMF, inibidores resultantes da degradação da celulose e dos xilanos da hemicelulose, foram encontrados em concentrações de 0,02 e 0,12 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. O valor de furfural obtido foi 6,0 vezes inferior ao reportado na literatura.

### 5.3.2 Avaliação do crescimento de *Desmodesmus sp.* em hidrolisado hemicelulósico

Na Figura 12 encontra-se o perfil de crescimento observado durante sete dias de cultivo da microalga *Desmodesmus sp.* em meio contendo hidrolisado hemicelulósico (Exp. 3MH) e cultivo fotoautotrófico (Exp. 0M). A fase inicial do Exp. 3MH foi diferenciada pela fase exponencial, caracterizada pela intensa reprodução celular, com uma velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) de 0,0086±0,0007 h<sup>-1</sup> e tempo de geração ( $t_g$ ) de 80,87±6,65 h (Tabela 10). Os resultados de  $\mu_x$  e  $t_g$  não diferiram significativamente quando comparados aos encontrados nos Exp. 0M, 3M, 6M e 3H. A fase exponencial teve duração de 3 dias, e logo em seguida deu-se a fase estacionária, que se estendeu até o final do monitoramento.

**Figura 12** - Crescimento celular da microalga *Desmodesmus* sp. cultivada na presença de luz em meio de cultura contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose (Exp. 3MH) e sem adição de xilose (Exp. 0M)



Fonte: Autor.

0M: Cultivo fotoautotrófico (controle) sem xilose; 3MH: Cultivo mixotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose em hidrolisado hemicelulósico.

**Tabela 10** - Parâmetros cinéticos do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. cultivada na presença de luz em meio de cultura contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose em hidrolisado hemicelulósico (Exp. 3MH) e sem adição de xilose (Exp. 0M)

Exp.	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	$t_g$ (h)
0M	0,0062±0,0012 <sup>a</sup>	114,67±21,46 <sup>b</sup>
3MH	0,0086±0,0007 <sup>a</sup>	80,87±6,65 <sup>b</sup>

Fonte: Autor.

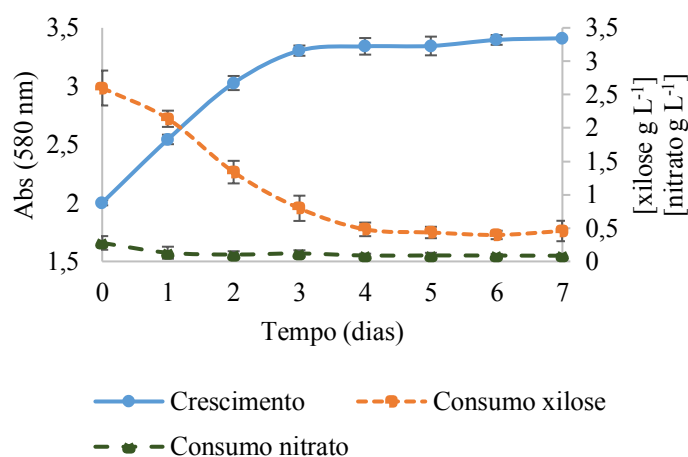
$\mu_x$ : velocidade específica de crescimento;  $t_g$ : tempo de geração; 0M: Cultivo fotoautotrófico (controle); 3MH: Cultivo mixotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose em hidrolisado hemicelulósico.

Na Figura 13 está representado o comportamento do crescimento celular e do consumo das fontes de carbono (xilose) e nitrogênio (nitrato) pela microalga *Desmodesmus* sp. em condição mixotrófica empregando hidrolisado hemicelulósico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose. Neste experimento foi possível observar que a microalga *Desmodesmus* sp. foi capaz de utilizar a xilose e o nitrogênio presentes no hidrolisado como fonte de nutrientes, apresentando ao final de sete dias de cultivo, um consumo total de 97,10±3,16% e de 70,00±1,55% de xilose e nitrato de sódio, respectivamente (Tabela 11).

A produção de biomassa microalgal no Exp. 3MH (2,20±0,07 g L<sup>-1</sup>) foi 1,53 vezes superior à encontrada no Exp. 3M (1,44±0,12 g L<sup>-1</sup>) e 5,1 vezes superior ao encontrado no Exp. 0M (cultivo fotoautotrófico). A produtividade volumétrica de biomassa foi de 11,48±0,39 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, com um rendimento de produção de biomassa de 0,86±0,03, conforme apresentado na Tabela 11. A produção de biomassa microalgal no Exp. 3MH não diferiu estatisticamente do encontrado no Exp. 9M, assim como a produtividade volumétrica de biomassa nos Exp. 3M, 6M e 9M.

No estudo envolvendo o cultivo da microalga *Scenedesmus acutus* em hidrolisado de cana-de-açúcar, contendo  $5 \text{ g L}^{-1}$  em açúcares totais, foi reportado uma quantidade de biomassa microalgal de  $2,12 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$  e produtividade volumétrica de biomassa de  $4,42 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ao final de 26 dias de cultivo (RATTANAPOLTEE & KAEWKANNETRA, 2014). No presente estudo, obteve-se uma produtividade volumétrica ( $11,48 \pm 0,39 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) 2,6 vezes maior no Exp. 3MH do que a reportada por estes autores em um período de sete dias de cultivo.

**Figura 13** - Crescimento celular e consumo de carbono e nitrato pela microalga *Desmodesmus* sp. cultivada na presença de luz em meio de cultura contendo  $3 \text{ g L}^{-1}$  de xilose em hidrolisado hemicelulósico (Exp. 3MH)



Fonte: Autor.  
Abs: absorvância

**Tabela 11** – Resultado dos parâmetros relacionados ao consumo de xilose e nitrato na produção de biomassa de *Desmodesmus* sp. nos Exp. 0M e 3MH

Exp.	Xilose consumida (%)	Nitrato consumido (%)	Produção de Biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )	$Q_B$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	$Y_{x/s}$
0M	-	$6,32 \pm 3,90^a$	$0,43 \pm 0,19^b$	$2,55 \pm 1,13^b$	-
3MH	$97,10 \pm 3,16^a$	$70,00 \pm 1,55^b$	$2,20 \pm 0,07^a$	$11,48 \pm 0,39^a$	$0,86 \pm 0,03$

Fonte: Autor.

$Q_B$ : Produtividade volumétrica de biomassa;  $Y_{x/s}$ : Rendimento de produção de biomassa; 0M: Cultivo fotoautotrófico (controle) sem xilose; 3MH: Cultivo mixotrófico contendo  $3 \text{ g L}^{-1}$  de xilose em hidrolisado hemicelulósico. Resultados com médias não seguidas pela mesma letra na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na Tabela 12 encontra-se a composição do hidrolisado hemicelulósico no início (0 dias) e término (7 dias) do cultivo nas condições do Exp. 3MH. A produção de biomassa microalgal neste cultivo provavelmente foi favorecida pela adição de outros açúcares como a glicose e arabinose, que também foram consumidos pela microalga em estudo. Foi possível, também, observar que os compostos inibidores, tais como, ácido acético e 5-HMF e ainda, o



glicerol, não foram detectados ao final dos sete dias de cultivo, sugerindo que estes foram consumidos pela microalga. O hidrolisado hemicelulósico em questão, também continha proteínas totais em sua composição, aproximadamente  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , fato que pode ter favorecido o cultivo microalgal, pois essas são macromoléculas essenciais em praticamente todos os processos celulares e desempenham reações bioquímicas vitais para o metabolismo.

**Tabela 12** - Composição química do hidrolisado hemicelulósico utilizado no Exp. 3MH, conduzido sob condições mixotróficas em meio contendo xilose

Composição ( $\text{g L}^{-1}$ )	Tempo de cultivo	
	0 dias	7 dias
Glicose	0,60	ND
Glicerol	-	ND
Ácido acético	0,60	ND
Furfural	ND	ND
5-HMF	0,00236	ND
Xilose	2,05	ND
Arabinose	0,32	ND

Fonte: Autor.

ND: Não detectado; 5-HMF: hidroximetilfurfural

### 5.3.3 Caracterização bioquímica da biomassa microalgal utilizando hidrolisado hemicelulósico

Na Tabela 13 a seguir estão apresentados os valores encontrados de lipídios, carboidratos totais, proteínas totais, amido e açúcares solúveis totais (AST) presentes na biomassa da microalga *Desmodesmus* sp., provenientes de diferentes cultivos: Um advindo de cultivo em meio contendo hidrolisado hemicelulósico, com  $3 \text{ g L}^{-1}$  de xilose (3MH) e outro, de cultivo fotoautotrófico (0M) na ausência de xilose, utilizado como controle.

**Tabela 13** - Caracterização bioquímica da biomassa de *Desmodesmus* sp. cultivada em hidrolisado hemicelulósico contendo  $3 \text{ g L}^{-1}$  de xilose

Exp.	Lipídios (%)	Amido (%)	AST (%)	Proteínas totais (%)	Carboidratos totais (%)
0M	$10,44 \pm 0,22^a$	$6,91 \pm 1,44^b$	$8,26 \pm 1,18^a$	$15,54 \pm 3,89^b$	$12,08 \pm 2,31^b$
3MH	$10,54 \pm 0,19^a$	$4,17 \pm 1,38^b$	$4,33 \pm 0,91^b$	$65,48 \pm 4,87^a$	$29,61 \pm 3,47^a$

Fonte: Autor.

0M: Cultivo fotoautotrófico (controle); 3MH: Cultivo mixotrófico contendo  $3 \text{ g L}^{-1}$  de xilose em hidrolisado hemicelulósico; AST: Açúcares solúveis totais; Resultados com médias não seguidas pela mesma letra na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O teor de lipídios obtido no Exp. 3MH foi de  $10,54 \pm 0,19\%$ , valor estatisticamente semelhante aos encontrados nos demais experimentos. No que diz respeito à produção de amido

(4,17±1,38%), foi observada uma redução no teor de 2,2 vezes em relação ao Exp. 3M, cultivo mixotrófico com 3 g L<sup>-1</sup>. Os valores obtidos de amido não diferiram estatisticamente dos obtidos nos experimentos Exp. 0M, 6M, 0H, 3H, 6H e 9H. O teor de AST encontrados (4,33±0,91%) foi semelhante aos encontrados nos Exp. 3M, 6M, 9M e 0H. O teor de proteínas (65,48±4,87%) não diferiu estatisticamente dos encontrados nos Exp. 3M, 6M e 9M. Quanto ao teor de carboidratos (29,61±3,47), houve um acréscimo de 2,4 vezes em relação aos cultivos mixotróficos (0M, 3M, 6M e 9M). O acréscimo no teor de carboidratos pode estar relacionado com a presença dos açúcares glicose e arabinose no hidrolisado hemicelulósico. A inserção do hidrolisado hemicelulósico pode ter contribuído para o aumento observado no teor de carboidratos presentes na parede celular das microalgas. Este fato sugere uma maior resistência dessa microalga à fatores externos. O teor de carboidrato obtido no Exp. 3MH foi superior em 2,8 vezes em relação ao teor de lipídios encontrados nas mesmas condições.

A Tabela 14 contém os dados de produtividade volumétrica para os compostos bioquímicos presentes na biomassa de *Desmodesmus* sp. em cultivo contendo hidrolisado hemicelulósico (3MH) e o cultivo fotoautotrófico (0M). A produtividade volumétrica de lipídios (Q<sub>L</sub>) encontrada no Exp. 3MH foi de 1,210±0,022 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, valor que não diferiu estatisticamente dos demais experimentos, todavia, com exceção a do Exp. 9M, a qual diferiu estatisticamente, apresentando uma menor produtividade. Em se tratando do amido e AST foram encontrados valores de produtividade volumétrica igual a 0,479±0,094 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 0,497±0,104 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores obtidos foram estatisticamente semelhantes aos encontrados nos experimentos 3M, 6M e 9M. Quanto à produtividade de proteínas totais (7,517±0,559 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e carboidratos totais (3,399±0,398 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), essas apresentaram os maiores valores no experimento 3MH.

**Tabela 14** - Produtividade volumétrica dos compostos bioquímicos presentes na biomassa de *Desmodesmus* sp.

Exp.	Q <sub>L</sub> (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Q <sub>A</sub> (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Q <sub>AST</sub> (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Q <sub>Prot</sub> (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Q <sub>C</sub> (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0M	0,266±0,008 <sup>a</sup>	0,176±0,045 <sup>b</sup>	0,211±0,030 <sup>b</sup>	0,396±0,099 <sup>c</sup>	0,308±0,059 <sup>c</sup>
3MH	1,210±0,022 <sup>b</sup>	0,479±0,094 <sup>a</sup>	0,497±0,104 <sup>a</sup>	7,517±0,559 <sup>a</sup>	3,399±0,398 <sup>a</sup>

Fonte: Autor.

Q<sub>L</sub>: Produtividade volumétrica lipídica; Q<sub>A</sub>: Produtividade volumétrica de amido; Q<sub>AST</sub>: Produtividade volumétrica de açúcares solúveis totais; Q<sub>Prot</sub>: Produtividade volumétrica de proteínas totais; Q<sub>C</sub>: Produtividade volumétrica de carboidratos totais; 0M: Cultivo fotoautotrófico (controle); 3MH: Cultivo mixotrófico contendo 3 g L<sup>-1</sup> de xilose em hidrolisado hemicelulósico. Resultados com médias não seguidas pela mesma letra na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A partir dos dados obtidos, foi possível observar que a utilização do hidrolisado hemicelulósico como fonte de nutrientes mostrou ser vantajosa para o crescimento da microalga

*Desmodesmus* sp., principalmente para produção de sua biomassa e, para o acúmulo proteínas e carboidratos. Todavia, em se tratando da produção de biocombustíveis foi observado que, apesar da suplementação do meio de cultura ter trazido benefícios para o crescimento microalgal como relatado, os teores de lipídios e carboidratos produzidos por essa espécie devem ser mais estudados em busca de valores mais expressivos. Os dados de produtividade apresentados sugerem que a *Desmodesmus* sp. apresenta um melhor perfil para produção de bioetanol em função do seu teor de carboidratos. Com base na literatura (XU *et al.*, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006), comumente, dentre as microalgas utilizadas para fins de produção de bioetanol e biodiesel encontram-se a *Chlorella protothecoides* (carboidratos totais: 15,43% e lipídios 55,2%) e *Chlorella vulgaris* (carboidratos totais: 12-17% e lipídios 40-53%) as quais podem servir de parâmetros para tais produções.

## 6 CONCLUSÃO

A microalga *Desmodesmus* sp. foi capaz de utilizar a xilose presente nos cultivos como fonte de carbono para o acúmulo de sua biomassa. A fonte de carbono orgânica e a fonte de nitrogênio foram de cruciais para o crescimento da microalga, uma vez que o esgotamento de uma dessas acarretou em uma estagnação no crescimento.

Os melhores resultados referentes à produção de biomassa microalgal e compostos como lipídios e carboidratos foram obtidos em condições mixotróficas contendo 3 e 9 g L<sup>-1</sup> de xilose (Exp. 3M e 9M).

O bagaço de cana-de-açúcar apresentou uma elevada fração hemicelulósica, e o processo de hidrólise ácida mostrou-se adequado com alta produção de açúcares e baixas concentrações de inibidores, sugerindo que essa biomassa lignocelulósica apresenta características favoráveis ao cultivo da microalga.

O cultivo da microalga *Desmodesmus* sp. apresentou melhor desempenho quando cultivado na presença de luz e do hidrolisado hemicelulósico (mixotrófica), exibindo a maior produção de biomassa microalgal e teores de proteínas e carboidratos. Nessa condição, a produção de biomassa microalgal mostrou-se 5,12 vezes superior ao cultivo fotoautotrófico no final do tempo de cultivo, e teor de proteínas e carboidratos de 65,48±4,87% e 29,61±3,47%, respectivamente. A partir das características obtidas da microalga *Desmodesmus* sp. foi possível observar que essa apresenta um melhor perfil para a produção de bioetanol de terceira geração, uma vez que o teor de carboidratos foi expressivo e superior ao teor de lipídios.

Sugere-se, para trabalhos futuros, um estudo mais aprimorado para a otimização da relação C/N no cultivo de *Desmodesmus* sp., a realização de cultivos envolvendo uma batelada alimentada contendo uma fonte de nitrogênio, e a utilização de tempos distintos de monitoramento do cultivo para o melhor entendimento do acúmulo dos compostos de interesse com o tempo.



## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOMOHRRA, A. E. F.; ELADEL, H.; EL-ESAWI, M.; WANG, S.; WANG, Q.; HE, Z.; HANELT, D. Effect of lipid-free microalgal biomass and waste glycerol on growth and lipid production of *Scenedesmus obliquus*: Innovative waste recycling for extraordinary lipid production. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 992-999, 2018.

AGROENERGIA, EMBRAPA. Agroenergia em revista: microalgas, v. 4, n. 10, dez/2016. ISSN 2238-1023

ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI F. A. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 125-136, 2014.

ANTUNES, F. A.; CHANDEL, A. K.; DOS SANTOS, J. C.; MILESSI, T. S.; PERES, G. F.; DA SILVA, S. S. Hemicellulosic Ethanol Production in Fluidized Bed Reactor from Sugar Cane Bagasse Hydrolysate: Interplay among Carrier Concentration and Aeration Rate. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 9, p. 8250-8259, 2017.

ARNOLD, A. A.; GENARD, B.; ZITO, F.; TREMBLAY, R.; WARSCHAWSKI, D. E.; MARCOTTE, I. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by <sup>13</sup>C solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 1, p. 369-377, 2015.

ARORA, N.; PATEL, A.; PRUTHI, P. A.; PRUTHI, V. Boosting TAG accumulation with improved biodiesel production from novel oleaginous microalgae *Scenedesmus* sp. IITRIND2 utilizing waste sugarcane bagasse aqueous extract (SBAE). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 1, p. 109-121, 2016.

ARUDCHELVAM, Y.; NIRMALAKHANDAN, N. Energetic optimization of algal lipid production in bubble columns: Part 1: Evaluation of gas sparging. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 757-764, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. Washington: AOAC, 1992.

BANDHU, S.; KHOT, M. B.; SHARMA, T.; SHARMA, O. P.; DASGUPTA, D.; MOHAPATRA, S.; GHOSH, D. Single Cell Oil from Oleaginous Yeast Grown on Sugarcane Bagasse-Derived Xylose: An Approach toward Novel Biolubricant for Low Friction and Wear. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. 2017.

BARTLEY, M. L.; BOEING, W. J.; DUNGAN, B. N.; HOLGUIN, F. O.; SCHAUB, T. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1431-1437, 2014.

BAUDELET, P. H.; RICOCHON, G.; LINDER, M.; MUNIGLIA, L. A new insight into cell walls of *Chlorophyta*. **Algal Research**, v. 25, p. 333-371, 2017.

BLIGH, E. G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

CACURO, T. A.; WALDMAN, W. R. Cinzas da Queima de Biomassa: Aplicações e Potencialidades. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2154-2165, 2015.

CALIXTO, C.D.; SANTANA, J. K. S.; TIBÚRCIO, V. P.; DE PONTES, L. F. B. L.; SASSI, C. F. C.; CONCEIÇÃO, M. M.; SASSI, R. Productivity and fuel quality parameters of lipids obtained from 12 species of microalgae from the northeastern region of Brazil. **Renewable Energy**, v. 115, p. 1144-1152, 2018.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. **Congresso Brasileiro de Química**, v. 47, 2007.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510-516, 2012.

CHEN, J.; LIU, X.; WEI, D.; CHEN, G. High yields of fatty acid and neutral lipid production from cassava bagasse hydrolysate (CBH) by heterotrophic *Chlorella protothecoides*. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 281-290, 2015.

CHENG, Y.; LU, Y.; GAO, C.; WU, Q. Alga-based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4166-4173, 2009.

CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P. L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; CHANG, J. S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

CHIA, S. R.; CHEW, K. W.; SHOW, P. L.; YAP, Y. J.; ONG, H. C.; LING, T. C.; CHANG, J. S. Analysis of economic and environmental aspects of microalgae biorefinery for biofuels production: a review. **Biotechnology Journal**, p. 1700618, 2018.

CHIU, P. H.; SOONG, K.; CHEN, C.N.N. Cultivation of two thermotolerant microalgae under tropical conditions: influences of carbon sources and light duration on biomass and lutein productivity in four seasons. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 190-198, 2016.

DATTA, R.; KELKAR, A.; BARANIYA, D.; MOLAEI, A.; MOULICK, A.; MEENA, R. S.; FORMANEK, P. Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review. **Sustainability**, v. 9, n. 7, p. 1163, 2017.

DEMIRBAS, Ayhan. Competitive liquid biofuels from biomass. **Applied Energy**, v. 88, n. 1, p. 17-28, 2011.

DENG, X. Y.; GAO, K.; ADDY, M.; LI, D.; ZHANG, R. C.; LU, Q.; RUAN, R. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on anaerobically digested swine manure with daily recycling of the post-harvest culture broth. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 716-723, 2018.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. D.; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DOS SANTOS, A. S.; PEREIRA JR, N.; FREIRE, D. M. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **PeerJ**, v. 4, p. e2078, 2016.

DOSHI A.; PASCOE S.; COGLAN L.; RAINEY T. J. Economic and political issues in the production of algae-based biofuels: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 329-337, 2016.

DUBOIS, M; GILLES, J.K.; HAMILTON, P. A.; REBERS, S.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356.

ELRAYIES, G. M. Microalgae: Prospects for greener future buildings. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 1175-1191, 2018.

EZE, C. N.; OGBONNA, J. C.; OGBONNA, I. O.; AOYAGI, H. A novel flat plate *air-lift* photobioreactor with inclined reflective broth circulation guide for improved biomass and lipid productivity by *Desmodesmus subspicatus* LC172266. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 6, p. 2745-2754, 2017.



- FARIAS S. C. E.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1833-1842, 2016.
- FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; DE REVIERS, B.; PRADO, J. F.; HANLAOUI, S. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed Editora, 2009.
- FREITA, C. M.; FREITA, L.; ROVIERO, J.; TENÓRIO, E.; RABELO, S.; MUTTON, M. Caracterização de cinzas, lignina, celulose e hemicelulose em bagaço de sorgo e cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia**, v. 8, n. esp., 2016.
- FREITAS, B. C. B.; ESQUÍVEL, M. G.; MATOS, R. G.; ARRAIANO, C. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Nitrogen balancing and xylose addition enhances growth capacity and protein content in *Chlorella minutissima* cultures. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 129-133, 2016.
- GIRARD, J. M.; TREMBLAY, R.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M.; DESCHÊNES, J. S. Phycoremediation of cheese whey permeate using directed commensalism between *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella protothecoides*. **Algal Research**, v. 22, p. 122-126, 2017.
- GOMES, G.M.F.; VASCONCELOS, A.M.; EGITO, A.S.; LIMA, A.R.; CARNEIRO, J.C.; LANDIM, A.V.; FONTELES, N.L.O.; SALLES, H.O. Degradabilidade *in situ* do bagaço de cana-de-açúcar para pequenos ruminantes de raças naturalizadas do Nordeste brasileiro. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.65, n.6, p.1792-1800, 2013.
- GORNALL, A. G.; BORDAWILL, C. S.; DAVID, M. M. The determination of protein by the biuret reaction. **Journal Biology Chemistry**, v. 177, p. 751-780, 1949.
- GRASEL, F. S.; STIEHL, A. C. R.; BERNARDI, L. P.; HERPICH, T. L.; BEHRENS, M. C.; ANDRADE, J. B.; MANGRICH, A. S. Inovação em Biorrefinarias I. Produção de Etanol de Segunda Geração a partir de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*) e Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum officinarum*). **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.1, 2017.
- GRESSLER, P.; SCHNEIDER, R.; CORBELLINI, V.; BJERK, T.; SOUZA, M.; ZAPPE, A; LOBO, E. A. Microalgas: aplicações em biorremediação e energia. **Caderno de Pesquisa**, v. 24, n. 1, p. 48-67, 2012.
- GROBBELAAR, J. U.; BORNMAN, C. H. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, v. 70, n. 1, p. 140-144, 2004.
- GUE, I. H. V.; UBANDO, A. T.; AGUILAR, K. D. T.; MANRIQUE, R. B.; CUELLO, J. L.; CULABA, A. B. Linear programming modelling of an integrated sugarcane microalgal

biofuel plant. In: **Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment and Management (HNICEM), 2017 IEEE 9th International Conference on**. IEEE, 2017. p. 1-5.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, 2012.

HALLENBECK, P. C.; GROGGER, M.; MRAZ, M.; VEVERKA, D. Solar biofuels production with microalgae. **Applied Energy**, v. 179, p. 136-145, 2016.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 199-203, 2010.

HENTSCHKE, G. S.; TORGAN, L. C. *Chlorococcales* lato sensu (*Chlorophyceae*, excl. *Desmodesmus* e *Scenedesmus*) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 65, n. 1, p. 87-100, 2010.

HO, S. H.; CHANG, J. S.; LAI, Y. Y.; CHEN, C. N. N. Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 108-116, 2014.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

ISLAM, M. A.; HEIMANN, K.; BROWN, R. J. Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1160-1170, 2017.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I. (Ed.). **Energy from Microalgae**. Springer, 2018.

JANUSZ, G.; PAWLIK, A.; SULEJ, J.; ŚWIDERSKA-BUREK, U.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; PASZCZYŃSKI, A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 941-962, 2017.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186-193, 2011.

JONSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

JUÁREZ, J. M.; HERNANDO, A. L.; TORRE, R. M.; LANZA, S. B.; RODRÍGUEZ, S. B. Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 265-271, 2016.

KARAM, L. M.; SOCCOL, C. R. Efeito da temperatura e pH no cultivo de *Spirulina* major. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 10, n. 1, 2008.

KATIYAR, R.; GURJAR, B. R.; BHARTI, R. K.; KUMAR, A.; BISWAS, S.; PRUTHI, V. Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 113, p. 1359-1365, 2017.

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; MACIEL, F. R. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2018.

LAURENS, L. M.; CHEN-GLASSER, M.; MCMILLAN, J. D. A perspective on renewable bioenergy from photosynthetic algae as feedstock for biofuels and bioproducts. **Algal Research**, v. 24, p. 261-264, 2017.

LEE, O. K.; LEE, E. Y. Sustainable production of bioethanol from renewable brown algae biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 92, p. 70-75, 2016.

LEE, O. K.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; LEE, E. Y. Sustainable production of liquid biofuels from renewable microalgae biomass. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 29, p. 24-31, 2015.

LEE, Y-K. Algal Nutrition–Heterotrophic Carbon Nutrition. **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology**, p. 116-124, 2004.

LEITE, G. B.; PARANJAPE, K.; ABDELAZIZ, A. E.; HALLENBECK, P. C. Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 123-130, 2015.

LEITE, G. B.; PARANJAPE, K.; HALLENBECK, P. C. Breakfast of champions: Fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. **Algal Research**, v. 16, p. 338-348, 2016.

LEMÕES, J. S., SOBRINHO, R. C. A., FARIAS, S. P., DE MOURA, R. R., PRIMEL, E. G., ABREU, P. C., D'OCA, M. G. M. Sustainable production of biodiesel from microalgae by direct transesterification. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 3, p. 33-38, 2016.

MA, C.; WEN, H.; XING, D.; PEI, X.; ZHU, J.; REN, N.; LIU, B. Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 111, 2017.

MARANDUBA, H. L.; ROBRA, S.; NASCIMENTO, I. A.; DA CRUZ, R. S.; RODRIGUES, L. B.; DE ALMEIDA NETO, J. A. Improving the energy balance of microalgae biodiesel: Synergy with an autonomous sugarcane ethanol distillery. **Energy**, v. 115, p. 888-895, 2016.

MARUDHUPANDI, T.; SATHISHKUMAR, R.; KUMAR, T. T. A. Heterotrophic cultivation of *Nannochloropsis salina* for enhancing biomass and lipid production. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 8-16, 2016.

MCCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVIERA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical chemistry**, v. 22, n. 9, p. 1156-1158, 1950.

MIAZEK, K.; REMACLE, C.; RICHEL, A.; GOFFIN, D. Effect of lignocellulose related compounds on microalgae growth and product biosynthesis: a review. **Energies**, v. 7, n. 7, p. 4446-4481, 2014.

MILANO, J.; ONG, H. C.; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; LAM, M. K.; LOH, P. K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180-197, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p.426-428, 1959.

MONÇÃO, F. S.; SARTORI, M. L.; VELOSO, R. V.S.; PANTOJA, L.A.; SANTOS A.S. Microalgas e biocombustíveis: Integração de cadeias produtivas. **Revista Virtual de Química**, 2018.

MORAIS, V. L. M.; ALSINA, O. L. S.; GOMES, W. C. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 1, 2007.

MU, J.; LI, S.; CHEN, D.; XU, H.; HAN, F.; FENG, B.; LI, Y. (2015). Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 99-105, 2015.

NAQVI, M.; YAN, J. First-generation biofuels. Handbook of Clean Energy Systems, p. 1-18, 2015.

OLIVEIRA, F.M. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ureia. Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 86f. 2011.

ONUMAEGBU, C.; MOONEY, J.; ALASWAD, A.; OLABI, A. G. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 93, p. 16-26, 2018.

ÖZÇİMEN, D.; İNAN, B. An overview of bioethanol production from algae. In: **Biofuels-Status and Perspective**. InTech, 2015.

PAN, Y. Y., WANG, S. T., CHUANG, L. T., CHANG, Y. W., & CHEN, C. N. N. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10510-10517, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARANJAPE, K.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 778-786, 2016.

PAZUCH, F. A.; NOGUEIRA, C. E. C.; SOUZA, S. N. M.; MICUANSKI, V. C.; FRIEDRICH, L.; LENZ, A. M. Economic evaluation of the replacement of sugar cane bagasse by vinasse, as a source of energy in a power plant in the state of Paraná, Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 34-42, 2017.

PCHARA, F. R. D. F. **Estudo da transferência de CO<sub>2</sub> por borbulhamento para o cultivo de microalgas em laboratório**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em aquicultura, 2016.

- PIRES, J. C. M. COP21: The algae opportunity? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 867-877, 2017.
- PRABHAKARAN, M.; SIVASANKAR, V.; OMINE, K.; VASANTHY, M. Microalgae Biofuels: A Green Renewable Resource to Fuel the Future. In: **Green Technologies and Environmental Sustainability**. Springer International Publishing, p. 105-129, 2017.
- PUGLIESE, L.; LOURENCETTI, C.; RIBEIRO, M. L. Impactos ambientais na produção do etanol brasileiro: uma breve discussão do campo à indústria. **Revista ReBraM**, v. 20, n. 1, p. 142-165, 2017.
- RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. D. M.; MOURA, C. W. D. N. *Scenedesmaceae* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*) from two areas of the Marimbus Pantanal (Baiano and Remanso). **Hoehnea**, v. 42, n. 3, p. 549-566, 2015.
- RATTANAPOLTEE, P.; KAEWKANNETRA, P. Utilization of agricultural residues of pineapple peels and sugarcane bagasse as cost-saving raw materials in *Scenedesmus acutus* for lipid accumulation and biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 6, p. 1495-1510, 2014.
- RESHMA, R.; ARUMUGAM, M. Selective degradation of the recalcitrant cell wall of *Scenedesmus quadricauda* CASA CC202. **Planta**, v. 246, n. 4, p. 779-790, 2017.
- RIBEIRO, J. E. S.; MARTINI, M.; ALTOMONTE, I.; SALARI, F.; NARDONI, S.; SORCE, C.; ANDREUCCI, A. Production of *Chlorella protothecoides* biomass, chlorophyll and carotenoids using the dairy industry by-product scotta as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 207-213, 2017.
- RIOS, L. F.; KLEIN, B. C.; LUZ, L. F.; MACIEL, F. R.; MACIEL, M. W. Nitrogen starvation for lipid accumulation in the microalga species *Desmodesmus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 469-476, 2015.
- RÍOS, L. F.; MARTINEZ, A.; KLEIN, B. C.; MACIEL, M. W.; MACIEL, F. R. Comparison of Growth and Lipid Accumulation at Three Different Growth Regimes with *Desmodesmus* sp. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 3, p. 421-427, 2018.
- ROCHA, G. J.; MULINARI, D. R. Modificação das fibras de celulose provenientes do bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de alumínio. **Cadernos UniFOA**, v. 6, n. 1 (Esp.), p. 11-18, 2017.

SALAMA, E. S.; KURADE, M. B.; ABOU-SHANAB, R. A.; EL-DALATONY, M. M.; YANG, I. S.; MIN, B.; JEON, B. H. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1189-1211, 2017.

SAMORÌ, G.; SAMORÌ, C.; GUERRINI, F.; PISTOCCHI, R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I. **Water Research**, v. 47, n. 2, p. 791-801, 2013.

SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2017.

SANTOS, R. R.; ARAÚJO, O. D. Q. F.; DE MEDEIROS, J. L.; CHALOUB, R. M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38-48, 2016.

SANTOS, M. A.; DOS SANTOS, B. R. C. Silagem da palma forrageira consorciada com resíduos da mandioca e bagaço da cana-de-açúcar: Revisão. **PUBVET**, v. 12, p. 133, 2018.

SASSI, P. G. P.; CALIXTO, C. D.; DA SILVA SANTANA, J. K.; SASSI, R.; SASSI, C. F. C.; ABRAHÃO, R. Cultivation of freshwater microalgae in biodiesel wash water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 22, p. 18332-18340, 2017.

SHUBA, E. S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 743-755, 2018.  
SILVEIRA, J. B.; LORENSI, J.; COELHO, R.; FRANCO, T. Otimização de condições de cultivo heterotrófico de microalgas. **Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 984-990, 2015.

SIQUEIRA, G.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 176, 2017.

SOARES, M. S.; PIRES, A. J. V. P.; SILVA, L. G. S.; GUIMARÃES, J. O.; MACHADO, T. C.; FRAZÃO, O. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Revista eletrônica Nutritime**, v.12, n. 01, p. 3837– 3855, 2015.

SOARES, S. S.; JÚNIOR, J. B. G.; MENDES, L. M.; MENDES, R. F.; DE PAULA PROTÁSIO, T.; LISBOA, F. N. Valorização do bagaço de cana-de-açúcar na produção de

pinéis aglomerados de baixa densidade. **Revista Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)**, v. 8, n. 2, 2017.

SONG, M.; PEI, H. The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 525-531, 2018.

STANISLAV, V. V.; CHRISTINA G. V. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. **Fuel**, v. 181, p. 1-33, 2016.

SU, Y.; SONG, K.; ZHANG, P.; SU, Y.; CHENG, J.; CHEN, X. Progress of microalgae biofuel's commercialization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, p. 402-411, 2017.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316-4342, 2012.

TAKEDA, H. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 673-675, 1996.

TAN, X. B.; ZHAO, X. C.; ZHANG, Y. L.; ZHOU, Y. Y.; YANG, L. B.; ZHANG, W. W. Enhanced lipid and biomass production using alcohol wastewater as carbon source for *Chlorella pyrenoidosa* cultivation in anaerobically digested starch wastewater in outdoors. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 784-793, 2018.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forage. *J. Anm. Sci.*, v. 26, p. 119-128. 1967.

XIA, L.; RONG, J.; YANG, H.; HE, Q.; ZHANG, D.; HU, C. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 402-409, 2014.

WANG, S. K.; WANG, X.; TAO, H. H.; SUN, X. S.; TIAN, Y. T. Heterotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with immobilized yeast. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 425-430, 2018.

YANG, S.; LIU, G.; MENG, Y.; WANG, P.; ZHOU, S.; SHANG, H. Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 180-185, 2014.



YEH, K-L.; CHANG, J-S.; CHEN, W-M. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 3, p. 201-208, 2010.

YU, X.; CHEN, L.; ZHANG, W. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 56, 2015.

ZHANG, L.; CHENG, J.; PEI, H.; PAN, J.; JIANG, L.; HOU, Q.; HAN, F. Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 115, p. 276-287, 2018.

ZHANG, Q.; LIU, C., LI, Y.; YU, Z.; CHEN, Z.; YE, T.; JIN, S. Cultivation of algal biofilm using different lignocellulosic materials as carriers. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 115, 2017.

ZHAO, Z.; MA, S.; LI, A.; LIU, P.; WANG, M. Effects of Trophic Modes, Carbon Sources, and Salinity on the Cell Growth and Lipid Accumulation of Tropic Ocean Oilgae Strain *Desmodesmus* sp. WC08. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 3, p. 452-463, 2016.

ZHENG, Y.; YU, X.; LI, T.; XIONG, X.; CHEN, S. Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP<sup>+</sup>-linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 125, 2014.

ZHOU, W.; WANG, J.; CHEN, P.; JI, C.; KANG, Q.; LU, B.; RUAN, R. Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 1163-1175, 2017.