



JULIA SOUZA CAPRONI

**UM PANORAMA DA PRODUÇÃO DO ETANOL DE
TERCEIRA GERAÇÃO**

**LAVRAS – MG
2021**

JULIA SOUZA CAPRONI

UM PANORAMA DA PRODUÇÃO DO ETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa

Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

JULIA SOUZA CAPRONI

**UM PANORAMA DA PRODUÇÃO DO ETANOL DE TERCEIRA
GERAÇÃO**

AN OVERVIEW OF THIRD GENERATION ETHANOL PRODUCTION

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 19 de novembro de 2021.

Dr. Gilson Campani Junior UFLA

Dr. Nathan Sombra Evangelista UFLA

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

*Aos meus pais, Vanderlei e Marta, sem o apoio e incentivo deles os meus sonhos
estariam distantes de serem realizados.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores da Escola de Engenharia, por todo suporte e conhecimento transmitidos.

Também gostaria de agradecer ao Professor Luciano pela confiança em meu trabalho, pelos seus ensinamentos, profissionalismo e dedicação em me orientar.

E por fim, agradeço a minha família e aos amigos por tudo que fizeram por mim ao longo desses anos.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A demanda crescente por combustíveis, somada ao objetivo mundial de reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa e as investidas para diminuir a dependência do petróleo geram a necessidade de desenvolver e aprimorar soluções mais limpas e renováveis, como por exemplo, o bioetanol. No entanto, a maior parte da produção mundial de etanol advém da cana-de-açúcar e do milho existindo a preocupação, agravada pelo crescimento da população mundial, do uso de terras aráveis e alimentos para outros fins que não sejam alimentares. Para atender essa preocupação foi desenvolvido o etanol 2G, produzido utilizando biomassa lignocelulósica, mas visto a baixa produtividade de etanol a partir desse material, vislumbra-se a produção de etanol de terceira geração (3G), a partir da biomassa de microalgas, já que essas possuem rápido crescimento, grande potencial de conversão em energia e permitem produção ininterrupta de matéria-prima. Assim, pela potencialidade encontrada nas microalgas e pelas dificuldades na implementação industrial da produção de etanol a partir dessa fonte, este trabalho visa realizar um panorama sobre a produção de etanol 3G. Existem estudos sobre diversas microalgas que podem ser utilizadas na produção de etanol, sendo de grande importância a seleção da microalga mais adequada, assim como, aprimorar e definir criteriosamente os métodos mais vantajosos para cada etapa de produção, para viabilizar a execução desse processo em grande escala de forma comercialmente competitiva. Algumas espécies com alto teor de carboidratos, como as dos gêneros *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Spirulina* sp. são destacadas na literatura. Também, é apontada a potencialidade dos sistemas híbridos para o cultivo de microalgas em larga escala e a possível utilização da hidrólise enzimática para atingir maiores sacarificações sem a formação de inibidores. Por fim, a estruturação de biorrefinarias é indicada como a solução mais promissora para viabilizar economicamente a produção do etanol 3G.

Palavras-chave: Biocombustíveis; Terceira Geração; Microalgas; Cianobactérias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma das etapas de produção do etanol 1G e 2G.	15
Figura 2 – Fluxograma das etapas de produção do etanol 3G.....	20
Figura 3 – Principais etapas para a obtenção das microalgas.....	21
Figura 4 – Lagoas do tipo <i>raceway</i>	25
Figura 5 – Fotobiorreatores fechados.	27
Figura 6 – Estrutura celular.	33
Figura 7 – Etapas da fermentação alcoólica.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparativo entre as gerações de biocombustíveis.....	14
Quadro 2 – Contraposição entre sistemas de cultivo abertos e fechados.....	29
Quadro 3 – Comparativo entre diferentes métodos de rompimento celular.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de carboidratos, em peso seco, de diferentes microalgas.	41
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO.....	14
3	ETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO.....	17
4	PRINCIPAIS ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO.....	21
4.1	Obtenção da matéria-prima.....	21
4.1.1	Cultivo.....	21
4.1.2	Recuperação e secagem da matéria-prima.....	29
4.2	Rompimento celular.....	32
4.3	Hidrólise.....	35
4.4	Fermentação.....	37
4.5	Destilação.....	39
5	MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS.....	41
5.1	Algas verdes.....	42
5.2	Cianobactérias.....	47
5.3	Demais algas.....	50
6	VIABILIDADE E PERSPECTIVAS DA PRODUÇÃO DO ETANOL 3G..	52
7	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Desde a Revolução Industrial e a urbanização, a sociedade industrializada demanda quantidades cada vez maiores de combustíveis para atender as novas necessidades do cotidiano da crescente população e o funcionamento de equipamentos e máquinas industriais. As matrizes energéticas foram se adaptando às fontes disponíveis, passando pela utilização da madeira, do óleo de baleia, do carvão mineral, mas foi a utilização de derivados do petróleo que consolidou o modelo industrial de produção em massa (CARVALHO, 2008).

Ainda hoje, a maior parte da matriz energética mundial é composta por fontes não renováveis, sendo aproximadamente 31,5% composta de petróleo e derivados e 26,9% de carvão mineral (IEA, 2018). O uso contínuo de combustíveis fósseis tem acarretado consequências negativas ao meio ambiente e, nas últimas décadas, existe uma preocupação mundial com o controle das emissões de gases causadores do efeito estufa (GEE), que impedem a dispersão da radiação solar para a atmosfera, levando a um aumento gradativo da temperatura média da Terra, denominado aquecimento global. Esse pode gerar fenômenos meteorológicos cada vez mais extremos e danosos à humanidade.

Em função dessas preocupações, em 1992, organizou-se a Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima e, desde então, seus países membros realizam conferências periódicas para monitorar o cumprimento das metas anteriores e estabelecer novas metas e medidas para reduzir as emissões globais de GEE. Essas reuniões são chamadas de Conferências das Partes, na qual as nações firmaram alguns dos mais importantes acordos e tratados internacionais para o controle do efeito estufa, como por exemplo, o Protocolo de Kyoto e o Acordo de Paris (FREITAS et al., 2020).

Em 2015, no Acordo de Paris, foi delimitado um aumento de 2°C na temperatura média da Terra até o final do século, sendo um dos objetivos principais a redução dos gases emitidos pela queima de combustíveis fósseis (FURTADO et al., 2020). Porém, de acordo com Vital (2018), na COP-24 foi divulgado que as emissões de dióxido de carbono atingiram nível recorde em 2018, sendo a combustão de combustíveis fósseis a principal fonte de emissão.

Assim, devido à preocupação mundial quanto aos níveis de emissão de dióxido de carbono e dado, segundo Aditya et al. (2016), que a combustão de combustíveis fósseis corresponde por mais da metade do mercado de energia do setor de transportes, a redução das emissões de dióxido de carbono nesse setor tem impacto significativo, principalmente no Brasil, onde a maioria dos produtos é transportada por via rodoviária. Por essas razões, é necessário desenvolver e aprimorar soluções alternativas, como por exemplo, o bioetanol, que é uma das

formas mais efetivas de redução das emissões de GEE associadas ao setor rodoviário (FURTADO et al., 2020).

Além do fator ambiental, o uso de biocombustíveis também é importante para a diversificação das fontes energéticas, com a finalidade de reduzir a dependência energética e econômica de combustíveis fósseis, como o petróleo, de modo a não ser fortemente prejudicado pelas bruscas variações de preço, conforme ocorreu com muitos países durante as crises do petróleo (1956, 1973, 1979, 1991 e 2008), quando o acentuado aumento no preço do petróleo no mercado mundial prejudicou a economia dos países dependentes desse combustível (SILVA et al., 2021).

Foi para amenizar as crises do petróleo na década de 70, que o governo brasileiro, em 1975, incentivou a produção de etanol por meio do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), objetivando, inicialmente, a redução do consumo de petróleo ao se misturar etanol anidro à gasolina e a partir de 1979, desenvolvendo carros com motores que funcionavam com bioetanol hidratado sem a necessidade da adição de outro combustível (ANDRADE et al., 2009). Este programa é considerado um projeto pioneiro de biocombustíveis e responsável por iniciar o desenvolvimento da conceituada indústria sucroenergética nacional, atualmente, responsável pela segunda maior produção mundial de etanol (SILVA et al., 2020).

Os carros movidos a etanol hidratado tiveram grande aceitação e em 1985 cerca de 96% dos automóveis vendidos no Brasil eram movidos a esse combustível, resultando em uma frota de aproximadamente 4 milhões de veículos, a maior frota automotiva mundial movida com um biocombustível (CUNHA et al., 2015). No entanto, as indústrias alcooleiras passaram por crises após a queda no preço do petróleo e a retirada dos incentivos do governo a essas indústrias. O que gerou desconfiança a esse biocombustível pela elevação dos preços, diminuindo drasticamente a venda de novos carros movidos a etanol, de forma a quase provocar o desaparecimento do carro a álcool no país. Para proteger os consumidores das variações que o etanol e a gasolina estão expostos, foi desenvolvida uma tecnologia pioneira no mundo, os veículos Flex, com motores capazes de funcionar tanto com gasolina quanto com bioetanol, possibilitando a escolha pelo combustível que melhor lhe atendesse no momento. Essa nova tecnologia, auxiliou na retomada de uma maior utilização de etanol combustível (SILVA et al., 2020).

Atualmente, para promover o crescimento da produção e da participação de biocombustíveis no abastecimento do setor de transportes, o governo brasileiro emprega a Política Nacional dos Biocombustíveis (RenovaBio – Lei nº 13576/2017), essa estimula melhorias tecnológicas aumentando a produtividade e a redução de emissões de GEE na

produção, comercialização e uso de biocombustíveis, a fim de cumprir os compromissos do Acordo de Paris e conferir maior segurança energética com a diversificação da matriz. Essa Política consiste na fixação periódica de percentuais obrigatórios de biocombustíveis que deverão ser consumidos no país, combinados à emissão de créditos de carbono evitado (CBio). Os créditos de carbono evitado são títulos financeiros emitidos, proporcionalmente ao volume comercializado, pelos produtores de biocombustíveis. As metas definidas pelo Estado são repassadas para as distribuidoras de combustível, essas, de acordo com a sua participação no mercado, deverão cumprir o percentual obrigatório da distribuição de biocombustíveis ou comprar Cbio na Bolsa de Valores correspondente ao déficit para atingir o percentual destinado a ela (Instituto de Economia Agrícola, 2017; SPG).

Parcialmente em função da ampla utilização de etanol, a matriz energética brasileira é uma das mais limpas do mundo, na qual 46,1% é composta de fontes renováveis, sendo 18% da matriz gerada utilizando como biomassa a cana-de-açúcar, principal biomassa empregada no Brasil. Enquanto, no mundo, a participação de fontes renováveis é bastante inferior, cerca de 13,9% (EPE, 2020).

Os Estados Unidos e o Brasil são, respectivamente, o primeiro e o segundo maior produtor mundial de etanol e, em conjunto, são responsáveis por grande parte da produção mundial (VIDAL, 2020). No entanto, a maior parte da produção de etanol dos Estados Unidos advém do milho, por não possuírem um clima tropical adequado para o cultivo da cana-de-açúcar utilizada na produção do etanol brasileiro. Essa alcança altos rendimentos com baixos custos de conversão resultando em aproximadamente sete mil litros de etanol por hectare, três litros a mais por hectare quando comparada ao milho (ADITIYA et al., 2016; SILVA et al., 2020).

O etanol produzido mundialmente é majoritariamente de primeira geração (1G), obtido a partir da fermentação dos açúcares no caldo extraído diretamente da biomassa, como por exemplo, da cana-de-açúcar, do milho, da soja, do trigo. No entanto, devido ao uso da cultura agrícola para fins não alimentares, o não aproveitamento total da biomassa é bastante criticado, principalmente em países que possuem menor quantidade de terras aráveis e que utilizam cereais como matéria-prima. Para atender essas críticas foi desenvolvido o etanol de segunda geração (2G), produzido utilizando a biomassa lignocelulósica, tendo como foco a utilização de resíduos agrícolas, como por exemplo, o bagaço de sorgo, a palha do milho, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar (BNDES; CGEE, 2008; SINDHU et al., 2016).

Entretanto, mesmo com o melhor aproveitamento da biomassa e a maior produção de etanol sem a ampliação das áreas cultivadas, ainda existem preocupações como os danos ao meio ambiente causado pela atividade agrícola e com o uso de alimentos para outros fins que

não sejam alimentares (SILVA et al., 2019). Assim, vislumbra-se, atualmente, a produção de etanol de terceira geração (3G) a partir de biomassa de algas. Já que essas são consideradas uma matéria-prima com grande potencial de conversão em energia, além de possuírem rápido crescimento, devido sua elevada eficiência de conversão fotossintética e produção ininterrupta de biomassa, uma grande vantagem frente a sazonalidade da cana-de-açúcar (BRENNAN; OWENDE, 2010).

As algas também consomem baixa quantidade de água quando comparadas as matérias-primas atuais, podem ser cultivadas em terras inadequadas para agricultura, com o uso de água residual e sem a aplicação de defensivos agrícolas, consomem dióxido de carbono para seu crescimento auxiliando na melhoria do ar, e possibilitam a recuperação de diversos subprodutos de valor comercial, como pigmentos, após a extração das fontes de açúcar (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Assim, pelo grande potencial encontrado nas algas e pelas dificuldades na implementação da produção de etanol a partir dessa fonte de maneira comercialmente competitiva, em função do elevado custo de produção, o etanol 3G é o foco de estudo deste trabalho. Este trabalho busca realizar uma revisão geral, compilando estudos já desenvolvidos, visando elucidar as principais etapas de produção, as algas mais promissoras assim como suas formas de cultivo, a fim de avaliar as futuras perspectivas de produção e a possível utilização desse combustível para, juntamente com o etanol 1G e 2G, atenderem a maior demanda mundial por combustíveis menos poluentes, sem a necessidade de ampliar a utilização de terras aráveis.

2 ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO

Os biocombustíveis são classificados em gerações de acordo com a matéria-prima utilizada, e cada uma das gerações possui vantagens e desvantagens em relação as demais. Para melhor visualização, a classificação dos tipos de biocombustíveis, assim como as vantagens e desvantagens de cada geração estão apontadas no Quadro 1.

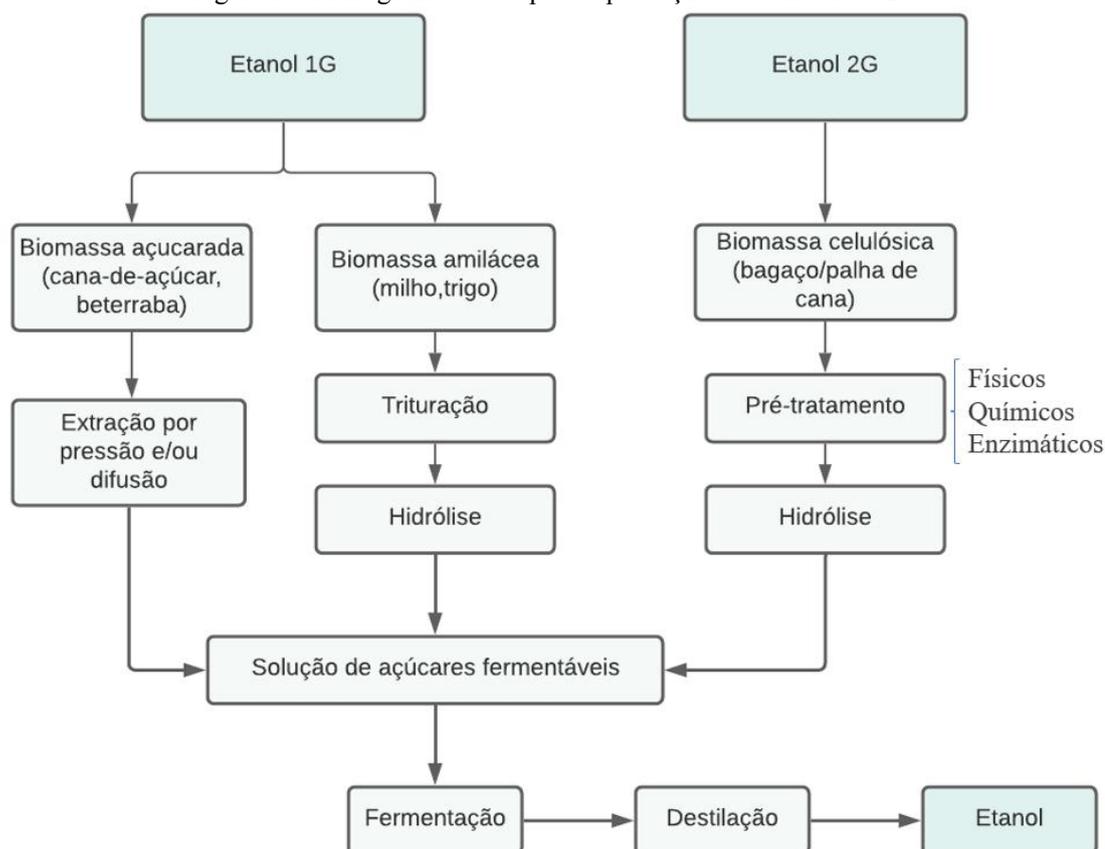
Quadro 1 – Comparativo entre as gerações de biocombustíveis.

Geração	Matéria-prima	Vantagens	Desvantagens
Primeira	Oleaginosas, milho, cana-de-açúcar e outras culturas.	Baixo custo; tecnologia já consolidada; alto rendimento.	Utiliza terras aráveis; compete diretamente com o preço de alimentos.
Segunda	Biomassa lignocelulósica: Resíduos agrícolas e florestais.	Não compete com a produção de alimentos; baixo custo da matéria-prima residual.	Necessidade de pré-tratamento da biomassa; alto custo do pré-tratamento; baixo rendimento.
Terceira	Biomassa de algas.	Não compete com a produção de alimentos; não precisa de grandes áreas de cultivo; ciclo de cultivo curto e ininterrupto; não necessita de água potável.	Tecnologia pouco desenvolvida; maior consumo de energia destinado ao cultivo das algas; custo associado à instalação de tanques de cultivo.

Fonte: Adaptado de BNDES e CGEE (2008); Brennan e Owende (2010); Sindhu et al. (2016).

As principais etapas de produção do etanol 1G a partir da cana-de-açúcar, biomassa mais utilizada no Brasil, consistem no cultivo, recepção e limpeza da biomassa, seguida da extração de açúcares, do tratamento e concentração do caldo, da fermentação e da destilação. No caso da produção a partir de milho e outras culturas que estocam açúcares sob a forma de amido, há a dificuldade na fermentação desse polissacarídeo, que requer uma etapa adicional de hidrólise anterior a fermentação. Além disso, para produção do etanol anidro, com concentração mínima de etanol em 99% em volume, é também necessária uma etapa de desidratação ao final do processo (GONÇALVES et al., 2020; PACHECO, 2011; ZART et al., 2020). Na Figura 1, é apresentado por meio de diagrama de blocos as principais etapas para a produção de etanol de primeira e segunda geração.

Figura 1 – Fluxograma das etapas de produção do etanol 1G e 2G.



Fonte: Adaptado de BNDES e CGEE (2008).

Como pode ser observado na Figura 1, a produção do etanol de segunda geração é similar a produção do etanol de primeira geração, com a adição de uma etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, essencial para aumentar a produtividade e viabilizar economicamente o processo. Esse pré-tratamento demanda um alto gasto energético, fazendo com que a produção do etanol de segunda geração apresente maiores custos quando comparada à produção do etanol 1G, mesmo sendo produzido a partir de matéria-prima residual (HARUN; DANQUAH, 2011b).

O pré-tratamento é necessário para permitir o acesso à celulose na estrutura lignocelulósica, pois os principais componentes dessa biomassa, celulose, hemicelulose e lignina, formam uma complexa estrutura que dificulta o acesso dos microrganismos e enzimas à celulose, impossibilitando uma boa degradação da celulose e, por consequência, a produção de etanol com bom rendimento. Esse pré-tratamento visa remover a lignina e a hemicelulose da biomassa, reduzir o tamanho físico do material e o grau de cristalinidade da matriz de celulose, aumentando a exposição dos componentes, viabilizando a hidrólise e posterior fermentação dos açúcares (MOSIER et al., 2005; SINDHU et al., 2016; ZART et al., 2020).

No entanto, o pré-tratamento gera elementos que prejudicam a atividade das enzimas e leveduras nas etapas posteriores, denominados inibidores, que associado às baixas concentrações de açúcares após a hidrólise, provoca um baixo rendimento do processo (MACRELLI et al., 2014; PACHECO, 2011).

Uma alternativa para minimizar os desafios encontrados para a produção de etanol 2G é a integração dos processos produtivos de etanol de primeira e segunda geração, pois algumas operações em comum e fluxos de energia podem ser compartilhados entre os processos, propiciando a redução dos investimentos. Ainda, ocorre a redução dos custos associados ao transporte da biomassa, pois utiliza-se como matéria-prima para a produção do etanol 2G a biomassa residual da produção 1G, que já se encontra na planta (ZART et al., 2020). Além disso, a baixa conversão obtida na produção de etanol 2G é compensada pelo alto rendimento obtido na produção de etanol 1G, e os inibidores formados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica são diluídos com a adição do caldo de cana-de-açúcar, não influenciando fortemente nos rendimentos e descartando, assim, a necessidade de desintoxicação (BHATIA et al., 2020; DIAS et al., 2012; LENNARTSSON et al. 2014).

3 ETANOL DE TERCEIRA GERAÇÃO

Como dito anteriormente, a demanda por combustíveis menos poluentes e renováveis está em amplo crescimento devido às políticas mundiais para redução de GEE e as investidas para diminuir a dependência de petróleo. Apenas no Brasil, existem previsões para a necessidade do aumento de produção de etanol, que atualmente varia em torno de 30 bilhões de litros, para cerca de 50 bilhões até 2030 (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2017). E globalmente, conforme divulgado durante a 20ª Conferência Internacional Datagro por Lara Bacellar, gerente executiva de etanol de uma das maiores comercializadoras de etanol do mundo, existe a expectativa que o mercado mundial possa demandar cerca de 55 bilhões de litros a mais de etanol até 2025, em decorrência do aumento da porcentagem de etanol acrescido a gasolina em diversos países (UDOP, 2020).

Para atender essa maior demanda, recorrer à produção de etanol 3G é uma solução atrativa devido às diversas vantagens conferidas a utilização de algas para produção de etanol, e uma vez que os métodos empregados atualmente para produção dessa geração de biocombustíveis não são comercialmente competitivos, se faz necessário investimentos em pesquisas para desenvolver novas técnicas.

Investimentos estão sendo realizados em diversos países, tendo em vista aperfeiçoar o sistema de cultivo, colheita e desidratação da biomassa em larga escala, selecionar algas com maiores taxas de crescimento e acúmulo de amido e óleo, além de buscar a estruturação biorrefinarias, que são plantas com a produção integrada de vários bioprodutos para diminuir as perdas inerentes ao processo e os custos de produção (BRASIL, 2014).

O Brasil detém cerca de 12% das reservas de água doce do mundo, além de receber altos níveis médios de insolação e possuir ampla extensão da costeira. Essas características conferem ao país grande potencial para produção de algas em larga escala, fazendo com que empresas realizem investimentos na estruturação de sistemas de produção de algas no Brasil (BRASIL, 2014).

Alguns desses investimentos estão sendo realizados pelo grupo brasileiro JB com coparticipação da empresa Austria's See Algae Technology – SAT e, também, pela empresa americana Solazyme em parceria com a brasileira Bunge. O primeiro avaliado em 8 milhões de dólares, visa utilizar prismas solares, desenvolvidos pela SAT, capazes de concentrar a luz solar nos tanques de cultivo através de fibras ópticas, em uma planta de cultivo de microalgas a ser instalada em Recife-PE, com o intuito de utilizar essa biomassa na produção de etanol e ração animal. O segundo, orçado em US\$ 120 milhões, busca a instalação de uma planta, anexa à

unidade da Bunge em São Paulo, para o cultivo de microalgas em sistemas heterotróficos (BRASIL, 2014). Além desses investimentos, outro projeto, realizado pelo grupo Proalga, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) objetiva aperfeiçoar o processo de obtenção de álcool através da hidrólise e fermentação da biomassa de macroalgas marinhas (CRUZ, 2009).

A biomassa das algas possui três componentes essenciais: carboidratos, proteínas e lipídeos, podendo ser utilizada tanto para a produção de bioetanol como biodiesel (ANTUNES; SILVA, 2010; BRENNAN; OWENDE, 2010). As espécies de algas ricas em lipídeos são ideais para a produção de biodiesel, uma vez que esse combustível é obtido pela transesterificação/esterificação desses lipídeos. Já as espécies ricas em carboidratos são desejáveis para produção de bioetanol. A integração da produção desses dois biocombustíveis também pode ser atrativa, pois após a extração dos lipídeos, resta uma biomassa rica em carboidratos que pode ser utilizada para produção de etanol (SUALI; SARBATLY, 2012).

As algas são agrupadas em microalgas e macroalgas de acordo com sua morfologia e tamanho. As microalgas são organismos microscópicos e, majoritariamente, unicelulares. Já as macroalgas, são organismos multicelulares, visíveis a olho nu, que possuem estruturas semelhantes as plantas superiores (JOHN et al., 2011).

Assim como na produção do etanol de primeira e segunda geração, o etanol de terceira geração é obtido por meio da fermentação de açúcares, nas algas, esses são obtidos, principalmente, a partir da conversão de amido e celulose (ANTUNES; SILVA, 2010). Na produção de etanol 3G, as microalgas possuem vantagens sobre as macroalgas por apresentarem maior produtividade de biomassa fermentável, mas, mesmo com o menor percentual de açúcares quando comparadas às microalgas, as macroalgas possuem quantidades significativas desse composto e podem ser utilizadas para a produção de etanol (WI et al., 2009).

As vantagens das microalgas em relação às macroalgas para produção de etanol se devem, principalmente, ao elevado crescimento celular propiciado por um eficiente sistema de fotossíntese, podendo duplicar sua biomassa em 24 horas (VIEIRA et al., 2014). E por conter altas taxas de carboidratos em sua estrutura que podem ser convertidos majoritariamente em glicose, sendo mais facilmente fermentada do que o alginato e manitol identificados nas macroalgas (HO et al., 2013).

Há uma infinidade de algas, e existem estudos sobre diversas microalgas que podem ser utilizadas na produção de etanol. Segundo Ueno et al. (1998), as espécies dos gêneros *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Oscillatoria* sp., *Cyanothece* sp. e a espécie *S. platensis* podem produzir etanol. Já Antunes e Silva (2010), dentre as microalgas, cita as espécies *Prymnesium parvum* e *Euglena gracilis* como mais promissoras para produção de etanol. Além

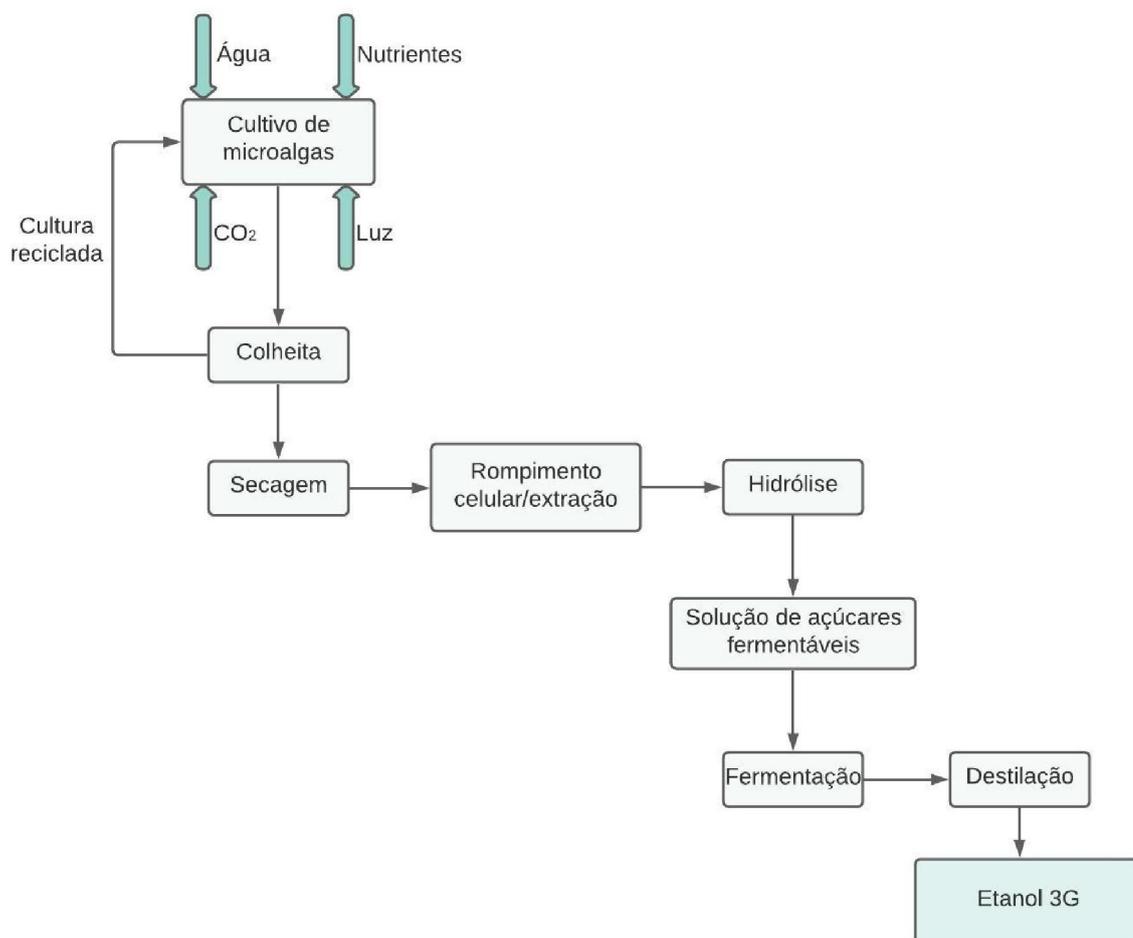
disso, aponta como promissoras as macroalgas do gênero *Sargassum* sp. e *Glacilaria* sp. E John et al. (2011), afirmam que as microalgas dos gêneros *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. são comumente utilizadas para produção de etanol devido ao seu alto teor de carboidratos.

Um fator de grande importância para viabilização da produção, em grande escala, de etanol a partir de algas é a triagem e seleção das algas com características que favoreçam a produtividade e redução de custos, tais como, bom rendimento fotossintético propiciando alta taxa de crescimento e produtividade de biomassa, grande conteúdo de carboidratos e lipídeos em diferentes condições de cultivo. Além de outras características como: se adaptar a mudança de temperatura, pH, luz, salinidade, ser resistentes a patógenos, a contaminantes e a tensão de cisalhamento (corriqueira em fotobiorreatores), ser dominante a outros microrganismos, necessitar de baixa quantidade de nutrientes, gerar coprodutos de alto valor agregado e exibir caráter de autofloculação (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Nenhuma espécie naturalmente possui todas essas características, por isso busca-se a modificação dos genes para agregar às algas promissoras outras características que otimizem a produção a fim de se alcançar viabilidade econômica, melhor qualidade e produtividade (GEORGIANNA; MAYFIELD, 2012).

A produção de etanol de terceira geração possui etapas similares a produção de etanol 1G e 2G, no entanto, o início do processo é um pouco distinto, tendo iniciação no cultivo das algas. O cultivo, normalmente autotrófico, pode ser realizado em lagoas abertas, fotobiorreatores ou ainda sistemas híbridos, com cada sistema possuindo suas vantagens e desvantagens. Em seguida, as algas são colhidas, posteriormente passam por secagem e rompimento celular para liberação dos polissacarídeos. O processo de secagem não pode degradar a biomassa e o rompimento celular pode ser efetuado por processo físico, químico ou enzimático, como será detalhado posteriormente. A partir dessa etapa o restante do processo é similar, passando pela hidrólise, processo de sacarificação dos polissacarídeos obtidos da biomassa em açúcares fermentáveis. Seguida da fermentação dos açúcares, por meio de microrganismos, principalmente leveduras, para obtenção do etanol e etapas para purificação do etanol, como a destilação e desidratação (KOSE; ONCEL, 2016). Um diagrama de blocos do processo está representado na Figura 2 para melhor visualização das etapas de produção.

Figura 2 – Fluxograma das etapas de produção do etanol 3G.



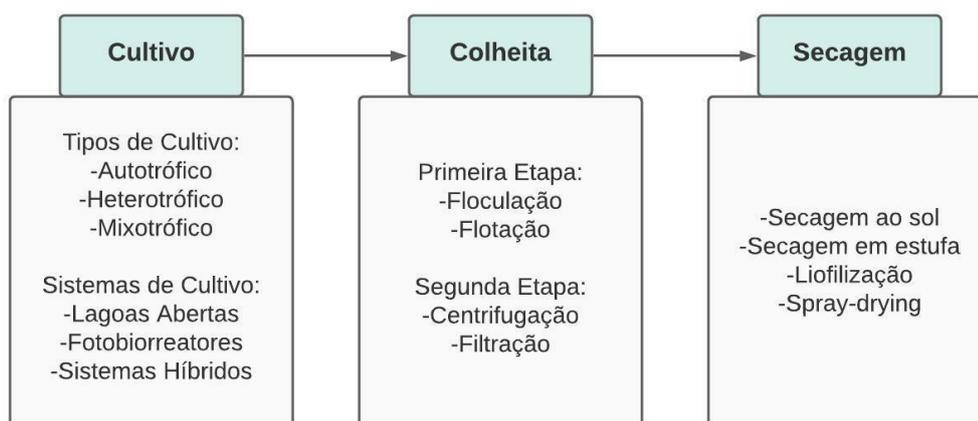
Fonte: Adaptado de Dragone et al. (2011).

4 PRINCIPAIS ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO

4.1 Obtenção da matéria-prima

As algas são obtidas através das etapas de cultivo, colheita e secagem. O cultivo e colheita de macroalgas são mais simples, geralmente o cultivo acontece em bancos naturais e a colheita ocorre por meio da suspensão das redes nas quais as macroalgas estão fixadas. Já as microalgas, por serem microscópicas, necessitam de sistemas de cultivo e recuperação mais elaborados. Essas são cultivadas em sistemas abertos, fechados (fotobiorreatores) ou híbridos e, geralmente, apresentam duas etapas de colheita (MATA et al., 2010; MUBARAK et al., 2015). As etapas para a obtenção das microalgas, assim como, algumas possíveis operações empregadas em cada uma delas estão apresentadas na Figura 3, abaixo.

Figura 3 – Principais etapas para a obtenção das microalgas.



Fonte: Adaptado de Mata et al. (2010) e Mubarak et al. (2015).

4.1.1 Cultivo

O cultivo de macroalgas é mais simples quando comparado ao de microalgas, e geralmente é realizado em bancos naturais, devendo cumprir requisitos de manejo e coleta, para que sejam realizados de forma adequada, a fim de evitar possíveis destruições do meio. Para seu cultivo, as macroalgas são coletadas nos bancos e posteriormente são fixadas em redes horizontais, em locais com variação da maré e luminosidade adequadas, para que não ocorra fotoinibição pelo excesso de luminosidade (DIOGO, 2012).

Nos dias de hoje, embora tenham limitantes, o cultivo de microalgas é muito versátil e, a longo prazo, gera resultados bem mais atrativos que os obtidos no cultivo de macroalgas

(KLEIN, 2013). Devido às vantagens apontadas e maior quantidade de estudos de produção de etanol a partir de microalgas, o cultivo desses microrganismos será melhor detalhado. Esse cultivo pode ser realizado em sistemas abertos, fechados ou híbridos. E normalmente, apresentam custos e desafios técnicos superiores aos de outras matérias-primas, sendo um dos maiores limitantes a realização do aumento de escala dos sistemas de produção (ALAM et al., 2012).

Majoritariamente, sistemas de cultivo de microalgas em grande escala são autotróficos, no qual as microalgas utilizam o carbono inorgânico para seu crescimento por meio da fotossíntese, cujo as microalgas convertem energia solar, dióxido de carbono e água em oxigênio e glicose, que quando originada em excesso, resulta na fabricação do amido e celulose também utilizados para produção de etanol (VIEIRA et al., 2014).

O crescimento e a composição das microalgas são influenciados por diversos fatores. Para obter taxas de crescimento satisfatórias, a intensidade luminosa, a concentração de nutrientes e de CO₂ devem ser adequadas. Além disso, o crescimento pode ser afetado pela salinidade, temperatura e pH do meio, pela presença de toxinas e patógenos, pela competição com outras espécies, pela profundidade do leito e por parâmetros operacionais, como o cisalhamento produzido pela agitação e a frequência de recuperação da biomassa (MATA et al., 2010).

Alguns desses fatores, assim como a fase de crescimento, também influenciam na composição da biomassa, sendo frequentemente manipulados para aumentar o teor de carboidratos nas microalgas. A concentração de nutrientes, a intensidade de luz, a temperatura e o tipo metabólico (autotróficos, heterotróficos e mixotróficos) são os elementos mais mencionados quando o intuito é manipular o percentual de carboidratos (MARKOU et al., 2012). Douskova et al. (2008) e Lourenço (2006), mostram que o aumento do teor de carboidratos pode ser induzido pela limitação de nutrientes essenciais como nitrato, fosfato e/ou sulfato, pois a diminuição desses componentes limita a formação de proteínas, clorofila, fosfolípidios, favorecendo a formação de carboidratos. Autores como Dragone et al. (2011), afirmam que a carência de nitrogênio no cultivo é um dos principais fatores que estimulam o acúmulo de carboidratos nas microalgas. Klein (2013) alcançou maior produtividade de carboidratos para o cultivo com concentrações intermediárias de CO₂ (7,5%) e baixos teores de nitrogênio.

Por ser fonte direta de energia, a quantidade e qualidade de irradiação solar sobre o cultivo influencia diretamente no crescimento das microalgas, podendo determinar o sucesso ou fracasso da cultura. A luz solar é um dos principais limitantes para o aumento de escala,

devido à dificuldade para a distribuição homogênea da luz em sistemas mais profundos. Assim, regiões com alta radiação solar durante o ano inteiro são melhores para o cultivo (JOHN et al., 2011). No entanto, a exposição luminosa em excesso pode causar fotoinibição, fenômeno que devido a danos aos receptores fotossintéticos, acarreta a diminuição da velocidade de fotossíntese e da produtividade (KARP, 2005).

O suprimento de CO₂ e nutrientes de forma homogênea também são fatores que dificultam o aumento de escala. As microalgas podem fixar o carbono contido no CO₂ atmosférico, em gases industriais, ou ainda, de carbonatos solúveis em água. O gás carbônico atmosférico não é suficiente para propiciar a grande produção de biomassa necessária para suprir demandas industriais. Deste modo, para fornecer os níveis necessários de CO₂, existe a possibilidade de utilizar gases residuais gerados durante o processo de combustão nas indústrias, pois esses contêm bons níveis de CO₂ (KUMAR et al., 2010). Outra alternativa, é a reutilização do dióxido de carbono produzido durante a fermentação realizada durante o próprio processo de obtenção do etanol (HARUN et al., 2010).

Diversos nutrientes devem ser introduzidos no meio de cultivo para serem utilizados pelas microalgas em seu desenvolvimento. Os principais elementos a serem fornecidos são, além do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, uma vez que são as principais substâncias que constituem as microalgas. Entretanto, também são necessários outros nutrientes, como, sais inorgânicos (potássio, cálcio, sódio, magnésio), elementos traço (ferro, zinco, manganês, chumbo e cádmio) e vitaminas (B, C, E) que, mantêm a estrutura e atividade celular, atuam como cofator de enzimas e auxiliam na divisão celular, respectivamente. (DRAGONE et al., 2011; ZENG et al., 2011).

O fornecimento, distribuição e redução de perdas desses nutrientes são alguns dos desafios a serem otimizados para o aumento de escala de forma competitiva. A utilização de águas residuais e reutilização de nutrientes que restaram do próprio processo de produção de etanol são soluções estudadas. Já que águas residuais, normalmente, têm altos índices de carga orgânica e nutrientes fundamentais para o crescimento das microalgas. Porém, só é praticável o uso de águas residuais no cultivo de espécies resistentes a condições extremas, pois alguns compostos presentes nessas águas podem prejudicar o crescimento das microalgas (KOSE; ONCEL, 2016).

A utilização de águas residuais, além de propiciar a redução dos custos com nutrientes, também auxilia no fornecimento de água, outro ponto importante para viabilizar a produção de etanol 3G, uma vez que em algumas etapas do processo, como no cultivo da matéria-prima, resfriamento e limpeza, são utilizados grandes volumes de água. Ainda, colabora no descarte

de águas utilizadas industrialmente, em razão da diminuição de dejetos ao empregá-las no cultivo de microalgas, reduzindo custos operacionais que seriam destinados ao tratamento dessas águas ao final de outros processos industriais (KOSE; ONCEL, 2016).

Outro fator a ser levado em conta no cultivo de microalgas, essencialmente em sistemas fechados, é o emprego de desgaseificadores para a remoção do O₂ dissolvido (OD) no meio de cultivo, pois a presença excessiva de OD, associada à alta intensidade luminosa, também pode causar danos foto-oxidativos às células e a inibição da fotossíntese (MOLINA et al., 2001). Estima-se que, para se evitar danos às microalgas, os níveis máximos de OD não devam ultrapassar 400% do valor de saturação com ar (CHISTI, 2007).

O cultivo de microalgas pode ser realizado em sistemas abertos (em lagoas abertas), sistemas fechados (em fotobiorreatores), ou ainda, em sistemas híbridos, que combinam as vantagens dos dois métodos. Sendo mais comuns as lagoas abertas fotossintéticas e os fotobiorreatores tubulares fechados (ANTUNES; SILVA, 2010).

4.1.1.1 Lagoas abertas

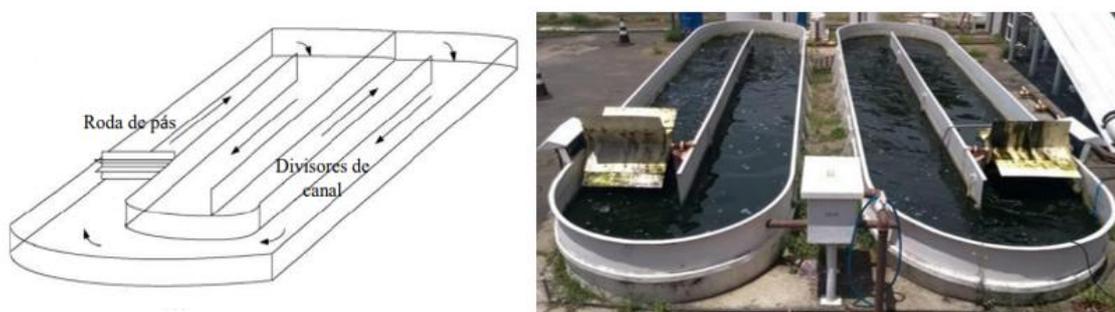
Sistemas abertos são empregados para o cultivo em escala industrial de microalgas desde 1950 e, ainda hoje, são os mais utilizados para esse fim. Esses podem ser naturais, em lagos e lagoas, ou artificiais, como as lagoas circulares, as inclinadas e as do tipo *raceway*. Sendo as mais utilizadas, no cultivo em massa de microalgas, as artificiais do tipo *raceway* (JOHN et al., 2011).

Sistemas do tipo *raceway*, conforme representado na Figura 4, consistem em canais de recirculação de ciclo fechado, com pequenas profundidades e elevados comprimentos, usualmente ovais ou sinuosos desenvolvidos em concreto, mas que também podem ser construídos com fibra de vidro e outros tipos de plástico (KLEIN, 2013; RAZZAK et al., 2013). Geralmente, são operados em regime contínuo, com as microalgas sendo inseridas continuamente imediatamente após as pás, e circulados até um ponto anterior a roda de pás, onde ocorre a retirada da biomassa (JOHN et al., 2011).

Nessas lagoas, para obter uma distribuição mais homogênea dos nutrientes, evitar a sedimentação das algas e melhorar as trocas gasosas, aumentando assim a produtividade de biomassa, o meio de cultivo é misturado por meio de propulsores com pás e/ou injeção de ar (MILANO et al., 2016). Esses aeradores também podem ser utilizados para fornecer dióxido de carbono ao meio, visto que o gás carbônico atmosférico não é suficiente para propiciar a formação de grandes quantidades de biomassa (KUMAR et al., 2010; MILANO et al., 2016).

Alguns estudos indicam que, mesmo possuindo uma menor eficiência em função das barreiras que serão melhor detalhadas na seção 4.1.1.4, culturas de microalgas em lagoas do tipo *raceway* possuem potencial para serem bem-sucedidas em escala comercial (ASHOKKUMAR; RENGASAMY, 2012; DAYANANDA et al., 2010). Mas ainda existem estudos que visam aumentar a produtividade, por meio de modificações, como a diminuição da profundidade dos sistemas para a melhor incidência de luz e o emprego de formas alternativas para homogeneizar o meio, propiciando melhor distribuição dos nutrientes e CO₂, evitando a sedimentação das algas e melhorando as trocas gasosas (CHIARAMONTI et al., 2013).

Figura 4 – Lagoas do tipo *raceway*.



Fonte: Adaptado de Jorquera et al. (2010) e Oss (2019).

4.1.1.2 Fotobiorreatores

Os fotobiorreatores fechados (FBRs) foram criados em função das desvantagens encontradas em sistemas abertos, essas serão detalhadas na seção 4.1.1.4. Esses são reatores isolados do meio externo, projetados para o crescimento autotrófico, que podem ser classificados de acordo com sua geometria ou material de construção. Os principais modelos são os fotobiorreatores tubulares, de placas paralelas e os de coluna. Normalmente, esses reatores são construídos de vidro ou algum tipo de plástico, sendo todos transparentes (KLEIN, 2013; MILANO et al., 2016; RAZZAK et al., 2013).

Dentre as várias formas de fotobiorreatores criados, os tubulares se destacam para a produção de microalgas (BAJHAIYA et al., 2010). Esses fotobiorreatores são formados por tubos retos, dispostos verticalmente, horizontalmente ou inclinados, orientados de forma a potencializar a absorção de luz. Sua superfície tubular eleva a área iluminada, possibilita melhor eficiência na absorção e distribuição da luz, implicando em elevadas produtividades de biomassa, pois reduz a fotoinibição, diminui pontos com carência de luz, aumenta o contato do

CO₂ com o meio líquido e a transferência de massa (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015; TREDICI et al., 1998).

Entretanto, em fotobiorreatores tubulares, o tamanho é um fator limitante, pois os tubos apresentam diâmetros inferiores a 10 cm, isso ocorre porque em sistemas fechados, onde normalmente se atingem altas concentrações de microalgas, a luminosidade não penetra profundamente (CHISTI, 2007). Por apresentarem baixas capacidades, comumente inferiores a 20 L, são necessárias várias unidades para se alcançar produções industriais (CHEAH et al., 2015).

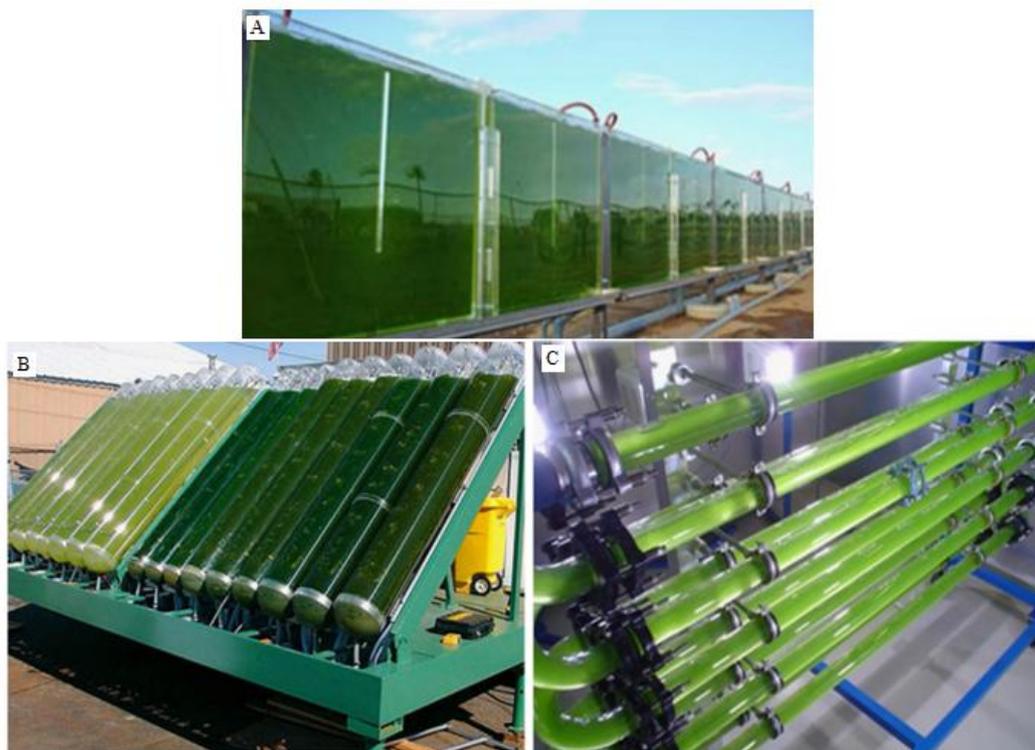
Além disso, o cultivo em FBRs, assim como nas *raceways*, é normalmente contínuo (BRENNAN; OWENDE, 2010). Em reatores tubulares, o meio de cultivo é introduzido e circulado continuamente entre o arranjo de tubos e o reservatório, passando por degaseificação e resfriamento, até o ponto de colheita da biomassa, imediatamente anterior a introdução de um novo meio de cultivo (CHISTI, 2007). De forma similar, em FBRs de placas paralelas, o meio de cultivo fresco e o reciclado são inseridos continuamente em uma extremidade e, na outra extremidade, ocorre a colheita da biomassa e a degaseificação do meio (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Os fotobiorreatores de coluna se assemelham aos tubulares por serem constituídos por um tubo vertical, mas seu formato cilíndrico permitir que apenas metade da sua superfície seja iluminada. Além disso, esse fotobiorreator é compacto, de fácil operação e controle das condições de cultivo, possui boa agitação e as melhores taxas de transferência de massa entre os fotobiorreatores (BRENNAN; OWENDE, 2010; GRIMA et al., 2002). Já os de placas paralelas, consistem em placas paralelas compridas que formam canais por onde finas camadas de meio de cultivo escoam.

Geralmente, tanto nos fotobiorreatores de coluna como nos de placas paralelas, ocorre a injeção de ar no fundo do reator, essa além de normalmente fornecer dióxido de carbono, propicia o aumento da turbulência do meio, reduzindo gastos de energia com agitação, evitando a sedimentação das microalgas e o acúmulo de oxigênio na cultura (BRENNAN; OWENDE, 2010; HARUN et al., 2010).

Na Figura 5 temos a imagem de fotobiorreatores de placas planas (A), de fotobiorreatores tubulares (B) e de um fotobiorreator horizontal contínuo (C).

Figura 5 – Fotobiorreatores fechados.



Onde: A- Fotobiorreatores de placas planas; B- Fotobiorreatores tubulares; C- Fotobiorreator horizontal contínuo.

Fonte: Adaptado de Bitog et al. (2011).

4.1.1.3 Sistemas Híbridos

Os sistemas híbridos são uma alternativa potencial para produção de microalgas, em larga escala, de maneira economicamente viável. Esses sistemas combinam o sistema aberto e fechado em dois estágios separados de cultivo, e são uma solução para superar a baixa produtividade atingida em sistemas abertos e o elevado custo conferido aos sistemas fechados (RAZZAK et al., 2013).

Nesse sistema, primeiramente, as microalgas são cultivadas em reatores fechados até alcançarem altas concentrações celulares, para assim, se tornarem dominantes quando expostas a outras espécies, sendo capazes de sobressair na competição com outros microrganismos. Minimizando, assim, os efeitos de possíveis contaminações e competições com espécies indesejadas, ao serem expostas ao ambiente. Em seguida, as microalgas são transferidas e cultivadas em tanques abertos sob condições controladas de nutrientes, para otimizar a produção de carboidratos (KLEIN, 2013; RAZZAK et al., 2013).

4.1.1.4 Comparação entre os métodos

Sistemas abertos são projetos de fácil instalação e operação, com custos de construção e manutenção econômicos quando comparados aos fotobiorreatores. Contudo, conforme destacado anteriormente, estão sujeitos a desvantagens que promovem uma baixa eficiência de produção. Já os fotobiorreatores corrigem várias desvantagens encontradas no cultivo em sistema aberto, podendo apresentar produtividade de 3 a 5 vezes maiores, mas, possuem custo de construção e operação muito elevados, sendo indicados apenas para espécies e aplicações específicas, nas quais a maior produtividade compense os maiores gastos (MATA et al., 2010).

Em sistemas abertos, a seleção da espécie e do ambiente de cultivo deve ser ainda mais criteriosa, pois por serem abertos para atmosfera, o controle das condições de produção é difícil, o risco de contaminações é elevado e pode haver a competição da espécie de interesse com outras culturas do meio. Outras desvantagens desses sistemas de cultivo, são a necessidade de uma maior área superficial para a instalação, a suscetibilidade a variações de temperatura e incidência de luz durante o dia e sazonais, a perda de água por evaporação e ao escape de CO₂. Além disso, a iluminação que chega efetivamente às microalgas é baixa (BRENNAN; OWENDE, 2010; JOHN et al., 2011; KOSE et al., 2016; MATA et al., 2010).

Devido à possibilidade de verticalização, os fotobiorreatores necessitam de menos espaço para a sua instalação. Além disso, em sistemas fechados, por serem isolados, os empecilhos do risco de contaminação, da competição com outras espécies e dos demais efeitos externos, como chuvas e ventos, são quase inexistentes. Também não sofrem com a evaporação de água e com as perdas de gases do meio de cultivo, e permitem maior controle sob variáveis do processo, como temperatura, pH, agitação, concentrações de O₂ e CO₂, entre outras (BRENNAN; OWENDE, 2010; HOMIAK, 2014; JOHN et al., 2011; MATA et al., 2010).

Outros fatores que colaboram com a maior produtividade e o desenvolvimento de culturas com concentrações bem maiores, são a diminuição de zonas escuras e a eficiente agitação. Essa agitação constante, propicia a homogeneização dos nutrientes e mantém as microalgas suspensas, maximizando a eficiência fotossintética e de fixação de CO₂ (BRENNAN; OWENDE, 2010; MATA et al., 2010).

Assim como os sistemas abertos, os fotobiorreatores também apresentam desvantagens, como as altas tensões de cisalhamento impostas sobre as células, o acúmulo de O₂, a formação de gradientes de pH, a possibilidade do cultivo de uma única espécie de microalga, o bloqueio da luz resultante da incrustação de microalgas na parede e o superaquecimento do sistema (CHISTI, 2007; GRIMA et al., 2002). Esse último fator, adiciona a necessidade de sistemas de

refrigeração e de controle de temperatura, elevando ainda mais os custos com consumo de energia (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015; RAZZAK et al., 2013).

No Quadro 2, estão expostas sinteticamente algumas das vantagens e desvantagens discutidas.

Quadro 2 – Contraposição entre sistemas de cultivo abertos e fechados.

Condições	Sistemas abertos	Sistemas fechados
Custos de construção, manutenção e operação	Baixos	Altos
Eficiência na utilização de luz	Baixa	Alta
Produtividade	Baixa	De 3 a 5 vezes mais produtivos
Controle de variáveis do processo (temperatura, pH, etc)	Difícil	Fácil
Risco de contaminação e competição com outras espécies	Alto	Baixo
Perda de água por evaporação e perda de CO ₂	Alta	Baixa (de acordo com a eficiência de resfriamento, pH do meio, etc)
Agitação	Deficiente	Eficiente/Uniforme
Concentração de biomassa	Baixa	Alta
Área requerida para instalação	Maior	Menor (verticalidade)
Tensão de cisalhamento sobre as microalgas	Muito baixa	Baixa/Alta
Aumento de escala	Difícil	Difícil

Fonte: Adaptado de Mata et al. (2010).

4.1.2 Recuperação e secagem da matéria-prima

Assim como no cultivo, a recuperação de microalgas também é mais complexa que a de macroalgas e a recuperação desses microrganismos também será melhor detalhada devido à maior utilização de microalgas para a produção de etanol.

Normalmente, a colheita das macroalgas ocorre por meio da suspensão das redes nas quais essas estão fixadas. Já a colheita de microalgas ainda é um desafio, por serem microscópicas, possuírem baixas densidades e estarem em suspensão no meio de cultivo, necessitando de sistemas de colheita mais elaborados, que, geralmente, apresentam duas etapas de separação sólido-líquido, sendo a primeira etapa uma separação inicial da biomassa do meio de cultivo e a segunda etapa para aumentar a concentração microalgal (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Existem várias operações unitárias que podem ser empregadas na recuperação de microalgas, tais como, flotação, floculação, sedimentação, filtração, centrifugação, entre outras. Apesar dessa variedade de operações existentes, para a produção em grande escala, ainda é necessário o desenvolvimento de processos energeticamente eficientes e com menor custo. As operações mais utilizadas na primeira etapa de separação são a floculação e a flotação, já na etapa de concentração, as mais empregadas são a filtração e a centrifugação (MUBARAK et al., 2015).

A escolha dos métodos de separação mais adequados é de extrema importância para alcançar a viabilidade econômica do processo de produção do etanol 3G, já que a colheita corresponde de 20 a 30% do custo final do processo de produção de biomassa microalgal (BRENNAN; OWENDE, 2010). Mas, pode chegar a 60% do custo total em meios de cultivos com baixa concentração celular (GRIMA et al., 2003).

Essa escolha depende de características como a densidade e o tamanho da espécie cultivada, além da concentração celular no cultivo, e da relação entre o valor do produto a ser obtido e o custo conferido a cada método. Outro fator importante é o tempo necessário para realizar a separação e a possibilidade de atingir uma concentração final de biomassa que viabilize economicamente seu processamento e conversão (BRENNAN; OWENDE, 2010; MATA et al., 2010).

Para a coleta inicial da biomassa, a floculação química é a técnica mais utilizada, além de econômica, é mais eficiente que outros métodos tradicionais. A decantação e remoção das microalgas são facilitadas pelo agrupamento e, conseqüente, aumento do tamanho das partículas, permitindo que grandes volumes sejam tratado de uma única vez (BILANOVIC et al., 1988; HO et al., 2013; SALIM et al., 2011). Esse método resulta em uma concentração de biomassa de 5 a 10% (GRIMA et al., 2003).

Apesar de ser menos utilizada devido ao seu alto custo, a flotação é outra forma de se realizar a separação inicial da biomassa, sendo a flotação por ar dissolvido, em meio a outros métodos de flotação, a mais utilizada para esse fim. Essa técnica consiste na injeção de microbolhas de ar que arrastam as microalgas para a superfície, formando uma espécie de espuma com maior concentração celular que é coletada (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Atualmente, mesmo possuindo alto gasto energético e altas tensões de cisalhamento, podendo danificar as células, o método mais utilizado na etapa de concentração microalgal é a centrifugação, devido a sua alta eficiência, chegando a 95% em condições otimizadas (GRIMA et al., 2003; KNUCKEY et al., 2006). No entanto, com o aumento de escala os gastos de construção, manutenção e operacionais aumentam ainda mais, tornando a filtração por

membranas cada vez mais atraente em função desses custos serem mais baixos (WANG et al., 2006.)

Outro principal método empregado para a concentração das microalgas é a filtração, apesar de ser uma técnica simples, na maioria dos casos demanda mais energia que a centrifugação (BRENNAN; OWENDE, 2010). Entretanto, costuma ser mais eficiente para microalgas filamentosas ou formadoras de colônias e cianobactérias de grandes tamanhos, permitindo o rendimento de concentração de 27% de sólidos (GRIMA et al., 2003; SCHENK et al., 2008).

Após a recuperação das microalgas, o próximo passo é realizar a secagem da biomassa para a remoção do líquido agregado, com a finalidade de preservar para o armazenamento e preparar a biomassa para a ruptura celular (MIRANDA, 2011). O tempo de secagem para a biomassa microalgal, normalmente, é mais longo quando comparado a outras biomassas, isso ocorre devido aos elevados teores de água em meio as microalgas, o que acaba acarretando significativos gastos energéticos (LEE et al., 2015b).

Diferentes processos de secagem podem ser empregados, com cada método possuindo suas vantagens e desvantagens, sendo essas avaliadas em função do custo energético, do tempo de secagem e da finalidade para a qual a biomassa seca será empregada. Alguns exemplos são, a secagem em estufa, a solar, e a liofilização (GULDHE et al., 2014; FORNASIER et al., 2018). Outro método bastante utilizado industrialmente é a secagem por atomização ou *spray drying*, mas em função do seu elevado custo, o seu emprego é contraindicado para produção de biocombustíveis, por se tratar de um produto de baixo valor agregado (GRIMA et al., 2013; MATA et al., 2010).

Dentre os processos convencionais citados, a secagem ao sol possui o menor custo, no entanto, a secagem por esse método se alonga por longos períodos, necessita de grandes superfícies de secagem, podendo, também, ocorrer a perda da biomassa (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Já a liofilização é o processo de maior custo, principalmente, quando empregado em grande escala. Essa técnica consiste na desidratação após o congelamento e permite uma maior estabilidade celular, obtendo a preservação dos nutrientes, que é necessária em alguns casos (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A secagem em estufa, geralmente apresenta bom custo-benefício, possui um menor custo comparado a liofilização e um tempo de secagem significativamente menor que o obtido no secador solar. Em temperaturas controladas, possui bons resultados de preservação e secagem (GULDHE et al., 2014; FORNASIER et al., 2018).

Alguns estudos que alcançaram bons resultados de secagem utilizando estufa foram o de Fornasier et al. (2018), que constatou a não degradação da espécie *Chlorella vulgaris* mediante a secagem em estufa a 50 °C até peso constante. Zorn (2017), que optou pela secagem em estufa em temperaturas entre 55 a 60 °C por 24 h para efetuar a extração de lipídeos das espécies *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana*. E Freitas et al. (2017), que obteve a preservação da *Spirulina*, após secagem, em temperaturas mais baixas, até níveis satisfatórios de umidade para o armazenamento, com destaque para a de 60 °C.

Após a secagem da matéria-prima, essa pode ser triturada para a posterior avaliação do teor dos componentes de interesse (ZORN, 2017).

Tanto para a recuperação, quanto para a secagem das microalgas cabe o estudo de um método, entre esses tradicionais ou de outros processos existentes, com melhor custo benefício. Sendo a escolha das técnicas a serem utilizadas em grande escala essenciais para alcançar a viabilidade econômica do processo de produção.

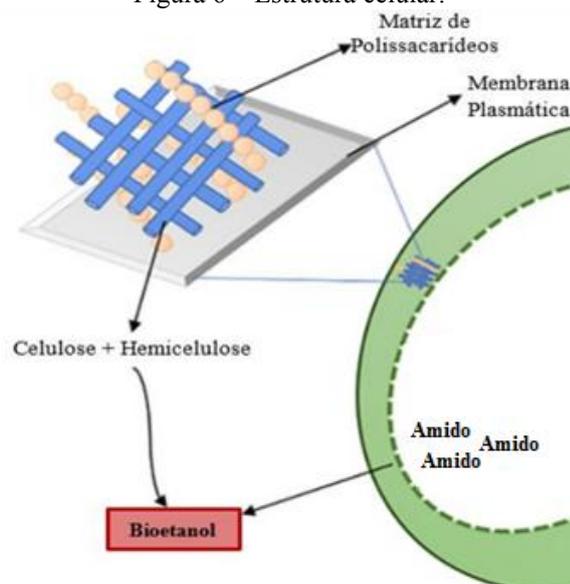
4.2 Rompimento celular

Como dito anteriormente, a maior fração de monossacarídeos é obtida a partir da quebra de amido e celulose. Esses, assim como outros açúcares, são produtos intracelulares, necessitando do rompimento das células, comumente chamado de pré-tratamento, para modificar a estrutura celulósica e promover a liberação desses componentes, tornando-os mais acessíveis as enzimas (HARUN; DANQUAH, 2011a).

A qualidade do rompimento celular influencia no rendimento global de produção de etanol 3G. Um bom pré-tratamento, além de liberar os açúcares intracelulares, deve ser rentável, propiciar uma hidrólise mais rápida e com maior formação de açúcares fermentáveis. Também, não pode causar a degradação de carboidratos, nem a formação de inibidores para as etapas de hidrólise e fermentação (SILVERSTEIN, 2004). Além disso, para facilitar a hidrólise, é desejável a redução do tamanho de partícula para a obtenção de maior área superficial (MOSIER et al., 2005).

Para a escolha do método de rompimento é importante o conhecimento da estrutura da parede celular, representada na estrutura celular da Figura 6. Normalmente, a parede celular de microalgas é composta, externamente, por polissacarídeos específicos, como pectina, ágar e alginatos e, internamente, por celulose, além de outros compostos, como hemicelulose e glicoproteínas. Mas existem diversas composições, sendo essencial realizar pesquisas para caracterização de microalgas específicas (CHEN et al., 2013; MARTÍN-JUÁREZ et al., 2017).

Figura 6 – Estrutura celular.



Fonte: Adaptado de Martín-Juárez et al. (2017).

Diferentes formas de ruptura da parede celular de microalgas têm sido estudadas, pois o rompimento celular é um dos limitantes para a produção, em escala industrial, de bioprodutos, como o bioetanol (GÜNERKEN et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2015). Essas técnicas podem ser divididas entre físicas, químicas ou enzimáticas, sendo também possível a combinação entre técnicas, que pode melhorar a eficiência do pré-tratamento (PAULO, 2011).

Os métodos químicos realizam o rompimento mediante a utilização de solventes orgânicos e reações ácido-base, como por exemplo, recorrendo a adição de ácido clorídrico/sulfúrico, de hidróxido de sódio ou de líquidos iônicos, associados a altas temperaturas e/ou pressões (BRENNAN; OWENDE, 2010; SHUBA; KIFLE, 2018). Esses métodos são apontados como possíveis soluções para melhorar a degradação da celulose e diminuir a cristalinidade da estrutura da parede celular (BEHERA et al., 2014).

Dentre os métodos químicos, a utilização de ácidos fortes é um método promissor para a realização do pré-tratamento visando a produção de etanol 3G, pois essa técnica alcança alta eficiência de liberação de carboidratos (DONG et al., 2016). Essa, ainda, pode ter as desvantagens ambientais conferidas aos métodos químicos, devido à grande toxicidade de algumas substâncias, amenizadas com a utilização de ácidos orgânicos, que são mais biodegradáveis (WANG et al., 2016).

Já os métodos físicos, consistem em técnicas que promovem o rompimento celular por meio da geração de tensões produzidas por aquecimento, turbilhonamento, ou dispositivos mecânicos, como por exemplo, a autoclavagem, o ultrassom, a irradiação micro-ondas, o

moinho de esferas, o homogeneizador de alta pressão e o homogeneizador de alta velocidade. Sendo os três últimos, também denominados métodos mecânicos, em função das tensões que ocasionam o rompimento serem geradas por dispositivos mecânicos (KUMAR et al., 2016).

Dentre os métodos físicos, o equipamento que se destaca é o homogeneizador de alta pressão, que embora ainda possua alto gasto energético, alcança altas taxas de rompimento celular, sendo apontado como uma possível técnica de aplicação industrial (SAMARASINGHE et al., 2012; SPIDEN et al., 2013). Nesse equipamento, a ruptura, fracionamento e homogeneização das microalgas são provocados pela geração de tensões de cisalhamento sobre as partículas, em função de uma brusca descompressão, alcançada pela passagem das microalgas, a alta pressão, através de um pequeno orifício que desemboca em uma câmara a pressão atmosférica (ANGLES et al., 2017). Além disso, o homogeneizador precisa de um sistema de refrigeração, pois essa descompressão acarreta significativa liberação de calor (TREVAN et al., 1990).

Por fim, os métodos enzimáticos, consistem na degradação da estrutura celular pela combinação de enzimas, com cada espécie enzimática responsável por degenerar um componente específico da parede celular (KHOO et al., 2020). Embora seja um método com menor geração de resíduos, o processo enzimático é mais lento e necessita de maior controle dos parâmetros do processo. Sendo indicado para compostos de interesse sensíveis à tensão de cisalhamento, ao calor, ou facilmente degradadas por compostos químicos. Também devem ser analisados a presença de inibidores e a possibilidade de reciclo das enzimas, devido ao alto custo de algumas enzimas. Além disso, a eficiência de ruptura pode ser influenciada por outros fatores, como a espécie/gênero da microalga e pelo estágio de crescimento celular (FLEURI; SATO, 2005).

O melhor método de tratamento depende de muitos elementos específicos de cada processo, como a composição da biomassa celulósica, pH, temperatura, material de construção dos equipamentos, impacto ambiental, viabilidade econômica, entre outros. No Quadro 3, encontra-se uma comparação de alguns desses fatores para os métodos físicos, químicos e enzimáticos.

Quadro 3 – Comparativo entre diferentes métodos de rompimento celular.

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Físicos	Não utiliza produtos químicos tóxicos.	Alto gasto energético e hidrólise insuficiente.
Químicos	Rapidez, facilidade e eficiência da hidrólise.	Uso de substâncias tóxicas; pode ocorrer a decomposição de açúcares em inibidores da fermentação; pode ocorrer corrosão do equipamento (ácido concentrado).
Enzimáticos	Possibilita seletividade; menor quantidade de resíduos; não necessita de altas temperaturas e possibilita o uso de equipamentos simples.	Alto custo das enzimas; processo lento; necessita maior controle do processo.

Fonte: Paulo, 2011.

4.3 Hidrólise

A Hidrólise, ou sacarificação, consiste na quebra de polissacarídeos em monossacarídeos. Esse processo é imprescindível, pois as leveduras normalmente utilizadas comercialmente não são capazes de fermentar o amido, a celulose e demais polissacarídeos presentes no interior da microalga (HARUN et al., 2010). Essa etapa está inter-relacionada com a etapa do pré-tratamento, uma vez que a despolimerização da parede celular faz parte do processo de rompimento celular (RAZEGHIFARD, 2013).

A hidrólise pode ser química ou enzimática, sendo as principais vantagens e desvantagens a serem ponderadas para a escolha do método com melhor custo-benefício

destacadas no Quadro 3. Essas, são basicamente as mesmas já citadas para os pré-tratamentos dessas categorias, com o adendo de que, para a hidrólise enzimática, normalmente é necessária a realização de pré-tratamentos. No entanto, a utilização de enzimas é uma boa alternativa para obter maiores conversões sem a formação de inibidores (LYND et al., 2002).

A hidrólise ácida atua na quebra da parede celular, seguida da despolimerização dos compostos intracelulares. O ácido fragmenta as ligações dos polissacarídeos, de forma que ao final da hidrólise, qualquer adição de água resulta na rápida partição desses em seus monossacarídeos (PANDEY et al., 2019; ABD-RAHIM et al., 2014).

Apesar da hidrólise com ácido concentrado possuir maiores taxas de obtenção de açúcares fermentáveis, o método mais empregado para biomassas celulósicas, em larga escala, é a hidrólise com ácido diluído. A menor utilização de ácidos concentrados é conferida às dificuldades de operação, reciclo e a formação de substâncias que podem inibir a fermentação, como, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido levulínico. Além disso, ao se utilizar ácido diluído, não é necessário recuperar o ácido e essa técnica pode ser utilizada em biomassas aquáticas (JEONG et al., 2012; ZHOU et al., 2011).

Em geral, a hidrólise ácida é associada a elevadas temperaturas e oferece maior conversão. Além disso, em meio a outros ácidos, o ácido sulfúrico tem se destacado por apresentar bons resultados (CHEN et al., 2013; JAMBO et al., 2016). Como, por exemplo, Miranda et al. (2012), constataram que a hidrólise da microalga *Scenedesmus obliquus* com ácido sulfúrico, a 120 °C, por 30 minutos, possuía melhor conversão de carboidratos e açúcares complexos em açúcares simples do que os demais métodos químicos e físico-químicos testados.

Shokrkar et al. (2017), também alcançaram bons resultados para a hidrólise com ácido sulfúrico diluído, avaliando uma cultura mista (*S. obliquus*, *C. vulgaris* e *C. reinhardtii*). Nesse estudo, além do ácido sulfúrico diluído, foram empregados o ácido clorídrico e fosforoso, a 121 °C, encontrando rendimentos em açúcares redutores superiores a 80%, para concentração microalgal de 25 a 50 g/L. No entanto, os resultados foram bastante inferiores para concentrações maiores de microalgas, cerca de 54% para uma concentração de 100 g/L, sendo uma forma encontrada para obter melhores rendimentos, a adição de MgSO₄ ao ácido sulfúrico diluído.

O outro método de hidrólise é o enzimático, que emprega enzimas, como as celulasas, as α -amilases e as glucoamilases, para realizar a quebra dos carboidratos (CHOI et al., 2010). Para aumentar a fração de polissacarídeos convertidos em açúcares simples, a hidrólise enzimática é, normalmente, associada a pré-tratamento termoquímico (ZHOU et al., 2011).

Suali e Sarbatly (2012) constataram que o pré-tratamento com ácido diluído aumenta o rendimento da hidrólise enzimática. Já Choi et al. (2010), mesmo sem pré-tratamentos, obtiveram êxito na hidrólise da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* a partir das enzimas amilase de *B. licheniformis* e glucoamilase de *Aspergillus niger*.

A hidrólise enzimática vem conquistando espaço e tem sido foco de diversos estudos. No entanto, mesmo com os bons resultados alcançados, a lentidão do processo e o alto custo das enzimas limitam sua maior aplicação industrial, sendo a hidrólise química ácida a mais utilizada comercialmente. Também é usual, para biomassas compostas de celulose e hemicelulose, a combinação dos métodos químicos e enzimáticos, aliados a rompimentos físicos (ABD-RAHIM et al., 2014; ZHOU et al., 2011).

Após a hidrólise, encaminha-se para a fermentação, podendo também realizar uma etapa anterior de destoxificação, para diminuir a concentração de inibidores e melhorar a fermentação.

4.4 Fermentação

A próxima etapa é a fermentação alcoólica, na qual, microrganismos degradam os compostos orgânicos formando o etanol, dióxido de carbono e liberando energia. Essa etapa é a essência do processo, sendo fundamental para produção de um etanol de boa qualidade (MATSUDO et al., 2011).

Ao se manter o hidrolisado e o agente fermentador em dornas de fermentação, o etanol é produzido pela redução de aldeído acético obtido do piruvato resultante da quebra da glicose, conforme a Figura 7. Destaca-se que a enzima responsável pela descarboxilação do piruvato é a piruvato descarboxilase, a qual está presente em todos os agentes de fermentação alcoólica (MATSUDO et al., 2011).

Figura 7 – Etapas da fermentação alcoólica.



Fonte: Adaptado de Martín-Juárez et al. (2017).

A fermentação alcoólica possui as fases preliminar, tumultuosa e complementar. E deve ser idealmente interrompida ao final da fase tumultuosa, a fim de poupar tempo e evitar danos ao fermentador.

Após a inserção dos fermentadores ao meio, verifica-se uma grande multiplicação celular e pouco desprendimento de CO₂, essa fase é chamada de preliminar. Em seguida, ocorre a fase tumultuosa, marcada pela alta taxa fermentativa e grande liberação de CO₂, além do aumento de temperatura, do fervilhar do mosto e da formação de espuma. Por fim, chega-se a fase complementar, na qual o desprendimento de dióxido de carbono é bem menor, o mosto se assenta com a redução da temperatura, e ocorre a diminuição rápida do teor de açúcares (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009 apud RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999).

No Brasil, o processo fermentativo costuma seguir o método Melle-Boinot, um processo em batelada alimentada com reciclo do fermentador. Esse é recuperado, geralmente por centrifugação, do vinho resultante de uma fermentação anterior. Normalmente, esse método costuma alcançar boa produtividade e diminuir os riscos do agente fermentador se tornar inativo devido à repressão catabólica, mas a fermentação também pode ser conduzida em batelada ou em processo contínuo (PACHECO, 2010).

O rendimento da fermentação pode ser comprometido pela influência de variados fatores como, por exemplo, pela temperatura, pH e teor alcoólico no meio, qualidade do substrato, possíveis contaminações microbianas e pela floculação do fermentador (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009 apud RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999).

As leveduras, algumas bactérias e fungos filamentosos podem promover a fermentação alcoólica de açúcares, porém, as leveduras são as mais utilizadas. Para a adequada aplicação industrial, os agentes fermentadores devem possuir alto rendimento e velocidade de fermentação, ser tolerantes a acidez, ao etanol, a altas temperaturas, e aos inibidores formados durante o pré-tratamento/hidrólise, possuir estabilidade genética e se adaptar a variações de concentração osmótica (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; ALENCAR et al., 2009).

As enzimas possuem faixas de pH e temperatura ótimas, nas quais sua atividade é máxima. Apesar das leveduras tolerarem meios com pH entre 2,5 e 8,5, a faixa ótima para o pH se encontra entre 4 e 5, já que em meios mais ácidos o crescimento das leveduras é restringido e a proliferação de bactérias que venham a contaminar o meio é dificultada (SCHMIDELL et al., 2001).

Embora a velocidade da reação enzimática aumente com o aumento da temperatura, a faixa ótima de temperatura para as leveduras se encontra entre 28 e 34 °C, pois após atingir uma velocidade máxima, o aumento de temperatura inibe a atividade enzimática,

principalmente em meio com altas concentrações de etanol, podendo causar a desnaturação das enzimas, tornando-as inativas (BROWN; OLIVER, 1982).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é tradicionalmente empregada na fermentação industrial, uma vez que apresenta elevada tolerância a acidez, ao etanol, e a outros inibidores, proporcionando altas produtividades de etanol. Contudo, possui a grande desvantagem de só ser efetiva na conversão de hexoses (BALAT et al., 2008; MUSSATTO et al., 2010).

Além das hexoses, o hidrolisado é composto por outros açúcares, como a xilose, galactose, manose, arabinose. Sendo assim, para se conseguir a adequada fermentação de outros monossacarídeos, o uso de outros microrganismos fermentadores, além da *S. cerevisiae*, deve ser providenciado (KATAHIRA et al., 2006).

Algumas bactérias, como a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Zymomonas mobilis*, podem ser utilizadas para fermentação industrial (DIEN et al., 2003). Entretanto, é preciso mais testes visando a utilização de outros microrganismos para a fermentação de biomassa microalgal. Ainda, a *Zymomonas mobilis*, uma das bactérias mais empregadas, também só realiza, com bom rendimento, a fermentação de hexoses (MUSSATTO et al., 2010).

Rempel (2018) realizou a fermentação de biomassa proveniente da *Spirulina* sp., adicionando nutrientes ao mosto, com 10% (v/v) de inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em temperaturas de 30 °C, pH entre 4,5 e 5, constatando uma conversão de açúcares em etanol de 83,56 %, alcançando maior produtividade com 16 h de fermentação. Já Lee et al. (2015a), procederam a fermentação da biomassa residual de *Chlorella* sp., após a extração de lipídeos, por 20 horas a 180 rpm, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com temperatura em torno de 30 °C, e obtiveram rendimentos de 79,3% e 82,4% para a fermentação realizada após a hidrólise ácida e para hidrólise enzimática simultânea a fermentação, respectivamente.

4.5 Destilação

Como o etanol é geralmente comercializado na forma hidratada, com aproximadamente 95 % de etanol em volume, ou na forma anidra, com concentração de pelo menos 99,5 % de etanol, é necessário realizar a purificação do mosto resultante da fermentação, composto basicamente por etanol, água e outros componentes minoritários, para elevar a concentração de etanol e possibilitar sua comercialização (MUSSATTO et al., 2010; GIL et al., 2014).

A purificação é realizada principalmente por meio da destilação, na qual a separação acontece em função da diferença entre as volatilidades relativas dos componentes da mistura,

culminando em um vapor enriquecendo do material mais volátil e em um líquido contendo altas concentrações dos componentes menos voláteis (MCCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).

No caso do etanol obtido a partir da cana de açúcar, o vinho resultante da fermentação possui uma concentração de aproximadamente 6 a 10 °GL¹, sendo viável sua purificação por meio da destilação (JARDIM, 2014). Na obtenção do etanol 3G, existe a preocupação da geração de um hidrolisado com maiores concentrações de açúcares fermentáveis e métodos que permitam maior eficiência de fermentação, para que o baixo teor de etanol não impossibilite a utilização da destilação como etapa de purificação.

A destilação da mistura etanol-água possui várias dificuldades, entre elas estão o elevado consumo energético e a formação de um azeótropo para a composição de, aproximadamente, 93% em massa de álcool. Essa fração pode ser aumentada pela redução da pressão do processo, no entanto, não é viável economicamente obter o etanol anidro apenas pela redução da pressão, sendo necessária uma posterior desidratação ou o emprego de técnicas alternativas de destilação para obter álcool em concentrações superiores ao seu ponto azeotrópico (SILVA et al., 2018).

Para a obtenção do etanol anidro os processos alternativos mais utilizados são a destilação azeotrópica por meio do uso de ciclo-hexano, a destilação extrativa utilizando monoetilenoglicol ou glicerol e a desidratação com peneiras moleculares (GIL et al., 2014).

¹ É a fração de etanol, em volume, contida na mistura.

5 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS

Existem mais de 100.000 espécies de algas na Terra, distinguidas a partir de sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. Esse grupo de organismos é normalmente aquático, clorofilado, fotossintetizante, não vascular, sem a presença de flores e sementes, e produtor de esporos (HOMIAK, 2014). As algas também possuem baixo nível de lignina e hemicelulose, o que facilita o processo de hidrólise e aumenta a produtividade e o desempenho do combustível (CARRIQUIRY et al., 2011).

Através da fotossíntese, as algas utilizam luz solar, nutrientes e dióxido de carbono para seu crescimento celular, assim como, para produção de carboidratos e lipídeos, de maneira mais eficiente que as plantas superiores (BRENNAN; OWENDE, 2010). As taxas de carboidratos, lipídeos e demais propriedades conferidas a determinadas algas são influenciadas por sua natureza, pelas condições de cultivo e estado fisiológico da cultura (DÍAS-PALMA et al., 2012).

Devido às vantagens de produtividade de biomassa que as microalgas possuem quando comparadas às macroalgas, a maior parte das pesquisas abordam esses micro-organismos. A partir de espécies e gêneros apontados por alguns autores, percebe-se uma grande incidência de gêneros do filo das algas verdes (Chlophytas), como por exemplo, *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. e de cianobactérias, como *Spirulina* sp. Mas, também são realizados estudos com foco em outras microalgas, e até mesmo, macroalgas. Na Tabela 1 são apresentados percentuais de carboidratos, em peso seco, de algumas microalgas.

Tabela 1 – Percentual de carboidratos, em peso seco, de diferentes microalgas.

Biomassa	% Carboidratos (Peso Seco)	Referências
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17,00	(DRAGONE et al., 2011).
<i>Chlorella</i> sp.	19,50	(PHUKAN et al., 2011).
<i>Chlorella vulgaris</i>	20,99	(WANG et al., 2013).
<i>Dunaliella salina</i>	32,00	(DRAGONE et al., 2011).
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	21,69	(SHUPING, et al., 2010).
<i>Euglena gracilis</i>	14-18	(DRAGONE et al., 2011).
<i>Prymnesium parvum</i>	25-33	(DRAGONE et al., 2011).
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21-52	(DRAGONE et al., 2011).
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17	(DRAGONE et al., 2011).
<i>Spirulina platensis</i>	31,20	(JENA et al., 2011)
<i>Spirulina</i> sp.	20,00	(BILLER; ROSS, 2011.)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	8,00	(BILLER; ROSS, 2011.)

Fonte: Do autor (2021).

Com base nos dados apresentados, é possível constatar uma maior quantidade de carboidratos nas microalgas dos gêneros *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp., incidentes na literatura, quando comparadas, por exemplo, com as microalgas da espécie *Nannochloropsis oculata*. Outras espécies, como *Euglena gracilis* e *Prymnesium parvum*, citadas por Antunes e Silva (2010), também possuem um percentual de carboidratos atrativo para a produção de etanol. Mas, cabe reforçar que existem outras propriedades a serem consideradas, como por exemplo a taxa de crescimento, antes de selecionar a matéria-prima, mesmo que possuir grandes quantidades de carboidratos seja essencial.

Apesar do seu elevado crescimento celular, altas taxas de carboidratos e maior facilidade de fermentação, as microalgas necessitam de técnicas mais específicas para viabilizar o seu cultivo, extração e conversão, gerando custos de processamento superiores quando comparados com outros tipos de cultura (SUALI; SARBATLY, 2012). Ainda que apresente desvantagens, a grande quantidade de vantagens observadas nas microalgas faz com que pesquisadores acreditem em uma melhor adequação desse grupo de algas para produção de etanol (MENETREZ, 2012).

A partir das microalgas, os monossacarídeos que são fermentados para originar o etanol são obtidos pela hidrólise do amido, principal polissacarídeo de reserva, juntamente de carboidratos, presentes na parede celular, com função estrutural. A parede celular de microalgas é composta essencialmente por carboidratos, sendo externamente constituída por polissacarídeos específicos, como pectina, ágar e alginatos e, internamente, o principal componente é a celulose, além de outros compostos, como hemicelulose e glicoproteínas (CHEN et al., 2013; MARTÍN-JUÁREZ et al., 2017).

5.1 Algas verdes

As microalgas verdes pertencem ao filo das *Chlorophytas*, são micro-organismos fotossintetizantes bastante diversos, com cerca de 8 mil espécies distintas. Seu principal componente de reserva é o amido, e as suas paredes celulares são constituídas internamente de celulose e externamente de pectina. As *Chlorophyceae*s, uma classe que engloba quase todas as algas verdes, são conhecidas por apresentarem grandes taxas de crescimento (HADI et al., 2016).

Os gêneros *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. são constantemente citados na literatura para a produção de bioetanol de terceira geração. Mas também existem estudos que apontam a potencial produção de etanol a partir de outras microalgas verdes, como as do gênero *Spirogyra*

sp. e *Dunaliella* sp., estudadas por Paulo (2011) e Varela-Bojórquez et al. (2016), respectivamente. Além da espécie *Chlamydomonas reinhardtii*, estudada por autores como Costa (2014), capaz de realizar fotofermentação, um metabolismo alusivo a fermentação ácida mista de bactérias, que tem como produtos elementos como o etanol e H₂.

Varela-Bojórquez et al. (2016), utilizaram a espécie *Dunaliella tertiolecta* por apresentar bons teores de carboidratos e maior facilidade de cultivo devido sua alta tolerância à salinidade, temperatura e luz. O cultivo se deu em um sistema entre 23 e 24 °C, com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A colheita foi realizada por centrifugação a 4.000 rpm e 10 °C, com posterior lavagem com amônio 0,5 M e liofilização. A biomassa foi submetida a hidrólise ácida com ácido sulfúrico 1% (v/v) a 120 °C por 15 minutos, após esse período a biomassa foi filtrado para remover os resíduos sólidos, neutralizada com NaOH 2 M e autoclavada a 120 °C durante 15 minutos. Na fermentação, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, inoculada durante 24 horas a 200 rpm e 30 °C. A concentração máxima de etanol foi obtida entre 30 e 33 horas de fermentação, na qual obteve-se aproximadamente 0,615 mL de etanol por grama de biomassa, sendo essa microalga considerada adequada para a produção de bioetanol.

Já Paulo (2011), para microalgas do gênero *Spirogyra* sp., realizou o cultivo em fotobiorreatores em coluna de duas formas, com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão ou iluminação constante, sendo que sob iluminação constante a produção de biomassa foi bem mais rápida, fazendo-se mais adequada para a produção de etanol. Nas etapas de ruptura celular e hidrólise, o método considerado mais adequado dentre os testados, foi a hidrólise com ácido sulfúrico a 2 N em autoclave a 120 °C por 30 minutos a 1,2 bar. Esse método, apesar de ter atingido menor sacarificação (78%) quando comparado a técnica que associou moagem a 48 h de hidrólise enzimática (90%), foi avaliado como mais vantajoso em virtude do bom rendimento obtido com a hidrólise ácida sem formação de inibidores e do longo período necessário para realizar a hidrólise enzimática. Ao final, utilizando a levedura *S. carlsbergensis*, foi obtido um rendimento de 82% para a fermentação de glucoses e manoses, degradando também alguma arabinose, mas não metabolizando xiloses e galactoses. O baixo teor alcoólico produzido não foi passível de detecção, mas em função dos rendimentos próximos à outras microalgas estudadas, a autora considerou essa biomassa uma possível candidata para produção de etanol.

Microalgas do gênero *Chlorella* sp. foram estudadas por Lee et al. (2015a), que procederam um estudo sobre a produção de etanol a partir da fermentação da biomassa residual de *Chlorella* sp. após a extração de lipídeos. Primeiramente, as microalgas foram cultivadas em

um reator de coluna de bolha Pyrex de 6 L, colhidas por centrifugação (4000 rpm, 10 minutos), lavadas e liofilizadas por quatro dias ou mais. Posteriormente, foi realizada a extração dos lipídeos, e cada kg de *Chlorella* sp. resultou em 0,62 kg de a biomassa residual. A hidrólise foi testada por via ácida e enzimática em diferentes condições, não foi necessário pré-tratamento devido ao rompimento da parede celular durante a extração de lipídeos. A hidrólise enzimática foi realizada com várias enzimas comerciais, em diferentes temperaturas (35-55 °C) e pHs (3,5-6,5), com a concentração de enzimas na faixa de 0,08-2,4 mL/g de resíduo de biomassa seca. A maior eficiência de sacarificação para a hidrólise enzimática foi de 76,8% com base na quantidade de carboidrato total, na qual 93,8% dos monossacarídeos totais eram glicose. Esses resultados foram obtidos para a hidrólise conduzida por 3 horas com 0,8 mL de Pectinex por g de biomassa residual a 45 °C e pH 5,5. No entanto, sob as mesmas condições, o rendimento da hidrólise enzimática testada para as células inteiras foi de apenas 22,7%. Já a hidrólise com ácido diluído foi realizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos na presença de HCl ou H₂SO₄ em variadas concentrações (0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1 N), sendo obtidos melhores resultados para 0,3 N de HCl, para a qual foi alcançada uma eficiência de sacarificação de 98,2%, na qual 82% eram glicose. Foi realizada a fermentação (3 mL de *S. cerevisiae* pré-cultivada, a 30 °C e 180 rpm por 20 horas) do hidrolisado enzimático e do hidrolisado com ácido diluído nas condições de maior sacarificação, sendo testada também a realização da hidrólise enzimática simultânea a fermentação. Foi alcançado um rendimento de 79,3% de conversão de açúcares fermentáveis na fermentação do hidrolisado enzimático e a fermentação, após a correção do pH, do hidrolisado ácido resultou na produção de 0,4 g etanol/g açúcar fermentável. Na hidrólise enzimática com fermentação simultânea, a biomassa residual foi misturada a uma solução tampão de acetato de sódio (pH 6,0), *S. cerevisiae* inoculada e 0,8 mL de enzimas por grama de biomassa, obtendo um rendimento de etanol de 82,3%. Assim, a hidrólise enzimática com fermentação simultânea foi o procedimento com maior eficiência na formação de etanol, além de ser um processo mais simples e rápido, sendo apontado como mais adequado para esse caso. Por fim, a utilização dessa biomassa residual foi considerada possível, além de contribuir para viabilidade econômica da produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

Klein (2013) e Martins (2018) também estudaram as microalgas do gênero *Chlorella*. Klein (2013) realizou o cultivo em fotobiorreator de placa plana, analisando algumas variáveis de cultivo e alcançando maiores produtividades de carboidratos para o cultivo submetido a alto fluxo luminoso, com iluminação contínua, concentrações de CO₂ intermediárias (7,5%) e baixos teores de nitrogênio. A ruptura das células anterior à hidrólise foi feita por desintegração mecânica através do uso de pilão e almofariz. Para a hidrólise ácida utilizando H₂SO₄ 2 N, a

120 °C em autoclave vertical por 30 minutos, foi possível atingir concentrações de até 2 g/L de açúcares fermentescíveis, no entanto, a quebra das paredes celulares e a liberação de açúcares não foi completa, pois foram detectadas células inteiras, provavelmente devido a maceração ineficiente da biomassa. Além disso, a hidrólise ácida a alta temperatura resultou na formação de inibidores e perda de açúcares fermentescíveis pela sua decomposição, as hexoses foram degradadas em ácido levulínico e HMF, enquanto o furfural é resultado da degradação de pentoses. Já a fermentação foi realizada em agitador orbital a 30 °C e agitação de 160 rpm por 120 horas, utilizando 10 gramas de massa úmida da levedura *Dekkerabruxellensis* CCA155 (mantida no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos) por litro de hidrolisado. Apesar de ser capaz de converter diferentes hexoses e pentoses em etanol, essa levedura possui um metabolismo mais lento quando comparada a *Saccharomyces cerevisiae*, o que somado as baixas concentrações de açúcares no hidrolisado, culminou em baixos teores de etanol que não puderam ser detectados pelo HPLC. Assim, a adaptação das leveduras ao hidrolisado de microalgas, a otimização da hidrólise de maneira a disponibilizar maior concentração de açúcares, assim como a quantidade de leveduras e o tempo ideal de fermentação precisam ser avaliados para que seja possível a produção de etanol a partir dessa biomassa utilizando a levedura *Dekkerabruxellensis*.

Já Martins (2018) avaliou ser possível a extração integrada de lipídeos e carboidratos da microalga *Chlorella* sp. para a produção conjunta de bioetanol e biodiesel. E obteve bons resultados aplicando a hidrólise ácida (5 % (v/v) de H₂SO₄, a 120 °C, por 10 minutos), utilizando uma concentração 10 g/L de sólidos totais, que resultou em um rendimento de 89% de sacarificação. No entanto, constatou que uma maior concentração de biomassa reduz a eficiência de hidrólise, provavelmente, devido ao contato insuficiente entre as células e o ácido, o que dificulta a ampliação de escala.

Huahuachampi e Conto (2020) objetivaram a produção de etanol a partir da biomassa de *Scenedesmus obliquus* cultivada em água residual de lavanderia doméstica. Inicialmente, o cultivo foi realizado em um fotobiorreator tubular com emprego de águas residuais de lavanderia doméstica, a produção ideal ocorreu em aproximadamente 28 dias. Além da viabilidade de produção microalgal, o cultivo foi considerado capaz de efetuar o tratamento dessas águas residuais contendo nitratos e fosfatos, pois as concentrações de nitratos anterior e posterior ao cultivo, respectivamente, foram de 23,56 mg/l e 4,81 mg/l, enquanto a concentração de fosfato decresceu de 30,45 mg /l para 4,30 mg /l. A biomassa de algas foi colhida por sedimentação/floculação com sulfato de alumínio e desidratada em secador solar. As melhores condições experimentais de hidrólise foram obtidas utilizando ácido sulfúrico. Nesse processo,

primeiramente, a biomassa (0,5 kg) foi suspensa em 5 L de H_2SO_4 (2 N) a 25 °C e depois colocada em autoclave por 30 minutos a 120 °C e 15 psi, resultando em 47 g de açúcares fermentáveis totais para cada 100 g de microalgas. Após a hidrólise a biomassa foi filtrada e teve seu pH ajustado entre 4,0 e 4,5 com $Mg(OH)_2$. O agente fermentador utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a fermentação foi conduzida por 30 horas sob agitação de 115 rpm, pH entre 4,0 e 5,0 e temperatura de 30 a 35 °C. Durante a fermentação, foram consumidos 71,9 % dos açúcares totais, alcançando entre 28 e 30 horas uma concentração de 15,5 g/L de etanol. Essa foi mantida constante e após a destilação, o teor de etanol obtido por destilação foi de 14% em peso, segundo os autores, sendo condizente com outras investigações feitas da mesma forma.

Miranda (2011) também utilizou as microalgas da espécie *Scenedesmus obliquus* para a produção de bioetanol. Nesse estudo, o método que resultou em uma maior extração de açúcares também foi a hidrólise ácida com H_2SO_4 (2 N), em autoclave por 30 minutos a 120 °C. Além disso, com a secagem prévia da biomassa a eficiência de sacarificação foi aumentada em 55%, tendo um papel importante no processo, possivelmente devido ao enfraquecimento da parede celular. Foi obtido melhores resultados de fermentação utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus*, a qual resultou em uma concentração de etanol de 11,7 g/L após 24 h de fermentação. E, em função do baixo rendimento de formação de etanol, conclui-se que provavelmente ocorreu a formação de inibidores durante o processo, o que justificou a baixa eficiência de fermentação.

Por meio dos trabalhos descritos é possível perceber que no geral as concentrações de etanol obtidas são baixas, sendo necessário desenvolver microalgas com maiores teores de carboidrato e realizar otimizações no processo como um todo para viabilizar a produção comercial de etanol 3G.

No cultivo, algumas alternativas encontradas para agregar maiores concentrações de carboidratos na biomassa, foram mantendo a cultura sob iluminação contínua, concentrações médias de CO_2 e baixos teores de nitrogênio (KLEIN, 2013; PAULO, 2011). Outro ponto notado, foi a importância da secagem prévia da biomassa, que, no trabalho de Miranda (2011), permitiu o aumento de 55% na eficiência de sacarificação obtida pela hidrólise ácida da microalga *Scenedesmus obliquus*.

Além disso, a maior parte dos autores aplicaram a hidrólise ácida associada a altas temperaturas, que pode gerar inibidores de fermentação. Ainda, a levedura mais utilizada foi a *S. cerevisiae*, que só apresenta altas taxas de fermentação a partir de hexoses. Esses fatores, contribuem para as baixas quantidades de etanol produzidas, sendo necessário maior ênfase no

aprimoramento da hidrólise enzimática e de outros microrganismos fermentadores. Uma abordagem interessante foi realizada por Lee et al. (2015a), que obtiveram sucesso realizando a hidrólise enzimática simultânea a fermentação, o que traria vantagens relativas a redução de uma etapa de processo, deixando-o mais simples, rápido e acessível.

Outras melhorias foram apontadas por Huahuachampi e Conto (2020), que mostraram ser possível a utilização de águas residuais de lavanderias domésticas, o que diminuiria os gastos com nutrientes no cultivo. Por fim, Martins (2018) e Lee et al. (2015a) concluíram ser viável a extração integrada de lipídeos e carboidratos da microalga *Chlorella* sp. para a produção conjunta de etanol e biodiesel, o que contribuiria abundantemente para a viabilização da produção de biocombustíveis 3G, pela redução dos custos de produção e adição de valor ao que seria um resíduo.

5.2 Cianobactérias

As microalgas do filo *Cyanobacteria* são procariontes, fotoautótrofos e geralmente apresentam coloração azul esverdeada. Uma das grandes vantagens do uso de cianobactérias para a produção de etanol é a capacidade desses microrganismos de realizar fermentação sem a necessidade da adição de agentes fermentadores, como as leveduras (DVORAK, 2015; PALINSKA; KRUMBEIN, 2000; GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2012).

A maior parte dos estudos encontrados envolvendo cianobactérias foram utilizando as microalgas do gênero *Spirulina*. Rempel (2018) propôs produzir bioetanol reutilizando a biomassa residual para posterior produção de biometano. O cultivo foi realizado em tanques abertos de 10 L com agitação e suplementação com *Zarrouk* 20%. As microalgas foram recuperadas por filtração, em tela de nylon, após atingirem a fase de declínio e submetidas a secagem em estufa por 24 horas a 50 °C, resultando em uma biomassa com 55% de carboidratos. O método físico de ruptura celular testado com o melhor desempenho foi o de congelamento/descongelamento. Em seguida, foi avaliada a hidrólise enzimática utilizando as enzimas alfa-amilase e amiloglicosidase livres e imobilizadas, com temperatura ótima de 50 °C e pH de 5,5. Para a imobilização das enzimas, foram adicionados 5 ml de poliálcool polidimetilacrilato e 5 ml de isocianato de tolueno, mantendo a relação 5:5 (v/v), depois, os suportes com as enzimas foram colocados por 24 horas em dessecador, fracionados, embalados a vácuo e armazenados a 4 °C. A hidrólise da solução de *Spirulina* 20% (m/v) teve duração de 24 horas, com agitação de 150 rpm e com o meio mantido a temperatura e pH ótimos. Nessas condições, a hidrólise com 1 % (v/v) de cada uma das enzimas não imobilizadas alcançou rendimentos próximos a

100%, enquanto que para hidrólise com as enzimas imobilizadas, a maior eficiência foi de 83,19%, ao se adicionar 1% (m/v) do suporte com enzimas imobilizadas em conjunto, na razão de 1,5 mL de enzimas para aproximadamente 10 g de suporte. A menor eficiência se deu em função do menor volume de enzimas adicionado, mas é possível perceber que as enzimas imobilizadas possuem maior atividade, pois mesmo em concentrações de enzima inferiores alcançaram uma sacarificação satisfatória. No entanto, as enzimas imobilizadas não apresentaram bons resultados de reuso, o que pode ter ocorrido pelo desprendimento e lixiviação das enzimas durante as 24 horas de reação. A fermentação conduzida a 30 °C, pH entre 4,5 e 5, e utilizando 10% (v/v) de inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada para diferentes concentrações de hidrolisado, com ou sem a adição de nutrientes ao mosto. Para a fermentação sem a adição de nutrientes, aplicando 3% de hidrolisado no preparo do inóculo, foi obtida uma conversão de 83,36%. Já adicionando 15% de hidrolisado no preparo do inóculo, as conversões de açúcares em etanol foram de 83,56% e 74,11%, com e sem a adição de nutrientes ao mosto, respectivamente. Na fermentação com melhor rendimento, foi produzido 23 g/L de etanol, alcançando maior produtividade com 16 h de fermentação. Por fim, constatou-se um bom potencial para a produção de biometano com a biomassa residual de *Spirulina* sp., agregando maior viabilidade econômica ao processo.

Peron (2018) objetivou a utilização de resíduos da extração de proteínas da biomassa de *Spirulina platensis* para a produção de etanol. Após a extração de proteínas por tratamento ultrassônico com agitação em meio alcalino, os resíduos sólidos da extração foram combinados com os resíduos líquidos da precipitação das proteínas na razão de 100 g/L. Como o processo de extração das proteínas também resulta na liberação dos carboidratos não foi necessário aplicar outro método de ruptura celular, seguindo para a hidrólise enzimática. Anteriormente à adição das enzimas, o meio passou por ajuste de pH e autoclavagem a 121 °C por 10 minutos para a liquefação do amido. Após o resfriamento até a temperatura ótima para a atividade das enzimas, essas foram adicionadas simultaneamente. A hidrólise enzimática foi realizada a 50 °C, pH de 5,5 por 24 horas, utilizando 0,5; 1,0 e 1,5% (v/v) das enzimas α -amilase e amiloglucosidase, obtendo melhor rendimento para a adição de 1 % (v/v), para a qual se atingiu uma eficiência de 92,80%. A fermentação do hidrolisado com melhores condições de hidrólise, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi conduzida a 30 °C por 12 horas, formando 8,06 g/L de bioetanol, com eficiência de 100% e produtividade de 0,533 g/L h. Por meio desse trabalho é possível concluir que a espécie *S. platensis*, apesar do seu baixo teor de lipídeos, é uma matéria-prima potencial para a produção de etanol em sistema de biorrefinarias, sendo possível a aplicação integral da biomassa, por meio do uso das frações residuais da extração de

lipídios e proteínas, que são compostos de valor agregado, para produção de bioetanol 3G, o que pode ser uma forma de alcançar a viabilidade econômica de produção desse combustível.

Castrodeza (2016) realizou seu trabalho com a espécie *Spirulina maxima*. O cultivo realizado em fotobiorreatores com agitação e sob condições de estresse nutricional, atingiu altos teores de carboidrato. A privação de fósforo foi a melhor maneira de aumentar o acúmulo de carboidratos sem afetar a produtividade de biomassa, pois apesar da redução da concentração de nitrogênio no meio de cultivo também favorecer o acúmulo de carboidratos, essa manipulação reduziu consideravelmente o crescimento das microalgas. Para a cultura com deficiência de fósforo (2 mg/L), foi obtido, em 9 dias de cultivo, uma concentração celular de 1,7 g/L com teor de carboidratos de 62% em massa, sendo o principal açúcar (97%) a glicose. Enquanto o cultivo com escassez de nitrogênio (200 mg/L), em 9 dias, resultou em uma biomassa contendo 67% de açúcares, mas com concentração de biomassa igual a 1,14 g/L. Foram testadas a hidrólise ácida ou a combinação de pré-tratamento térmico seguido de hidrólise enzimática. Para a hidrólise ácida foi utilizado ácido sulfúrico, as concentrações de 0,5%, 1%, 2% em volume foram avaliadas, os experimentos foram realizados com 3% em peso de biomassa seca e, para cada concentração, foram realizadas autoclavagens a 121 °C por 15, 30 e 45 minutos, sendo os melhores resultados obtidos para a concentração de 1% (v/v) em autoclave por 45 minutos, para a qual foi atingida 19 g/L de glicose no hidrolisado (próximo a 100% de eficiência). Porém, para uma maior concentração de biomassa, a eficiência do processo sofreu uma drástica redução, ao se aplicar 10% em peso de biomassa seca o rendimento da hidrólise caiu para 50%. Já a hidrólise enzimática, foi realizada utilizando as enzimas Liquozyme SC DS e Spirizyme Fuel, doadas pela Novozymes (Dinamarca) e o pré-tratamento térmico, a 121 °C, foi testado com diferentes períodos (0, 15, 30 e 45 minutos). Após o pré-tratamento térmico, a hidrólise enzimática foi realizada pela adição de 0,01 grama de enzima Liquozyme por grama de biomassa seca, e a temperatura foi mantida a 80°C por 2h. Após o resfriamento, foi acrescentado 0,01 g de Spirizyme Fuel por grama de biomassa seca e a solução foi mantida em uma incubadora orbital a 50°C, com agitação de 175 rpm por 24h. O melhor resultado foi encontrado para a hidrólise enzimática com 3% em peso de biomassa seca e pré-tratamento térmico de 30 minutos, alcançando uma concentração de glicose no hidrolisado de 15,7 g/L (95% de eficiência). Para a realização da fermentação, utilizando 3% em volume do inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o pH do meio foi ajustado para 4, e a fermentação foi conduzida em um incubadora orbital a 30 ° C, 175 rpm, durante 24 horas. Os hidrolisados resultantes da hidrólise ácida e enzimática com melhores resultados foram submetidos a fermentação, atingindo 7,2 g/L de etanol e rendimento global do processo de 240

g etanol por quilo de biomassa seca para a hidrólise ácida, e 6,9 g/L de etanol e rendimento global de 230 gramas de etanol por quilo de biomassa seca para o hidrolisado enzimático, obteve-se, portanto, maior rendimento a partir da hidrólise ácida. No entanto, foi concluído que a produção de etanol só seria viável economicamente utilizando teores de biomassa acima de 7,5 % em massa, pois o consumo de energia diminuiu significativamente, sendo necessário otimizar o rendimento para maiores cargas de biomassa nas etapas de hidrólise e fermentação, para se obter mostos com maiores concentrações de etanol.

Assim como para as microalgas verdes, no geral as concentrações de etanol obtidas a partir de cianobactérias são baixas, o que ainda é agravado pela drástica redução da eficiência do processo ao executá-lo com maiores cargas de biomassa, sendo necessário buscar alternativas.

No cultivo, a privação de fósforo foi outra forma encontrada para aumentar o acúmulo de carboidratos. Essa foi mais apropriada para a *Spirulina máxima*, por não afetar significativamente a produtividade de biomassa, uma vez que a escassez de nitrogênio, apesar de também propiciar o aumento da concentração de carboidratos, impactou o crescimento celular (CASTRODEZA, 2016)

Na etapa de hidrolisação dos polissacarídeos, mais estudos como o de Rempel (2018) poderiam ser executados, pois a imobilização das enzimas seria uma boa solução para otimizar a hidrólise enzimática, uma vez que as enzimas imobilizadas com êxito apresentam maior atividade e possibilitam seu reuso, necessitando de menores quantidades de enzimas, diminuindo o alto custo com esses biocatalizadores, e o tempo de reação. O que resultaria na maior utilização da hidrólise enzimática, solucionando a dificuldade associada aos inibidores formados durante a hidrólise ácida.

Além disso, as microalgas do gênero *Spirulina* sp., apesar do seu baixo teor de lipídeos, se mostraram uma matéria-prima potencial para a produção de etanol em sistema de biorrefinarias. Peron (2018) obteve bons resultados para a produção de etanol utilizando os resíduos da extração de proteínas. Já Rempel (2018) encontrou potencial para a produção de biometano com a biomassa residual da produção de etanol, sendo formas de melhorar a viabilidade econômica de produção do etanol 3G.

5.3 Demais algas

Devido à grande variedade de algas, também existem estudos realizados com outras microalgas e até macroalgas. Como por exemplo, Hargreaves (2013), objetivou a produção de

etanol utilizando a macroalga *Kappaphycus alvarezii*, classificada como uma alga vermelha. Nesse estudo, foi empregado um pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, seguido de hidrólise enzimática. A fermentação foi realizada em batelada simples por meio da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. E os resultados apontaram essa espécie como potencial biomassa para produção de etanol de terceira geração. Essa alga ainda é fonte de carragena, um subproduto de alto valor agregado que pode contribuir para a viabilização da produção do etanol 3G.

Já Silva Neto (2013) buscou estudar a alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*. Inicialmente, essa espécie foi adquirida de um cultivo comercial, localizado na praia de Flecheiras, município de Trairi, Ceará. Posteriormente, a biomassa foi submetida a lavagem, secagem e trituração para subsequente hidrólise com ácido clorídrico (0,5 M), em autoclave a 121 °C por 20 minutos. A fermentação foi efetuada por 52 horas a 30 °C, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Na fermentação, 82,5% da glicose e 72% da galactose foram convertidas, resultando em 5,3 g/L de etanol. Assim, essa biomassa foi configurada como outra possível fonte para a produção de etanol.

Por fim, Andrade (2018) aspirou a utilização da espécie *Euglena gracilis* para a produção de etanol, uma vez que essa microalga não requer pré-tratamento, por não apresentar uma rígida parede celular. Durante o estudo, alternativas foram testadas para aumentar a produção de paramylon, um carboidrato semelhante ao amido formado por essa espécie. Em meio lactato o crescimento celular foi superior ao observado em meio mineral e a centrifugação foi o método de separação de biomassa mais adequado. Além disso, a utilização com FeCl₂ como fonte de estresse, apesar de ter aumentado razoavelmente a produtividade de biomassa, não influenciou consideravelmente o acúmulo de paramylon. A hidrólise enzimática, com Cellulase (50 mL/L) por 72 horas, atingiu concentração de açúcares fermentáveis 5 vezes superior à obtida pela hidrólise com ácido sulfúrico diluído (0,06% (v/v)) em uma autoclave vertical a 127 °C por 10 minutos. E a fermentação, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da biomassa obtida com as melhores condições alcançou um alto rendimento global, sendo essa espécie uma matéria-prima potencial para a produção de etanol.

Esses estudos indicam outras possíveis matérias-primas, mas assim como para as microalgas verdes e cianobactérias, ainda são necessárias otimizações para ser viável a produção de etanol 3G de forma comercialmente competitiva.

6 VIABILIDADE E PERSPECTIVAS DA PRODUÇÃO DO ETANOL 3G

Devido às inúmeras vantagens da produção de etanol a partir de microalgas e cianobactérias, existe um grande interesse de recorrer à produção de etanol 3G para atender a maior demanda por combustíveis limpos e renováveis. No entanto, atualmente, a produção dessa geração de bioetanol em escala industrial não é comercialmente competitiva, pois o custo de processamento é bastante superior ao de outras biomassas, em função da necessidade de técnicas mais específicas para o cultivo e conversão das microalgas (SUALI.; SARBATLY, 2012).

Segundo Reis e Gouveia (2013), autores estimam o custo de produção em cerca de 5000 euros por tonelada, bastante superior aos 700 euros por tonelada convencionados para viabilização de biocombustíveis. Outros pesquisadores, estipulam o custo de produção de biocombustíveis de terceira geração entre 3 e 4 dólares por litro, bem acima do valor que o etanol 1G é comercializado atualmente (SILVA; SILVA, 2019).

Apesar da existência de experimentos em escala laboratorial que alcançaram a produção de etanol a partir de microalgas, é possível perceber a existência de estudos, que mesmo em pequena escala, não obtiveram sucesso. O que enfatiza a importância de uma criteriosa triagem e seleção da biomassa, assim como, de aprimorar e analisar cuidadosamente os métodos mais adequados para cada etapa de produção.

Os estudos apontam a necessidade de aprimorar várias técnicas em diferentes etapas de produção para a viabilidade ser alcançada. Como a seleção de microalgas com características que favoreçam a produtividade e redução de custos, a otimização dos sistemas de cultivo, colheita e secagem, melhores condições de rompimento celular e hidrólise, e métodos que permitam maior eficiência de fermentação de outros monossacarídeos além das hexoses.

A inserção de características que facilitem a produção por meio da modificação genética das microalgas, a utilização de sistemas híbridos para oferecer melhores condições de cultivo em um primeiro momento e diminuir o custo utilizando uma segunda etapa aberta, a utilização de águas residuais e a reutilização de nutrientes que restaram do próprio processo de produção de etanol para facilitar o suprimento de grandes quantidades de água e reduzir os custos com nutrientes, o estudo de melhores combinações de métodos de pré-tratamento e hidrólise, de formas de tornar o processo de hidrólise enzimática mais rápido e barato, e de outros microrganismos fermentadores, como as bactérias, são alternativas potenciais para auxiliar na viabilização da produção de bioetanol 3G (HARUN et al., 2010; KATAHIRA et al., 2006; KOSE; ONCEL, 2016; KUMAR et al., 2010; MUSSATTO et al., 2010).

Mas a estruturação de biorrefinarias que integrem a produção de vários bioprodutos de valor agregado, como a geração simultânea de bioetanol, biodiesel, biogás e hidrogênio verde, a extração de pigmentos e proteínas, parece ser uma das melhores formas de aumentar a viabilidade de produção de etanol a partir de microalgas, por diminuírem as perdas inerentes ao processo e os custos de produção, além de agregarem valor a subprodutos (BRASIL, 2014; LEE et al., 2015a; MARTINS, 2018; RADZUN et al., 2015).

Assim, em função dos diversos estudos desenvolvidos, as perspectivas são que as limitações logo serão minimizadas, existindo a possibilidade de que no futuro as microalgas se tornem uma das matérias-primas mais utilizadas para produção de etanol (FERREIRA et al., 2021). E, apesar de ter iniciado as pesquisas posteriormente a países como Estados Unidos, Japão, Chile e alguns europeus, o Brasil poderá se destacar na produção de biocombustíveis 3G devido sua grande extensão costeira, abundância de água, e altos níveis de insolação, características que favorecem o cultivo de microalgas em grande escala (SILVA et al., 2020).

7 CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho foi possível verificar que, nas condições atuais, em consequência dos elevados custos relativos ao cultivo e processamento das microalgas, a produção de etanol 3G em escala industrial não é economicamente viável. No entanto, existem diversos estudos direcionados à produção de etanol a partir de microalgas devido à potencialidade encontrada nessa biomassa, à crescente demanda por combustíveis mais limpos e renováveis, assim como, à reprovação do uso de terras aráveis e alimentos para outros fins que não sejam alimentares, gerando perspectivas para a futura viabilização da produção de etanol 3G.

Também foi possível compreender as vantagens e desvantagens de cada método de rompimento celular e hidrólise, bem como, de sistemas de cultivo abertos e fechados. Sendo o uso de sistemas híbridos uma interessante alternativa para a viabilização do cultivo de microalgas em grande escala, por alcançarem produtividades maiores do que as obtidas em sistemas abertos, sem o elevado custo dos sistemas fechados.

Além disso, dentre uma variedade de microalgas, os estudos utilizaram com frequência biomassas dos gêneros *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Spirulina* sp.. Ainda, foi possível observar o maior emprego da hidrólise ácida à elevadas temperaturas, além do potencial da hidrólise enzimática para atingir maiores conversões sem a formação de inibidores.

Os estudos também indicaram a importância de selecionar as microalgas mais adequadas e a necessidade de aprimorar e definir criteriosamente os métodos mais vantajosos para cada etapa de produção. Por fim, a alternativa apontada como mais promissora para possibilitar a produção comercial de etanol 3G foi a estruturação de biorrefinarias que produzam diferentes bioprodutos de valor agregado simultaneamente.

REFERÊNCIAS

- ABD-RAHIM, Faiqah et al. Production of high yield sugars from *Kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 309-315, 2014.
- ADITIYA, H. B. et al. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 66, p. 631–653, 2016.
- ALAM, F. et al. Biofuel from algae - Is it a viable alternative? **Procedia Engineering**, v. 49, p. 221-227, 2012.
- ALENCAR, Elvira Maria Bezerra de et al. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 819-824, 2009.
- ANDRADE, E. T. de.; CARVALHO, S. R. G. de.; SOUZA, L. F. de. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. **Engevista**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 127-136, dez. 2009.
- ANGLES, Emilie et al. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. **Algal Research**, v. 21, p. 27-34, 2017.
- ANTUNES, R.; SILVA, I. C. Utilização de algas para a produção de biocombustíveis. **Cluster do conhecimento Energias Renováveis. Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Portugal)**, 2010.
- ASHOKKUMAR, Veeramuthu; RENGASAMY, Ramasamy. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 394-399, 2012.
- BAJHAIYA, A. K. et al. Algal biodiesel The next generation biofuel for India. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 4, p. 728-739, 2010.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.
- BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91-106, 2014.
- BHATIA, S. K. et al. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 300, n. January, p. 122724, 2020.
- BILANOVIC, D.; SHELEF, G.; SUKENIK, A. Flocculation of microalgae with cationic polymers—effects of medium salinity. **Biomass**, v. 17, n. 1, p. 65-76, 1988.
- BILLER, P.; ROSS, A. B. Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 215-225, 2011.
- BITOG, Jessie Pascual et al. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 131-147, 2011.

BNDES [Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social] (Brasil); CGEE [Centro de Gestão e Estudos Estratégicos]. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. 1 ed. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 314 p.

BRASIL, B. dos S. A. F. Microalgas: a 3ª geração de biocombustíveis no Brasil. **Embrapa Energia-Artigo (INFOTECA-E)**, 2014. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/991420/1/microalgas.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2021.

BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 14, p. 557-577, 2010.

BROWN, S. W.; OLIVER, S. G. The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast, *Saccharomyces uvarum*. **Biotechnology Letters**, v. 4, n. 4, p. 269-273, 1982.

CARRIQUIRY, M. A.; DU, X.; TIMILSINA, G. R. Second generation biofuels: Economics and policies. **Energy Policy**, v. 39, n. 7, p. 4222-4234, 2011.

CARVALHO, J. F. de. Combustíveis fósseis e insustentabilidade. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 3, p. 30-33, set. 2008.

CARVALHO, Juliana Maria Andrade. **Produção de bioetanol de terceira geração a partir de *Euglena gracilis***. 2018. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) - Universidade Federal da Bahia, escola politécnica, Salvador, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/27079>. Acesso em: 20 out. 2021.

CHEAH, Wai Yan et al. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190-201, 2015.

CHEN, Chun-Yen et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.

CHIARAMONTI, David et al. Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible. **Applied Energy**, v. 102, p. 101-111, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHOI, Seung Phill; NGUYEN, Minh Thu; SIM, Sang Jun. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5330-5336, 2010.

COSTA, Rosângela Lúcio. **Produção de Hidrogênio e Etanol a partir da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii***. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15232>. Acesso: 18 out. 2021.

CRUZ, B. da. **ProAlga: a nova geração de biocombustíveis**. [Rio de Janeiro: UFRJ], 2009. Disponível em: http://www.olharvital.ufrj.br/2006/index.php?id_edicao=160&codigo=2. Acesso em: 07 jun. 2021.

CUELLAR-BERMUDEZ, Sara P. et al. Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 98, p. 53-65, 2015.

CUNHA, V.; BARTABURU, X.; SUMIDA, E. **Cana-de-açúcar**. 1. ed. São Paulo: Editora Origem, 2015.

DAYANANDA, C. et al. Isolation, characterization and outdoor cultivation of green microalgae *Botryococcus* sp. **Scientific Research and Essays**, v. 5, n. 17, p. 2497-2505, 2010.

DIAS, M. O. S. et al. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 246–252, 2012.

DÍAZ–PALMA, P. et al. Biochemical profile of halophilous microalgae strains from high-andean extreme ecosystems (NE-Chile) using methodological validation approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 6, p. 730-736, 2012.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258-266, 2003.

DIOGO, E. M. dos S. **Utilização de Algas na Produção de Bioetanol**. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Instituto Politécnico de Tomar, Tomar (Portugal), 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.26/5849>. Acesso em: 12 ago. 2021.

DONG, T. et al. Impact of biochemical composition on susceptibility of algal biomass to acid-catalyzed pretreatment for sugar and lipid recovery. **Algal Research**, v. 18, p. 69-77, 2016.

DOUSKOVA, I. et al. Microalgae as a means for converting flue gas CO₂ into biomass with high content of starch. In: **BIOENERGY: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES: International Conference, 2008, Guimarães, Portugal**.

DRAGONE, G. et al. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331-3335, 2011.

DVOŘÁK, P. et al. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 739-757, 2015.

EPE [Empresa de Pesquisa Energética]. **Matriz energética e elétrica**, 2020. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica>. Acesso em: 25 abr. 2021.

FERREIRA, I. M. de L. et al. Biomassa de microalgas como matéria prima para produção de biocombustíveis: Uma visão geral. In: **CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PETROLÉO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS, 4., 2021. Anais eletrônicos [...]**. [s. l.]: Editora Realize, [2021]. Disponível em: http://www.editorarealize.com.br/editora/ebooks/conepetro/2021/TRABALHO_EV147_MD7_SA_ID183_05052021143648.pdf. Acesso em: 14 out. 2021.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Harumi. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, p. 871-879, 2005.

- FORNASIER, F. et al. Avaliação de diferentes métodos de secagem da biomassa de microalga *Chlorella vulgaris*. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 8, n. 1, p. 03-16, 2018.
- FREITAS, C. V. M.; SILVA, M. L. P. Mudanças do Clima: Análise das Conferências que trataram do Mercado de Carbono e seus principais resultados. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 10, p. 75332-75342, 2020.
- FREITAS, L. V. D. et al. Estudo dos impactos da secagem da microalga *Spirulina platensis* em estufa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2017, São Carlos. **Anais eletrônicos** [...]. [s.l.]: Blucher, 2017. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeqic2017/095.pdf>. Acesso em: 1 set. 2021.
- FURTADO, M. I. V.; FURTADO, R. C. Estudo avaliativo da emissão de CO₂ a partir de combustíveis fósseis utilizando Redes Neurais. **Conhecimento & Diversidade**, [s. l.], v. 11, n. 25, p. 47-62, jun. 2020.
- GEORGIANNA, D. R.; MAYFIELD, S. P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 329-335, 2012.
- GIL, I. D.; GARCÍA, L. C.; RODRÍGUEZ, G. J. B. J. Simulation of ethanol extractive distillation with mixed glycols as separating agent. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 1, p. 259-270, 2014.
- GONÇALVES, F. de O. **Análise da produção de etanol visando soluções para melhorar a eficiência econômica e ambiental**. 2020. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2020. Disponível em: https://bdt.unifal-mg.edu.br:8443/bitstream/tede/1728/5/Dissertacao_FelipeDeOliveiraGoncalves_2020_PPGE_Q.pdf. Acesso em: 26 abr. 2021.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, Cristina et al. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 610-616, 2012.
- GRIMA, Brigitte et al. The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. **Nature**, v. 420, p. 178-182, 2002.
- GRIMA, E. Molina et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.
- GULDHE, A. et al. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. **Fuel**, v. 128, p. 46-52, 2014.
- GÜNERKEN, Emre et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243-260, 2015.
- HADI, S. I. et al. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149284, 2016.
- HAHN-HÄGERDAL, Bärbel et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HARGREAVES, Paulo Iiboshi. **Produção de etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii*-Biocombustível de terceira geração**. 2013. 102 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://186.202.79.107/download/producao-de-etanol-a-partir-de-kappaphycus-alvarezii.pdf>. Acesso em: 20 out. 2021.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1079-1084, 2011a.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, p. 304-309, 2011b.

HERNÁNDEZ, D. et al. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939-945, 2015.

HO, S. H. et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191-198, 2013.

HOMIAK, J. A. Produção de biodiesel utilizando microalgas. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 9, n. 2, p. 65-74, 2014.

HUAHUACHAMPI, H. J.; CONTO, J. R. L. **Obtención de etanol a partir de la biomasa de microalgas (*Scenedesmus obliquus*) cultivada en agua residual de lavandería doméstica**. 2020. 98 p. Dissertação (Licenciatura em Química) - Universidade Nacional de San Agustín de Arequipa, Faculdade de Ciências Naturais e Formais, Arequipa, 2020. Disponível em: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/20.500.12773/12588>. Acesso em: 18 out. 2021.

IEA [International Energy Agency]. **Data and Statistics**, 2018. Disponível em: <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-browser?country=WORLD&fuel=Energy%20supply&indicator=TPESbySource>. Acesso em: 19 abr. 2021.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (São Paulo). **RenovaBio: prós e contras**. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=14393>. Acesso em: 25 abr. 2021

JAMBO, Siti Azmah et al. A review on third generation bioethanol feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 756-769, 2016.

JARDIM, H. A. S. P. M. **Projeto, construção e desenvolvimento metodológico de um aparelho de destilação**. Estudo de caso: produção de etanol anidro via destilação extrativa utilizando glicerol. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/4142>. Acesso em: 12 out. 2021.

JENA, U.; DAS, K. C.; KASTNER, J. R. Effect of operating conditions of thermochemical liquefaction on biocrude production from *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6221-6229, 2011.

JEONG, Tae Su et al. Behaviors of glucose decomposition during acid-catalyzed hydrothermal hydrolysis of pretreated *Gelidium amansii*. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 435-440, 2012.

JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186-193, 2011.

JORQUERA, Orlando et al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource technology**, v. 101, n. 4, p. 1406-1413, 2010.

KARP, G. **Biologia Celular e Molecular: Conceitos e experimentos**. 1. ed. Barueri: Editora Manole Ltda., 2005.

KATAHIRA, Satoshi et al. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose-and cellobiosaccharide-assimilating yeast strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1136-1143, 2006.

KHOO, Kuan Shiong et al. Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 122996, 2020.

KLEIN, B. C. **Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração**. 2013. 128 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266647/1/Klein_BrunoColling_M.pdf. Acesso em: 1 ago. 2021.

KNUCKEY, Richard M. et al. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 300-313, 2006.

KOSE, A.; ONCEL, S. S. Algae as a promising resource for biofuel industry: facts and challenges. **International Journal of Energy Research**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 924-951, 2016.

KUMAR, A. et al. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371-380, 2010.

KUMAR, K. et al. Recent developments on biofuels production from microalgae and macroalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 235-249, 2016.

LEE, O. K. et al. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 22-27, 2015a.

LEE, O. K. et al. Sustainable production of liquid biofuels from renewable microalgae biomass. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 29, p. 24-31, 2015b.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 165, n. C, p. 3-8, 2014.

LYND, Lee R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

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

MACRELLI, S.; GALBE, M.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–16, 2014.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 631-645, 2012.

MARTÍN-JUÁREZ, J. et al. Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: Solving the hurdles. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**. Woodhead Publishing, 2017. p. 183-207.

MARTINS, Lorena Borges. **Extração integrada de carboidratos e lipídeos para a produção de bioetanol e biodiesel a partir da microalga *Chlorella* sp.** 2018. 73 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/25145>. Acesso em: 12 out. 2021.

MATA, T. M., MARTINS, A. A., CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MATSUDO, M. C. et al. CO₂ from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 3, p. 650-656, 2011.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. **Unit Operations of Chemical Engineering**. 5. ed. Nova York: McGraw-Hill International Editions, 1993.

MENETREZ, M. Y. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 13, p. 7073-7085, 2012.

MILANO, Jassinnee et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180-197, 2016.

MIRANDA, J. R. P. de C. **Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. 130 p. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2011. Disponível em: https://run.unl.pt/bitstream/10362/5997/1/Miranda_2011.pdf. Acesso em: 30 ago. 2021.

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, Paula C.; GOUVEIA, Luisa. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 342-348, 2012.

MOLINA, Emilio et al. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 113-131, 2001.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, v. 7, p. 117-123, 2015.

MUSSATTO, Solange I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.

OSS, R. N. **Produção de biomassa com microalgas em lagoa de alta taxa aplicada ao pós-tratamento de um reator uasb tratando esgoto sanitário visando a produção de carvão ativado**. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019. Disponível em: http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_13710_tese%20Rodrigo.pdf. Acesso em: 18 ago. 2021.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15136>. Acesso em: 04 out. 2021.

PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?. **Embrapa Agroenergia-Circular Técnica**, Brasília, v. 1, p. 6, 2011.

PALINSKA, Katarzyna A.; KRUMBEIN, Wolfgang E. Perforation patterns in the peptidoglycan wall of filamentous cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 1, p. 139-145, 2000.

PANDEY, Ashok et al. **Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels**. 2. ed. Londres: Academic Press, 2019.

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. E. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2009.

PAULO, Vanessa Patrícia Faria. **Otimização da produção de açúcares por microalgas para a produção de bioetanol**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/4100>. Acesso em: 21 set. 2021.

PERON, Bianca Colombari. **Frações residuais do processo de extração de proteínas da biomassa de Spirulina platensis como matéria-prima para produção de bioetanol**. 2018. 69 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018. Disponível em: <http://riut.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3950>. Acesso em: 19 out. 2021.

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae Chlorella as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307-3312, 2011.

RADZUN, K. A. et al. Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2015.

RAZEGHIFARD, Reza. Algal biofuels. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1, p. 207-219, 2013.

- RAZZAK, S. A. et al. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing — A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013.
- REIS, Alberto; GOUVEIA, Luísa. Biorrefinarias de microalgas. **Boletim de Biotecnologia**, v. 3, p. 28-29, 2013
- REMPEL, Alan. **Produção de bioetanol e biometano a partir da biomassa de spirulina sp.** 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui/handle/tede/1519>. Acesso em: 04 out. 2021.
- SALIM, Sina et al. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 849-855, 2011.
- SAMARASINGHE, Nalin et al. Algal cell rupture using high pressure homogenization as a prelude to oil extraction. **Renewable Energy**, v. 48, p. 300-308, 2012.
- SCHENK, Peer M. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 20-43, 2008.
- SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA., 2001. 2 v.
- SHOKRKAR, Hanieh; EBRAHIMI, Sirous; ZAMANI, Mehdi. Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. **Fuel**, v. 200, p. 380-386, 2017.
- SHUBA, Eyasu Shumbulo; KIFLE, Demeke. Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 743-755, 2018.
- SHUPING, Z. et al. Pyrolysis characteristics and kinetics of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* using thermogravimetric analyzer. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 359-365, 2010.
- SILVA NETO, A. A. **Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (wulfen) como fonte potencial de carboidratos para a produção de etanol**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/10488>. Acesso em: 20 out. 2021.
- SILVA, B. M.; SILVA, W. S. D. da. Um panorama da implantação do etanol de 3ª geração como uma fonte de energia sustentável. **Engevista**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 176-192, 2019.
- SILVA, F. S. G.; MIGOT, B. C.; SILVA, Fabio C. da. A importância do bioetanol dentro do contexto brasileiro, comparação de sua síntese a partir de cana-de-açúcar e milho e bioetanol de segunda geração. In: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA FATEC DE BOTUCATU, 8., 2019. **Anais eletrônicos** [...]. Botucatu: Embrapa, [2020]. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1122477/1/Importancia-bioetanol-Jornacitec-2019.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2021.
- SILVA, R. O. et al. Multi-objective optimization of an industrial ethanol distillation system for vinasse reduction—A case study. **Journal of Cleaner Production**, v. 183, p. 956-963, 2018.

- SILVA, S. P. da. et al. A IMPORTÂNCIA DA BIOMASSA NA MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA. **Pensar Acadêmico**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 557-583, 2021.
- SILVERSTEIN, R. A. **A Comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Faculdade de Pós-Graduação da Universidade da Carolina do Norte, Raleigh, 2004. Disponível em: <https://repository.lib.ncsu.edu/handle/1840.16/2689>. Acesso em: 12 set. 2021.
- SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 76–82, 2016.
- SPG [Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis] (Brasil). **RenovaBio**. Brasília, [s. d.]. Disponível em: <http://antigo.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-biocombustiveis/acoes-e-programas/programas/renovabio>. Acesso em: 25 abr. 2021.
- SPIDEN, Erin M. et al. Critical analysis of quantitative indicators of cell disruption applied to *Saccharomyces cerevisiae* processed with an industrial high pressure homogenizer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 120-126, 2013.
- SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316-4342, 2012.
- TREDICI, Mario R.; ZITTELLI, Graziella Chini. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 2, p. 187-197, 1998.
- TREVAN et al. **Biotecnologia: Princípios Biológicos**. 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1990. 284 p.
- UDOP [UNIÃO NACIONAL DE BIOENERGIA] (Brasil). **EUA e Brasil veem espaço para avanço do etanol antes de transição para elétricos**, 2020. Disponível em: <https://www.udop.com.br/noticia/2020/10/30/eua-e-brasil-veem-espaco-para-avanco-do-etanol-antes-de-transicao-para-eletricos.html>. Acesso em: 25 jun. 2021.
- UENO, Y., KURANO, N., MIYACHI, S. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 38-43, 1998.
- VARELA-BOJÓRQUEZ, N. et al. Production of bioethanol from biomass of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)**, v.2, n.2, p. 110-116, 2016.
- VIDAL, F. Produção e Mercado de Etanol. **Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE – Banco do Nordeste**, p. 1-10, 2020.
- VIEIRA, T. de Q. et al. Estudo da viabilidade do uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella sp* visando a produção de biocombustíveis. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 4, p. 3477-3490, 2014.
- VITAL, M. H. F. Aquecimento global: acordos internacionais, emissões de CO₂ e o surgimento dos mercados de carbono no mundo. **BNDES**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 48, p. 167-244, set. 2018.

WANG, Alice; LEWUS, Rachael; RATHORE, Anurag S. Comparison of different options for harvest of a therapeutic protein product from high cell density yeast fermentation broth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 1, p. 91-104, 2006.

WANG, K. et al. Fast pyrolysis of microalgae remnants in a fluidized bed reactor for bio-oil and biochar production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 494-499, 2013.

WANG, Y. et al. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 485-497, 2016.

WI, S. G. et al. The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6658-6660, 2009.

ZART, V. P. M. et al. ETANOL 1, 5G: UMA DISCUSSÃO SOBRE A INTEGRAÇÃO ENTRE O ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO. **Ciência, Tecnologia e Inovação: Do Campo à Mesa, Graças**, p. 356-374, 2020. Apresentado no Congresso Internacional da Agroindústria (CIAGRO), 2020, [s. l.]. Disponível em: <https://ciagro.institutoidv.org/ciagro/uploads/1850.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2021.

ZENG, Xianhai et al. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, 2011.

ZHOU, N. et al. Hydrolysis of Chlorella biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10158-10161, 2011.

ZORN, S. M. F. E. **Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da biomassa de microalgas marinhas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2017. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97137/tde-21112017-134913/publico/EQD17003_C.pdf. Acesso em: 30 ago. 2021.