

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF

**Avaliação de cultivos de *Kappaphycus alvarezii*
em diferentes condições climáticas e hidrólise
enzimática do resíduo gerado pós-processamento
de carragena**

Eddyn Gabriel Solórzano Chávez

Araraquara

2017

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF

Avaliação de cultivos de *Kappaphycus alvarezii* em diferentes condições climáticas e hidrólise enzimática do resíduo gerado pós-processamento de carragena

Eddyn Gabriel Solórzano Chávez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

2017

**Avaliação de cultivos de *Kappaphycus alvarezii*
em diferentes condições climáticas e hidrólise
enzimática do resíduo gerado pós-processamento de
carragena**

Eddyn Gabriel Solórzano Chávez

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Solórzano Chávez, Eddyn Gabriel
S689a Avaliação de cultivos de *Kappaphycus alvarezii* em diferentes condições climáticas e hidrólise enzimática do resíduo gerado pós-processamento de carragena / Eddyn Gabriel Solórzano Chávez. – Araraquara, 2017.
110 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração: Ciências dos Alimentos.

Orientador: Fernando Masarin.

1. Macroalga. 2. *Kappaphycus alvarezii*. 3. Cultivo. 4. Resíduo. 5. Composição química. 6. Hidrólise enzimática. I. Masarin, Fernando, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de cultivos de *Kappaphycus alvarezii* em diferentes condições climáticas e hidrólise enzimática do resíduo gerado pós-processamento de carragena

AUTOR: EDDYN GABRIEL SOLORZANO CHAVEZ

ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN

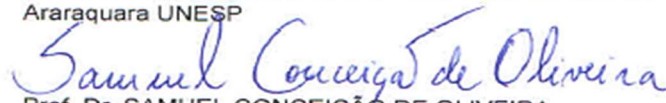
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FERNANDO MASARIN
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dra. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química do Câmpus de
Araraquara UNESP



Prof. Dr. SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 29 de novembro de 2017

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin, pela orientação, os ensinamentos e dedicação durante o desenvolvimento da pesquisa;

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pelos ensinamentos, e por ter me recebido no Laboratório de Enzimologia;

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição e ao Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAr, por toda a infraestrutura e apoio;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus Araraquara – UNESP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado;

À Seção Técnica da Pós-graduação;

Ao Instituto de Pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, pelo fornecimento das macroalgas para o estudo;

Aos professores, funcionários e pós-graduandos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Agradecimentos pessoais

A Deus por este presente maravilhoso que é a vida;

Aos meus pais, por serem modelos de coragem, pelo apoio e amor incondicional. Meu infinito agradecimento;

Aos meus irmãos, pelo apoio, carinho e confiança;

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Fernando, Julián, Elen, Juliana, Natalia e Thamyres;

A todos que, por ventura, esqueci.

Resumo

Kappaphycus alvarezii é uma macroalga vermelha utilizada principalmente para produção industrial de hidrocolóides (principalmente carragena). O cultivo de *K. alvarezii* foi estabelecido como uma atividade econômica importante em mais de 20 países. Os principais componentes da biomassa de *K. alvarezii* são carboidratos. O processamento de carragena a partir de *K. alvarezii* promove a formação de um resíduo rico em glucana. **Objetivo:** Avaliar o desenvolvimento de cultivos de *K. alvarezii* em diferentes condições climáticas e averiguar o efeito da hidrólise enzimática sobre os resíduos obtidos pós-processamento de carragena. **Métodos:** A parte experimental envolveu o cultivo de 4 cepas de *K. alvarezii* ao longo de um ano no oceano atlântico em Ubatuba-SP. A partir dos dados dos cultivos foram calculadas as velocidades de crescimento e produtividades. Cultivos selecionados com base nos dados de produtividade foram previamente misturados e homogeneizados e submetidos a um pré-tratamento com KOH 6%. As biomassas previamente pré-tratadas com KOH 6% foram extraídas com água para a obtenção das carragenas e dos resíduos. As frações obtidas no processamento foram caracterizadas quimicamente. Os resíduos foram hidrolisados enzimaticamente com celulasas comerciais. **Resultados:** Foram diferenciados três níveis de produtividade (A, setembro-dezembro de 2013; B, janeiro-março de 2014; C, abril-junho 2014). Os valores de produtividade foram maiores no nível B e intermediários nos níveis A e C. Os valores de produtividade e velocidade de crescimento dos cultivos foram correlacionados em função da temperatura e transparência. Os principais componentes avaliados na biomassa dos cultivos em estudo foram galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis, grupos sulfatos e lipídeos. Os teores médios dos componentes nas amostras não tratadas referentes aos níveis A B e C foram de 40,8%, 44,3% e 34,4% (galactanas), 13,1%, 14,9% e 13,1% (glucanas), 14,8%, 14,8% e 12,5% (cinzas), 4,6%, 4,1% e 2,1% (proteínas), 3,1%, 3,6% e 3% (aromáticos insolúveis), 11,3%, 13,7% e 12,1% (grupos sulfato) e 8,3%, 1,8% e 5% (lipídeos), respectivamente. Após o pré-tratamento com KOH 6% as amostras sofreram redução das frações de galactanas, glucanas e proteínas. As carragenas obtidas mostraram um enriquecimento das frações de galactanas, cinzas e proteína, sendo similares a uma carragena comercial. Os resíduos obtidos mostraram um enriquecimento da fração de glucanas. Os teores brutos médios de glucanas nos resíduos referentes aos níveis A B e C foram de 31,5%, 34,3% e 32,6%, respectivamente. As hidrólises enzimáticas das frações de glucanas dos resíduos obtidos culminaram em uma conversão de 100%, para ambos os níveis em estudo. **Conclusão:** A macroalga *K. alvarezii* foi capaz de se desenvolver em todas as estações climáticas do ano. A hidrólise enzimática da fração de glucana dos resíduos indicaram que a formação de glicose a partir de glucana independe dos diferentes cultivos e cepas em estudo. Desta forma, os hidrolisados de glicose mostraram potencial para produção de bioprodutos e/ou biocombustíveis.

Palavras-chave: Macroalga, *Kappaphycus alvarezii*, Cultivo, Resíduo, Composição química e Hidrólise enzimática.

Abstract

Kappaphycus alvarezii is a red macroalgae used mainly for industrial production of hydrocolloids (mainly carrageenan). *K. alvarezii* cultivation has been established as a major economic activity in more than 20 countries. The main components of *K. alvarezii* biomass are carbohydrates. Carrageenan processing from *K. alvarezii* promotes the formation of a residue rich in glucan. **Objective:** Evaluate the development of *K. alvarezii* cultures under different climatic conditions and to investigate the effect of the enzymatic hydrolysis on the residues obtained after carrageenan process. **Methods:** The experimental part involved the cultivation of 4 strains of *K. alvarezii* over a year in the Atlantic Ocean in Ubatuba-SP. Growth rates and productivity were calculated with cultivation data. Cultivation selected on the basis of productivity data were pre-mixed and homogenized and pretreated with 6% KOH. The biomass previously pretreated with 6% KOH were extracted with water to obtain carrageenans and residues. The fractions obtained in the processing were characterized chemically. The residues were enzymatically hydrolyzed with commercial cellulases. **Results:** Three levels of productivity were differentiated (A, September-December 2013, B, January-March 2014, C, April-June 2014). The productivity values of level B were higher than of levels A and C. The productivity values and the growth rate of the cultivations were correlated as a function of temperature and transparency. The main components evaluated in the biomass of the studied cultivations were galactans, glucans, ashes, proteins, insoluble aromatics, sulfate groups and lipids. The mean contents of the components in the untreated samples for levels A, B and C were 40,8%, 44,3% and 34,4% (galactans), 13,1%, 14,9% and 13,1% (glucans), 14,8%, 14,8% and 12,5% (ashes), 4,6%, 4,1% and 2,1% (proteins), 3,1%, 3,6% and 3% (insoluble aromatics), 11,3%, 13,7% and 12,1% (sulfate groups) e 8,3%, 1,8% and 5% (lipids), respectively. After pre-treatment with 6% KOH, the samples were reduced in the fractions of galactans, glucans and proteins. The carrageenans obtained showed an enrichment of the galactans, ashes and proteins fractions and were similar to a commercial carrageenan. The residues obtained showed an enrichment of the glucans fraction. The averages glucans content in the A, B and C residues were 31.5%, 34.3% and 32.6%, respectively. The enzymatic hydrolysis of the glucan fraction of the residues obtained culminated in a conversion of 100%, for both study levels. **Conclusion:** The macroalgae *K. alvarezii* was able to develop in all climatic seasons of the year. The enzymatic hydrolysis of the glucan fraction of the residues indicated that the formation of glucose from glucan does not depend on the different cultures and strains studied. In this way, glucose hydrolysates showed the potential to produce bioproducts and/or biofuels.

Key words: Macroalgae, *Kappaphycus alvarezii*, Cultivation, Residue, Chemical composition and Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

CBH	Celobiohidrolase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DFRC	Derivatização seguida por clivagem redutora
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
FPU	Filter paper units
HMF	Hidroximetilfurfural
PVC	Policloroeteno
SBA	Soro de albumina bovina

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tipos de carboidratos e teores de carboidratos totais em porcentagem mássica (%massa/massa, dados em base seca) de algumas classes e espécies de macroalgas (6,13,27–29)..... 30
- Tabela 2.** Teores de lipídeos, proteínas e cinzas em porcentagem mássica (%massa/massa, dados em base seca) de algumas classes e espécies de macroalgas (6)..... 32
- Tabela 3.** Modelos matemáticos ajustados para os dados de produtividade ($\text{g.m}^{-2}\text{dia}^{-1}$) e velocidade de crescimento ($\%\text{dia}^{-1}$) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e transparência (m). Cultivos das 4 diferentes cepas de *K. alvarezii*. Dados de cultivos referentes ao período de agosto de 2013 a julho de 2014. 62
- Tabela 4.** Rendimento das frações da biomassa de *K. alvarezii*. Amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) em relação a amostra não tratada. Resíduo em relação a biomassa pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume). Carragena semi-refinada em relação biomassa pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume). Teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material de partida) (dados em base seca). 67
- Tabela 5.** Rendimento das frações a biomassa de *K. alvarezii*. (a) Rendimento do resíduo em relação biomassa não tratada. (b) Rendimento carragena em relação a biomassa não tratada. Teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material de partida) (dados em base seca). 72
- Tabela 6.** Teores de hidroximetilfurfural (HMF), ácido fórmico e ácido levulínico nas amostras não tratadas, pré-tratadas com KOH 6% (massa/volume), resíduos e carragenas semi-refinada e comercial das diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Teores apresentados em % mássica (gramas/100 gramas de material bruto, dados em base seca). 77
- Tabela 7.** Composição química e rendimento das frações não tratadas e após um pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Rendimentos e teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material original, dados em base seca)..... 81

Tabela 8. Composição química e rendimento das frações pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) e dos resíduos oriundos após extração de carragena de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Rendimentos e teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material original, dados em base seca). 86

Tabela 9. Composição química e rendimento das frações das pré-tratadas com KOH (%massa/volume) e das carragenas semi-refinadas oriundas do processo de extração de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Rendimentos e teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material original, dados em base seca). 90

Tabela 10. Parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena das diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. 104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de balsa ancorada utilizada para cultivos de *Kappaphycus alvarezii*. Sistema conhecido como “TIE-TIE” ou sistema de amarração (16). 253
- Figura 2.** Morfologia e ultraestrutura de *Calliarthron Thalli* com pontuações flexíveis denominadas geniculum e separado por segmentos calcificados denominados intergeniculum. (A) Aspecto geral, (B) seção longitudinal (vista sobre luz UV) e (C) seção transversal de geniculum. (D) Célula genicular imatura com parede celular primária desenvolvida e parede celular secundária desprezível. (E) Célula genicular madura com parede secundária mais espessa, (F) Célula intergenicular contendo apenas parede celular primária. Abreviações: cen=células; gc=células geniculares; igc=células intergeniculares; ceri=células geniculares centrais; peri=células geniculares periféricas; cl=cloroplastos; M=lamela média; P=parede celular primária; S1=parede celular secundária. A barra de escala representa 1 mm (A e B), 10 mm (C) e 0.5 mm (D-F). 275
- Figura 3.** Morfologia e ultraestrutura de *Arapdopsis*. (A e B) seção transversal da fibra com barra de escala de 0,5 mm. M=lamela média; P=parede celular primária; S1-S2-S3= camadas da parede celular secundária. 286
- Figura 4.** Informação estrutural dos principais polissacarídeos encontrados em macroalgas (6)..... 308
- Figura 5.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (33). 364
- Figura 6.** Fluxograma geral das etapas desenvolvidas no estudo..... 386
- Figura 7.** Sistema de cultivos experimental de *K. alvarezii* no oceano atlântico na praia do Itaguá, Ubatuba, SP, Brasil, (23°27'5,8"Sul; 45°02'49,3"Oeste). 397
- Figura 8.** Perfil de produtividade dos cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii* em função dos cultivos mensais. Dados referentes a agosto de 2013 a julho de 2014. 575

- Figura 9.** Produtividades médias dos diferentes níveis de cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii*. Nível A: mês de setembro, outubro, novembro e dezembro de 2013; Nível B: meses de janeiro, fevereiro e março de 2014; Nível C: meses de abril, março e junho de 2014..... 586
- Figura 10.** Velocidade de crescimento dos cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii* em função dos cultivos mensais. Dados referentes a agosto de 2013 a junho de 2014..... 597
- Figura 11.** Velocidades de crescimento médias dos diferentes níveis dos cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii*. Nível A: mês de setembro, outubro, novembro e dezembro de 2013; Nível B: meses de janeiro, fevereiro e março de 2014; Nível C: meses de abril, março e junho de 2014. 608
- Figura 12.** Produtividade em função da temperatura, transparência e salinidade dos cultivos mensais de diferentes cepas de *K. alvarezii*. (a) produtividade versus temperatura, (b) produtividade versus transparência, (c) produtividade versus salinidade. Cultivos de cepas de *K. alvarezii*. Dados dos cultivos referentes ao período de agosto de 2013 a julho de 2014. 561
- Figura 13.** Velocidade de crescimento em função da temperatura, transparência e salinidade dos cultivos mensais de diferentes cepas de *K. alvarezii*. (a) velocidade de crescimento versus temperatura, (b) velocidade de crescimento versus transparência, (c) velocidad de crecimiento versus salinidade. Cultivos de 4 cepas de *K. alvarezii*. Dados dos cultivos referentes ao período de agosto de 2013 a julho de 2014. 631
- Figura 14.** Exemplo do aspecto visual da biomassa de *K. alvarezii* após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume). (a) Amostra não tratada. (b) Amostra após um o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume). Ambas amostras se referem a cepa verde do nível B.....63
- Figura 15.** Rendimentos das frações da biomassa de *K. alvarezii*. (a) Amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) em relação a amostra não tratada. (b) Resíduo em relação a biomassa pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume). (c) Carragena em relação biomassa pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume). Teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material de partida) (dados em base seca). 68

Figura 16. Exemplo do aspecto visual da biomassa de *K. alvarezii* após a extração de carragena e obtenção do resíduo. a) Resíduo. b) Carragena semi-refinada. Ambas amostras se referem a cepa verde do nível B.....68

Figura 17. Rendimentos das frações a biomassa de *K. alvarezii*. (a) Rendimento do resíduo em relação biomassa não tratada. (b) Rendimento carragena em relação a biomassa não tratada. Teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material de partida) (dados em base seca). 73

Figura 18. Hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Hidrólise utilizando-se extrato enzimático comercial Cellic CTec II. (a) Conversão de glucana em glicose referente ao nível A. (b) Conversão de glucana em glicose referente ao nível B. (c) Conversão de glucana em glicose referente ao nível C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral. 931

Figura 19. Hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Hidrólise enzimática utilizando-se extrato enzimático comercial Cellic CTec II. (a) Concentração de glicose referente ao nível A. (b) Concentração de glicose referente ao nível B. (c) Concentração de glicose referente ao nível C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral. 953

Figura 20. Ajuste do modelo proposto a cinética de hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena das diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii* em estudo. (a) Ajuste do modelo da cepa marrom do nível A. (b) Ajuste do modelo da cepa verde do nível A. (c) Ajuste do modelo da cepa vermelha do nível A. (d) Ajuste do modelo da cepa marrom do nível B, (e) Ajuste do modelo da cepa verde do nível B. (f) Ajuste do modelo da cepa vermelha do nível B. (g) Ajuste do modelo da cepa marrom do nível C. (h) Ajuste do modelo da cepa verde do nível C. (i) Ajuste do modelo da cepa vermelha do nível C..... 103

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Velocidade de crescimento ($\% \text{dia}^{-1}$).....	40
Equação 2. Produtividade ($\text{g.m}^{-2}\text{dia}^{-1}$).....	41
Equação 3. Rendimento mássico após pré-tratamento com KOH (%).....	43
Equação 4. Rendimento mássico de obtenção do resíduo ou carragena (%)..	44
Equação 5. Porcentagem mássica de lipídeos na amostra (%).....	45
Equação 6. Porcentagem mássica de cinzas na amostra (%).....	46
Equação 7. Porcentagem mássica de proteínas na amostra (%).....	47
Equação 8. Porcentagem mássica de grupo sulfatos na amostra (%).....	49
Equação 9. Porcentagem mássica de glucana (%).....	51
Equação 10. Porcentagem mássica de galactana (%).....	51
Equação 11. Atividade de celulases totais (FPU.mL^{-1})	54
Equação 12. Conversão de glucana em glicose (%).....	55
Equação 13. Reações de hidrólise de polissacarídeos	96
Equação 14. Hidrólise de glucana.....	96
Equação 15. Variação temporal da concentração de glicose (g)	96
Equação 16. Crescimento exponencial para a concentração de glicose	97
Equação 17. Concentração de glicose.....	97
Equação 18. Velocidade máxima de reação	98

Sumário

1. Introdução	19
2. Revisão bibliográfica	22
2.1. <i>Produção comercial de carragena</i>	22
2.2. <i>Cultivos e produção de macroalgas</i>	23
2.3. <i>Classificação, ultraestrutura e morfologia celular de macroalgas</i>	25
2.4. <i>Composição química de macroalgas</i>	28
2.5. <i>Carboidratos</i>	29
2.5.1. <i>Proteínas, lipídeos e cinzas</i>	31
2.5.2. <i>Aromáticos</i>	32
2.6. <i>Hidrólise ácida e enzimática de celulose</i>	34
3. Objetivo	37
4. Material e Métodos	38
4.1. <i>Obtenção e preparação da biomassa de K. alvarezii</i>	38
4.2. <i>Pré-tratamento do material com hidróxido de potássio</i>	42
4.3. <i>Extração de carragena e obtenção do resíduo</i>	43
4.4. <i>Composição química das frações de K. alvarezii</i>	44
4.4.1. <i>Extração com solvente apolar (teor de lipídeos)</i>	45
4.4.2. <i>Teor de cinzas</i>	45

4.4.3. Teor de proteínas	46
4.4.4. Teor de grupos sulfato	48
4.4.5. Teores de carboidratos, ácidos fórmicos e levulínico e compostos aromáticos insolúveis	49
4.4.6. Teor de hidroximetilfurfural (HMF)	52
4.5. Determinação da atividade enzimática de celulasas totais	52
4.6. Hidrólise enzimática dos resíduos obtidos	54
4.7. Modelagem cinética da hidrólise enzimática	55
5. Resultados e discussão	56
5.1. Avaliação de cultivos de diferentes cepas de <i>K. alvarezii</i>	56
5.2. Processamento da biomassa de <i>K. alvarezii</i> para produção de carragena semi-refinada visando à obtenção de um resíduo	64
5.3. Avaliação da composição química das amostras em estudo	74
5.4. Avaliação da hidrólise enzimática da fração de glucana dos resíduos obtidos	92
5.5. Avaliação da modelagem cinética da hidrólise enzimática	95
6. Conclusões	105
7. Bibliografia	106

1. Introdução

Atualmente, grandes quantidades de etanol são produzidas a partir da sacarose e/ou melaço de cana de açúcar, além de materiais lignocelulósicos. O uso de materiais lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis e produtos químicos apresenta muitas vantagens em termos de disponibilidade de recursos tendo em vista a grande quantidade desses materiais produzidos por atividades florestais e agrícolas. Entretanto, os materiais lignocelulósicos são muito recalcitrantes à hidrólise enzimática de polissacarídeos, sendo necessário um pré-tratamento químico prévio do material para hidrólise enzimática com conversões acima de 30% (1). Outra fonte renovável que pode ser utilizada para a produção de bioprodutos e/ou biocombustíveis são as algas, que também podem ser cultivadas em grandes quantidades no Brasil. As algas são plantas terrestres e aquáticas e muitas espécies contêm altos teores de carboidratos e baixo conteúdo de lignina e no futuro próximo essa fonte tornar-se á essencial para o uso em processos fermentativos (2-6). Além disso, algumas espécies de algas também contêm lipídeos que podem ser pré-extraídos e utilizados para a produção de biodiesel (7).

O baixo conteúdo de lignina em algas faz com que os polissacarídeos sejam mais acessíveis a tratamentos químicos e enzimáticos o que torna as algas menos recalcitrantes do que as plantas terrestres (2,5,8,9). As algas também produzem mais oxigênio do que utilizam na respiração, ao contrário das plantas terrestres. Desta forma, as algas têm um ganho ambiental que pode ser

convertido em um ganho econômico com a comercialização de créditos de carbono. Além disso, em média as algas têm uma produtividade de $22 \text{ kg.m}^{-2}\text{ano}^{-1}$ superiores às plantas terrestres que tem uma produtividade média de $0,5\text{--}4,4 \text{ kg.m}^{-2}\text{ano}^{-1}$ (ambos dados reportados em relação a biomassa produzida) (2,10).

As macroalgas marinhas são classificadas em três principais grupos: macroalga marrom (*Phaeophyceae*), macroalga verde (*Chlorophyceae*) e macroalga vermelha (*Rhodophyceae*) (11,12). A composição química das macroalgas vermelhas varia de espécie para espécie, porém geralmente incluem glucanas, galactanas, grupos sulfatos e compostos inorgânicos. A glucana consiste em um carboidrato polimérico que contem unidades fundamentais de glicose. A galactana consiste em um carboidrato polimérico que contem unidades fundamentais de galactose e 3,6-anidrogactose, além de grupos sulfatos. O padrão de substituição de grupos sulfato e de 3,6-anidrogactose nas galactanas varia entre as diferentes classes desses compostos, da espécie da macroalga vermelha, além das condições de cultivo. A parede celular das macroalgas vermelhas é composta por frações de glucanas, por dois tipos de polissacarídeos estruturais de cadeia longa que são avaliados pela sua capacidade de formação de gel, além de compostos inorgânicos (13–15).

A espécie *K. alvarezii* pertence à classe de macroalgas vermelhas, sendo cultivada para fins comerciais principalmente na Indonésia e Filipinas. O cultivo de macroalgas vermelhas foi estabelecido como uma atividade econômica importante em mais de 20 países, contribuindo com aproximadamente 35% da

produção total de macroalgas marinhas (16). A espécie *K. alvarezii* é amplamente utilizada para a produção industrial de hidrocolóides (principalmente a carragena). A carragena pode ser classificada como lambda (λ), kappa (κ) ou iota (i) de acordo com a capacidade de formação de gel e é utilizada principalmente no setor alimentício, farmacêutico e de cosméticos (11,12).

A carragena representou um mercado global anual de mais de 762 milhões de dólares em 2016 (17). O Brasil produz pequenas quantidades de carragena, aproximadamente 10 toneladas por ano. O Brasil, também produziu no ano de 2015, 700 toneladas da macroalga *K. alvarezii*. Entretanto, essa produção não foi suficiente frente a demanda econômica nacional, que é da ordem de 1800 toneladas por ano, exigindo a importação de 1100 toneladas de *K. alvarezii* das Filipinas (18,19). O processamento de carragena de diferentes cepas de *K. alvarezii* promove a formação de um resíduo rico em glucana. Esse resíduo pode ser hidrolisado enzimaticamente por celulasas formando glicose que pode ser utilizada para a produção de bioprodutos de interesse comercial (um exemplo seria a produção de etanol combustível) (15,20)

Dentro do contexto apresentado o objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento de cultivos de *K. alvarezii* em diferentes condições climáticas e o efeito da hidrólise enzimática dos resíduos obtidos pós-processamento de carragena. A seguir será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o estado da arte do tema abordado no estudo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. *Produção comercial de carragena*

A carragena kappa é um importante coloide hidrofílico (hidrocolóide) que se acumula em numerosas espécies de macroalgas vermelhas. A indústria global de carragena foi avaliada em 762 milhões de dólares em 2016 (17). O maior produtor de carragena atualmente é a Filipinas, que representa cerca do 77% da oferta mundial (18,19). O valor do mercado para carragena na Ásia-Pacífico é extremamente maior em comparação com os mercados da América do Norte e Europa. A China é o principal exportador de carragena para Estados Unidos e Europa. A produção mundial de carragena excedeu 56 mil toneladas em 2013 e tem um mercado muito competitivo na Argentina, Canadá, Chile, Dinamarca, França, Japão, México, Marrocos, Portugal, Coreia do Sul, Espanha, Rússia e Estados Unidos. O mercado da carragena teve uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 5,2% nos anos 2013 a 2016 (11-15).

Na indústria de alimentos a carragena é utilizada principalmente como um agente estabilizante e espessante. Nos Estados Unidos a principal aplicação é na indústria de chocolate, utilizando a carragena para manter o chocolate em suspensão. A carragena é utilizada também na indústria farmacêutica, de cosméticos e em outros segmentos (11-15).

Cultivos comerciais de macroalgas vermelhas (principalmente de *K. alvarezii*) foram iniciados em meados de 1970 nas Filipinas e desde então tem sido transferido com sucesso para a Indonésia, Tanzânia, Vietnam e algumas

ilhas do pacífico, sendo responsáveis por mais de 88% da produção industrial mundial de carragena. A introdução de *K. alvarezii* no Brasil ocorreu em 1995 em Ubatuba-SP e em 1998 no estado do Rio de Janeiro. Após o ano de 2008 foi permitida a produção comercial de *K. alvarezii* pelo governo brasileiro na baía de Sepetiba-RJ, onde encontram-se, aproximadamente, 30 fazendas de cultivo. O Brasil produz pequenas quantidades de carragena, aproximadamente 10 toneladas por ano. Parte da produção de carragena no Brasil é obtida de bancos naturais de *Hypnea musciformis*, porém esses bancos são limitados e o cultivo de *H. musciformis* não foi desenvolvido com sucesso, consequentemente o Brasil importa anualmente 1 tonelada de carragena e 2 toneladas de *K. alvarezii* das Filipinas (16,18,21,22).

2.2. Cultivos e produção de macroalgas

As macroalgas são cultivadas comercialmente para a extração de carragena por meio de técnicas de aquicultura (cultivo de organismos aquáticos). Existem diferentes métodos de cultivo, como segue:

- Método do cultivo em linha: os propágulos das macroalgas são conectados a cordas com diferentes comprimentos (por exemplo, de 10 m a 50 m, ou mais) que são colocadas em um arranjo paralelo com espaçamento variável entre elas, dependendo do tamanho das espécies de macroalgas (de 0,3 m a 1,0 m ou mais).

- Método do cultivo líquido: os propágulos das macroalgas são anexados a redes colocadas a uma determinada profundidade de água, geralmente flutuando na superfície ou ligeiramente submersas.
- Método do cultivo de jangada flutuante: a plantação ocorre na superfície, associando macroalgas a linhas ou redes com forma dada por uma estrutura rígida flutuante feita de bambu ou outro tipo de material.
- Método do cultivo de tanques ou lagoas: as macroalgas podem ser amarradas promovendo racemos profusos suspensos ou flutuando livremente na superfície de tanques ou lagoas (23).

Além dos métodos de cultivo descritos anteriormente existe ainda o método conhecido como “TIE-TIE” (Figura 1), que consiste em um sistema de amarração, o qual foi utilizado no presente estudo. Esse sistema consiste em uma balsa ancorada na superfície da água com 0,5 m a 1,0 m de profundidade. A balsa ancorada é dividida em módulos que contém tubos de PVC (policloreto de polivinila) fechados em sua extremidade (Figura 1). Sob cada módulo é amarrada uma rede de nylon. Os módulos principais também podem ser divididos em módulos secundários (Figura 1). Ao longo dos módulos são alinhadas linhas de nylon com um espaçamento adequado entre elas para amarrar os brotos em crescimento vegetativo das macroalgas, (Figura 1) (11).

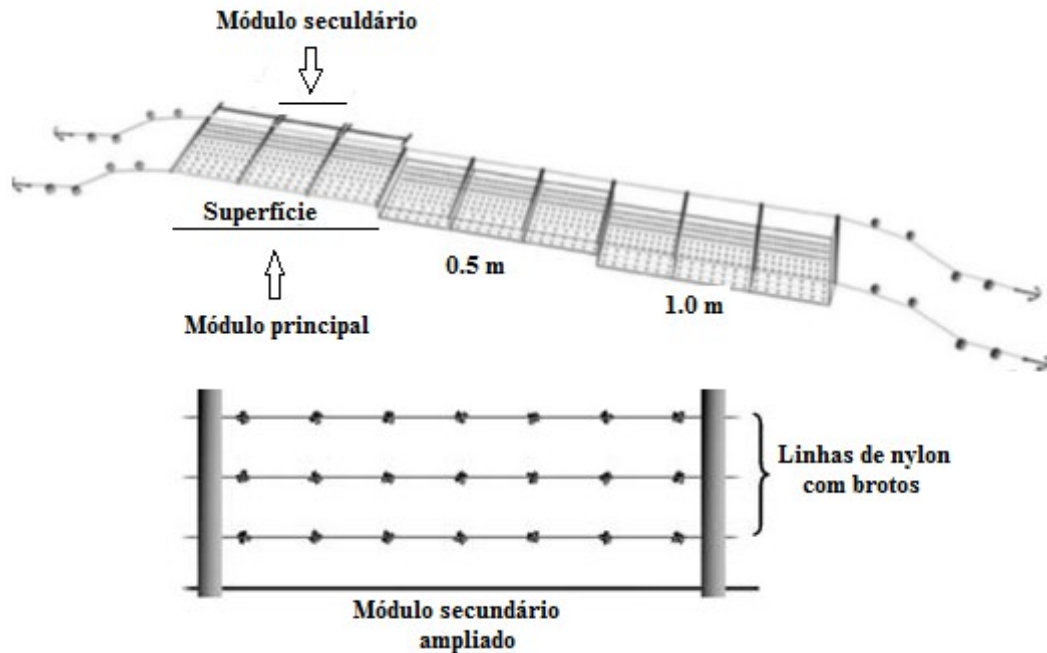


Figura 1. Esquema de balsa ancorada utilizada para cultivos de *Kappaphycus alvarezii*. Sistema conhecido como “TIE-TIE” ou sistema de amarração (16).

2.3. Classificação, ultraestrutura e morfologia celular de macroalgas

As algas são plantas aquáticas ou terrestres e existem em uma grande variedade de espécies que vivem em vários tipos de ambientes. Elas podem ser autotróficas ou heterotróficas. As algas autotróficas são fotossintetizantes e utilizam a luz solar para fixar o carbono inorgânico da atmosfera (CO_2). O carbono assimilado é transformado em moléculas orgânicas mais complexas (como, por exemplo, os carboidratos) e utilizado como reserva alimentar ou como constituinte estrutural da parede celular da planta. As algas heterotróficas são capazes de assimilar pequenas moléculas orgânicas que são transformadas em compostos mais complexos como lipídeos, carboidratos e proteínas (24).

As algas são agrupadas em duas categorias: microalgas e macroalgas baseando-se em sua morfologia e tamanho. As microalgas são organismos microscópios, unicelulares e fotossintetizantes. As macroalgas são compostas de múltiplas células organizadas em estruturas semelhantes a raízes, talo e folhas de plantas superiores. As algas também podem ser divididas em classes: verdes, pardas e vermelhas. A classe das algas pardas contém apenas macroalgas (pluricelulares). Entretanto, a classe das algas verdes e vermelhas contém ambos os tipos, unicelulares e pluricelulares (6,24,25).

Macroalgas, como por exemplo, *Calliarthron Thalli* contém em sua parede celular carbonato de cálcio. As regiões calcificadas são denominadas de “intergeniculum” e as regiões que não contém carbonato de cálcio são denominadas de “geniculum” (Figura 2A-C). As regiões periféricas da geniculum contém células com paredes celulares mais espessas (maduras - Figura 2C e 2E) enquanto na região central da geniculum as células têm paredes celulares mais finas (imaturas- Figura 2C e 2D) (3).

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão na direção transversal e longitudinal da parede celular de *C. Thalli* mostram a deposição da lamela média (M), parede celular primária (P) e distintas paredes celulares secundárias (S1) nas células de geniculum maduras e imaturas, sendo notável na geniculum madura (Figura 2D-E) (3). As regiões da intergeniculum contém apenas a parede celular primária não sendo encontrada parede celular secundária (Figura 2F). Paredes celulares secundárias também não têm sido descritas na literatura em macroalgas vermelhas (3). Entretanto, nos materiais lignocelulósicos, a maior

parte da lignina se encontra nas paredes celulares secundárias (26). A ausência desta parede nas macroalgas vermelhas pode explicar o baixo teor de lignina na sua composição (Figura 2).

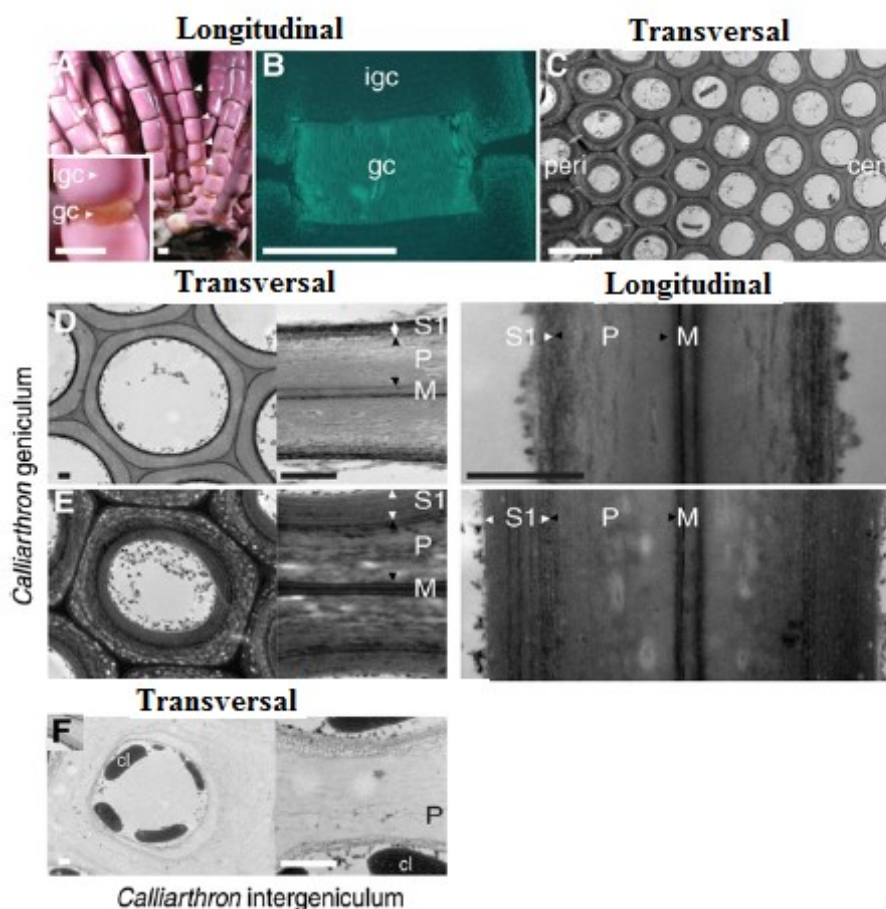


Figura 2. Morfologia e ultraestrutura de *Calliarthron Thalli* com pontuações flexíveis denominadas geniculum e separado por segmentos calcificados denominados intergeniculum. (A) Aspecto geral, (B) seção longitudinal (vista sobre luz UV) e (C) seção transversal de geniculum. (D) Célula genicular imatura com parede celular primária desenvolvida e parede celular secundária desprezível. (E) Célula genicular madura com parede secundária mais espessa, (F) Célula intergenicular contendo apenas parede celular primária. Abreviações: cen=células; gc=células geniculares; igc=células intergeniculares; ceri=células geniculares centrais; peri=células geniculares periféricas; cl=cloroplastos;

M=lamela média; P=parede celular primária; S1=parede celular secundária. A barra de escala representa 1 mm (A e B), 10 mm (C) e 0.5 mm (D-F).

A Figura 3 mostra a microscopia eletrônica de transmissão de uma célula de fibra de planta terrestre do gênero *Arapdopsis* que pertence à família *Brassicaceae* (que incluem as couves e mostardas). A microscopia mostra uma parede celular secundária mais desenvolvida e com subcamadas visuais (parede secundária S1, S2 e S3) e uma parede celular primária mais fina quando comparado a parede celular de *C. Thalli* (Figura 2D e 2E) (3).

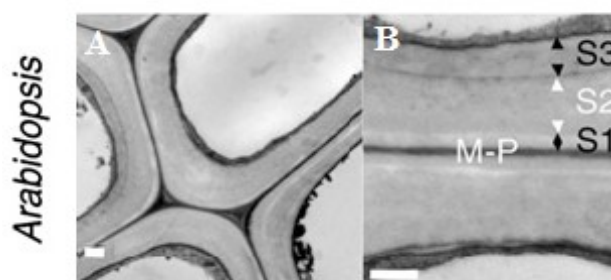


Figura 3. Morfologia e ultraestrutura de *Arapdopsis*. (A e B) seção transversal da fibra com barra de escala de 0,5 mm. M=lamela média; P=parede celular primária; S1-S2-S3= camadas da parede celular secundária.

2.4. Composição química de macroalgas

As macroalgas contém carboidratos, lipídeos, proteínas, cinzas e aromáticos (3,6,27). A composição química de macroalgas pode ser muito variável dependendo das classes e espécies avaliadas (6).

2.5. Carboidratos

Muitos tipos de carboidratos poliméricos são encontrados em macroalgas. Os principais tipos de carboidratos que compõem as macroalgas pardas são a laminarina (polissacarídeo de cadeia linear consistindo de unidades de glicose conectados por ligações do tipo β -1-3 com poucas ramificações conectadas através de ligações do tipo β -1-6), manitol (um tipo de açúcar álcool) e celulose (polissacarídeo de cadeia linear consistindo de unidades de glicose conectados por ligações do tipo β -1-4). As macroalgas pardas podem conter ainda o alginato (polímero de cadeia linear consistindo de unidades de ácido β -D-manurônico e α -D-gulurônico conectados por ligações do tipo 1-4) (Figura 4 e Tabela 1) (6). As macroalgas vermelhas contêm Agar (polissacarídeo de cadeia linear consistindo de unidades de β -D-galactose e 3-6- α -L-anidrogallactose conectados em ligações do tipo 1-4 alternadas em ligações do tipo 1-3), carragena (polissacarídeo linear consistindo de unidades de β -D-galactose-4-sulfato e 3-6- α -D-anidrogallactose-2-sulfato conectados em ligações do tipo 1-4 alternadas em ligações do tipo 1-3) e celulose (Figura 4 e Tabela 1) (6).

As macroalgas verdes contêm amido (polissacarídeo linear e ramificado consistindo de unidades de glicose conectadas através de ligações do tipo α -1-4 e α -1-6), pectina (polímero consistindo de unidades de ácido galacturônico interrompidas por unidades de L-ramnose) e celulose (Figura 4 e Tabela 1) (6).

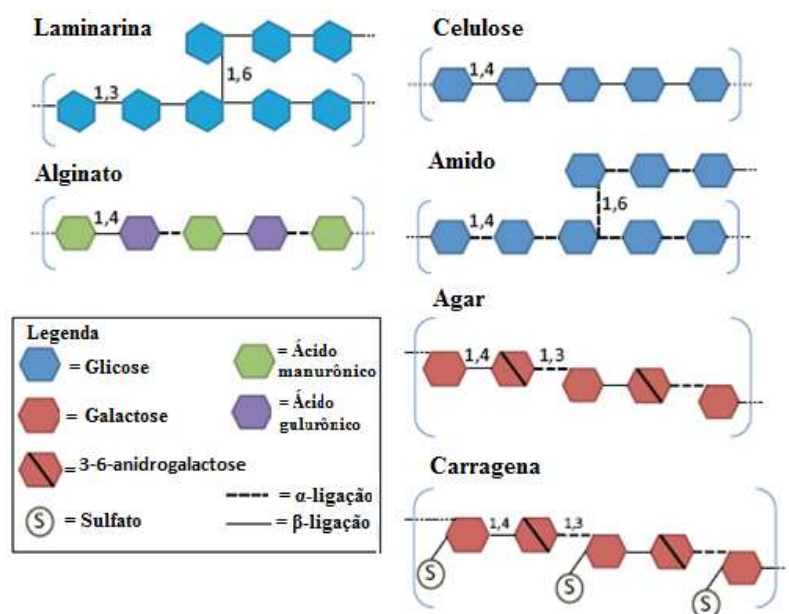


Figura 4. Informação estrutural dos principais polissacarídeos encontrados em macroalgas (6).

Tabela 1. Tipos de carboidratos e teores de carboidratos totais em porcentagem mássica (%massa/massa, dados em base seca) de algumas classes e espécies de macroalgas (6,13,28–30).

Algas	Classes	Tipos de carboidratos	Carboidratos totais (%)	Referência
<i>Gelidium amanssi</i>	Vermelha	Agar, carragena, celulose	75,2	(30)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>		Celulose, carragena	55,4-78,3	(19,(15,20)
<i>Laminaria japônica</i>	Marrom	Laminarina, manitol, alginato, celulose	51,9	(28)
<i>Sargassum fulvellum</i>			39,6	(28)
<i>Ulva lactuca</i>	Verde	Amido, celulose	54,3	(28)
<i>Ulva pertusa</i>			65,2	(29)

Os principais tipos de carboidratos encontrados na macroalga vermelha *K. alvarezii* são glucanas e galactanas. A literatura reporta teor médio de glucana e galactana da ordem de 32% e 13% (%massa/massa), respectivamente (15,20).

2.5.1. Proteínas, lipídeos e cinzas

Os conteúdos de proteínas em macroalgas são também variáveis dependendo das espécies avaliadas. Em média o teor de proteínas em macroalgas é de 12% (%massa/massa, biomassa seca) (Tabela 2) (6,27). O conteúdo de lipídeos é também variável dependendo das espécies avaliadas. Os lipídeos podem ser extraídos da biomassa e utilizados para a produção de biodiesel. Em média o teor de lipídeos em macroalgas é de 5% (%massa/massa, biomassa seca) (Tabela 2) (6,7,27). O conteúdo de cinzas em macroalgas também é bastante variável dependendo das espécies avaliadas. Compostos químicos inorgânicos são comuns de serem encontrados em macroalgas. O teor de cinzas é maior nas macroalgas pardas (em média 35%) seguido pelas macroalgas verdes (em média 22%) e macroalgas vermelhas (em média 6%) (% massa/massa, biomassa seca) (Tabela 2) (6,27).

Tabela 2. Teores de lipídeos, proteínas e cinzas em porcentagem mássica (%massa/massa, dados em base seca) de algumas classes e espécies de macroalgas (6).

Macroalgas	Classes	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)
Gelidium amanssi	Vermelha	0,6	18,5	5,7
Gelidium amanssi		1,1	13,1	8,6
Gelidium amanssi		0,9	12,2	3,3
Laminaria japonica	Parda	1,8	14,8	31,5
Laminaria japonica		1,5	8,1	30,9
Sargassum fulvellum		1,4	13,0	46,0
Ulva lactuca	Verde	6,2	20,6	18,9
Ulva pertusa		2,6	7,0	25,2

Meinita *et al.* (13), reportaram teores médios de proteínas, lipídeos e cinzas em biomassa de *K. alvarezii* da ordem de 2,3-5,4%, 0,6-0,9% e 12,6-19,5%, respectivamente. Outros estudos reportaram teores médios de proteínas, lipídeos e cinzas em biomassa de *K. alvarezii* (cepas vermelha e marrom) da ordem de 15,5-16,2%, 2,8-4,7% e 0,6-0,8% (%massa/massa), respectivamente (15,20).

2.5.2. Aromáticos

Recentemente a detecção de compostos aromáticos em paredes celulares de macroalgas vem sendo avaliada. Martone *et al.* (3) demonstraram através da técnica de DFRC (do inglês - Derivatization followed by reductive cleavage) que paredes celulares de *C. thalli* contém componentes derivados de reações radicalares de acoplamento de álcoois hidroxicinâmicos (monolignols) que são componentes precursores da formação da lignina e são utilizados para caracterizar ligninas de plantas terrestres. O método de DRFC é considerado

como um diagnóstico de lignina, pois esse método cliva apenas as ligações do tipo β -aryl-éter de monolignols acetilados. A aplicação do método de DFRC em *C. Thalli* mostrou a presença de acetatos oriundos de álcoois p-cumaril, coniferil e sinapílico (monômeros de DFRC), tipicamente derivados de unidades de p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). Os acetatos de p-cumaril, coniferil e sinapílico são comumente encontrados em fibras de plantas terrestres após a aplicação do método de DFRC (3).

Para cada grama de biomassa de *C. Thalli* genicula foi obtido aproximadamente 0,25 mg de monômeros de DFRC (razão molar H:G:S = 1:1.5:traços), enquanto que na intergenicula não calcificada foi obtido 0,19 mg de monômeros de DFRC (razão molar H:G:S = 1:2.4:0.1). O rendimento de monômeros de DFRC de gimnosperma (Pine loblolly) e da ordem de 50 mg por grama de biomassa e essencialmente 100% (G). Arabidopsis mostrou um rendimento de DFRC de 20 mg por grama de biomassa (razão molar HGS = traços: 4:1) (3).

Yaich *et al.* (27) quantificaram o teor de aromáticos em biomassa da macroalga *Ulva lactuca* pelo método de lignina Klason (lignina insolúvel). O teor de aromáticos foi da ordem de 1,5% (%massa/massa, dados em base seca). Wi *et al.* (2) mostraram a presença de 1,5% de aromáticos insolúveis e 3,2% de aromáticos solúveis (%massa/massa, dados em base seca) em biomassa da macroalga *Gelidium amanssi*. Entretanto, os teores médios de lignina total em gimnospermas e angiospermas são em média de 30% e o de cana-de-açúcar de 20% (9,31,32). Estudos recentes da macroalga *K. alvarezii* (cepas vermelha e

marrom) mostraram teores médios de aromáticos insolúveis da ordem de 1,8-2,7% (%massa/massa, dados em base seca) (15,20).

2.6. Hidrólise ácida e enzimática de celulose

A celulose pode ser hidrolisada em de glicose por tratamento enzimático ou ácido. Existem algumas propriedades físico-químicas que dificultam a hidrólise enzimática e podem ser entendidos. No caso da hidrólise ácida, condições de reações mais severas são necessárias (altas temperaturas e concentrações de ácido). Isso significa que parte dos açúcares liberados dos polissacarídeos são degradados antes do final da hidrólise ácida. Além disso, a hidrólise química pode promover a formação de compostos que são capazes de inibirem subseqüentes fermentações. No caso da hidrólise enzimática, a reação é realizada sob condições mais amenas, porém requer tempos mais longos de tratamento (até 72h) (33).

A acessibilidade de enzimas ao substrato é crítica durante a hidrólise enzimática. Adicionalmente, adsorção de celulasas na superfície do substrato também tem uma importante função (34). Celulasas que adsorvem no substrato ampliam sua extensão mostrando um aumento na velocidade de hidrólise da celulose cristalina comparada à de celulasas que adsorvem menos fortemente. A descoberta de domínios de ligação para celulose (CBDs) em algumas enzimas celulolíticas explica em parte as diferenças da habilidade de celulasas em adsorver na celulose (35). Uma correlação entre a hidrofobicidade de endoglucanases e sua habilidade em adsorver na celulose tem sido reportada

(36). Certamente, a hidrofobicidade da lignina também pode favorecer a adsorção de celulases. Durante o tratamento enzimático do material lignocelulósico com celulases, acima de 70% do total da enzima adicionada pode não ser produtiva devido à adsorção na lignina (adsorção improdutiva) (30-32).

Para uma eficiente hidrólise da celulose é necessária a ação sinérgica de enzimas, divididas em três grupos principais: endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), que clivam aleatoriamente o interior da cadeia de celulose; exo-1,4- β -D-glucanases, ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), que clivam as extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose e liberam unidades de celobiose; e 1,4- β -D-glicosidases, ou celobiases, (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose em glicose, além de clivarem oligossacarídeos. Os três grupos catalisam a hidrólise de ligações β -1,4 glicosídicas, e atuam sinergicamente, criando novos sítios para hidrólise, além de reduzir a inibição pelo produto (40,41) (Figura 5).

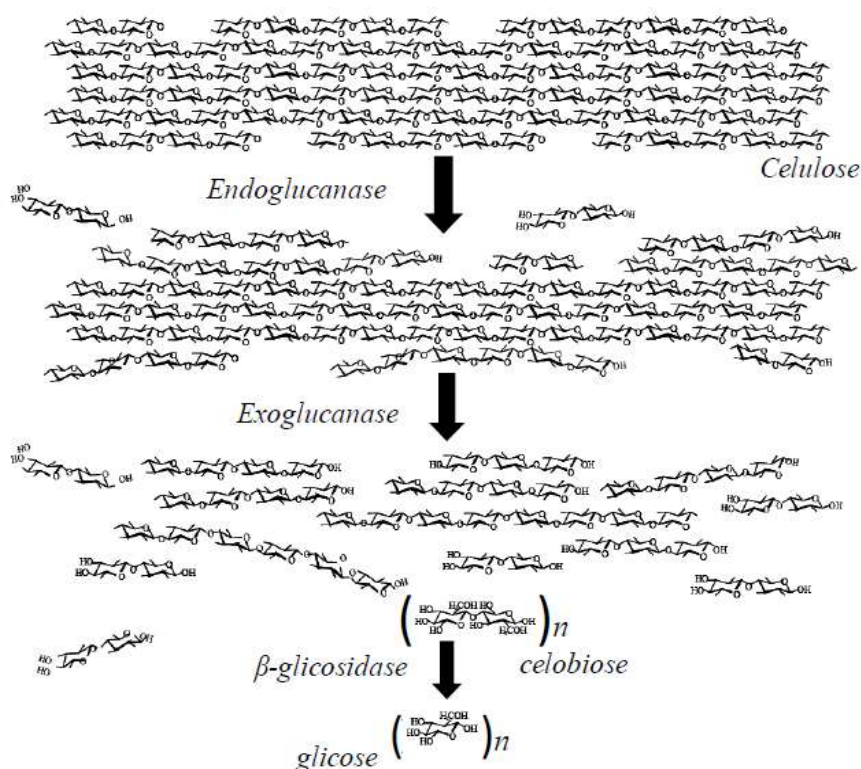


Figura 5. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (34).

A literatura tem reportado um conteúdo limitado de lignina e/ou aromáticos em biomassa de macroalgas (2,3,6,16,33) (15,20). Desta forma, celulasas podem ser mais efetivas nesta biomassa devido a menor probabilidade de adsorção improdutiva da enzima. Estudos recentes demonstraram que a fração de glucana da biomassa de *K. alvarezii* (cepas vermelha e marrom) foram susceptíveis a hidrólise enzimática com extratos comerciais contendo atividade de celulasas, não mostrando nenhum tipo de recalcitrância (15,20).

3. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento de cultivos de *K. alvarezii* em diferentes condições climáticas e averiguar o efeito da hidrólise enzimática dos resíduos obtidos pós-processamento de carragena. Para atingir a meta do estudo foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Medir e correlacionar os dados de velocidade de crescimento e produtividade dos cultivos em função da temperatura, salinidade e transparência de diferentes cepas de *K. alvarezii* (verde, vermelha, marrom e G11) ao longo de cultivos mensais em um período de um ano completo;
- Extrair as carragenas semi-refinadas e obter os resíduos de diferentes cepas de *K. alvarezii* previamente selecionadas de acordo com os dados de produtividade e velocidade de crescimento dos cultivos avaliados;
- Determinar a composição química das frações (amostras não tratadas, tratadas com KOH, carragenas semi-refinadas e resíduos) oriundas do processamento de carragena semi-refinada das amostras selecionadas;
- Avaliar a hidrólise enzimática através do parâmetro de velocidade máxima de formação de glicose, sobre os resíduos oriundos do processamento de carragena semi-refinada das amostras selecionadas;

4. Material e Métodos

A Figura 6 mostra um fluxograma geral das etapas desenvolvidas no estudo. Os detalhes de cada etapa são descritos a seguir.

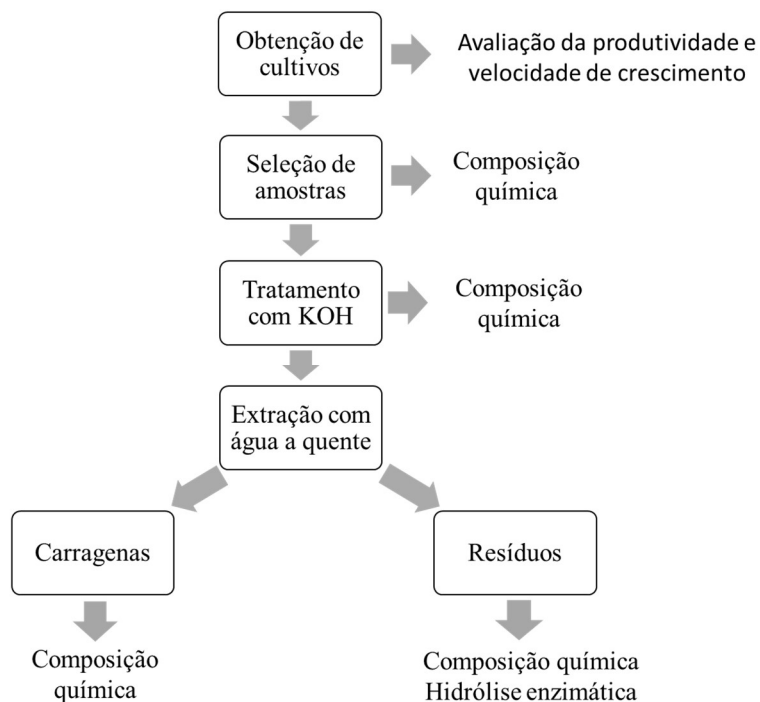


Figura 6. Fluxograma geral das etapas desenvolvidas no estudo.

4.1. Obtenção e preparação da biomassa de *K. alvarezii*

Para o presente estudo foram utilizadas 4 diferentes cepas da macroalga *K. alvarezii*. Tais cepas foram obtidas a partir da colaboração com o grupo de pesquisa do Instituto de Pesca da secretaria do governo do estado de São Paulo, Ubatuba-SP. Foram utilizadas as seguintes cepas da macroalga: marrom, vermelha, verde e G11. As 4 diferentes cepas da macroalga *K. alvarezii* foram cultivadas no oceano Atlântico no campo experimental da praia do Itaguá,

Ubatuba, SP, Brasil ($23^{\circ}27'5,8''\text{Sul}$; $45^{\circ}02'49,3''\text{Oeste}$) no Instituto de Pesca (Figura 7).



Figura 7. Sistema de cultivos experimental de *K. alvarezii* no oceano atlântico na praia do Itaguá, Ubatuba, SP, Brasil, ($23^{\circ}27'5,8''\text{Sul}$; $45^{\circ}02'49,3''\text{Oeste}$).

A estrutura utilizada para cultivar as cepas da macroalga consistiu de uma balsa ancorada na baía (16,21). A balsa ancorada de 9,0m x 2,5m ($22,5\text{m}^2$) possui 3 módulos principais de 3,0m x 2,5m ($7,5\text{m}^2$) munidos de tubos de PVC fechados em suas extremidades. Uma rede de linhas de nylon com largura de 60 mesh foi utilizada sob a balsa para evitar perda de brotos das cepas em estudo. Cada módulo principal foi dividido em 5 módulos secundários de 0,6m x 2,5m ($1,5\text{m}^2$). Cada módulo secundário foi composto por uma linha de nylon de 2,5m

que foi utilizada para fixar as macroalgas de cada cepa em estudo a serem cultivadas (método conhecido como “TIE-TIE”). 10 brotos em crescimento vegetativo de cada cepa em estudo contendo cada um aproximadamente 70g (dados em base úmida) foram previamente pesados e fixados em uma linha de nylon em um módulo secundário na superfície da água do mar, o que proporcionou uma densidade de 6,7 plantas por m² de cultivo. Os cultivos foram realizados com as 4 cepas em estudo ao longo de um ano. Cada cultivo das cepas em estudo foi realizado por aproximadamente 30 dias (cultivos a cada 1 mês ao longo de um ano).

As macroalgas foram pesadas úmidas e a massa seca das cepas em estudo foi determinada utilizando-se uma umidade média de 35% (valor de referência comercial) (18,21). A velocidade de crescimento dos cultivos das diferentes cepas foi calculada segunda a equação 1 (21,43).

$$V = \left[\left(\frac{W_t}{W_o} \right)^{1/t} - 1 \right] \times 100\% \quad \text{[Equação 1]}$$

onde:

V = velocidade de crescimento (%dia⁻¹).

W_t = massa úmida final (g).

W_o = massa úmida inicial (g).

t = tempo de cultivo (dias).

A produtividade dos cultivos das diferentes cepas foi calculada segundo a equação 2 (21,43).

$$P = \left[\frac{\left(\frac{dwt_f - dwt_i}{t} \right) \times \left(\frac{dwt}{wwt} \right)}{A} \right] \quad \text{[Equação 2]}$$

Onde:

P = produtividade (g.m⁻²dia⁻¹).

dwt_f = massa final seca (g).

dwt_i = massa inicial seca (g).

t = tempo de cultivo (dias).

dwt = massa seca total (g).

wwt = massa úmida total (g).

A = área total do cultivo (m²).

Os dados abióticos como a temperatura, salinidade e transparência foram monitorados uma vez ao dia, nas proximidades da região denominada de Cais do Porto, pertencente ao Instituto de Pesca. A transparência da água neste local foi medida com a utilização de um Disco de Secchi. As amostras da água foram coletadas por volta das 10:00h e transportadas até o Laboratório do para medição de temperatura e salinidade. Para a medir a temperatura foi utilizado um termômetro e para a medida de salinidade foi utilizado um salinômetro manual tipo refratômetro.

A biomassa das 4 cepas de *K. alvarezii* cultivadas ao longo de um ano foram secas à temperatura de 25°C. A biomassa foi lavada com água destilada sob agitação em béquer de polipropileno de 10L por 45min na proporção de 100g (base seca) de biomassa de macroalga para 2,8L de água destilada. Utilizou-se

aproximadamente 60g da biomassa (base seca). Após esse período a solução oriunda da biomassa foi removida por meio de uma peneira com malha de 1mm. A condutividade elétrica da solução foi medida (condutivímetro portátil). A lavagem foi repetida até a solução de lavagem oriunda da biomassa indicar uma condutividade elétrica similar à da água destilada. Após as lavagens a amostra foi seca novamente à temperatura de 25°C. Esse material foi denominado de amostra não tratada.

4.2. Pré-tratamento do material com hidróxido de potássio

Foram selecionadas amostras e cepas utilizando como base os resultados de velocidade de crescimento e produtividade dos cultivos previamente realizados. As amostras selecionadas foram submetidas às etapas de processamento de carragena semi-refinada. Para isso, aproximadamente 30g (base seca) de biomassa não tratada foram colocadas em um béquer de polipropileno de 4L contendo 1500mL de solução de KOH 6% (%massa/volume). O recipiente foi fechado e mantido à temperatura de 25°C por 24h. Após esse período a solução alcalina foi removida por meio de uma peneira com malha de 1mm e os mesmos recipientes contendo os fragmentos da macroalga ainda embebidos na solução alcalina foram fechados e expostos ao sol por 1 dia para branqueamento. A biomassa após o branqueamento foi lavada durante 10min utilizando 1L de água destilada para cada 35g (dados em base seca) de biomassa (o processo foi repetido 2 vezes para neutralização do álcali e posteriormente a biomassa seca em estufa a 60°C). Os experimentos foram realizados em

triplicata. Essa biomassa foi denominada de macroalga pré-tratada em solução alcalina a frio (ATF) (16,18). Aproximadamente 20 g de biomassa ATF foram moídas em moinho de facas (Micro moinho tipo Willye TE-648, TECNAL) (0,84 mm). O rendimento após o pré-tratamento da biomassa com KOH 6% (%massa/volume) foi calculado segundo a equação 3: (16,18)

$$R = \frac{W_f}{W_i} \times 100\% \quad \text{[Equação 3]}$$

Onde:

R = rendimento mássico após pré-tratamento com KOH (%).

W_i = massa seca inicial (amostra não tratada) (g).

W_f = massa seca final (amostra pré-tratada com KOH) (g).

4.3. *Extração de carragena e obtenção do resíduo*

Aproximadamente 5g (base seca) de biomassa ATF previamente moída foi adicionada em frascos Erlenmeyers de 2L e embebidos com 400 ml de água destilada. Posteriormente os frascos foram colocados em uma incubadora shaker (Gyromax™ 737R, Amerex Instruments) a 65°C à 120rpm por 2h. Ao final da extração o conteúdo dos frascos foi filtrado em um sistema a vácuo composto por um Kitassato de 1L e um funil de Büchner dotado de um filtro de nylon. Posteriormente a fração que passou pelo filtro foi seca em estufa a 40°C até a obtenção de massa constante. Essa biomassa foi denominada de carragena semi-refinada (16,18). O resíduo retido no filtro foi lavado com água destilada e

seco em estufa a 40°C até a obtenção de massa constante. Os experimentos foram realizados em triplicata. A carragena e o resíduo foram pesados e moídos em moinho de facas (Micro moinho tipo Willye TE-648, TECNAL) (0,84 mm). Os rendimentos de obtenção de carragena e resíduo foram calculados segunda a equação 4: (16,18)

$$R = \frac{W_f}{W_i} \times 100\% \quad \text{[Equação 4]}$$

Onde:

R = rendimento mássico de obtenção do resíduo ou de carragena (%)

W_i = massa seca inicial (amostra tratada com KOH) (g).

W_f = massa seca final (resíduo ou carragena) (g).

4.4. *Composição química das frações de K. alvarezii*

As amostras geradas nos processamentos descritos nos itens 4.2 e 4.3 foram caracterizadas quimicamente. As amostras foram as seguintes: (a) biomassa obtida após a lavagem com água a frio (não tratada), (b) biomassa obtida após a extração com hidróxido de potássio (ATF, pré-tratada com KOH), (c) resíduo e (d) carragena semi-refinada. Todas as amostras foram previamente moídas em moinho de facas (Micro moinho tipo Willye TE-648, TECNAL) (0,84 mm).

4.4.1. Extração com solvente apolar (teor de lipídeos)

Aproximadamente 0,5 g (dados em base seca) das amostras não tratadas foram submetidas à extração com hexano por 6h em aparelho Soxhlet (15,20). A massa de lipídeos extraída foi calculada com base na diferença entre a massa seca inicial menos a massa seca final após a extração, segunda a equação 5. Os experimentos foram realizados em triplicata. (15,20)

$$L = \frac{W_f}{W_i} \times 100\% \quad \text{[Equação 5]}$$

Onde:

L = porcentagem mássica de lipídeos na amostra (%).

Wi = massa seca inicial (g).

Wf = massa seca final (após a extração) (g).

4.4.2. Teor de cinzas

Cadinhos de porcelana foram colocados no forno de mufla a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ por 3h utilizando uma rampa de aquecimento pré-programada (15,20). Após o término de 3h, os cadinhos foram mantidos no forno de mufla até a temperatura atingir aproximadamente 105°C . Então, os cadinhos foram retirados do forno de mufla e colocados em um dessecador com sílica para o resfriamento à temperatura de 25°C . Após 1h (aproximadamente) os cadinhos foram pesados. Posteriormente, foram pesados aproximadamente 1g (dados em base seca) das amostras, colocadas nos cadinhos (previamente secos e pesados) e levados ao

forno de mufla novamente, o qual foi aquecido seguindo a mesma rampa de aquecimento utilizada anteriormente. Os cadinhos permaneceram no forno de mufla por 3h após a temperatura atingir $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$. Após o período de 3h, os cadinhos foram mantidos no forno de mufla até a temperatura atingir aproximadamente 105°C . Os cadinhos foram retirados do forno de mufla e colocados em um dessecador com sílica para o resfriamento à 25°C . Após 1h (aproximadamente) os cadinhos foram pesados. O cálculo do teor de cinzas nas amostras em estudo foi realizado segundo a equação 6. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (15,20,44).

$$C = \frac{W_f}{W_i} \times 100\% \quad [\text{Equação 6}]$$

Onde:

C = porcentagem mássica de cinzas na amostra (%).

W_i = massa seca inicial das amostras antes do procedimento da mufla (g)

W_f = massa seca final após o procedimento da mufla (g).

4.4.3. Teor de proteínas

Para a determinação de proteínas nas amostras em estudo foi utilizada a metodologia de Lowry modificada por Hartree (45). O método baseia-se no uso de em uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção em

660nm. É um método bastante sensível e utiliza como reagentes as seguintes soluções: solução (a): carbonato de sódio 2% (%massa/volume) em hidróxido de sódio 0,1N, Solução (b): tartarato de sódio e potássio 1% (%massa/volume) em água destilada e solução (c): Sulfato de cobre 1% (%massa/volume) em água destilada. No momento da dosagem, as soluções a, b e c foram misturadas na proporção de 100:1:1, respectivamente. (45)

Foram pesadas aproximadamente 0,05 g de cada amostra em tubos de ensaios que foram tratados por 20mL de uma solução de NaOH 1M a 80°C por 4h para dissolver as proteínas das amostras em estudo (15,20). Ao final das 4h a suspensão foi centrifugada e alíquotas de 0,5mL do sobrenadante previamente diluído em água destilada foram adicionadas em 2,5mL, contendo a mistura das soluções a, b e c (proporção 100:1:1, respectivamente). A mistura foi homogeneizada em vortex mantendo-a em repouso durante 15min e então foi adicionado 0,25mL do reagente Folin- Ciocalteau 1N, agitando-se em vortex novamente para completa homogeneização. Após 30min, foram realizadas leituras em 660nm em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro Amersham Biosciences). Para a determinação quantitativa de proteínas foi construída uma curva de calibração utilizando soro de albumina bovina (SBA) como padrão de proteína bovina, foi realizada segundo a equação 7. Os experimentos foram realizados em triplicata.

$$P = \left(\frac{C \times V_f}{1000} \right) \times \frac{100\%}{W_i} \quad \text{[Equação 7]}$$

Onde:

P = porcentagem mássica de proteínas na amostra (%)

C = concentração de proteínas ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Vf = volume final da solução contendo proteínas (20ml)

Wi: massa seca inicial da amostra (g)

4.4.4. *Teor de grupos sulfato*

O conteúdo de grupos sulfato foi quantificado através da medida de espalhamento de luz em espectrofotometria (15,20). Aproximadamente 0,05g (dados em base seca) de amostra moída foi pesada e adicionada em tubos de ensaio. Um mililitro de solução de HCl 0,5N foi adicionada a cada tubo, os tubos foram tampados com papel de alumínio e autoclavados a 120°C por 1h a 1 atm de pressão. Ao fim da reação, a amostra foi transferida a um tubo Falcon de 15mL, o qual foi adicionado água destilada para se obter um volume final de 10mL, seguido de centrifugação a 7000xg por 10min. Assim, 2mL do sobrenadante, 18mL de água destilada e 2mL de HCl 0,5N foram colocados em um tubo de ensaio e agitado em vortex por alguns segundos. Em seguida 1mL de reagente gelatina de BaCl_2 (Difco-Laboratories, Detroit, EUA) foram também adicionados. Os tubos foram mantidos a 25°C por 30min. Ao final os tubos foram homogeneizados em agitador vortex e tomadas as leituras em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 550nm. Os cálculos dos teores de grupos sulfatos foram realizados segundo a equação 8:

$$GS = [(C \times V_f)/1000] \times \frac{100\%}{W_i} \quad \text{[Equação 8]}$$

Onde:

GS= porcentagem mássica de grupo sulfatos na amostra (%).

C = concentração de grupos sulfatos (mg.ml⁻¹).

V_f = volume final da suspensão contendo grupos sulfato (10ml).

W_i= massa seca inicial da amostra (g).

4.4.5. Teores de carboidratos, ácidos fórmicos e levulínico e compostos aromáticos insolúveis

Para a determinação de carboidratos poliméricos e ácidos foi utilizada a metodologia de hidrólise ácida (15,20). Porções de cerca de 300mg (dados em base seca) das amostras foram tratadas com 3mL de ácido sulfúrico 72% (%massa/massa) por 1h a 30°C. Em seguida, o conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido, para frascos Erlenmeyers de 250mL com auxílio de 79mL de água destilada. A mistura foi autoclavada por 1h, a 121°C, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 (Schott, Alemanha) (previamente secos em estufa a 105°C por 2h, esfriados em dessecador munido com sílica a temperatura de 25°C e pesados). O material retido foi lavado, com 2 porções de 5mL de água, e seco em estufa a 60°C por 12h. Posteriormente o material retido foi seco a 105°C por 2h, resfriado em dessecador com sílica a temperatura de 25°C e pesado. O material retido nos filtros de vidro sinterizados correspondeu aos aromáticos insolúveis. O filtrado foi avolumado para em balão volumétrico de

100ml. Para a detecção dos açúcares monoméricos uma pequena alíquota do filtrado foi passada através de membranas de $0,45\mu\text{m}$ e na sequência passado através de cartuchos do tipo SEP-PACK C_{18} e injetados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise cromatográfica foi feita, utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87H, com ácido sulfúrico $0,005\text{M}$ como eluente a $0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a 60°C e detecção por índice de refração a temperatura de 60°C (Shimadzu, modelo C- R7A), a fim de detectar glicose, galactose, ácido fórmico e ácido levulínico nas amostras em estudo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para a quantificação foi elaborada uma curva de calibração com padrões autênticos de glicose (G1008.01.AG, Lot# 86333, Synth), galactose (G0625-100G, Lot# SLBJ2471V, Sigma), ácido fórmico (F0507-100ML, Lot# SHBF0916V, Sigma) e ácido levulínico (W262701-100G-K, Lot# MKBS8027V, Sigma).

A partir das concentrações de glicose, galactose, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido fórmico e levulínico foram obtidas as massas a partir do volume final de 100ml do filtrado. Para o cálculo da porcentagem mássica de glucana nas amostras, a massa de HMF foi multiplicada pelo fator de conversão em glicose (1,429) e adicionada à massa de glicose previamente calculada. A massa total de glicose foi multiplicada pelo fator de conversão de hidrólise ácida de glicose para glucana (0,9) e o resultado foi multiplicado pelo valor resultante de 100 dividido pela massa inicial da amostra (Equação 9). Para o cálculo da porcentagem mássica de galactana nas amostras foi realizado o seguinte procedimento: as massas de ácido fórmico e levulínico foram multiplicadas pelo

fator de conversão de ácido fórmico e levulínico para anidrogalactose (3,523 e 1,396, respectivamente). A massa de galactose foi multiplicada pelo fator de conversão de galactose para galactana (0,9). A massa de galactana oriunda da massa de galactose foi somada a massa de anidrogalactose. A massa total (galactana + anidrogalactose) foi multiplicada pelo valor resultante de 100 dividido pela massa inicial da amostra (Equação 10). Os cálculos dos teores percentuais de glucana e galactana foram realizados segundo as equações 9 e 10, respectivamente. (15,20)

$$G = [(glicose + (HMF \times 1,429)) \times 0,9] \times \frac{100\%}{W_i} \quad \text{[Equação 9]}$$

$$Gal = [(galactose \times 0,9) + (AF \times 3,5) + (AL \times 1,4)] \times \frac{100\%}{W_i} \quad \text{[Equação 10]}$$

Onde:

G = porcentagem mássica de glucana (%).

Gal = porcentagem mássica de galactana (%).

Glicose = massa de glicose (g).

Galactose = massa de galactose (g).

HMF = massa de hidroximetilfurfural (g).

AF = massa de ácido fórmico (g).

AL = massa de ácido levulínico (g).

W_i = massa seca inicial da amostra (g).

4.4.6. Teor de hidroximetilfurfural (HMF)

Para a quantificação de hidroximetilfurfural (HMF) utilizou-se o filtrado (item 4.4.5) obtido após da hidrólise ácida das amostras em estudo. Para a detecção de HMF uma pequena alíquota do filtrado foi passada através de membranas de 0,45µm. Então, o filtrado foi injetado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Perkin-Elmer, modelo Flexar), equipado com uma coluna C₁₈ de 250mm de comprimento e 4mm de diâmetro externo (Hypersil; Thermo-Scientific) utilizando como eluente acetonitrila:água (1:8) com 1% (%volume/volume) de ácido acético com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ (15,20). A análise foi realizada a 25°C. O HMF foi detectado a 276nm por meio de um detector UV-Visível. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para os cálculos foi elaborada uma curva de calibração com padrão autêntico de HMF (W501808-25G-K, Lot# STBD9762V, Sigma).

4.5. Determinação da atividade enzimática de celulasas totais

A determinação da atividade enzimática foi realizada para o extrato comercial Cellic CTec II (Novozymes). A atividade de celulasas totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (46). A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30mL contendo 1mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8, uma tira de papel de filtro 1cm x 5cm (aproximadamente 50mg) e 0,5mL de extrato enzimático, diluído nas seguintes proporções: 1:100, 1:200, 1:300 e 1:400. Os tubos de ensaios foram aquecidos em banho maria a 50°C por 60min. Após esse tempo, adicionou-se 3mL de DNS

e a mistura foi fervida por 5min (47). Foram adicionados então 20mL de água destilada em cada tubo e homogeneizou-se a mistura em agitador vortex. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 540nm. Foram realizados controles para cada diluição, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Para o branco foi adicionada água destilada no lugar da amostra. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através de uma curva de calibração com padrão autêntico de glicose e usados para construir um gráfico correlacionando o inverso das diluições do extrato enzimático em função da quantidade de glicose liberada. A equação da reta foi utilizada para determinar o valor da diluição da enzima que correspondesse a liberação de 2mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulasas totais do extrato em FPU.mL⁻¹. Uma curva de calibração foi utilizada no cálculo da atividade de FPU e foi preparada a partir de uma solução padrão de glicose (G1008.01.AG, Lot# 86333, Synth) de 10 mg.mL⁻¹. Aliquotas de 1mL dessa solução foram adicionados a tubos de ensaio de 30mL com diferentes volumes de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8 (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0) o que culminou nas seguintes concentrações de glicose (6,7, 5,0, 3.3 e 2,0 mg.mL⁻¹, respectivamente). De cada solução obtida foram adicionados 0,5mL de padrão, 1mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8, 3mL de DNS e fervidos por 5min. Após a etapa de fervura foram adicionados então 20mL de água destilada em cada tubo, agitando-se a mistura em vortex para completa homogeneização. A

leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences) a 540nm.

$$ACT = \frac{0,37}{\text{diluição de enzima para liberar 2,0 mg de glicose}} \quad [\text{Equação 11}]$$

ACT = atividade de celulasas toatis (FPU.mL⁻¹).

4.6. *Hidrólise enzimática dos resíduos obtidos*

Os resíduos obtidos foram hidrolisados enzimaticamente com extrato comercial contendo atividade de celulase (Cellec CTec II, Novozymes, Dinamarca). Para a hidrólise foi utilizada uma proporção de 10 FPU por grama de amostra (dados em base seca), o que correspondeu a 200 UI de β-glicosidases. Cada experimento de hidrólise foi conduzido em tubos Falcon de 50 mL contendo 100 mg de amostra moída (dados em base seca) e 5 mL de tampão de acetato de sódio 50 mM (pH 4,8) contendo 1 FPU de celulasas totais. Os frascos foram incubados a 45°C com agitação rotativa de 120 rpm em um shaker (Gyromax™ 737R, Amerex Instruments). Durante o processo de sacarificação enzimática as reações foram monitoradas em intervalos de 4 a 72h, sendo que em cada tempo retirou-se uma alíquota de 0,25mL do sobrenadante, a qual foi fervida durante 5min para a inativação das enzimas e posteriormente congelada e estocada (15,20). Para a determinação e quantificação dos açúcares resultantes da hidrólise enzimática, as alíquotas foram descongeladas, centrifugadas e o sobrenadante foi previamente diluído e analisado por um sistema de cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC) (item 4.4.5). Foram calculadas as concentrações de glicose e galactose no hidrolisado enzimático. A partir dos dados de composição química, dos fatores de hidrólise enzimática (0,9, para glicose) e do volume final da reação (5mL) foram calculadas as porcentagens de conversão de glucana em glicose (Equação 10). Para o cálculo, também foram previamente descontadas as massas de glicose presentes nos extratos enzimáticos utilizados em cada reação. Segundo a equação 12. (15,20)

$$CG:g = [Cg \times V_f] \times 0,9 \times \frac{100\%}{W_{iG}} \quad \text{[Equação 12]}$$

Onde:

CG:g = conversão de glucana em glicose (%).

Cg = concentração de glicose (g.L⁻¹).

V_f= volume final da solução contendo glicose (0,005L).

W_{iG}= fração de glucana na massa seca inicial da amostra (g).

4.7. Modelagem cinética da hidrólise enzimática

Os parâmetros de cinética da hidrólise enzimática foram estimados por regressão não linear, minimizando-se a soma dos quadrados dos resíduos entre os valores experimentais (obtidos em triplicata) e os calculados pelo modelo matemático $g = g_{max} (1 - e^{-kt})$ (48), de acordo com o algoritmo de Marquardt (49). Os ajustes do modelo cinético da hidrólise enzimática da fração de glucana dos resíduos obtidos para todos os dados experimentais das diferentes cepas e níveis em estudo, foram realizados no software Origin Graph. Para o cálculo da

velocidade máxima de formação de glicose, foram multiplicados os valores das triplicatas dos parâmetros g_{max} e k do presente modelo matemático. A partir dos valores de cada réplica, foi calculada a média e desvio padrão para todas as diferentes cepas e níveis em estudo (48).

5. Resultados e discussão

5.1. Avaliação de cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii*

Inicialmente foram preparados os cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii* a fim de avaliar o perfil de produtividade e velocidade de crescimento em diferentes estações climáticas ao longo de um ano em Ubatuba-SP. As cepas avaliadas foram: vermelha, marrom, verde e G11. O período de avaliação dos cultivos foi de agosto de 2013 a julho de 2014, sendo que cada cultivo foi monitorado em média por 30 dias. A Figura 10 mostra o perfil de produtividade das 4 cepas em estudo ao longo dos meses de agosto de 2013 a julho de 2014. Os valores de produtividade variaram de 43,5-80,3 g.m⁻²dia⁻¹ (cepa vermelha), 50,8- 103,5 g.m⁻²dia⁻¹ (cepa marrom), 42,9-85,2 g.m⁻²dia⁻¹ (cepa verde) e 27,0-42,9 g.m⁻²dia⁻¹ (cepa G11). As cepas vermelha, marrom e verde mostraram valores similares de produtividade entre si, entretanto, as cepas vermelha, marrom e verde apresentaram valores superiores de produtividade quando comparadas à cepa G11 (Figura 8).

A partir do perfil de produtividade das cepas em estudo foram selecionados três níveis diferenciados ao longo dos cultivos em diferentes estações climáticas

do ano (A, B e C) (Figura 8): O nível A se refere ao mês de cultivo de setembro a dezembro de 2013; o nível B se refere aos meses de cultivos entre janeiro a março de 2014; o nível C se refere aos meses de cultivo entre os meses de abril a junho de 2014 (Figura 8).

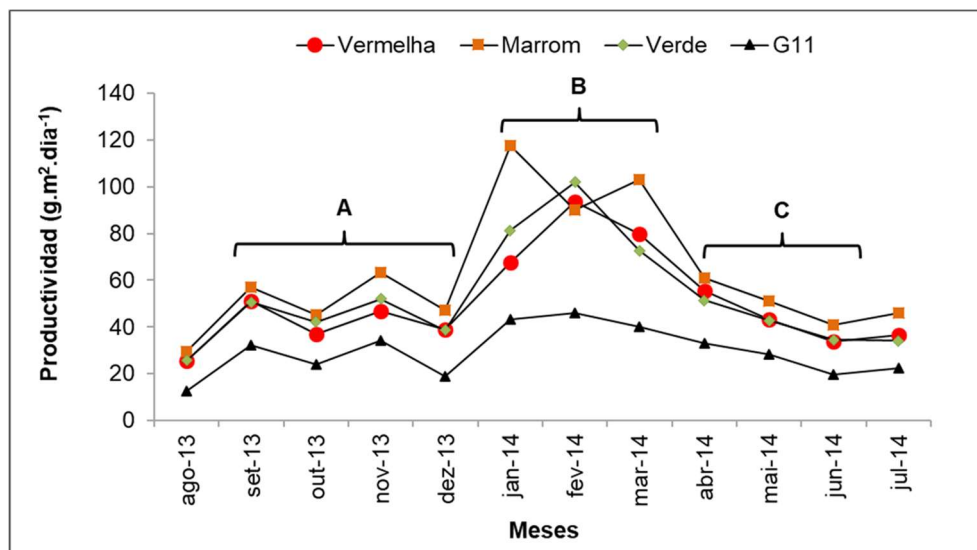


Figura 8. Perfil de produtividade dos cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii* em função dos cultivos mensais. Dados referentes a agosto de 2013 a julho de 2014.

Os níveis A, B e C mostraram produtividades médias de 43,5, 80,3 e 44,2 $\text{g.m}^{-2}\text{dia}^{-1}$ (cepa vermelha), 53,1, 103,5 e 50,8 $\text{g.m}^{-2}\text{dia}^{-1}$ (cepa marrom), 45,8, 85,2 e 42,9 $\text{g.m}^{-2}\text{dia}^{-1}$ (cepa verde) e 27,3, 43,0 e 27,0 $\text{g.m}^{-2}\text{dia}^{-1}$ (cepa G11), respectivamente (Figura 9). É notável uma maior produtividade das diferentes cepas em estudo no nível B quando comparado aos níveis A e C. Todavia, os níveis A e C mostraram produtividades médias similares (Figura 9). Desta forma,

foram obtidas maiores produtividades nos períodos das estações de verão-outono (nível B) (meses de janeiro, fevereiro e março) e produtividades intermediárias nas estações da primavera-verão (nível A) (meses de setembro, outubro, novembro e dezembro) e nas estações de outono- inverno (nível C) (mês de abril, maio e junho) (Figura 9). Apesar das variações encontradas ao longo do ano os valores de produtividade dos cultivos das diferentes cepas de *K. alvarezii* apresentados estão no mesmo patamar de outros cultivos de *K. alvarezii* realizados em Ubatuba-SP (15,16,18,20).

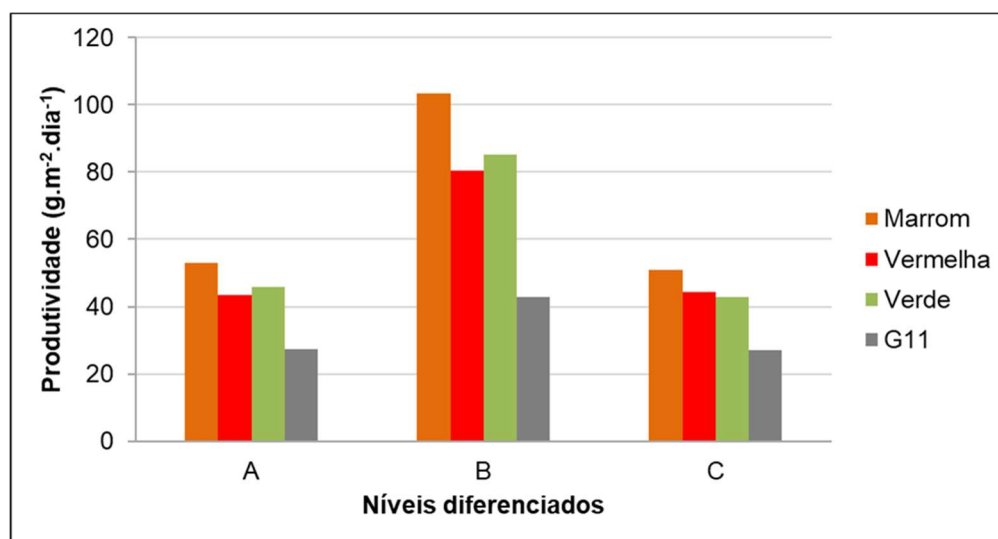


Figura 9. Produtividades médias dos diferentes níveis de cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii*. Nível A: mês de setembro, outubro, novembro e dezembro de 2013; Nível B: meses de janeiro, fevereiro e março de 2014; Nível C: meses de abril, maio e junho de 2014.

Quanto aos valores de velocidade de crescimento, a Figura 9 mostra o perfil desta variável em função dos cultivos mensais. O perfil mostrado na Figura 9 é similar ao apresentado para os valores de produtividade. Entretanto, nota-se que

os três níveis A, B, e C identificados previamente no gráfico de produtividade em função dos cultivos mensais (Figura 8) se apresentam menos pronunciados no gráfico de velocidade de crescimento em função dos cultivos mensais (Figura 10).

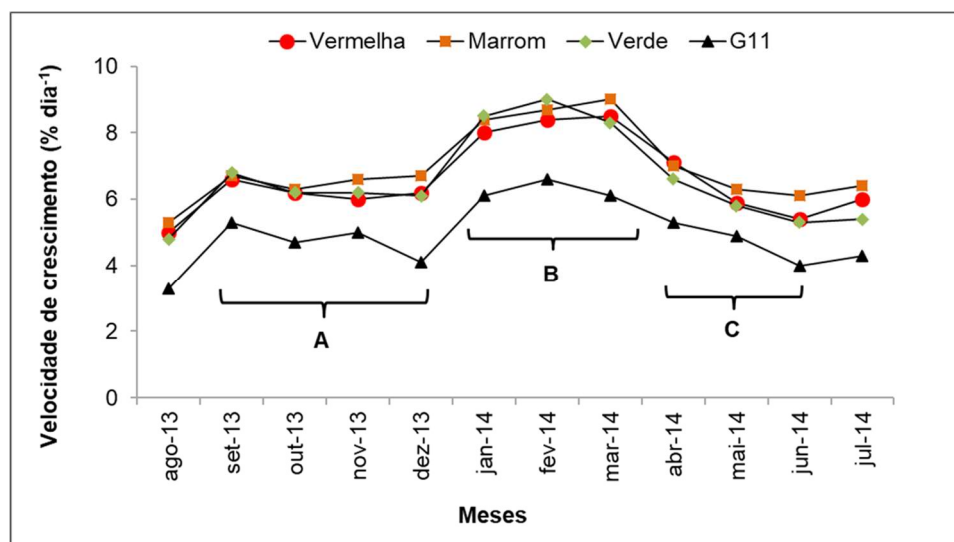


Figura 10. Velocidade de crescimento dos cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii* em função dos cultivos mensais. Dados referentes a agosto de 2013 a junho de 2014.

Os valores de velocidade de crescimento variaram de 6,1-8,3 %dia⁻¹ (cepa vermelha), 6,4-8,7 %dia⁻¹ (cepa marrom), 5,9-8,1 %dia⁻¹ (cepa verde) e 4,7-6,2 %dia⁻¹ (cepa G11) (Figura 9). As cepas vermelha, marrom e verde apresentaram valores similares de velocidade de crescimento. Todavia, as cepas vermelha, marrom e verde mostram valores superiores de velocidade de crescimento quando comparadas à cepa G11 (Figura 9). Os níveis A, B e C mostraram velocidades de crescimento médias de 6,2, 8,3 e 6,1 %dia⁻¹ (cepa vermelha), 6,6, 8,7 e 6,5 %dia⁻¹ (cepa marrom), 6,3, 8,1 e 5,9 %dia⁻¹ (cepa verde) e 4,8, 6,3 e 4,7 %dia⁻¹ (cepa

G11), respectivamente (Figura 8). É notável uma maior velocidade de crescimento das diferentes cepas em estudo do nível B quando comparado aos níveis A e C. Todavia, os níveis A e C mostraram velocidades de crescimento médias similares (Figura 11). Desta forma, foram obtidas maiores velocidades de crescimento nos períodos das estações de verão-outono (nível B) (meses de janeiro, fevereiro e março), velocidades de crescimento intermediárias nas estações da primavera-verão (nível A) (meses de setembro, outubro, novembro e dezembro) e nas estações de outono- inverno (nível C) (mês de abril, maio, junho) (Figura 11). Apesar das variações encontradas ao longo do ano os valores de velocidade de crescimento dos cultivos das diferentes cepas de *K. alvarezii* apresentados estão no mesmo patamar de outros cultivos de *K. alvarezii* realizados em Ubatuba-SP (15,16,18,20).

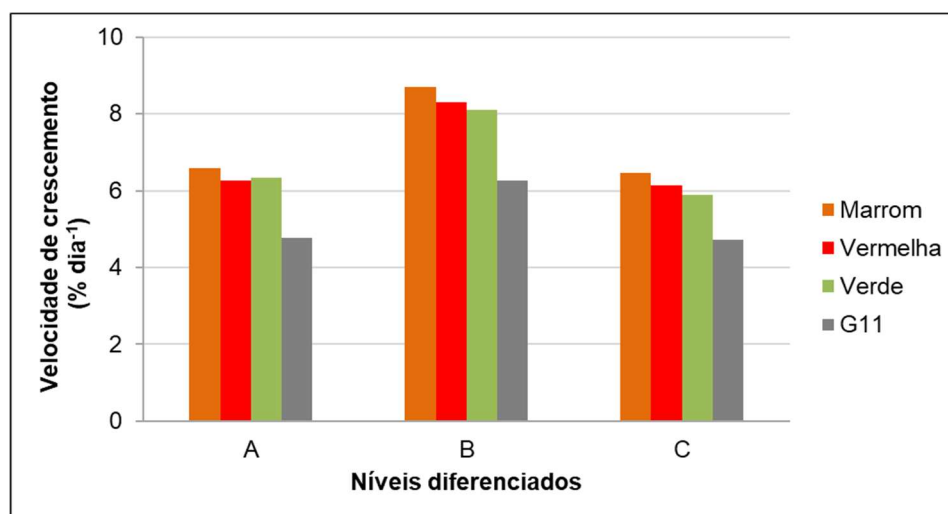


Figura 11. Velocidades de crescimento médias dos diferentes níveis dos cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii*. Nível A: mês de setembro, outubro, novembro e dezembro de 2013; Nível B: meses de janeiro, fevereiro e março de 2014; Nível C: meses de abril, março e junho de 2014.

A figura 12 apresenta a correlação da produtividade em função da temperatura, transparência e salinidade das diferentes cepas em estudo. O aumento da produtividade foi proporcional ao aumento da temperatura para todas as cepas estudadas (Figura 12a). O mesmo ocorreu com a produtividade em função da transparência (Figura 14b). Todavia, a produtividade em função da salinidade não mostrou nenhum tipo de correlação (Figura 12c).

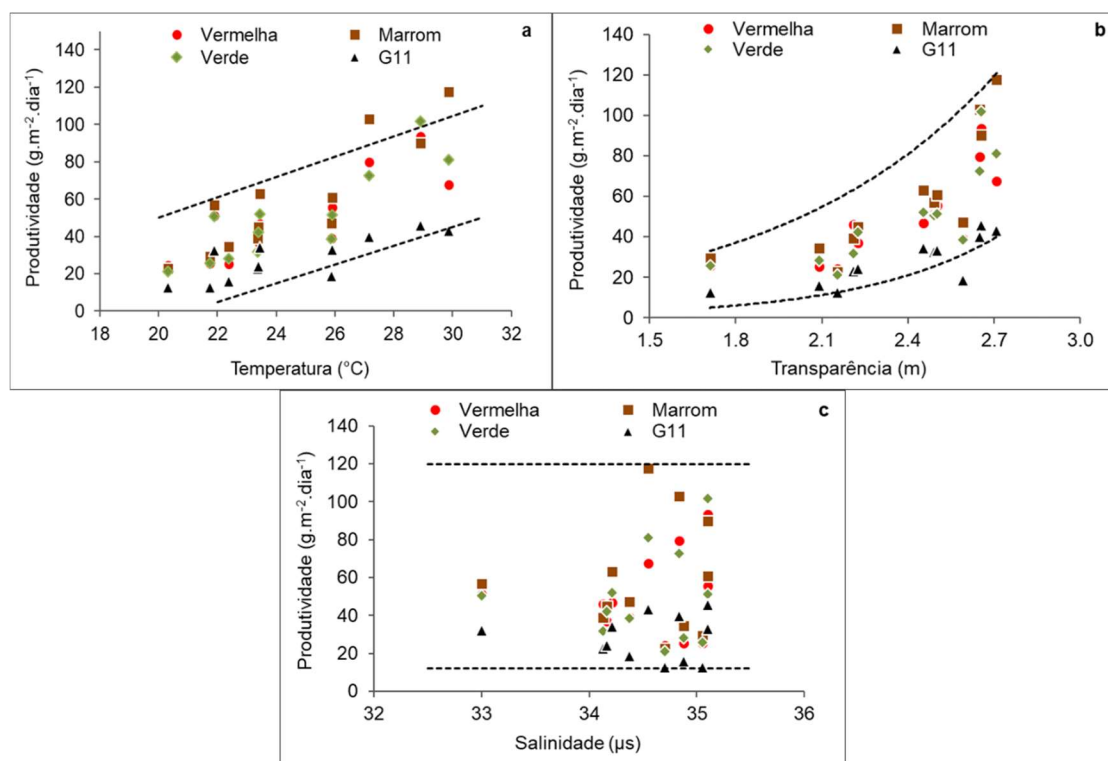


Figura 12. Produtividade em função da temperatura, transparência e salinidade dos cultivos mensais de diferentes cepas de *K. alvarezii*. (a) produtividade versus temperatura, (b) produtividade versus transparência, (c) produtividade versus salinidade. Cultivos de cepas de *K. alvarezii*. Dados dos cultivos referentes ao período de agosto de 2013 a julho de 2014.

Desta forma, os dados de produtividade em função da temperatura apresentaram um ajuste em um modelo matemático do tipo linear, enquanto a

temperatura em função da transparência um ajuste em um modelo matemático do tipo exponencial (Figuras 12a,b e Tabela 3). Entretanto, os dados de produtividade em função da salinidade não mostraram nenhum tipo de correlação matemática (Figura 12c). As equações matemáticas ajustadas para a produtividade em função da temperatura e transparência para cada cepa individual em estudo foram razoáveis, gerando uma R^2 médio da ordem de 0,72 e 0,70, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Modelos matemáticos ajustados para os dados de produtividade ($\text{g.m}^{-2}\text{dia}^{-1}$) e velocidade de crescimento ($\%\text{dia}^{-1}$) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e transparência (m). Cultivos das 4 diferentes cepas de *K. alvarezii*. Dados de cultivos referentes ao período de agosto de 2013 a julho de 2014.

Amostras	Produtividade versus temperatura	Velocidade de crescimento versus temperatura	Produtividade versus transparência	Velocidade de crescimento versus transparência
Marrom	$y = 8,8689x - 158,37$ $R^2 = 0,7891$	$y = 0,3901x - 2,7668$ $R^2 = 0,8184$	$y = 1,7637e^{1,4334x}$ $R^2 = 0,7095$	$y = 3,6556x - 1,8637$ $R^2 = 0,6989$
Verde	$y = 7,0749x - 123,7$ $R^2 = 0,7523$	$y = 0,4368x - 4,2626$ $R^2 = 0,782$	$y = 1,8326e^{1,3486x}$ $R^2 = 0,6915$	$y = 4,1418x - 3,3659$ $R^2 = 0,6838$
Vermelha	$y = 6,0966x - 100,19$ $R^2 = 0,6956$	$y = 0,3815x - 2,8883$ $R^2 = 0,7882$	$y = 2,3075e^{1,2543x}$ $R^2 = 0,6971$	$y = 3,6257x - 2,1261$ $R^2 = 0,6925$
G11	$y = 3,1349x - 48,931$ $R^2 = 0,6398$	$y = 0,2825x - 2,0615$ $R^2 = 0,6466$	$y = 1,1453e^{1,3092x}$ $R^2 = 0,6994$	$y = 2,9935x - 2,2278$ $R^2 = 0,7061$

A figura 13 apresenta a correlação da velocidade de crescimento em função da temperatura, transparência e salinidade das diferentes cepas em estudo. O aumento da velocidade de crescimento foi proporcional ao aumento da temperatura para todas as cepas estudadas (Figura 13a). O mesmo ocorreu com

a velocidade de crescimento em função da transparência (Figura 13b). Todavia, a velocidade de crescimento em função da salinidade não mostrou nenhum tipo de proporcionalidade (Figura 13c).

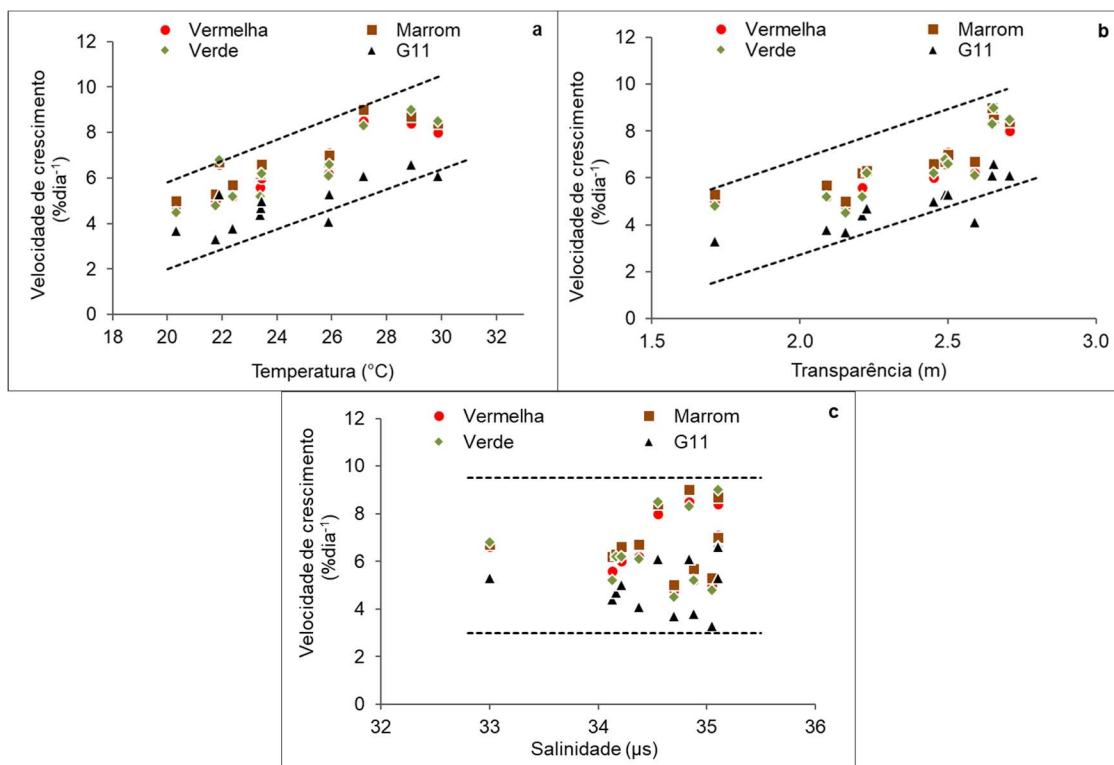


Figura 13. Velocidade de crescimento em função da temperatura, transparência e salinidade dos cultivos mensais de diferentes cepas de *K. alvarezii*. (a) velocidade de crescimento versus temperatura, (b) velocidade de crescimento versus transparência, (c) velocidade de crescimento versus salinidade. Cultivos de 4 cepas de *K. alvarezii*. Dados dos cultivos referentes ao período de agosto de 2013 a julho de 2014.

Desta forma, os dados de velocidade de crescimento em função da temperatura e transparência indicaram um ajuste em um modelo matemático do tipo linear (Figuras 13a,b e Tabela 3). Entretanto, os dados de velocidade de crescimento em função da salinidade não mostraram nenhum tipo de correlação

matemática (Figura 13c). As equações matemáticas ajustadas para a velocidade de crescimento em função da temperatura e transparência para cada cepa individual em estudo foram razoáveis, gerando uma R^2 médio da ordem de 0,76 e 0,70, respectivamente (Tabela 3).

5.2. *Processamento da biomassa de K. alvarezii para produção de carragena semi-refinada visando à obtenção de um resíduo*

A partir dos dados de produtividade e velocidade de crescimento apresentados anteriormente foram selecionadas as cepas marrom, verde e vermelha para as etapas subsequentes do trabalho proposto, ou seja, processamento de carragena semi-refinada e obtenção do resíduo para cada nível em estudo. A cepa G11 não foi selecionada, pois apresentou os menores valores de produtividade e velocidade de crescimento (Figuras 8 e 9). Desta forma, as biomassas de cada cepa obtidas nos respectivos meses: setembro-dezembro de 2013 (nível A), janeiro-março de 2014 (nível B) e abril-junho de 2014 (nível C) foram misturas e homogeneizadas prévio as etapas de processamento de carragena.

A figura 14 a,b apresenta o aspecto visual da biomassa de *K. alvarezii* (cepa verde, nível B) após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume). O pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) proporcionou um branqueamento no material quando comparado a amostra não tratada. Esse comportamento é comum e corrobora com o reportado recentemente na literatura (20).



Figura 14. Exemplo do aspecto visual da biomassa de *K. alvarezii* após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume). (a) Amostra não tratada. (b) Amostra após um o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume). Ambas amostras se referem a cepa verde do nível B.

A figura 15a e a tabela 4 apresentam os rendimentos da biomassa de diferentes cepas de *K. alvarezii* pertencente a cada nível em estudo, após um pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume). Os rendimentos médios das cepas marrom, vermelha e verde referentes ao nível A após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) foram de 73,3%, 84,3% e 79,9% (%massa/massa), respectivamente (Figura 15a e Tabela 4). Os rendimentos médios das cepas referentes ao nível B e C após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) foram de 66,6% e 74,4% (marrom, %massa/massa), 65,2% e 80,8% (vermelha, %massa/massa) e 88,6% e 81,1% (verde, %massa/massa), respectivamente (Figura 15a, Tabela 4). Os valores dos rendimentos obtidos após o pré-tratamento com KOH 6% (massa/volume) das cepas e níveis em estudo foram comparados utilizando-se um teste estatístico (teste de Tukey,

Tabela 4). Os rendimentos após o pré-tratamento com KOH 6% (massa/volume) foram mais acentuados nos níveis A e C, com exceção da cepa marrom do nível C (73,3%, massa/massa). Todavia, as cepas marrom e vermelha mostraram os menores rendimentos no nível B. Os rendimentos da cepa vermelha nível A (84,3%, massa/massa) e da cepa verde nível B (88,6%, massa/massa) não foram comparados com as outras cepas e níveis em estudo, pois os dados não foram realizados em triplicata, porém, os valores apresentados estão no mesmo patamar das amostras que culminaram nos maiores rendimentos (níveis A e C) (Tabela 4).

Tabela 4. Rendimento das frações da biomassa de *K. alvarezii*. Amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) em relação a amostra não tratada. Resíduo em relação a biomassa pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume). Carragena semi-refinada em relação biomassa pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume). Teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material de partida) (dados em base seca).

Amostras	Níveis diferenciados	Rendimento** (%)
Amostra pré-tratada em relação a não tratada		
Marrom	A	73,3 ± 0,3 ^{aeg}
Vermelha		84,3*
Verde		79,9 ± 0,6 ^{befg}
Marrom	B	66,6 ± 5,8 ^{cd}
Vermelha		65,2 ± 4,2 ^d
Verde		88,6*
Marrom	C	75,4 ± 3,9 ^{efg}
Vermelha		80,8 ± 1,9 ^{fg}
Verde		76,9 ± 0,3 ^g
Resíduo em relação a amostra pré-tratada		
Marrom	A	31,4 ± 2,0 ^{abcdefg}
Vermelha		28,8*
Verde		30,4 ± 0,9 ^{bcdefg}
Marrom	B	35,4 ± 3,3 ^{cfg}
Vermelha		26,7 ± 3,6 ^{def}
Verde		26,5*
Marrom	C	31,2 ± 0,1 ^{efg}
Vermelha		33,2 ± 0,7 ^{fg}
Verde		34,9 ± 0,5 ^g
Carragena em relação a amostra pré-tratada		
Marrom	A	69,1 ± 4,2 ^{abd}
Vermelha		63,1*
Verde		63,2 ± 1,6 ^{bdf}
Marrom	B	54,8 ± 5,0 ^{cefg}
Vermelha		62,9 ± 4,2 ^{df}
Verde		64,2*
Marrom	C	53,0 ± 0,4 ^{efg}
Vermelha		59,5 ± 0,5 ^{fg}
Verde		56,1 ± 1,3 ^g

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelos desvios-padrão.

*Valores obtidos apenas com uma amostragem.

**Na coluna, os valores com as mesmas letras não diferem entre si com um nível de significância de 0,05 (teste Tukey, Software GraphPad Instat).

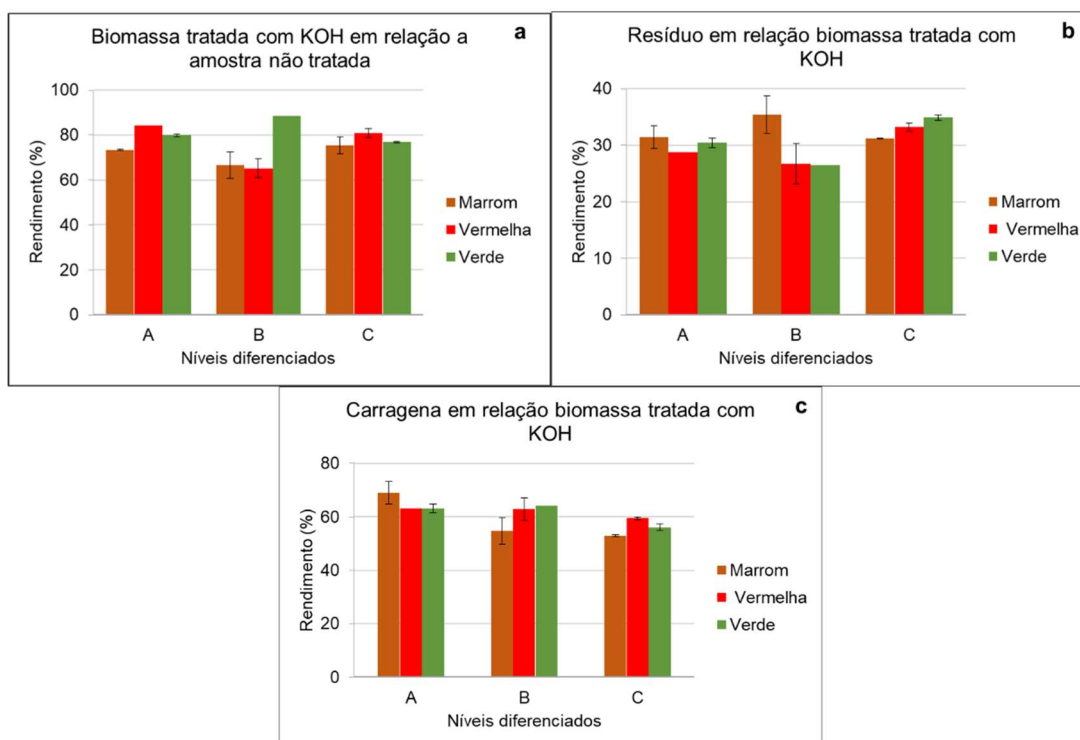


Figura 85. Rendimentos das frações da biomassa de *K. alvarezii*. (a) Amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) em relação a amostra não tratada. (b) Resíduo em relação a biomassa pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume). (c) Carragena em relação biomassa pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume). Teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material de partida) (dados em base seca).

A extração com água à quente utilizando à biomassa previamente pré-tratada com KOH gerou mais duas frações: o resíduo (fração insolúvel) e a carragena semi-refinada (fração líquida) (Figura 16a,b).

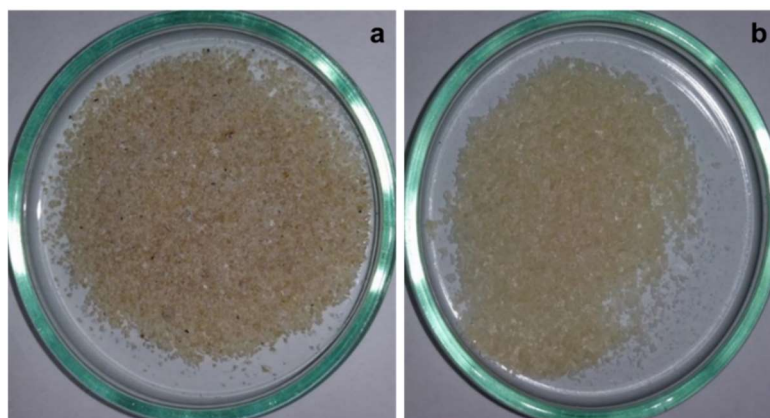


Figura 16. Exemplo do aspecto visual da biomassa de *K. alvarezii* após a extração de carragena e obtenção do resíduo. a) Resíduo. b) Carragena semi-refinada. Ambas amostras se referem a cepa verde do nível B.

Os rendimentos dos resíduos das cepas marrom, vermelha e verde referente ao nível A em relação à amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) foram de 31,4%, 28,8% e 30,4% (%massa/massa), respectivamente (Figura 17b, Tabela 5). Os rendimentos do resíduo referentes ao nível B e C em relação à amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) foram de 35,4% e 29,1% (marrom, %massa/massa), 26,7% e 32,2% (vermelha, %massa/massa) e 26,5% e 35,5% (verde, %massa/massa), respectivamente (Figura 15b, Tabela 4). Considerando o teste estatístico (teste de Tukey, Tabela 5) os rendimentos do resíduo em relação a amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) não mostraram uma diferença significativa entre as cepas e níveis em estudo (Figura 15b, Tabela 4). A exceção foi o rendimento do resíduo da cepa vermelha do nível B, que mostrou um valor significativamente menor (26,7%, massa/massa) quando comparado ao rendimento do resíduo da cepa

verde do nível C (34,9%, massa/massa) (Figura 15b, Tabela 4). Os rendimentos do resíduo em relação a amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) da cepa vermelha nível A (28,8%, massa/massa) e da cepa verde nível B (26,5%, massa/massa) não foram comparados com as outras cepas e níveis em estudo, pois os dados não foram realizados em triplicata, porém, os valores apresentados estão no mesmo patamar das outras amostras em estudo. A exceção foi o rendimento da cepa vermelha do nível B (Figura 15b, Tabela 4).

Os rendimentos da carragena semi-refinada das cepas marrom, vermelha e verde referentes ao nível A em relação à amostra pré-tratada com KOH foram de 69,1%, 63,1% e 63,2% (%massa/massa), respectivamente (Figura 15c, Tabela 4). Os rendimentos da carragena semi-refinada em relação à amostra pré-tratada com KOH referentes ao nível B e C foram de 54,8% e 54,8% (marrom, %massa/massa), 62,9% e 54,6 (vermelha, %massa/massa) e 64,2% e 60,4% (verde, %massa/massa), respectivamente (Figura 15c, Tabela 4). Considerando o teste estatístico (Teste de Tukey, Tabela 5) os rendimentos da carragena semi-refinada em relação a amostra pré-tratada com KOH 6% (%massa/volume) não mostraram uma diferença significativa entre as cepas e níveis em estudo (Figura 15b, Tabela 4). A exceção foram as cepas marrons dos níveis A e B (69,1% e 54,8%, %massa/massa, respectivamente) que mostraram uma diferença significativa entre seus valores de rendimento de carragena semi-refinada (Figura 15b, Tabela 4). Os rendimentos de carragena semi-refinada da cepa vermelha nível A (63,1%, massa/massa) e da cepa verde nível B (64,2%, massa/massa) não foram comparados com as outras cepas e níveis em estudo, pois os dados

não foram realizados em triplicata, porém, os valores apresentados estão no mesmo patamar das outras cepas e níveis em estudo com exceção cepas marrons dos níveis A e B (Figura 15b, Tabela 4).

Os rendimentos do resíduo e da carragena semi-refinada também foram calculados em relação à amostra não tratada (original) (Figura 17ab, Tabela 5). Os rendimentos do resíduo referente ao nível A em relação à amostra não tratada das cepas marrom, vermelha e verde foram de 22,9%, 24,3% e 24,2% (%massa/massa), respectivamente (Figura 17a, Tabela 5). Os rendimentos do resíduo em relação à amostra não tratada referentes ao nível B e C foram de 23,6 e 21,7% (marrom, %massa/massa), 17,4 e 26% (vermelha, %massa/massa) e 23,5% e 28,8% (verde, %massa/massa), respectivamente (Figura 17a, tabela 5). Os rendimentos do resíduo em relação à amostra não tratada não mostraram diferenças significativas para as cepas e níveis em estudo, com exceção da cepa vermelha do nível B (17,4%, %massa/massa) que mostrou um rendimento significativamente menor quando comparado as outras cepas e níveis em estudo (teste de Tukey, Tabela 5). Os rendimentos do resíduo em relação a amostra não tratada da cepa vermelha nível A (24,3%, %massa/massa) e da cepa verde nível B (23,5%, %massa/massa) não foram comparados com as outras cepas e níveis em estudo, pois os dados não foram realizados em triplicata, porém, os valores apresentados estão no mesmo patamar das outras amostras e estudo, com exceção da cepa vermelha do nível B (Figura 17a, Tabela 5).

Tabela 5. Rendimento das frações a biomassa de *K. alvarezii*. (a) Rendimento do resíduo em relação biomassa não tratada. (b) Rendimento carragena em relação a biomassa não tratada. Teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material de partida) (dados em base seca).

Amostras	Níveis diferenciados	Rendimento** (%)
Resíduo em relação biomassa não tratada		
Marrom	A	22,9 ± 2,0 ^{abcefg}
Vermelha		24,3*
Verde		24,2 ± 0,9 ^{bcefg}
Marrom	B	23,6 ± 3,3 ^{cefg}
Vermelha		17,4 ± 3,6 ^d
Verde		23,5*
Marrom	C	23,5 ± 0,1 ^{ef}
Vermelha		26,8 ± 0,7 ^{fg}
Verde		26,8 ± 0,5 ^g
Carragena em relação a biomassa não tratada		
Marrom	A	50,7 ± 4,2 ^{abf}
Vermelha		53,2*
Verde		50,4 ± 1,6 ^{bf}
Marrom	B	36,5 ± 5,0 ^{cdeg}
Vermelha		41,0 ± 4,2 ^{deg}
Verde		56,9*
Marrom	C	40,0 ± 0,4 ^{efg}
Vermelha		48,1 ± 0,5 ^{fg}
Verde		43,1 ± 1,3 ^g

Todos os dados relatados são os valores médios seguidos pelos desvios-padrão.

*Valores obtidos apenas com uma amostragem.

**Na coluna, os valores com as mesmas letras não diferem entre si com um nível de significância de 0,05 (teste Tukey, Software GraphPad InStat).

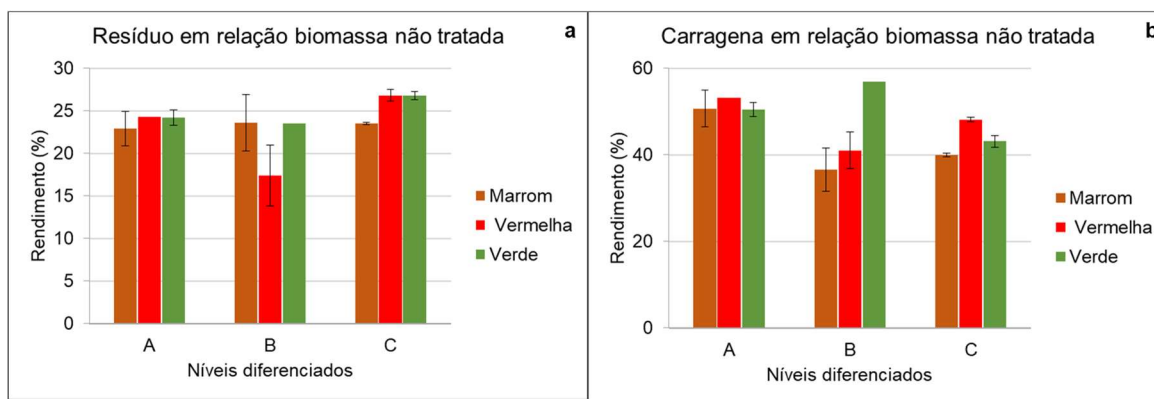


Figura 17. Rendimentos das frações a biomassa de *K. alvarezii*. (a) Rendimento do resíduo em relação biomassa não tratada. (b) Rendimento carragena em relação a biomassa não tratada. Teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material de partida) (dados em base seca).

Os rendimentos da carragena semi-refinada referentes ao nível A em relação à amostra não tratada das cepas marrom, vermelha e verde foram de 50,7 53,2 e 50,4% (%massa/massa), respectivamente (Figura 17b, Tabela 5). Os rendimentos da carragena semi-refinada em relação à amostra não tratada referentes aos níveis B e C foram de 36,5 e 40,8% (marrom, %massa/massa), 41,0 e 48,9% (vermelha, %massa/massa) e 56,9 e 44,3% (verde, %massa/massa), respectivamente (Figura 17b, Tabela 5). Os rendimentos da carragena semi-refinada em relação a amostra não tratada não mostraram diferenças significativas para todas cepas e níveis em estudo, com exceção das cepas marrons dos níveis B e C e da cepa vermelha do nível B (36,5%,40% e 41%, massa/massa, respetivamente) que mostraram rendimentos significativamente menores quando comparado as outras cepas e níveis em estudo (Figura 17b, Tabela 5). Os rendimentos da carragena semi-refinada em relação a amostra não tratada da cepa vermelha nível A (53,2%, massa/massa)

e da cepa verde nível B (56,9%, massa/massa) não foram comparados com as outras cepas e níveis em estudo, pois os dados não foram realizados em triplicata, porém, os valores apresentados estão no mesmo patamar das outras amostras e estudo, com exceção das cepas marrons dos níveis B e C e da cepa vermelha do nível B (Figura 17b, Tabela 5).

Desta forma, os resíduos e as carragenas semi-refinadas que apresentaram os menores rendimentos referem-se as cepas marrom e vermelha cultivadas durante os meses de janeiro-março (Nível B) (Figuras 8, 9, 10 e 11). Esses cultivos mostraram as maiores produtividades e velocidades de crescimento quando comparado aos cultivos dos níveis A e C (Figuras 8, 9, 10 e 11). Apesar das variações encontradas ao longo do ano os rendimentos de carragenas semi-refinadas em relação as amostras não tratadas dos cultivos de diferentes cepas e níveis apresentados foram relativamente maiores aos reportados na literatura (rendimentos entre 30-40%) (16,18).

5.3. Avaliação da composição química das amostras em estudo

Para a avaliação da composição química das frações obtidas no presente estudo foi utilizada a metodologia de hidrólise ácida para materiais lignocelulósicos com modificações (9,15,20,50). Após as etapas de hidrólise ácida foram analisados os teores de açúcares monoméricos presentes nos hidrolisados previamente obtidos. Além disso, também foram analisados os teores de hidroximetilfurfural (HMF), ácido fórmico e ácido levulínico nos

mesmos, pois esses compostos são derivados da oxidação de açúcares em meio ácido (51).

A tabela 6 apresenta os teores dos derivados de açúcares em meio ácido das diferentes cepas e níveis em estudo. As amostras não tratadas, pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume), os resíduos, as carragenas semi-refinada e comercial, das três cepas em estudo referentes aos níveis diferenciados A, B e C mostraram uma variação nos teores dos componentes de 1,1-2,3%, 1,1-3,8%, 1,1-2,9%, 2,0-4,6% (%massa/massa) (HMF), 2,5-4,1%, 1,8-3,5%, 1,0-2,2%, 2,3-3,2% (%massa/massa) (ácido fórmico) e 1,8-5,4%, 0,6-6,0%, 1,0-1,2%, 1,4-4,4% (%massa/massa) (ácido levulínico), respectivamente (Tabela 6). Os teores de HMF produzidos após a hidrólise ácida das amostras não tratadas, pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) e resíduos do processamento de carragena, das diferentes cepas e níveis em estudo, corroboraram com os dados reportados na literatura para biomassa lignocelulósica submetida ao mesmo tratamento (52). Entretanto, os dados indicaram que as carragenas semi-refinadas e comercial foram mais suscetíveis a oxidação em meio ácido, mostrando maiores teores de HMF quando comparado as amostras não tratadas, pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) e os resíduos. A fração de carragena semi-refinada e comercial são macromoléculas que contêm maiores conteúdos de galactana e consequentemente maior teor de anidrogactose, que é uma molécula menos estável em meio ácido (51). Todavia, os teores de ácidos fórmico e levulínico variaram de forma aleatória em função das diferentes cepas e níveis não mostrando uma diferença clara entre as cepas e frações em estudo (Tabela 6).

Esse comportamento foi diferente do reportado para materiais lignocelulósicos (47), o que confirma a presença de anidrogalactose nas amostras em estudo.

Tabela 6. Teores de hidroximetilfurfural (HMF), ácido fórmico e ácido levulínico nas amostras não tratadas, pré-tratadas com KOH 6% (massa/volume), resíduos e carragenas semi-refinada e comercial das diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Teores apresentados em % mássica (gramas/100 gramas de material bruto, dados em base seca).

Amostras	Níveis diferenciados	HMF (%)	Ácido Fórmico (%)	Ácido Levulínico (%)
Não Tratada				
Marrom	A	2,3 ± 0,7	3,4 ± 0,1	4,3 ± 0,6
Verde		1,6 ± 0,4	3,5 ± 0,03	4,2 ± 0,6
Vermelha		1,6 ± 0,4	3,3 ± 0,1	4,2 ± 0,6
Marrom	B	1,7 ± 0,5	4,0 ± 0,4	5,0 ± 0,2
Verde		1,6 ± 1,0	4,1 ± 0,3	5,4 ± 1,0
Vermelha		1,9 ± 0,4	3,8 ± 0,1	4,3 ± 0,6
Marrom	C	1,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Verde		1,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,5*
Vermelha		1,1 ± 0,1	3,2 ± 0,4	2,4 ± 0,4
Tratada com KOH				
Marrom	A	1,8 ± 0,1	3,5*	6,0*
Verde		1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,5	4,6 ± 0,7
Vermelha		2,1 ± 0,2	3,2 ± 0,2	5,1 ± 0,5
Marrom	B	3,4 ± 0,1	2,4 ± 0,6	4,1 ± 1,1
Verde		3,8 ± 0,8	3,2 ± 0,6	5,5 ± 1,1
Vermelha		2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,3	3,7 ± 1,1
Marrom	C	1,8 ± 0,8	2,9 ± 0,1	1,7 ± 1,1
Verde		1,1 ± 0,3	1,8 ± 0,2	0,8 ± 0,5
Vermelha		1,7 ± 0,7	2,1 ± 0,2	0,6 ± 0,3
Resíduo				
Marrom	A	1,1 ± 0,2	1,9 ± 0,3	1,1 ± 0,1
Verde		1,1 ± 0,1	2,2	1,0 ± 0,7
Vermelha		1,2 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Marrom	B	2,9 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1
Verde		1,4*	1,2*	1,0*
Vermelha		2,3 ± 0,6	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1
Marrom	C	1,9 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,2
Verde		1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,6
Vermelha		1,3 ± 0,7	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,4
Carragena semi-refinada				
Marrom	A	4,8 ± 1,1	2,3 ± 0,3	3,8 ± 0,3
Verde		3,1 ± 0,7	2,9 ± 1,0	2,6 ± 0,8
Vermelha		4,6 ± 0,3	2,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2
Marrom	B	1,7 ± 0,2	2,9 ± 0,6	4,4 ± 0,8
Verde		2,2 ± 0,3	2,5 ± 1,3	1,4 ± 0,8
Vermelha		2,0 ± 1,0	2,5 ± 0,7	1,7 ± 0,4
Marrom	C	2,8 ± 0,8	2,6 ± 0,2	2,1 ± 0,8
Verde		2,5 ± 0,1	3,2 ± 0,8	2,4 ± 1,2
Vermelha		3,1 ± 0,5	3,0 ± 1,0	1,6 ± 0,02
Carragena comercial		3,4 ± 0,1	3,9 ± 0,4	6,6 ± 1,3

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral.

*Valores obtidos apenas com uma amostragem.

As tabelas 7, 8 e 9 apresentam a composição química das diferentes cepas e níveis das amostras de *K. alvarezii* em estudo (não tratada, tratada com KOH, resíduo, carragena semi-refinada e comercial). Além disso, as Tabelas 7, 8 e 9 também mostram a composição química em relação ao material de partida após aplicar um balanço de massa. Para a elaboração das Tabelas 7, 8 e 9 foram escolhidos os principais componentes encontrados na biomassa em estudo, como se segue: galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfato (15,20). Os aromáticos solúveis não foram quantificados, pois o espectro ultravioleta de moléculas de aminoácidos oriundas da hidrólise de proteínas das frações em estudo e a formação de HMF em meio ácido se sobrepõem com as moléculas dos aromáticos solúveis, não sendo possível quantificar os mesmos de forma seletiva (52).

A tabela 7 apresenta a composição química das diferentes cepas e níveis em estudo das amostras de *K. alvarezii* não tratadas (amostras originais) e após um pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume). Os teores brutos de galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis, grupos sulfato, lipídeos e a soma dos componentes nas amostras não tratadas foram ranqueados de acordo com as diferentes cepas e níveis em estudo, como se segue: 32,1-45,5% (galactanas), 12,7-16,6% (glucanas), 14,4-17,1% (cinzas), 1,8-5,6% (proteínas), 2,5-4% (aromáticos insolúveis), 10,7-13,8% (grupos sulfato), 1,5-8,6% (lipídeos) e 83,2-100,1% (soma dos componentes) (%massa/massa) (Tabela 7). As diferentes cepas de *K. alvarezii* referentes ao nível C apresentaram os menores teores de galactanas (média de 34,4%,

%massa/massa), enquanto que as diferentes cepas referentes aos níveis A e B culminaram em maiores teores de galactanas (em média 42,6%, %massa/massa) (Tabela 7). Todavia, as diferentes cepas de *K. alvarezii* referentes ao nível A apresentaram os maiores teores de lipídeos (média de 8,3%, %massa/massa), enquanto que as diferentes cepas referentes aos níveis B e C culminaram em menores teores de lipídeos (em média 3,4%, %massa/massa) (Tabela 7). Além disso, as diferentes cepas de *K. alvarezii* referentes ao nível C apresentaram os menores teores de proteínas (média de 2,1%, %massa/massa), enquanto que as diferentes cepas referentes aos níveis B e C culminaram em maiores teores de proteínas (em média 4,4%, %massa/massa) (Tabela 7). Os teores dos outros componentes (glucanas, cinzas, aromáticos insolúveis e grupos sulfatos) não mostraram diferenças acentuadas entre as cepas e níveis em estudo, considerando-se os desvios padrões, apresentando em média teores de 13,8%, 14%, 3,2% e 5% (%massa/massa), respectivamente (Tabela 7). A literatura reportou um conteúdo médio de 66,5% (%massa/massa) de carboidratos totais em diferentes cepas de *K. alvarezii* oriundas da Indonésia (13), enquanto o conteúdo de carboidratos totais médio das amostras de diferentes cepas e níveis do presente estudo foi de 53,2% (%massa/massa), ou seja, 20% inferior aos dados reportados na literatura. Além disso, os autores também reportaram um teor médio de lipídeos para as mesmas cepas de 0,7% (%massa/massa), enquanto o teor lipídeos médio das amostras de diferentes cepas e níveis do presente estudo foi de 5% (%massa/massa), ou seja, 86% superior. Entretanto, cabe salientar que os teores

de lipídeos sofreram uma grande variação em seus conteúdos em função da variação dos cultivos mensais do presente estudo (Tabela 7).

Estudos recentes realizados com as cepas vermelha e marrom de *K. alvarezii* cultivadas em Ubatuba-SP (mesma região dos cultivos do presente trabalho) no mês de maio e junho de 2013 mostraram teores médios de galactana, glucana, cinzas, aromáticos insolúveis e grupos sulfatos similares aos relatados no presente estudo. A exceção foi o teor de lipídeos, que foi reportada com uma média de 0,6% (%massa/massa), enquanto que no presente trabalho foi constatado um teor médio de 5,2% e 4,5% (%massa/massa) de lipídeos para as cepas marrom e vermelha cultivadas nos meses de abril, maio e junho, respectivamente (Tabela 7) (15,20).

Tabela 7. Composição química e rendimento das frações não tratadas e após um pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Rendimentos e teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material original, dados em base seca).

Amostras	Níveis diferenciados	Componentes da biomassa (g/100g de material bruto)								
		Rendimento (%)	Galactana (%)	Glucana (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromáticos insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	Lipídios (%)	
Não tratada										
Marrom	A		41,3 ± 1,9	13,8 ± 1,0	15,2 ± 0,1	5,6 ± 0,5	3,5 ± 0,4	12,1 ± 0,8	8,6 ± 0,9	
Verde			41,2 ± 1,7	12,9 ± 0,5	14,8 ± 0,1	3,8 ± 0,2	3,1 ± 0,3	11,0 ± 0,6	8,4 ± 0,2	
Vermelha			40,0 ± 0,8	12,7 ± 0,7	14,4 ± 0,03	4,4 ± 1,0	2,8 ± 0,9	10,7 ± 0,5	8,0 ± 1,2	
Marrom	B	-	45,5 ± 3,9	16,6 ± 2,2	15,0 ± 0,7	4,9 ± 0,4	3,4 ± 0,6	14,0 ± 0,3	1,5 ± 0,3	
Verde				44,8 ± 0,9	14,5 ± 1,6	15,1 ± 0,1	3,7 ± 0,3	3,4 ± 1,0	13,4 ± 1,0	2,3 ± 0,2
Vermelha				42,6 ± 3,3	13,5 ± 1,6	14,3 ± 0,1	3,8 ± 0,3	4,0 ± 1,0	13,8 ± 0,6	1,5 ± 0,1
Marrom	C		35,0 ± 2,0	13,5 ± 0,4	17,1 ± 0,02	2,2 ± 0,9	2,5 ± 0,3	12,4 ± 0,4	5,2 ± 0,5	
Verde				32,1 ± 4,7	13,0 ± 1,6	15,4 ± 0,01	1,8 ± 0,7	3,9 ± 0,2	11,7 ± 0,8	5,3 ± 0,2
Vermelha				36,1 ± 2,4	12,7 ± 0,8	15,1 ± 0,4	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,6	12,2 ± 0,3	4,5 ± 0,2
Componentes da biomassa (g/100g de material original, balanço de massa)										
Amostras		Rendimento (%)	Galactana (%)	Glucana (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromáticos insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	Lipídios (%)	
Tratada com KOH										
Marrom	A	73,3 ± 0,1	23,7 ± 1,2	9,2 ± 1,1	14,2 ± 0,3	2,7 ± 0,4	1,8 ± 0,3	11,8 ± 1,1		
Verde		79,9 ± 0,3	26,7 ± 5,3	8,2 ± 1,4	13,5 ± 0,2	2,7 ± 0,4	1,5 ± 0,5	14,7 ± 1,6		
Vermelha		84,3*	31,9 ± 1,2	9,4 ± 0,3	14,2 ± 0,03	1,9 ± 0,1	2,9 ± 0,3	14,2 ± 2,2		
Marrom	B	66,6 ± 2,8	22,1 ± 0,4	8,9 ± 0,02	11,9 ± 0,3	2,0 ± 0,1	2,5 ± 0,5	11,5 ± 1,1		
Verde		88,6*	30,9 ± 3,0	14,0 ± 0,6	15,2 ± 0,5	4,6 ± 0,4	1,6 ± 0,1	15,9 ± 0,3	nd	
Vermelha		65,2 ± 2,0	20,9 ± 1,0	7,3 ± 0,4	10,8 ± 0,1	2,8 ± 0,01	1,7 ± 0,2	9,8 ± 0,1		
Marrom	C	75,4 ± 3,9	26,7 ± 1,3	12,1 ± 0,4	13,3 ± 0,1	3,1 ± 0,3	4,1 ± 0,1	9,1 ± 0,9		
Verde		76,9 ± 1,9	16,5 ± 0,6	7,0 ± 0,8	13,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3,8 ± 0,1	8,5 ± 0,5		
Vermelha		80,9 ± 0,2	20,5 ± 1,8	7,7 ± 0,9	14,2 ± 0,2	1,7 ± 0,4	2,5 ± 0,2	9,0 ± 1,1		

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral. *Valores obtidos apenas com uma amostragem. nd = não detectada.

O balanço de massa é necessário para compararmos o material pré-tratado com KOH 6% (%massa/volume) diretamente com o material não tratado (original). Os componentes que culminaram em maiores reduções foram: galactanas, glucanas, proteínas e lipídeos (Tabela 7). Os teores de lipídeos não foram detectados após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) (Tabela 7). As reduções nos teores de galactanas, glucanas e proteínas das amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) das diferentes cepas e níveis em estudo foram ranqueadas, como se segue: 20,3-51,4%, 22,3-59,2% e 3,4-45,9% (%massa/massa), respectivamente. Os teores de glucanas das diferentes cepas e níveis em estudo culminaram em uma redução média de 22,5% (%massa/volume). Todavia, a literatura reporta uma redução da fração de glucanas após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume), cepas vermelha e marrom de *K. alvarezii*, da ordem de 5,5% (%massa/massa), sendo que os autores consideram essa redução com um erro experimental, atribuindo que não houve uma redução significativa da fração de glucanas após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) (15,20). Essa diferença pode ser atribuída ao processo de lavagem do material após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume), pois o processo de lavagem pode influenciar na dissolução da fração de glucanas em biomassa de *K. alvarezii* (15,20). Os rendimentos nas etapas de pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) das amostras das diferentes cepas e níveis em estudo culminaram em um valor médio de 78,4% (%massa/massa, figura 15a e Tabela 4). Entretanto, a literatura reporta rendimentos após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume),

cepas vermelha e marrom de *K. alvarezii*, da ordem de 89,4% (%massa/massa) (15,20). Desta forma, o processo de lavagem com água após o pré-tratamento com KOH 6% (%massa/volume) das diferentes cepas e níveis em estudo sugere uma maior dissolução do material e consequentemente maior dissolução da fração de glucanas, culminando em uma maior redução da mesma.

A tabela 8 apresenta a composição química das diferentes cepas e níveis em estudo das amostras de *K. alvarezii* previamente pré-tratadas com KOH 6% (massa/volume) em relação a fração insolúvel obtida após a etapa de extração de carragena semi-refinada (resíduo). Os teores brutos de galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis, grupos sulfato e a soma dos componentes nas amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) foram ranqueados de acordo com as diferentes cepas e níveis em estudo, como se segue: 21,4-37,8% (galactanas), 9,1-16,1% (glucanas), 15,1-19,4% (cinzas), 1,8-5,2% (proteínas), 1,8-3,9% (aromáticos insolúveis), 11,1-18,4% (grupos sulfato) e 62,7-92,9% (soma dos componentes) (%massa/massa) (Tabela 8). As diferentes cepas de *K. alvarezii* referentes ao nível C apresentaram os menores teores de galactanas e glucanas (média de 27,4% e 8,2%, %massa/massa), respetivamente, enquanto que as diferentes cepas referentes aos níveis A e B culminaram em maiores teores de galactanas e glucanas (em média 33,9% e 12,4%, %massa/massa), respetivamente (Tabela 8). Todavia, as diferentes cepas de *K. alvarezii* referentes ao nível C apresentaram os menores teores de proteínas (média de 2,1%, %massa/massa), enquanto que as diferentes cepas referentes aos níveis B e C culminaram em maiores teores de proteínas (em

média 3,9%, %massa/massa) (Tabela 8). Além disso, as diferentes cepas de *K. alvarezii* referentes ao nível C apresentaram os menores teores de grupos sulfato (média de 11,4%, massa/massa), enquanto que as diferentes cepas referentes aos níveis B e C culminaram em maiores teores de grupos sulfato (em média 16,9%, massa/massa) (Tabela 8). Os teores de cinzas e aromáticos insolúveis não mostraram diferenças acentuadas entre as cepas e níveis em estudo, considerando-se os desvios padrões, apresentando em média teores de 16,9% e 2,9% (%massa/massa), respectivamente (Tabela 8). A literatura reporta que amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume), cepas vermelha e marrom de *K. alvarezii*, apresentam teores médios de galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfato da ordem de 34%, 13,8%, 21,6%, 0,4%, 2,7% e 10,5% (%massa/massa), respectivamente (15,20), corroborando com os dados das diferentes cepas e níveis em estudo.

As amostras dos resíduos mostraram uma composição química diferenciada frente as amostras não tratadas e pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume). Os teores brutos médios de galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos solúveis e grupos sulfatos dos resíduos das diferentes cepas e níveis em estudo foram de 15,4-26,4% (galactana), 29,6-36,7% (glucana), 11,5-13,7% (cinzas), 1,7-3,8% (proteínas), 1,6-4,3% (aromáticos solúveis), 5,5-8,2% (grupos sulfatos) e 72-83,5% (soma dos componentes) (%massa/massa). Esses dados confirmam o enriquecimento da fração de glucana nas amostras dos resíduos, corroborando com a maior solubilidade das galactanas em água frente as glucanas (13,20). A literatura reporta um

comportamento similar com biomassa de *K. alvarezii*, cepas vermelha e marrom, porém, apresenta um enriquecimento mais acentuado da fração de glucanas nos resíduos obtidos (15,20).

Tabela 8. Composição química e rendimento das frações pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) e dos resíduos oriundos após extração de carragena de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Rendimentos e teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material original, dados em base seca).

Amostras	Níveis diferenciados	Componentes da biomassa (g/100g de material bruto)							
		Rendimento (%)	Galactana (%)	Glucana (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromáticos insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	
Tratada com KOH									
Marrom	A		32,3 ± 1,2	12,6 ± 1,1	19,4 ± 0,3	3,7 ± 0,4	2,4 ± 2,3	16,1 ± 1,1	
Verde			33,4 ± 5,3	10,3 ± 1,4	16,9 ± 0,2	5,2 ± 0,4	1,9 ± 0,5	18,4 ± 1,6	
Vermelha			37,8 ± 1,2	11,1 ± 0,3	16,8 ± 0,03	2,3 ± 0,1	3,4 ± 0,3	16,9 ± 2,2	
Marrom	B	-	33,2 ± 0,4	13,3 ± 0,02	17,9 ± 0,3	3,0 ± 0,1	3,8 ± 0,5	17,2 ± 1,1	
Verde				34,9 ± 3,0	15,8 ± 0,6	17,2 ± 0,5	5,2 ± 2,1	1,8 ± 0,1	18,0 ± 0,3
Vermelha				32,1 ± 1,0	11,2 ± 0,4	16,6 ± 0,1	4,3 ± 0,01	3,6 ± 0,2	15,0 ± 0,1
Marrom	C			35,4 ± 1,3	16,1 ± 0,4	17,1 ± 0,02	2,2 ± 0,9	2,5 ± 0,3	12,1 ± 0,9
Verde				21,4 ± 0,6	9,1 ± 0,8	15,4 ± 0,01	1,8 ± 0,7	3,9 ± 0,2	11,1 ± 0,5
Vermelha				25,4 ± 1,8	9,5 ± 0,9	15,1 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,6	11,1 ± 1,1
Componentes da biomassa (g/100g de material original, balanço de massa)									
Amostras		Rendimento (%)	Galactana (%)	Glucana (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromáticos insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	
Resíduo									
Marrom	A	31,4 ± 2,0	8,3 ± 4,3	10,0 ± 1,8	4,2 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,2	2,1 ± 0,8	
Verde			30,4 ± 0,8	6,5 ± 1,8	10,1 ± 2,3	4,1 ± 0,7	0,5 ± 0,3	1,1 ± 0,4	2,5 ± 0,5
Vermelha			28,8	7,0 ± 1,4	8,9 ± 0,7	3,9 ± 0,5	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,8	2,2 ± 0,6
Marrom	B	35,4 ± 3,3	6,4 ± 0,6	11,1 ± 2,8	4,2 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	2,3 ± 0,8	
Verde			26,5 ± 0,0	4,3	8,9	na	0,9	0,5	na
Vermelha			26,7 ± 3,5	5,7 ± 0,9	10,5 ± 0,9	3,1 ± 0,6	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1
Marrom	C	31,2 ± 0,1	6,8 ± 1,1	9,5 ± 0,4	4,0 ± 1,2	0,9 ± 0,1	1,1 ± 1,7	2,3 ± 0,7	
Verde			34,9 ± 0,4	5,4 ± 0,4	10,5 ± 1,6	4,3 ± 0,4	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,3	2,0 ± 0,6
Vermelha			33,1 ± 0,7	6,7 ± 0,5	10,7 ± 0,9	3,8 ± 0,2	0,7 ± 0,4	1,4 ± 0,7	1,8 ± 0,7

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral. na = não analisado

O balanço de massa é necessário para compararmos os resíduos diretamente com as amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume). As reduções nas frações de galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfato dos resíduos das diferentes cepas e níveis em estudo foram ranqueadas, como se segue: 73,6-87,7%, 1,9-43,6%, 72,4-81,3%, 59,1-90,4%, 41,7-88,9% e 81-90% (%massa/massa), respectivamente. As frações de galactanas nas amostras dos resíduos das diferentes cepas e níveis em estudo culminaram em reduções altas, quando comparado as amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume), atingindo um valor médio de 79,6% (%massa/massa). A redução da fração de galactana nos resíduos obtidos é comum no processamento de carragena, pois a fração de galactana tem um alto grau de solubilidade em água a temperaturas superiores a 60°C (13,20). A literatura reporta o mesmo comportamento das frações de galactanas em resíduos obtidos no processamento de carragena, cepas vermelha e marrom de *K. alvarezii* (redução da ordem de 94%, %massa/massa) (15,20). Os teores de cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfatos das diferentes cepas e níveis em estudo também foram reduzidos nos resíduos obtidos quando comparados com as amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume), atingindo um valor médio de 68%, 73,5%, 64,6% e 76% (%massa/massa), respectivamente. A literatura apresenta comportamento similar na redução de cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfatos em resíduos de biomassa de *K. alvarezii* (cepas vermelha e marrom) oriundos de amostras previamente pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) quando comparado

aos dados das diferentes cepas e níveis em estudo (15,20). As glucanas das diferentes cepas e níveis em estudo mostraram uma dissolução média de 22,5% (%massa/volume) após a obtenção dos resíduos oriundos da extração das amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume). Porém, a literatura reporta uma dissolução da fração de glucanas no processamento de carragena, em amostras de *K. alvarezii* (cepas vermelha e marrom) pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume), da ordem de 2,6% (%massa/volume), sendo que os autores consideram esse valor um erro experimental, atribuindo que não houve uma redução significativa da fração de glucana na extração de carragena das amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) (15,20). Os dados indicam que pode haver variação nos processos de obtenção de carragena (pré-tratamentos com KOH e extração em água) o que pode levar a formação de resíduos com conteúdo diferenciados (principalmente os teores de glucanas e galactanas). Outra possibilidade seria variação na solubilidade da matéria-prima (diferentes solubilidades das frações de galactanas e glucanas das diferentes cepas e níveis em estudo). Desta forma, há indícios de que a matéria-prima (diferentes cultivos e cepas de *K. alvarezii*) e os processos de produção de carragena (pré-tratamento com KOH e extração com água) possam influenciar na composição química dos resíduos e carragenas semi-refinadas.

A tabela 9 apresenta a composição química das diferentes cepas e níveis em estudo das amostras de *K. alvarezii* previamente pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume) em relação a fração solúvel obtida após a etapa de extração de carragena (carragenas semi-refinadas). Os teores brutos médios de

galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos solúveis e grupos sulfatos das carragenas semi-refinadas das diferentes cepas e níveis em estudo foram de 22,3-39,0% (galactanas), 4,1-8,3% (glucanas), 11,5-25,3% (cinzas), 2,3-5,5% (proteína), 1,0-2,7% (aromáticos solúveis), 10,5-21,9% (grupos sulfatos) e 72,6-92,4% (soma dos componentes) (%massa/massa). Esses dados confirmam o enriquecimento das frações de galactanas, cinzas e grupos sulfatos nas amostras das carragenas semi-refinadas, corroborando com a maior solubilidade das galactanas em água quando comparado às glucanas (13,20). A literatura reporta um comportamento similar com biomassa de *K. alvarezii*, cepas vermelha e marrom, porém, apresenta um enriquecimento mais acentuado da fração de galactanas nas carragenas semi-refinadas obtidas (15,20). Os teores brutos das carragenas semi-refinadas das diferentes cepas e níveis em estudo foram similares ao reportado para uma carragena comercial. Porém, a carragena comercial mostrou um maior teor de cinzas (34,8%, %massa/massa) e menores teores de glucanas e grupos sulfatos (0,4% e 12,8%, %massa/massa, respectivamente) quando comparado às carragenas semi-refinadas das diferentes cepas e níveis em estudo (15,20).

Tabela 9. Composição química e rendimento das frações das pré-tratadas com KOH (%massa/volume) e das carragenas semi-refinadas oriundas do processo de extração de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Rendimentos e teores apresentados em % mássica (grama/100 gramas de material original, dados em base seca).

Amostras	Níveis diferenciados	Componentes da biomassa (g/100g de material bruto)							
		Rendimento (%)	Galactana (%)	Glucana (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromáticos insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	
Tratada com KOH									
Marrom	A		32,3 ± 1,2	12,6 ± 1,1	19,4 ± 0,3	3,7 ± 0,4	2,4 ± 2,3	16,1 ± 1,1	
Verde			33,4 ± 5,3	10,3 ± 1,4	16,9 ± 0,2	5,2 ± 0,4	1,9 ± 0,5	18,4 ± 1,6	
Vermelha			37,8 ± 1,2	11,1 ± 0,3	16,8 ± 0,03	2,3 ± 0,1	3,4 ± 0,3	16,9 ± 2,2	
Marrom	B	-	33,2 ± 0,4	13,3 ± 0,02	17,9 ± 0,3	3,0 ± 0,1	3,8 ± 0,5	17,2 ± 1,1	
Verde				34,9 ± 3,0	15,8 ± 0,6	17,2 ± 0,5	5,2 ± 2,1	1,8 ± 0,1	18,0 ± 0,3
Vermelha				32,1 ± 1,0	11,2 ± 0,4	16,6 ± 0,1	4,3 ± 0,01	3,6 ± 0,2	15,0 ± 0,1
Marrom	C		35,4 ± 1,3	16,1 ± 0,4	17,1 ± 0,02	2,2 ± 0,9	2,5 ± 0,3	12,1 ± 0,9	
Verde				21,4 ± 0,6	9,1 ± 0,8	15,4 ± 0,01	1,8 ± 0,7	3,9 ± 0,2	11,1 ± 0,5
Vermelha				25,4 ± 1,8	9,5 ± 0,9	15,1 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,6	11,1 ± 1,1
Componentes da biomassa (g/100g de material original, balanço de massa)									
Amostras		Rendimento (%)	Galactana (%)	Glucana (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Aromáticos insolúveis (%)	Grupos sulfato (%)	
Carragena semi-refinada									
Marrom	A	69,1 ± 4,2	19,3 ± 0,6	5,4 ± 1,5	15,9 ± 0,2	1,7 ± 0,6	1,1 ± 0,5	12,1 ± 0,6	
Verde			63,2 ± 1,5	24,3 ± 2,6	4,4 ± 0,5	15,3 ± 0,04	1,5 ± 0,5	0,9 ± 0,5	12,1 ± 1,1
Vermelha			63,1	21,1 ± 1,0	5,2 ± 1,2	8,6 ± 0,5	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,8	13,8 ± 1,4
Marrom	B	54,8 ± 5,0	16,1 ± 2,5	2,2 ± 1,0	6,5 ± 0,2	1,9 ± 0,5	0,6 ± 0,4	12,0 ± 1,2	
Verde			64,2	15,9 ± 2,8	3,6 ± 0,6	13,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,8 ± 0,9	12,5 ± 0,9
Vermelha			62,9 ± 4,2	15,8 ± 1,8	2,6 ± 1,3	7,2 ± 0,6	na	1,4 ± 0,4	12,0 ± 2,0
Marrom	C	53,2 ± 0,3	11,9 ± 2,6	3,5 ± 0,6	12,2 ± 0,4	2,4 ± 0,4	1,3 ± 0,6	5,6 ± 1,1	
Verde			56,1 ± 1,3	17,2 ± 1,9	3,3 ± 0,1	14,2 ± 0,3	2,5 ± 1,0	1,4 ± 0,5	7,5 ± 0,7
Vermelha			59,5 ± 0,5	23,2 ± 0,7	3,7 ± 0,7	13,6 ± 0,8	3,3 ± 0,6	0,6 ± 1,0	6,8 ± 0,5

Todos os dados apresentados são os valores médios seguidos pelo desvio padrão amostral. na = não analisado

O balanço de massa é necessário para compararmos as carragenas semi-refinadas diretamente com as amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume). As reduções nos teores de galactanas, glucanas, cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfato das carragenas semi-refinadas das diferentes cepas e níveis em estudo foram ranqueadas, como se segue: 9,4-66,4%, 53,2-83,5%, 7,8-63,7%, 9,1-71,1%, 48-84,2% e 18,3-53,7% (%massa/massa), respectivamente. As glucanas nas amostras das carragenas semi-refinadas das diferentes cepas e níveis em estudo culminaram em reduções altas quando comparado as amostras pré-tratadas com KOH 6% (%massa/volume), atingindo um valor médio de 67,5% (%massa/massa). Esse efeito é comum, pois como descrito anteriormente, a maior parte da fração de glucanas não foi solúvel no processo de extração de carragena, permanecendo na fração insolúvel (resíduo). A literatura reporta um efeito similar na extração de carragena de biomassa de *K. alvarezii* (cepas vermelha e marrom), porém, menos acentuado neste caso, indicando que praticamente toda fração de glucana permaneceu na fração dos resíduos (não havendo dissolução da fração de glucana no processo de extração de carragena) (15,20). As frações de galactanas, cinzas e grupos sulfatos nas amostras das carragenas semi-refinadas das diferentes cepas e níveis em estudo não mostraram uma redução acentuada, pois uma menor quantidade de galactanas, cinzas e grupos sulfatos permanece nos resíduos insolúveis (a maior parte é dissolvida no processo de obtenção de carragena). O mesmo comportamento foi notado na extração de carragena de biomassa de *K. alvarezii* (cepas vermelha e marrom) corroborando com os dados das diferentes cepas e níveis em estudo. Todavia, neste caso foi notada uma maior solubilidade da fração de galactanas o que levou a um maior

teor de galactanas das carragenas obtidas quando comparado às carragenas semi-refinadas das diferentes cepas e níveis em estudo (15,20).

Os dados da composição das carragenas semi-refinadas confirmam os indícios de que a matéria-prima (diferentes cultivos e cepas de *K. alvarezii*) e os processos de produção de carragena (pré-tratamento com KOH e extração com água) influenciam na composição química dos resíduos e carragenas semi-refinadas.

5.4. *Avaliação da hidrólise enzimática da fração de glucana dos resíduos obtidos*

A figura 18a,b,c apresenta o comportamento cinético da hidrólise enzimática em função da conversão de glucana em glicose, das frações dos resíduos obtidos após a extração de carragena das diferentes cepas e níveis em estudo. A figura 18a,b,c mostra que após 72h de hidrólise enzimática todos os resíduos em estudo apresentaram em uma conversão média de glucana em glicose próxima a 100% (%massa/massa), considerando os desvios padrões. A exceção foi a conversão de glucana em glicose do resíduo da cepa verde referente ao nível C, que atingiu uma conversão máxima de 85,4% (%massa/massa), após 72h de hidrólise enzimática (Figura 20c). A literatura reporta um comportamento similar da hidrólise enzimática de resíduos oriundos do processamento de carragena de biomassa de *K. alvarezii*, cepas vermelha e marrom, ou seja, uma conversão de glucana em glicose de aproximadamente 100% após 72h de hidrólise enzimática com extrato comercial Cellic CTec II (carga de 10FPU/g de substrato) (15,20).

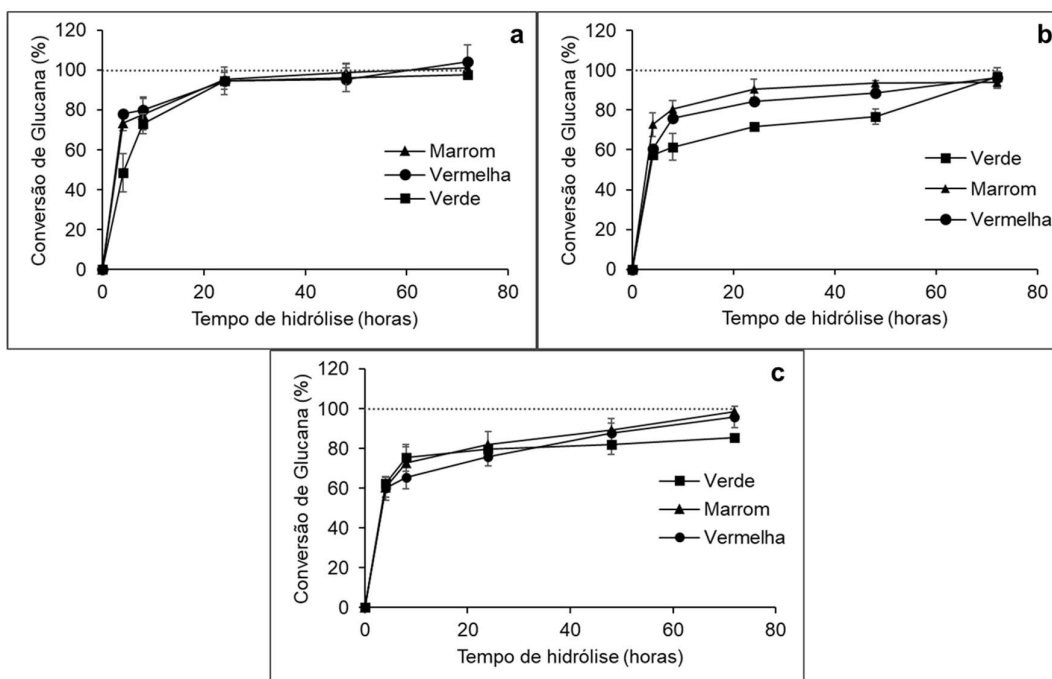


Figura 18. Hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Hidrólise utilizando-se extrato enzimático comercial Cellic CTec II. (a) Conversão de glucana em glicose referente ao nível A. (b) Conversão de glucana em glicose referente ao nível B. (c) Conversão de glucana em glicose referente ao nível C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral.

A figura 19a,b,c apresenta o comportamento cinético da hidrólise enzimática em função da concentração de glicose das frações dos resíduos obtidos após a extração de carragena das diferentes cepas e níveis em estudo. Ao final de 72h de hidrólise enzimática os resíduos em estudo mostraram uma concentração de glicose que variou de 6,3-8,5 g.L⁻¹, considerando os desvios padrões (Figura 21a,b,c). A literatura reporta uma concentração diferente de glicose na hidrólise enzimática de resíduos oriundos do processamento de carragena de biomassa de *K. alvarezii*, cepas vermelha e marrom, ou seja, uma concentração de glicose de 13,7 g.L⁻¹ após 72h de hidrólise enzimática com

extrato comercial Cellic CTec II (carga de 10FPU/g de substrato) (15,20). Essa diferença pode ser explicada devido ao teor de glucanas presente nos resíduos do processamento de carragena. Os teores de glucana nos resíduos das diferentes cepas e níveis em estudo variaram de 29,6-36,7% (%massa/massa), porém o teor de glucanas dos resíduos reportados na literatura variaram de 50,2-54,6% (%massa/massa) (15,20). Desta forma, os menores teores de glucanas das diferentes cepas e níveis em estudo culminaram em uma menor concentração de glicose após a hidrólise enzimática, pois ambas conversões dos resíduos obtidos no presente trabalho e os reportados na literatura foram de aproximadamente 100%.

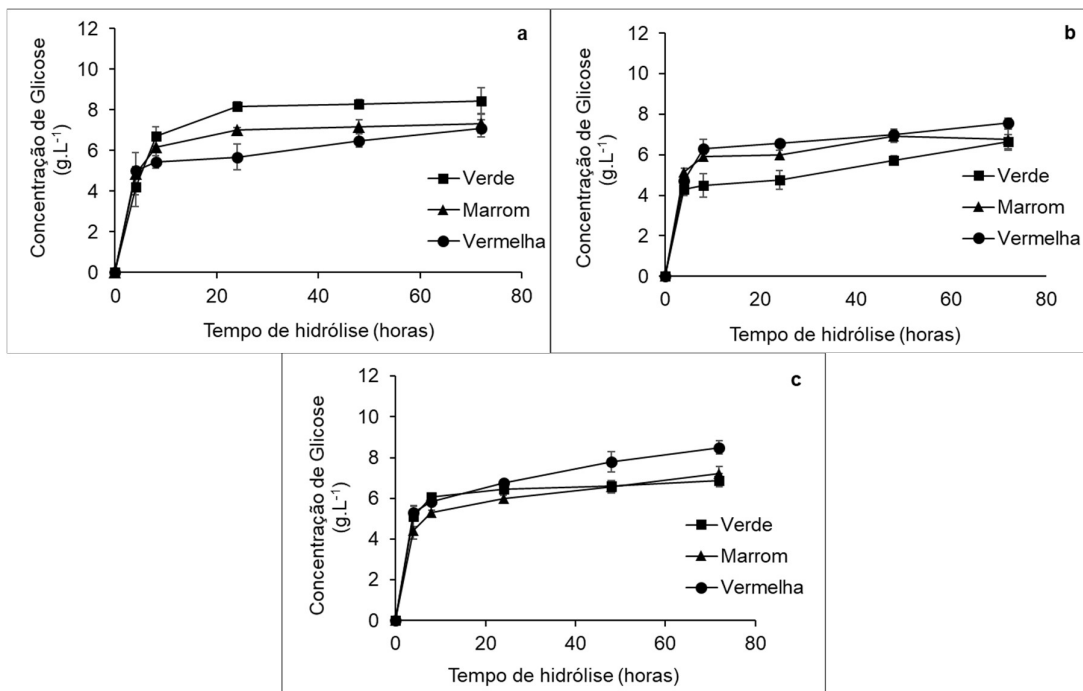


Figura 19. Hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena de diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*. Hidrólise enzimática utilizando-se extrato enzimático comercial Cellic CTec II. (a) Concentração de glicose referente ao nível A. (b) Concentração de glicose referente ao nível B. (c) Concentração de glicose referente ao nível C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral.

5.5. Avaliação da modelagem cinética da hidrólise enzimática

A modelagem matemática tem por objetivo na presente dissertação, compreender melhor o comportamento cinético da hidrólise de polissacarídeos (polímeros) visando desenvolver processos enzimáticos de hidrólise que possam atingir altos rendimentos em glicose e outros açúcares (monômeros) (51).

Reações de hidrólise de polissacarídeos são muito complexas, sendo afetadas por uma série de fatores de diferentes naturezas, a iniciar pelo fato de que o substrato está em uma fase sólida e o biocatalisador (enzima) em uma fase líquida, constituindo um sistema catalítico heterogêneo (53). Em face disso,

os modelos propostos na literatura para estes sistemas reacionais, partem de uma abordagem pseudo-homogênea, descrevendo o processo de hidrólise como uma sequência de reações irreversíveis de 1ª ordem, representada genericamente por (53):



É frequente a segunda reação da série ser significativa em processos de hidrólise ácida. Entretanto, em processos de hidrólise enzimática, dada a especificidade de ação do catalisador, não se observa a ocorrência de tal reação em extensão apreciável, o que permite considerar $r_2=0$ nestes casos.

Na presente dissertação, a cinética de hidrólise de glucana (polissacarídeo) utilizando o extrato enzimático Cellic CTec II foi acompanhada e modelada matematicamente medindo-se a concentração de glicose (monômero) formada durante a reação. Para a modelagem matemática da cinética da reação, partiu-se da equação 13 com a consideração de que $r_2=0$. Deste modo, a Equação 14 assume a seguinte forma:



Efetuando-se um balanço de massa de glicose no meio reacional, chega-se à seguinte equação para a taxa de variação temporal da concentração de glicose (g):

$$\frac{dg}{dt} = r_1 \quad [Equação\ 15]$$

Na equação 15, a velocidade de produção de glicose r_1 ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) é comumente postulada como sendo de primeira ordem ($r_1=kg$). A integração da Equação 15 com esta expressão para r_1 , resultaria num crescimento exponencial para a concentração de glicose, o que não condiz com o comportamento dos dados experimentais verificado em todos os ensaios. Desta forma, uma pequena modificação na expressão de r_1 foi introduzida visando descrever o comportamento observado experimentalmente de que a concentração de glicose tende a um valor máximo assintótico (g_{max}) para tempos longos de reação. Assim, a seguinte equação modificada foi proposta para r_1 , modificação esta que encontra respaldo no trabalho de Zinnai *et al* (54):

$$r_1 = k(g_{max} - g) \quad [\text{Equação 16}]$$

Nota-se que o caráter de primeira ordem da equação 16 fica preservado mesmo com a introdução da modificação proposta. Substituindo-se a equação 16 na equação 15 e integrando a equação resultante, obtém-se, após manipulações algébricas, a seguinte equação que descreve o perfil temporal de concentração de glicose de acordo com o modelo proposto: (48)

$$g = g_{max} \left(1 - e^{-kt}\right) \quad [\text{Equação 17}]$$

Devido aos parâmetros g_{max} e k serem oriundos de uma abordagem pseudo-homogênea, eles incorporam diversos aspectos intervenientes na cinética de hidrólise e, por esse motivo, foram estimados para cada ensaio realizado, visando incorporar as variações decorrentes das diferentes condições reacionais utilizadas. Os parâmetros foram estimados por regressão não linear,

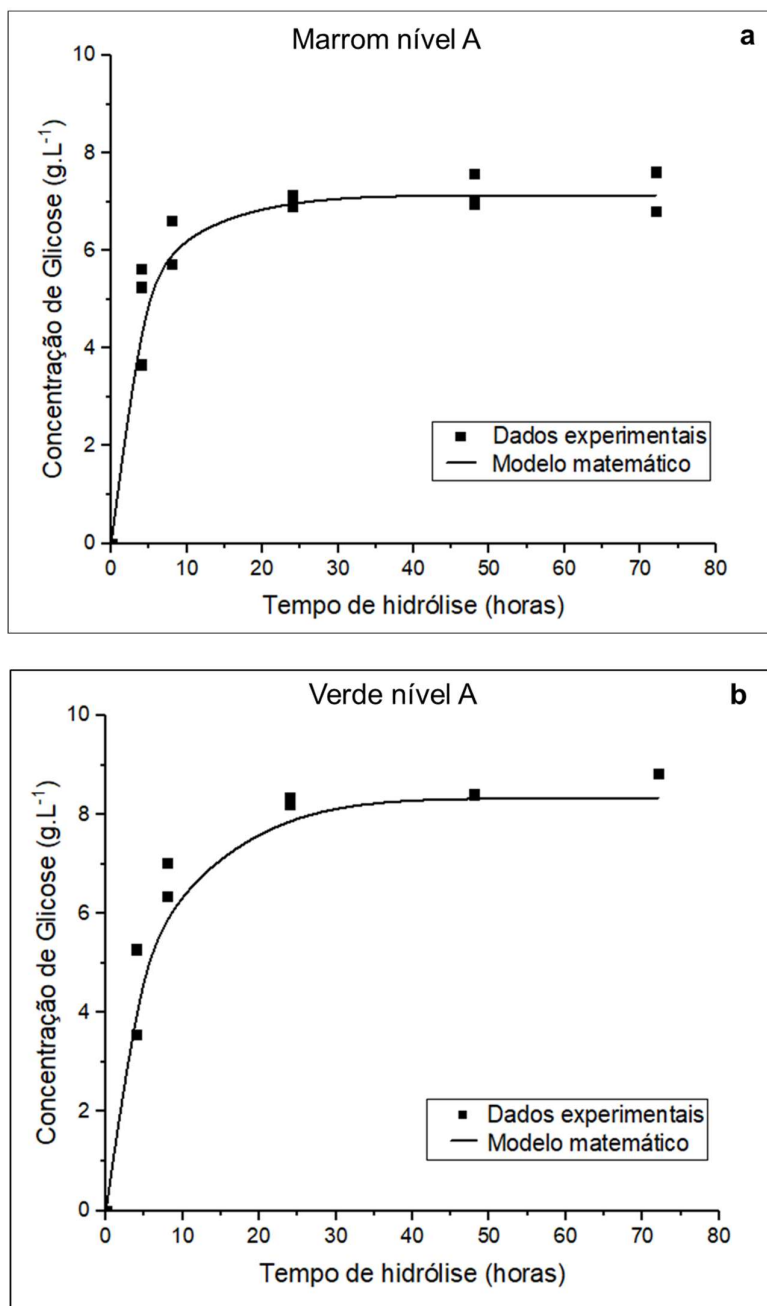
minimizando-se a soma dos quadrados dos resíduos entre os valores experimentais e os calculados pelo modelo, de acordo com o algoritmo de Marquardt. (49). Uma informação importante que pode ser extraída a partir do modelo matemático e que pode ser utilizada para comparação da capacidade catalítica dos diferentes resíduos oriundos das amostras em estudo é a velocidade máxima de reação (r_{lmax}). Analisando-se a equação 16, observa-se que r_1 é máximo quando g é mínimo, o que ocorre no instante inicial ($t=0$) quando $g=0$. Assim, a velocidade máxima de reação (r_{lmax}) é dada por:

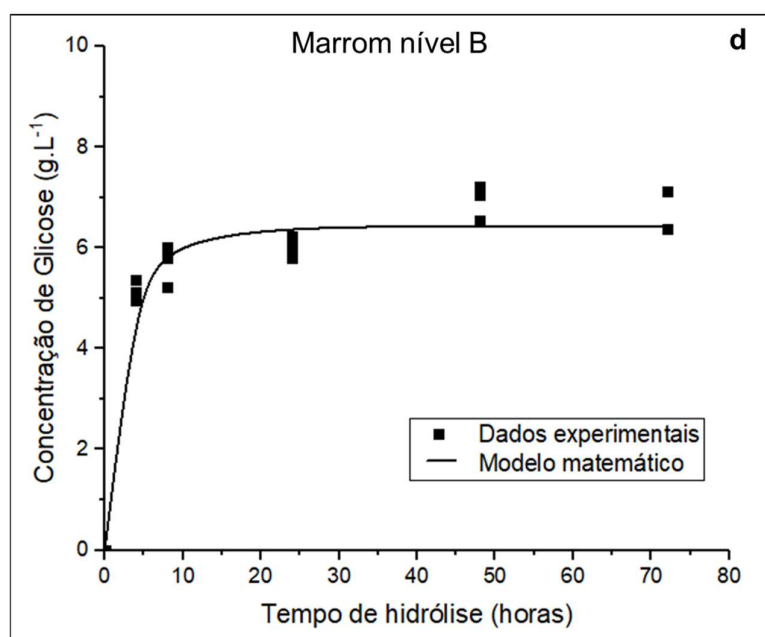
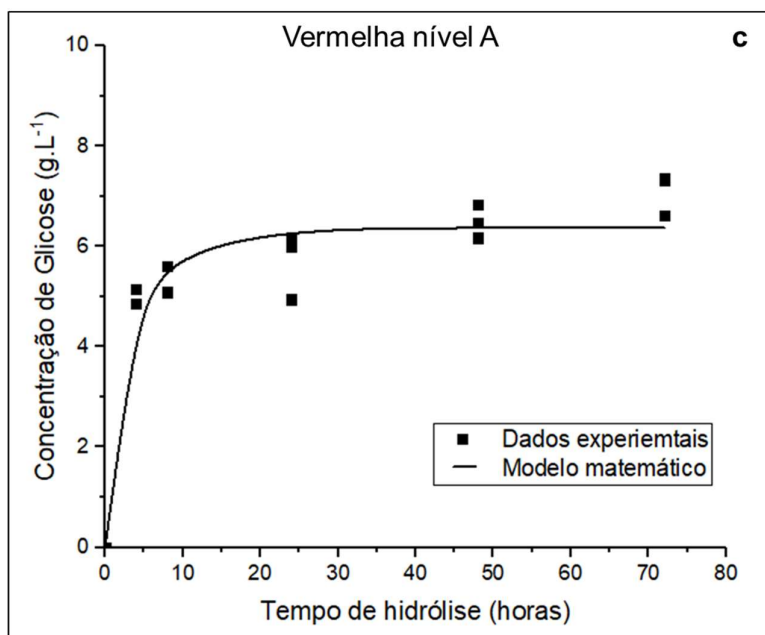
$$r_{lmax} = kg_{max} \quad \text{[Equação 18]}$$

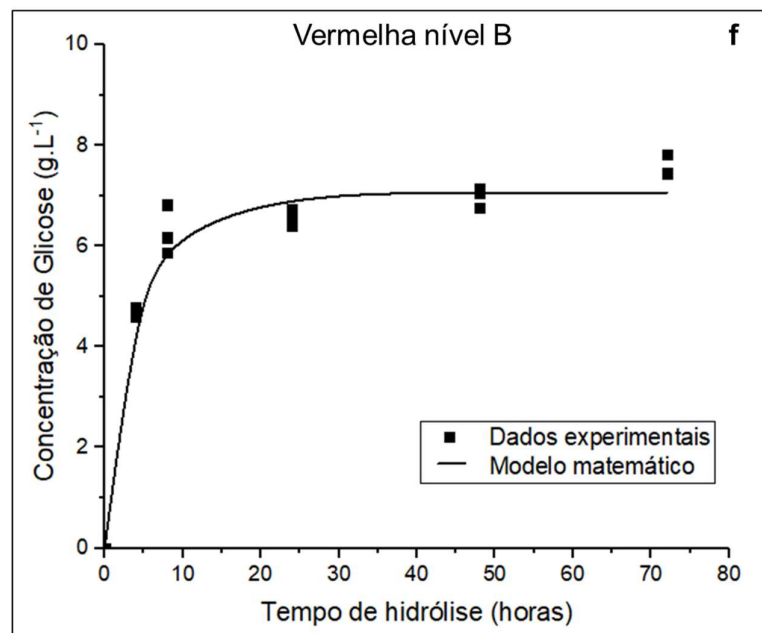
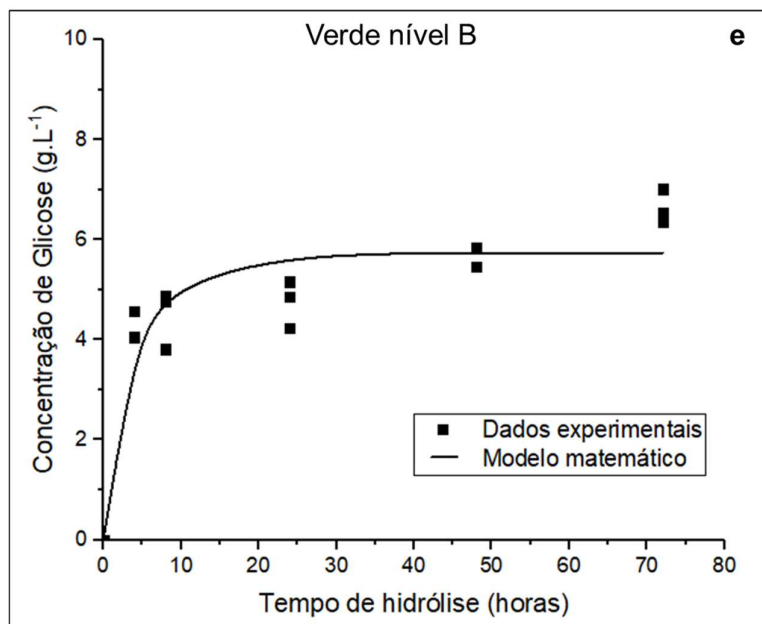
A cinética de hidrólise de glucana (polissacarídeo) utilizando-se o complexo enzimático comercial Cellic CTec II, foi acompanhada e modelada matematicamente medindo-se a concentração de glicose (monômero) formada durante a reação. O presente modelo matemático foi validado para esta condição utilizada, apresentando indicadores estatísticos (coeficiente de determinação R^2 , Fc e valor-p) bastante favoráveis à sua validação (48). A equação 19, descreve o perfil temporal de concentração de glicose de acordo com o modelo proposto Equação 17. (48)

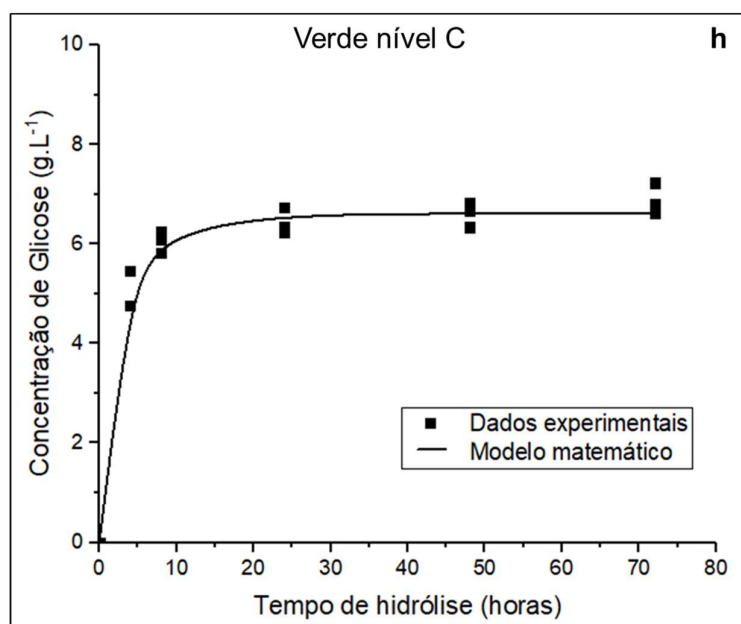
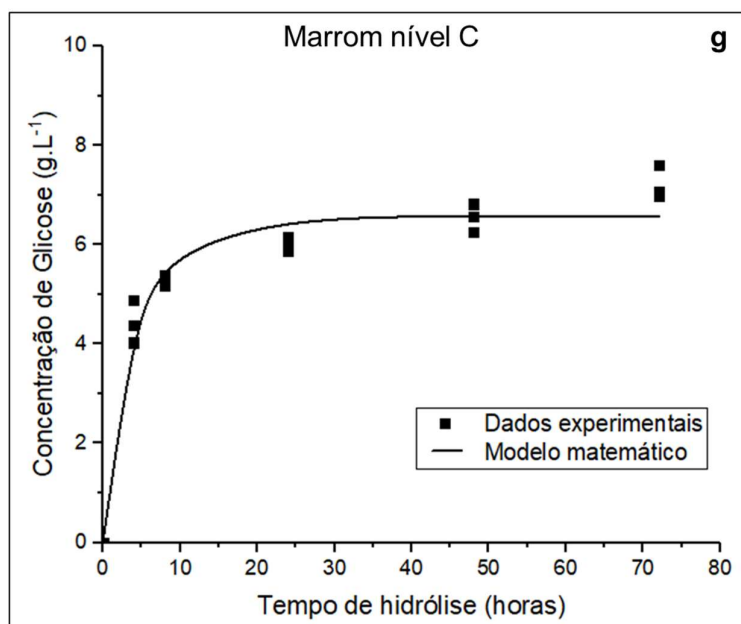
A figura 20 apresenta os ajustes do modelo cinético, da hidrólise enzimática da fração de glucana dos resíduos obtidos, em função dos dados experimentais das diferentes cepas e níveis em estudo. A figura 20 mostra que o modelo matemático proposto descreve bem a tendência do comportamento dos dados experimentais da hidrólise enzimática para todas as cepas e níveis em estudo. Esse comportamento está de acordo com dados reportados recentemente, para os quais o presente modelo matemático foi validado para descrever a hidrólise

enzimática da fração de glucana do resíduo do processamento de carragena de uma mistura de diferentes cepas de *K. alvarezii* (marrom, verde, vermelha e G11) (48).









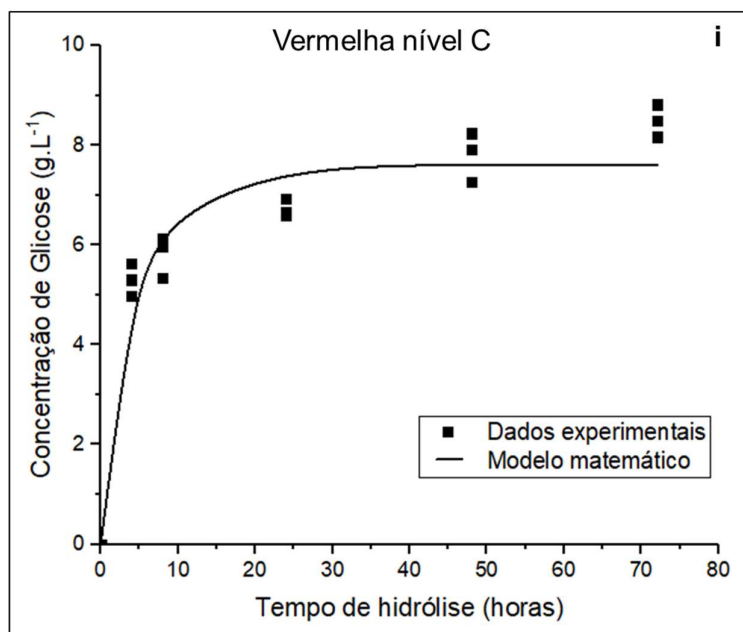


Figura 20. Ajuste do modelo proposto a cinética de hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena das diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii* em estudo. (a) Ajuste do modelo da cepa marrom do nível A. (b) Ajuste do modelo da cepa verde do nível A. (c) Ajuste do modelo da cepa vermelha do nível A. (d) Ajuste do modelo da cepa marrom do nível B, (e) Ajuste do modelo da cepa verde do nível B. (f) Ajuste do modelo da cepa vermelha do nível B. (g) Ajuste do modelo da cepa marrom do nível C. (h) Ajuste do modelo da cepa verde do nível C. (i) Ajuste do modelo da cepa vermelha do nível C.

A tabela 10 apresenta os dados estimados dos parâmetros cinéticos (g_{max} , k e R^2) após o ajuste no modelo matemático (Equação 13) dos dados experimentais da cinética enzimática de formação de glicose, a partir do polissacarídeo glucana. Os valores de g_{max} , k e R^2 das diferentes cepas e níveis em estudo variaram de 5,7-8,5 g.L⁻¹, 0,2-0,4 h⁻¹ e 0,8936-0,9895, respectivamente (Tabela 10). Os valores de g_{max} e k foram utilizados para calcular a velocidade máxima de formação de glicose. Assim, os valores de velocidade máxima de formação de glicose das diferentes cepas e níveis em

estudo variaram de 1,6-2,4 g.L⁻¹h⁻¹ (Tabela 10). Dados similares foram reportados recentemente na literatura, onde a velocidade máxima de formação de glicose de um resíduo oriundo do processamento de carragena de uma mistura de 4 cepas de *K. alvarezii* (marrom, verde, vermelha e G11) foi de aproximadamente 1,7 g.L⁻¹h⁻¹, utilizando-se o mesmo extrato enzimático do presente estudo (Cellic Ctec II) (48) (Tabela 10). O parâmetro de velocidade máxima de formação de glicose foi utilizado para comparar o efeito da hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena das diferentes cepas e níveis em estudo. Desta forma, após aplicar um teste estatístico (teste de Tukey, Tabela 10) nos dados de velocidade máxima de formação de glicose, foi constatado que não houve uma diferença significativa entre as cepas e níveis em estudo em relação a velocidade máxima de formação de glicose (Tabela 10). Desta forma, todos os resíduos oriundos do processamento de carragena das diferentes cepas e níveis em estudo foram hidrolisados da mesma forma, ou seja, atingindo um mesmo patamar de velocidade máxima de formação de glicose.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática dos resíduos oriundos do processamento de carragena das diferentes cepas e níveis de *K. alvarezii*.

Amostras	Níveis diferenciados	g_{max} (g.L ⁻¹)	k (h ⁻¹)	R^2	*Velocidade máxima de formação de glicose (g.L ⁻¹ h ⁻¹)
Marrom	A	7,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,9758	2,3 ± 0,1 ^{abcde fghi}
Verde		8,5 ± 0,1	0,2 ± 0,03	0,9824	1,6 ± 0,2 ^{bcde fghi}
Vermelha		6,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,9314	2,0 ± 0,4 ^{cde fghi}
Marrom	B	6,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,9678	2,4 ± 0,5 ^{de fghi}
Verde		5,7 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,8936	1,9 ± 0,6 ^{efghi}
Vermelha		7,1 ± 0,1	0,3 ± 0,02	0,9790	1,9 ± 0,1 ^{fghi}
Marrom	C	6,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,9657	1,8 ± 0,5 ^{ghi}
Verde		6,6 ± 0,2	0,4 ± 0,01	0,9895	2,3 ± 0,1 ^{hi}
Vermelha		7,6 ± 0,3	0,2 ± 0,04	0,9347	1,9 ± 0,3 ⁱ

Todos os dados relatados são os valores médios seguidos pelos desvios-padrão amostral.

*Na coluna, os valores com as mesmas letras não diferem entre si com um nível de significância de 0,05 (teste Tukey, Software GraphPad InStat).
 g_{max} = concentração máxima de glicose ($g.L^{-1}$).
 k = constante de velocidade (h^{-1}).

6. Conclusões

A macroalga *K. alvarezii* foi capaz de se desenvolver em todas as estações climáticas do ano em Ubatuba-SP, apresentando variações nas produtividades e velocidades de crescimento dos cultivos ao longo das estações. Desta forma, os cultivos realizados em estações mais frias (outono-inverno) culminaram em menores produtividades, porém os cultivos realizados nas estações mais quentes (primavera-verão) culminaram em maiores produtividades. Desta forma, o presente trabalho comprova que cultivos de diferentes cepas de *K. alvarezii* podem ser realizados durante todo o ano, havendo maior produtividade de biomassa durante as estações de primavera-verão.

O processamento da biomassa de *K. alvarezii* gerou 4 frações: amostra não tratada, tratada com KOH, resíduo e a carragena semi-refinada. Os rendimentos dos cultivos previamente tratados com KOH foram ligeiramente superiores nas estações verão e outono, níveis (B e C). Entretanto, os rendimentos dos resíduos e carragenas semi-refinadas em relação as amostras previamente tratadas com KOH foram similares em praticamente todas cepas e níveis em estudadas.

A composição química das 4 frações oriundas do processamento da biomassa de *K. alvarezii* indicou a presença dos principais componentes, como segue: cinzas, proteínas, aromáticos insolúveis e grupos sulfatos. Em resumo, os dados de composição química das amostras (não tratadas, tratadas com

KOH, resíduos e carragenas semi-refinadas) apresentados não mostraram variações substanciais entre as diferentes cepas e níveis em estudo.

A hidrólise enzimática com extrato comercial Cellic CTec II das frações de glucana dos resíduos obtidos após o processamento de carragena, das diferentes cepas e níveis em estudo, resultam em uma conversão de praticamente 100%. Além disso, a hidrólise enzimática da fração de glucana dos resíduos indicaram que a formação de glicose a partir de glucana independe dos diferentes cultivos e cepas em estudo. Desta forma, concluímos que pode haver um potencial de produção de bioprodutos a partir do melhor aproveitamento dos resíduos gerados no processamento de carragena. Um exemplo seria a produção de etanol a partir de hidrolisado de glicose.

Em resumo, ficou demonstrado que cultivos de *K. alvarezii* podem ser realizados com sucesso durante todos os meses do ano em Ubatuba-SP. Desta forma, há possibilidade de se produzir não somente carragena, mas também bioprodutos a partir do hidrolisado de glicose oriundo do resíduo do processo durante todos os meses do ano; diferentemente de cultivos de cana-de-açúcar, que se desenvolvem apenas uma vez ao ano. Esses avanços podem contribuir para uma melhor concepção de estratégias de produção de bioprodutos no setor de produção de hidrocoloides, um exemplo seria a produção comercial de etanol combustível.

7. Bibliografia

1. Mendes FM, Siqueira G, Carvalho W, Ferraz A, Milagres AMF. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. *Biotechnol Prog.* 2011;27(2):395–401.

2. Wi SG, Kim HJ, Mahadevan SA, Yang DJ, Bae HJ. The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. *Bioresour Technol.* 2009;100(24):6658–60.
3. Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C, et al. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Curr Biol.* 2009;19(2):169–75.
4. Ge L, Wang P, Mou H. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renew Energy.* 2011;36(1):84–9.
5. John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol* [Internet]. 2011;102(1):186–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
6. Wei N, Quarterman J, Jin YS. Marine macroalgae: An untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2013;31(2):70–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.009>
7. Ahmad AL, Yasin NHM, Derek CJC, Lim JK. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2011;15(1):584–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>
8. Harun R, Danquah MK. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochem.* 2011;46(1):304–9.
9. Masarin F, Gurpilhares DB, Baffa DC, Barbosa MH, Carvalho W, Ferraz A, et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol Biofuels* [Internet]. 2011;4(1):55. Available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/4/1/55>
10. Lewandowski I, Scurlock JMO, Lindvall E, Christou M. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy.* 2003;25(4):335–61.
11. Horn SJ, Aasen IM, Stgaard K. Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2000;24(1):51–7.
12. Goh CS, Lee KT. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010;14(2):842–8.
13. Meinita MDN, Kang JY, Jeong GT, Koo HM, Park SM, Hong YK. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus*

- alvarezii* (cottonii). J Appl Phycol. 2012;24(4):857–62.
14. Ismael Ulises Miranda Roldána, Ariane Tiemi Mitsuahara JPMD, Levi Ezequiel de Oliveirab, Valéria Cress Gellic, Rubens Montid LVS do S, Masarin F. Chemical, structural, and ultrastructural analysis of waste from the carrageenan and sugar-bioethanol processes for future bioenergy generation. Biomass and Bioenergy. 2017;
 15. Hayashi L, Oliveira EC, Bleicher-Lhonneur G, Boulenguer P, Pereira RTL, Von Seckendorff R, et al. The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. J Appl Phycol. 2007;19(5):505–11.
 16. Intelligence M. Global Carrageenan Market- Trends and Forecasts:(2017 - 2022 (Segmented by types, applications, grades and geography). Hyderabad; 2017.
 17. Hayashi L, de Paula EJ, Chow F. Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. J Appl Phycol. 2007;19(5):393–9.
 18. Abd-Rahim F, Wasoh H, Zakaria MR, Ariff A, Kapri R, Ramli N, et al. Production of high yield sugars from *Kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical and enzymatic hydrolysis. Food Hydrocoll [Internet]. 2014;42(P2):309–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.017>
 19. Masarin F, Cedeno FRP, Chavez EGS, de Oliveira LE, Gelli VC, Monti R. Chemical analysis and biorefinery of red algae *Kappaphycus alvarezii* for efficient production of glucose from residue of carrageenan extraction process. Biotechnol Biofuels [Internet]. 2016;9(1):122. Available from: <http://biotechnolobyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-016-0535-9>
 20. de Góes HG, Reis RP. Temporal variation of the growth, carrageenan yield and quality of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated at Sepetiba bay, southeastern Brazilian coast. J Appl Phycol. 2012;24(2):173–80.
 21. Hayashi L, Faria GSM, Nunes BG, Zitta CS, Scariot LA, Rover T, et al. Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. J Appl Phycol. 2011;23(3):439–47.
 22. Todorovic V, Redovnikovic IR, Todorovic Z, Jankovic G, Dodevska M, Sobajic S. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. J Food Compos Anal [Internet]. 2015;41:137–43. Available from:

23. John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol.* 2011;102(1):186–93.
24. Yanagisawa M, Nakamura K, Ariga O, Nakasaki K. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochem.* 2011;46(11):2111–6.
25. Chen H. *Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice.* Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice. 2014. 1-511 p.
26. Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chem.* 2011;128(4):895–901.
27. Kim NJ, Li H, Jung K, Chang HN, Lee PC. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresour Technol.* 2011;102(16):7466–9.
28. Jang S, Shirai Y, Uchida M, Wakisaka M. Production of mono sugar from acid hydrolysis of seaweed. *African J Biotechnol.* 2012;11(8):1953–63.
29. Yoon JJ, Kim YJ, Kim SH, Ryu HJ, Choi JY, Kim GS, et al. Production of Polysaccharides and Corresponding Sugars from Red Seaweed. *Adv Mater Res.* 2010;93–94:463–6.
30. Masarin F, Ferraz A. Evaluation of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden biopulping with *Ceriporiopsis subvermisporea* under non-aseptic conditions. *Holzforschung.* 2008;62(1):1–7.
31. Vicentim MP, De Almeida Faria R, Ferraz A. High-yield kraft pulping of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden biotreated by *Ceriporiopsis subvermisporea* under two different culture conditions. *Holzforschung.* 2009;63(4):408–13.
32. Ramos LP. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim Nova.* 2003 Dec;26(6):863–71.
33. Martins LF, Kolling D, Camassola M, Dillon AJP, Ramos LP. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour Technol.* 2008;99(5):1417–24.
34. Gilkes NR, Henrissat B, Kilburn DG, Miller RC, Warren R. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev.* 1991;55(2):303–15.
35. Klyosov a a. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose

- degradation. *Biochemistry*. 1990;29(47):10577–85.
36. Jorgensen H, Olsson L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme Microb Technol*. 2006;38(3–4):381–90.
 37. Lu Y, Yang B, Gregg D, Saddler JN, Mansfield SD. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Appl Biochem Biotechnol*. 2002;98–100:641–54.
 38. Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Skomarovsky A, et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - Evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme Microb Technol*. 2005;37(2):175–84.
 39. Brienzo M, Arantes V, Milagres AMF. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Fungal Biol Rev*. 2008;22(3–4):120–30.
 40. Henning Jorgensen JBK and CF. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod Biorefining*. 2007;1:119–34.
 41. Ge L, Wang P, Mou H. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renew Energy* [Internet]. 2011;36(1):84–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.06.001>
 42. Yong YS, Yong WTL, Anton A. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. *J Appl Phycol*. 2013;25(6):1831–4.
 43. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of ash in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Nrel/Tp-510-42622 [Internet]. 2008;(April 2005):18. Available from: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>
 44. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 1972;48(2):422–7.
 45. Ghose TK. International Union of Pure Commission on Biotechnology * Measurement of. *Pure Appl Chem* [Internet]. 1987;59(2):257–68. Available from: <http://www.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf>
 46. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959;31(3):426–8.
 47. Cedeño FRP. Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do resíduo oriundo do processamento de carragena de *Kappaphycus alvarezii*. Universidade Estadual Paul UNESP. 2017; Teses de Mestrado:114 p.

48. Froment GF, Bischoff KB, De Wilde J. Chemical Reactor Analysis and Design. 3rd Editio. 2010. 900 p.
49. Ferraz A, Baeza J, Rodriguez J, Freer J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresour Technol.* 2000;74(3):201–12.
50. Yun EJ, Kim HT, Cho KM, Yu S, Kim S, Choi IG, et al. Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. *Bioresour Technol.* 2016;199:311–8.
51. Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J Agric Food Chem.* 2010;58(16):9043–53.
52. Aguilar R, Ramírez JA, Garrote G, Vázquez M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *J Food Eng.* 2002;55(4):309–18.
53. Zinnai A, Venturi F, Quartacci MF, Andreotti A, Andrich G. The kinetic effect of some wine components on the enzymatic hydrolysis of glucan. *South African J Enol Vitic.* 2010;31(1):9–13.