

PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO MICROALGAS DE DIFERENTES FONTES COMO SUBSTRATOS

ISABELY SANDI BALDASSO^{1,2*}, EMANUELY FAGUNDES DA SILVA^{1,2}, HELEN
TREICHEL^{2,3}

1 Introdução

Os efluentes da suinocultura representam um importante desafio ambiental devido às elevadas concentrações de nutrientes e de matéria orgânica, podendo comprometer a qualidade dos corpos d'água e a biodiversidade (Zheng et al., 2026).

Como alternativa sustentável, as microalgas destacam-se pela capacidade de remover nitrogênio e fósforo e de produzir biomassa rica em compostos de interesse, conciliando a biorremediação de efluentes com a valorização de resíduos, em conformidade com a economia circular (Soto-Ramírez et al., 2021). Entretanto, sua utilização em processos fermentativos requer pré-tratamento para superar a resistência da parede celular e aumentar a disponibilidade dos compostos intracelulares (Günerken et al., 2015). Entre esses compostos, destaca-se o amido de reserva, cuja hidrólise pela α -amilase disponibiliza açúcares fermentescíveis para o metabolismo da levedura *Wickerhamomyces* sp., permitindo a conversão da biomassa residual em metabólitos e enzimas de interesse biotecnológico.

2 Objetivos

Avaliar a conversão de biomassa de *Chlorella* sp. proveniente da fitorremediação de efluentes suinícolas, por fermentação com *Wickerhamomyces* sp., em metabólitos e enzimas de interesse biotecnológico.

3 Metodologia

As microalgas utilizadas neste estudo pertencem ao gênero *Chlorella* e foram obtidas no processo de fitorremediação de efluente de águas residuais suínas previamente digerido nas

1 Graduanda Engenharia Ambiental e Sanitária, instituição Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, contato: isabely.baldasso@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa: Agroenergia

3 Doutora em Engenharia de Alimentos, UFFS, *Campus* Erechim, Orientadora.

instalações de suínos e aves da EMBRAPA (Concórdia, Santa Catarina, Brasil). A biomassa era composta por 56,1% de proteína, 34,7% de carboidrato, 1,7% de lipídio e 7,8% de minerais (Stefanski et al., 2020). A levedura utilizada na fermentação foi *Wickerhamomyces sp.* UFFS-CE-3.1.2. O meio fermentativo foi preparado com 200 g de biomassa com teor de umidade corrigido e 3 L de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 5,5). Em seguida, o mosto foi levado à autoclave, no vaso do biorreator de tanque agitado (STR), a 121 °C e 1 atm por 15 min. Posteriormente, o pH foi ajustado para 5 com NaOH 2 M, seguido da adição de 30 mL de alfa-amilase comercial a 30 °C e 80 rpm (Longo et al., 2026). Decorrida 1 h, a levedura foi inoculada na proporção de 10% (v/v), caracterizando o início da fermentação que teve duração de 72 h (Bonatto et al., 2021).

Em relação as atividades enzimáticas, para a amilase (Fuwa, 1954), utilizando o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para a quantificação (Miller, 1959). As demais enzimas, protease (Waghmare et al., 2015), catalase (Havir e McHale, 1987), peroxidase (Khan e Robinson, 1994; Devaiah e Shetty, 2009), ascorbato peroxidase (Nakano e Asada, 1981) e superóxido dismutase (Hasan et al., 2022), foram quantificadas por espectrofotometria, com exceção da lipase, que foi quantificada por titulação (Treichel et al., 2017). Os metabólitos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Longo et al., 2026).

4 Resultados e Discussão

A atividade enzimática apresentou perfis distintos ao longo da fermentação. A enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou atividade de 80 U/mL no momento do inóculo da levedura, indicando a presença do radical superóxido, que é dismutado em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Seu crescimento exponencial foi detectável em 72 h a 100 U/mL. O H₂O₂ gerado durante o processo fermentativo pode ser removido por enzimas antioxidantes, como a catalase e as peroxidases. A atividade da catalase iniciou-se em 24 h, com 584,86 U/mL, e em 48 h, com 1.275,23 U/mL, indicando uma resposta eficiente ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ugya et al., 2024). Entre as peroxidases, a ascorbato peroxidase apresentou a maior atividade, alcançando 2.329,60 U/mL em 18 h, enquanto a peroxidase atingiu seu pico apenas em 48 h, com 85,00 U/mL. As diferenças observadas entre as enzimas podem estar relacionadas aos seus distintos mecanismos de ação na detoxificação do H₂O₂, uma vez que a catalase atua diretamente sobre esse composto, enquanto as peroxidases

dependem de substratos redutores para sua atividade (Nakano and Asada, 1981). A lipase apresentou atividade de 228,75 U/mL e a protease, de 1.291,67 U/mL, logo no início da fermentação (0 h). A atividade dessas enzimas pode estar relacionada à composição nutricional do meio e às condições de cultivo, como disponibilidade de nutrientes, fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e oxigênio dissolvido (Elibol and Ozer, 2000; Gupta et al., 2002). A α -amilase comercial foi adicionada para hidrolisar o amido intraplasmático, disponibilizando açúcares fermentescíveis à levedura (Görgens et al., 2015). A maior atividade foi observada no início da fermentação e, após 72 h, atingiu 28,22 U/mL.

A baixa concentração de açúcares redutores totais (ART) pode estar relacionada à acidificação decorrente do pré-tratamento em autoclave, o que favorece a formação de compostos inibidores, como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), e reduz a disponibilidade de açúcares fermentescíveis (Lima et al., 2024). Apesar disso, a conversão dos açúcares resultou na produção de metabólitos, como glicerol e etanol, confirmada por CLAE (Görgens et al., 2015). O glicerol atingiu 5,62 g/L em 18 h e 2,75 g/L em 48 h, enquanto o etanol apresentou concentrações de 0,97 e 1,02 g/L, respectivamente, sugerindo a assimilação dos açúcares disponíveis pela levedura.

5 Conclusão

Conclui-se que a biomassa residual de *Chlorella* sp., com α -amilase e *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2, favoreceu a conversão de carboidratos, demonstrando seu potencial para obtenção de metabólitos, como etanol, e enzimas de interesse industrial.

Referências Bibliográficas

BONATTO, C.; SCAPINI, T.; ZANIVAN, J.; DALASTRA, C.; BAZOTI, S. F.; ALVES JÚNIOR, S.; FONGARO, G.; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H. Utilization of seawater and wastewater from shrimp production in the fermentation of papaya residues to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 321, art. 124501, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124501>.

DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 2-3, p. 119–126, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.04.010>.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus*

arrhizus. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 325–329, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00226-0).

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1954. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126476>.

GÖRGENS, J. F.; BRESSLER, D. C.; VAN RENSBURG, E. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for direct conversion of raw, uncooked or granular starch to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 369–391, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.888048>.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y>.

GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M. H. M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R. H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243–260, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>.

HASAN, M.; MOKHTAR, A. S.; MAHMUD, K.; BERAHIM, Z.; ROSLI, A. M.; HAMDAN, H.; MOTMAINNA, M.; AHMAD-HAMDANI, M. S. Physiological and biochemical responses of selected weed and crop species to the plant-based bioherbicide WeedLock. **Scientific Reports**, v. 12, art. 19602, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-24144-2.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 407–410, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90013-2).

LIMA, S.; GARCÍA-LÓPEZ, E. I.; KRIVTSOV, I.; ILKAEVA, M.; BORNES, C.; MAFRA, L.; LIOTTA, L. F.; VILLAR-RODIL, S.; PAREDES, J. I.; MARCÌ, G.; SCARGIALI, F. Valorisation of microalga *Chlorella* sp. into furans in the presence of Nb₂O₅ catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 433, art. 115457, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2024.115457>.

LONGO, V. D.; AMORIM, M. P.; SILVEIRA, N. M. F. P.; BALDASSO, I. S.; SILVA, E. F. da; FORNARI, A. C.; ALVES JÚNIOR, S. L.; NAZARI, M. T.; TREICHEL, H. Circular bioprocessing of *Chlorella* sp. biomass via *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 fermentation for the production of high-value enzymes, glycerol, and acetic acid. **Processes**, v. 14, n. 1, art. 111, 2026. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr14010111>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.

SOTO-RAMÍREZ, R.; LOBOS, M.-G.; CÓRDOVA, O.; POIRRIER, P.; CHAMY, R. Effect of growth conditions on cell wall composition and cadmium adsorption in *Chlorella vulgaris*: a new approach to biosorption research. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, art. 125059, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125059>.

STEFANSKI, F. S.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; BONATTO, C.; VENTURIN, B.; WEIRICH, S. N.; ULKOVSKI, C.; CAREZIA, C.; ULRICH, A.; MICHELON, W.; SOARES, H. M.; MATHIENSEN, A.; FONGARO, G.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Potential use of biological herbicides in a circular economy context: a sustainable approach. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, art. 521102, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.521102>

TREICHEL, H.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B.; AGNOL, D.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S. M.; BALDONI, D. B.; BEVILACQUA, C. B.; JACQUES, R. J. S.; VARGAS, G. D. L. P.; MOSSI, A. J. Lipase production from a newly isolated *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using canola cake as substrate. **Current Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 295–300, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2174/2211550105666151124193225>

UGYA, A. Y.; LI, X.; CHEN, H.; WANG, Q. Microalgae stress sensing through oxidative phosphorylation drives bioenergy potential: deciphering mechanisms and future opportunities. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, art. 114266, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114266>.

WAGHMARE, S. R.; GURAV, A. A.; NADAF, N. H.; JADHAV, D. B.; SONAWANE, K. D. Purification and characterization of novel organic solvent-tolerant 98 kDa alkaline protease from isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK. **Protein Expression and Purification**, v. 107, p. 1–6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.11.002>.

ZHENG, Y.-Y.; WANG, Y.-H.; YEH, C.-C.; LIAO, C.-H.; LEE, T.-M. Hot-climate flue-gas CO₂ algal treatment of undiluted swine wastewater: Field-validated performance and operating rules. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 14, n. 3, p. 122222, 2026. DOI: [10.1016/j.jece.2026.122222](https://doi.org/10.1016/j.jece.2026.122222).

Palavras-chave: Bioetanol, Hidrólise Enzimática e Planejamento de Experimentos.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0097

Financiamento

