



**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO  
JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**



**AVALIAÇÃO DA TORTA DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) PARA PRODUÇÃO DE  
BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**Crisley Mara de Azevedo Ferreira**

**Diamantina**

**2013**

**CRISLEY MARA DE AZEVEDO FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DA TORTA DE DENDÊ (*Elaeis guineenses*) PARA PRODUÇÃO 1  
BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

**DIAMANTINA, MG**

**2013**

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

F383a  
2011  
Ferreira, Crisley Mara de Azevedo.  
Avaliação da torta de dendê (*Elaeis guineensis*) para produção de etanol de segunda geração / Crisley Mara de Azevedo Ferreira. – Diamantina: UFVJM, 2013.  
63 p.

Orientador: Alexandre Soares dos Santos

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Química) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Palma. 2. Lignocelulose. 3. Álcool. 4. Biocombustíveis. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 662**

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

**AVALIAÇÃO DA TORTA DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) PARA PRODUÇÃO DE  
BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**CRISLEY MARA DE AZEVEDO FERREIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri– UFVJM, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Química

Aprovado em: 22 /02 /2013

---

Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos  
Presidente - UFVJM

---

Dra. Cynthia Maria Borges Damasceno  
Membro Externo - Embrapa Milho e Sorgo

---

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos  
Membro Titular – UFVJM

**DIAMANTINA, MG**

**2013**

*Dedico esse trabalho a todos que de alguma forma  
contribuíram para sua concretização...*

## AGRADECIMENTOS

A benção de viver é inexplicável, obrigada meu bom Deus pela oportunidade de evoluir... De crescer como ser humano e obrigada pelas pessoas que colocaste no meu caminho para me ajudarem a alcançar essa evolução;

À minha família e aos momentos que deixei de viver com vocês, ao amor que irrestritamente me dedicam; à alguém que é pedaço do meu coração que bate em outro corpo! Pela compreensão, carinho, força, amor, colo e tudo que sempre fez e faz por mim: minha **mãe Cláudia Mara** e ao meu **pai Wanderson Ferreira**, por me estimular querer ser melhor, me incentivar a lutar e a ir mais longe, do seu jeito, mas por me amar assim mesmo. Obrigada por tudo! Vocês são minha base e por quem tenho infinito amor!

Por estar ao meu lado, por viver tudo comigo, por ser a pessoa mais presente em minha vida apesar das diferenças: **irmã (Luana Ferreira)**.

Ao Prof. Dr. **Alexandre Soares dos Santos**, meu orientador, que me deu a oportunidade de aprender muito mais que eu imaginava, por me ensinar a buscar respostas e entender por que muitas vezes “o silêncio vale mais que mil palavras”.

A Profa. Dra **Lílian de Araújo Pantoja**, por me ensinar a “ter foco”, pelos ensinamentos, conselhos, por toda ajuda e disponibilidade, por tudo que fez por mim!

Ao Prof. MSc. **Harriman de Moraes** por ser essa pessoa por quem sempre tive infinito carinho, desde a graduação... por me ensinar a ter os pés no chão.

Por iluminar meus dias com sorrisos sinceros e palavras de conforto, pela amizade sincera e pela presença constante... Minha amiga sempre **amiga Nayara Mello** e por ter me dado de presente o “anjinho da dindinha”: **Nicolas Ribeiro**.

Por ter aparecido na minha vida me fazendo entender que amor existe sim... Na sua forma mais pura, mais verdadeira e por ser minha calma, meu amor: **Alencar Lopes**, pela paciência e compreensão, que com amor e um apoio incondicional foi responsável por sempre me deixar com um sorriso no rosto e pronta a recomeçar todos os dias...

**Aos amigos conquistados ao longo desses dois anos no LabBBio e Labvin** que fizeram tudo parecer mais leve, mesmo nos dias mais difíceis: Ilva de Fátima, João Vitor Leite, Flavinha, Philipe Brito, Karol Cruz, Suedali Villas Bôas, Mateus, André, Janaína Gonferja e todos os demais.

A “**minha galera**”: Plínio Rodrigues e Tamara Lauer, pelas ajudas, pelas noites, fins de semana, por tudo que aprendemos e fizemos juntos, a Isadora Ferreira por ter conquistado meu carinho e por ter me ajudado muito, mesmo de longe, ao Ramon Silva, pela disponibilidade em me socorrer sempre, pelo carinho, preocupação, pela atenção, alegria contagiante e por tudo que me ensinou, por tudo mesmo e a Fernanda Campos por tanta ajuda e boa vontade. Muito obrigada, sem vocês eu não chegaria até aqui.

**Aos amigos de toda vida**, que souberem entender minha ausência nos últimos tempos, e por darem colorido aos meus dias: Dayb Santos, Dani Correa, Bela Brandão, André Torres e tantos outros. Obrigado por passarem embaraços junto comigo, por terem gargalhado com as piadas sem graça que eu contei, por conhecerem meu lado mais “feio” e por estarem comigo mesmo assim...Sempre!

**Aos demais amigos e funcionários da UFVJM**, e todos os outros que de alguma forma cotribuíram para conclusão do meu trabalho... Minha eterna gratidão!!!

*“ Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo ...” Martha Medeiros*

*“Nada mais difícil, quando se procura um caminho, que descobrir se a força que nos empurra vem do desejo de fugir ou do desejo de buscar. Talvez, em algum nível bem profundo, nem haja qualquer diferença entre esses desejos.”*

*(Autor desconhecido)*

## RESUMO

FERREIRA, C. M. A. Avaliação da torta de dendê (*Elaeis guineensis*) para produção de etanol de segunda geração. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, 2013. 63p. Dissertação de Mestrado em Química, área de concentração: Química Orgânica.

A busca por energias alternativas, sustentáveis e economicamente viáveis, colocou em destaque o uso dos biocombustíveis. Os estudos recentes apontam o uso de biomassas residuais como candidatas potenciais para produção de bioenergia. Nesse contexto, a presente dissertação teve por objetivo avaliar a torta de dendê como insumo para produção de etanol de segunda geração por meio de estudos que envolveram etapas de pré-tratamento ácido e alcalino, sacarificação e fermentação. Inicialmente foi determinada a composição centesimal da torta de dendê, indicando a presença de 53,2% de carboidratos totais, dos quais 32% referente a fração de celulose. Para otimização do pré-tratamento ácido foi aplicado um Planejamento Fatorial através de delineamento composto central rotacional. O programa *STATISTICA Versão 8.0* (Statsoft Inc., Tulsa,) foi utilizado para análise dos dados. O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído resultou na remoção de pelo menos 82% da hemicelulose presente na torta de dendê. O pré-tratamento alcalino subsequente foi capaz de remover pelo menos 72% da lignina da biomassa, um interferente do processo fermentativo. Na sequência o processo de sacarificação foi otimizado com o uso de delineamento composto central rotacional com 3 fatores, 4 pontos centrais e 6 pontos axiais, onde foram avaliadas a concentração de celulases, a razão sólido-líquido e o tempo. O hidrolisado enzimático obtido em condição otimizada, com 80% de conversão da celulose a açúcares redutores, foi submetido à fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* apresentando um  $Y_{P/S}$  de 0,49 com 5,4%(v/v) de álcool no mosto fermentado. Os dados obtidos indicaram que a torta de dendê avaliada apresenta elevado potencial para produção de bioetanol de segunda geração.

**Palavras-chaves:** palma, lignocelulose, álcool, biocombustíveis



## ABSTRACT

FERREIRA, C. M. A. Evaluation of palm cake (*Elaeis guineensis*) for production of second generation ethanol. Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, UFVJM, 2013. 63p. Dissertation in Chemistry, area of concentration: Organic Chemistry.

The search for alternative energies, sustainable and economically viable, highlighted the use of biofuels. Recent studies indicate the use of residual biomass as potential candidates for bioenergy production. In this context, the present dissertation aimed at evaluating the palm cake as a feedstock for the production of second generation ethanol through studies involving acid and alkaline pretreatment steps, saccharification and fermentation. Initially it was determined the chemical composition of palm cake, indicating the presence of 53.2% of total carbohydrates, of which 32% related to cellulose. To optimize the pretreatment was applied a Factorial Design by central composite rotational design. The program STATISTICA version 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa,) was used for data analysis. Pretreatment with dilute sulfuric acid resulted in the removal of at least 82% of the hemicellulose present in palm cake. The subsequent alkaline pretreatment was able to remove at least 72% of the lignin from the biomass, an interfering of fermentation. Further the saccharification process was optimized by the use of central composite design with three factors, fourth central points and six axial points, evaluating the concentration of cellulase, the solid-liquid ratio and the time. The enzymatic hydrolyzate obtained under optimized conditions with 80% conversion of cellulose to sugars was subjected to fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* showing an  $Y_{P/S}$  of 0.49 based on 5.4% (v/v) of alcohol in the fermented must. The data indicated that the palm kernel cake evaluated presents high potential for production of second generation bioethanol.

**Keywords:** palm, lignocellulose, alcohol, biofuels

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>03</b>
2.1 Geral.....	03
2.2Específicos.....	03
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>04</b>
3.1 Etanol de segunda geração.....	04
3.2 Biomassas Lignocelulósicas.....	07
3.2. Celulose.....	08
3.2.2 Hemicelulose.....	09
3.2.3.Lignina.....	10
3.3 Torta de dendê.....	12
3.4 Pré-tratamento.....	14
3.4.1 Hidrólise ácida.....	17
3.4.2 Pré-tratamento alcalino.....	18
3.5 Sacarificação Enzimática .....	19
3.6 Fermentação alcoólica.....	20
3.6.1 Saccharomyces cereviasae.....	22
<b>4.METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
4.1 Delineamento experimental.....	23
4.2.Aquisição e tratamento para obtenção da torta de dendê.....	23
4.3 Caracterização química das biomassas.....	23
4.3.1 Umidade.....	24
4.3.2 Cinzas.....	24
4.3.3 Lipídeos ou Extrato etéreo.....	25
4.3.4 Proteína.....	25
4.3.5 Fibra Bruta.....	26
4.3.6 Fibra Solúvel em detergente ácido (FSDA).....	26

4.3.7 Fibra Solúvel em detergente neutro (FSDN).....	27
4.3.8 Celulose.....	28
4.3.9 Lignina.....	28
4.3.10 Hemicelulose.....	29
4.3.11 Amido e açúcares solúveis totais.....	29
4.3.12 Determinação açúcares redutores.....	30
4.4 Pré-tratamento ácido .....	31
4.4.1 Seleção da melhor condição de tratamento ácido.....	32
4.4.2 Determinação de glicose.....	32
4.4.3 Determinação de Compostos Fenólicos.....	32
4.5 Pré-tratamento alcalino.....	33
4.6 Sacarificação enzimática.....	34
4.7 Meio de fermentação e monitoramento do bioprocessos.....	35
4.7.1 Teor de etanol.....	36
4.7.2 Variáveis do processo fermentativo.....	36
4.7.2.1 Fatores de rendimento de produção.....	36
4.7.2.2 Produtividade Volumétrica.....	37
4.7.2.3 Eficiência fermentativa.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
5.1 Caracterização Química da torta de dendê.....	39
5.2 Planejamento experimental DCCR para o pré-tratamento com ácido diluído.....	41
5.3 Pré-tratamento alcalino.....	47
5.4 Processo de sacarificação enzimática.....	49
5.5 Fermentação.....	55
6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÃO.....	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.s.....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 -</b>	Histórico da produção de açúcar e álcool no Brasil .....	05
<b>FIGURA 2 -</b>	Rotas tecnológicas para produção de bioetanol de primeira e segunda geração.....	06
<b>FIGURA 3 -</b>	Classificação química dos componentes da biomassa lignocelulósica.....	07
<b>FIGURA 4 -</b>	Estrutura lignocelulósica de uma biomassa vegetal evidenciando um esqueleto de celulose circundado por hemicelulose e lignina.....	09
<b>FIGURA 5 -</b>	Estrutura química da celulose.....	09
<b>FIGURA 6 -</b>	Representação esquemática de diferentes estruturas que compõem a celulose e hemicelulose.....	10
<b>FIGURA 7 -</b>	Estrutura dos álcoois, álcool cumarílico (1), álcool coniferílico (2) e álcool sinapílico (3) precursores da lignina.....	11
<b>FIGURA 8 -</b>	Representação esquemática da estrutura das fibras lignocelulósicas.....	11
<b>FIGURA 9 -</b>	Aspecto morfológico do fruto do dendê <i>Elaeis guineensis</i> .....	13
<b>FIGURA 10 -</b>	Efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas degradantes.....	15
<b>FIGURA 11 -</b>	Reações e compostos formados durante o processo de hidrólise ácida do material lignocelulósico.....	18
<b>FIGURA 12 -</b>	Sistema enzimático do processo de degradação da celulose.....	20
<b>FIGURA 13 -</b>	Representação esquemática da via glicolítica para obtenção de etanol.....	21
<b>FIGURA 14 -</b>	Aspecto microscópico das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
<b>FIGURA 15 -</b>	Curva analítica de glicose, nas concentrações de 0 a 0,5 mg/mL de glicose, determinada segundo método descrito por McCready (1950).....	30
<b>FIGURA 16 -</b>	Sistema de fermentômetro utilizado no processo de fermentação. a) Dispositivo fermentômetro e b) aspecto do sistema de fermentômetro acoplado a um Erlenmeyer.....	36
<b>FIGURA 17 -</b>	Fluxograma das atividades realizadas para produção de bioetanol a partir de torta de dendê ( <i>Elaeis guineensis</i> ).....	38
<b>FIGURA 18 -</b>	Resíduo da extração do óleo do dendê na sua forma íntegra.....	40
<b>FIGURA 19 -</b>	Torta de dendê ( <i>Elaeis guineensis</i> ) após o processo de trituração.....	40
<b>FIGURA 20 -</b>	Gráfico de Pareto apresentando os efeitos dos fatores de respostas, em percentual de açúcares redutores sobre o processo de hidrólise ácida da torta de dendê.....	44

<b>FIGURA 21 -</b>	Gráficos de superfície de resposta para o percentual de açúcares redutores (AR%) removidos da torta de dendê em função dos efeitos combinados do tempo, concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e Razão S/L (razão sólido-líquido).....	45
<b>FIGURA 22 -</b>	Gráfico de Pareto para o fator de resposta percentual de açúcares redutores (AR) removidos durante o DCCR para sacarificação da torta de dendê.....	50
<b>FIGURA 23 -</b>	Gráfico de Pareto para o fator de resposta percentual de glicose removida durante o DCCR para sacarificação da torta de dendê.....	51
<b>FIGURA 24 -</b>	Gráfico de superfície resposta para o efeito da enzima celulase (μL/g torta) e Razão S/L sobre os açúcares (AR e glicose) liberados durante o processo de sacarificação enzimática.....	52
<b>FIGURA 25 -</b>	Gráfico de superfície resposta para o efeito da enzima celulase (μL/g tota) e tempo (h) sobre os açúcares (AR e glicose) liberados durante o processo de sacarificação enzimática.....	52
<b>FIGURA 26 -</b>	Gráfico de superfície resposta para o efeito da razão sólido líquido – S/L (%) e tempo (h) sobre os açúcares (AR e glicose) liberados durante o processo de sacarificação enzimática.....	53

#### **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1 -</b>	Características de algumas culturas vegetais com potencial teor oleaginoso.....	12
<b>TABELA 2 -</b>	Diferentes tipos de processos de pré-tratamento aplicados em biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol e suas respectivas vantagens.....	16
<b>TABELA 3 -</b>	Delineamento Composto Central Rotacional, do tipo 2 <sup>3</sup> com dois níveis de variações, 3 fatores (concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , razão sólido líquido e tempo em minutos), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), autoclavados a 1 atm a 120 °C.....	31
<b>TABELA 4 -</b>	Delineamento Composto Central Rotacional, do tipo 2 <sup>3</sup> com dois níveis de variações, 2 fatores (concentração de NaOH e temperatura), 4 pontos axiais e 4 pontos centrais (9C, 10C, 11C, 12C), realizado a uma razão sólido líquido de 10% por um período de 12 horas.....	33
<b>TABELA 5 -</b>	Delineamento Composto Central Rotacional do tipo 2 <sup>3</sup> com dois níveis de variações, 3 fatores (Razão S/L, celulase e tempo), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), mantido a 50 °C a 100 rpm.....	35
<b>TABELA 6 -</b>	Composição química da torta de dendê desengordurada com éter etílico.....	39
<b>TABELA 7 -</b>	Composição química de diferentes resíduos lignocelulósicos agroindustriais.....	41
<b>TABELA 8 -</b>	Delineamento Composto Central Rotacional, do tipo 2 <sup>3</sup> com dois níveis de variações, 3 fatores (concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , razão S/L e tempo de hidrólise), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), autoclavados à 1 atm a	42

120°C, com os respectivos fatores de resposta para o pré-tratamento ácido da torta de dendê.....

<b>TABELA 9 -</b>	Análise dos efeitos principais e de interações das variáveis do planejamento composto central para os percentuais de AR encontrados na torta de dendê.....	43
<b>TABELA 10 -</b>	Condições experimentais utilizadas na ampliação da escala experimental para obtenção dos hidrolisados hemicelulósicos. Valores críticos: Variáveis: AR; Solução: máximo; Valores previstos na solução: 15,79 .....	46
<b>TABELA 11 -</b>	Comparação das frações de carboidratos e lignina das tortas de dendê antes e após o pré-tratamento ácido.....	46
<b>TABELA 12 -</b>	Delineamento Composto Central Rotacional para o pré-tratamento alcalino da torta de dendê apresentando dois níveis, 2 fatores (concentração de NaOH e temperatura), 4 pontos axiais e 4 pontos centrais (9C, 10C, 11C, 12C), razão-sólido líquido de 10%, tempo de incubação de 12 horas, e os respectivos fatores de resposta.....	47
<b>TABELA 13 -</b>	Teores de lignina no resíduo sólido da torta de dendê após o tratamento alcalino com 7% de, NaOH, temperatura de 85°C, razão de sólido líquido de 10% e diferente tempos de reação.....	48
<b>TABELA 14 -</b>	Comparação das frações de hemicelulose, celulose e lignina das tortas de dendê antes e após o pré-tratamento alcalino, com concentração de NaOH de 7% a 85°C, por 36 horas e razão de sólido líquido de 10% .....	48
<b>TABELA 15 -</b>	Planejamento experimental DCCR 2 <sup>3</sup> com 3 fatores, 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C) e 6 axiais, com 3 níveis de variações (concentração de celulase, razão S/L e tempo) a 50°C a 100 rpm, com os respectivos fatores de resposta para o pré-tratamento enzimático da torta de dendê .....	49
<b>TABELA 16-</b>	Análise dos efeitos principais e de interações das variáveis do planejamento composto central para os percentuais de AR, encontrados para a torta de dendê.....	54
<b>TABELA 17 -</b>	Análise dos efeitos principais e de interações das variáveis do planejamento composto central para os percentuais de glicose (%), encontrados na torta de dendê.....	54
<b>TABELA 18 -</b>	Teores de celulose, hemicelulose e lignina analisados na torta de dendê antes e após a sacarificação enzimática, utilizando razão S/L de 15%, concentração de celulase de 65,75 µL /g de torta, 25 horas, 100 rpm à 50°C .....	55
<b>TABELA 19 -</b>	Variáveis do processo fermentativo utilizando como agente fermentativo a levedura <i>S. cerevisiae</i> após os pré-tratamentos ácido e alcalino e posterior sacarificação enzimática.....	56

## 1. INTRODUÇÃO

A crise energética que se estabeleceu nas últimas décadas, decorrente da oscilação do preço do petróleo, aliado ao aumento do seu consumo e projeções de exaustão de suas reservas, gerou uma busca incessante por energias alternativas, sustentáveis e economicamente viáveis, acompanhando a transição para uma sociedade pós-petróleo.

O Brasil já buscava por fontes alternativas de energia, antes mesmo da emissão de gases poluentes, efeito estufa e do aquecimento global se transformarem em uma das principais preocupações mundiais. As crises no mercado de petróleo ocorridas na década de 70, no século XX, causaram uma forte recessão na economia mundial, com o preço do barril de petróleo atingindo valores que ultrapassaram a barreira dos US\$ 100. Este fato levou o país a investir contundentemente no uso de fontes renováveis em substituição ao combustível fóssil, já que na época, o Brasil importava a maior parte do combustível que consumia. Eventos econômicos como estes levaram o Brasil a desenvolver ou adotar duas das mais bem-sucedidas alternativas ao combustível fóssil da história, o etanol e o biodiesel. A produção e consumo de etanol combustível foi estimulada a partir da década de 70 através da instituição do Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool). O Pró-Álcool passou a ser responsável pelo incentivo ao crescimento da produção de etanol em todo país. Porém na década de 80, com a estabilização do preço do petróleo e uso da cana-de-açúcar para a produção do açúcar, ocorreu uma forte crise no setor alcooleiro. Nova crise do petróleo adveio na década seguinte e no início do século XXI, anos 2000, a indústria nacional automotiva lançou o veículo ‘flex-fuel’, com motor capaz de usar etanol hidratado ou gasolina, e suas misturas.

Nas últimas décadas a preocupação mundial com os impactos ambientais gerados pela queima de combustíveis fósseis e a instabilidade recorrente no mercado de petróleo colocou novamente em destaque o uso dos biocombustíveis e, no ano de 2005, o Brasil implantou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, sancionado pela Lei 11.097. Esta Lei foi criada pelo governo federal para incentivar a produção de biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas, sobretudo focada em matérias-primas que pudessem promover o desenvolvimento das regiões mais pobres, como a região semiárida do nordeste do Brasil. A partir deste marco o biodiesel foi introduzido na Matriz Energética Brasileira, com percentuais mínimos de adição deste ao óleo diesel oriundo do petróleo e comercializado em todo o território nacional, começando com 2% (B2) em 2005, aumentando para 3% (B3) no segundo semestre de 2008 e 5% (B5) a partir de 2010.

O Cenário apresentado acima sugere o estabelecimento de um mercado agroindustrial que aumentou a demanda por biomassas oleaginosas e, por conseguinte, incrementou a oferta de resíduos/coproduto agroindustrial. De fato isso tem acontecido e cabe mencionar que até pouco tempo o valor dos materiais residuais era subestimado, pois seus principais empregos se restringiam a adubação orgânica e alimentação animal, quando possível. Hoje a busca por diversificação do uso das biomassas residuais da cadeia produtiva do biodiesel, agregando-lhe valor, faz parte de estratégia para tornar este mercado mais competitivo e sustentável.

A utilização dos resíduos da cadeia do biodiesel para a produção de álcool combustível é uma alternativa para o aproveitamento da energia contida nessas biomassas, com consequente agregação de valor, e pode ser realizada tanto por rota química quanto biológica. Basicamente dois processos estão envolvidos nesta transformação: a hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares; e a fermentação destes em etanol ou outros combustíveis (RABELO, 2010). Considerando a ampla disponibilidade deste tipo de matéria-prima no Brasil e seu baixo custo, quando comparado com outros países, o uso de tais biomassas residuais se apresenta como opção bastante atraente do ponto de vista econômico.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo otimizar processos de pré-tratamento e sacarificação do resíduo sólido advindo da extração do óleo de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq), chamado torta de dendê, para produção de bioetanol de segunda geração baseado, portanto, no aproveitamento de sua fração celulósica.



## 2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial da torta de dendê como insumo para produção de bioetanol de segunda geração.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

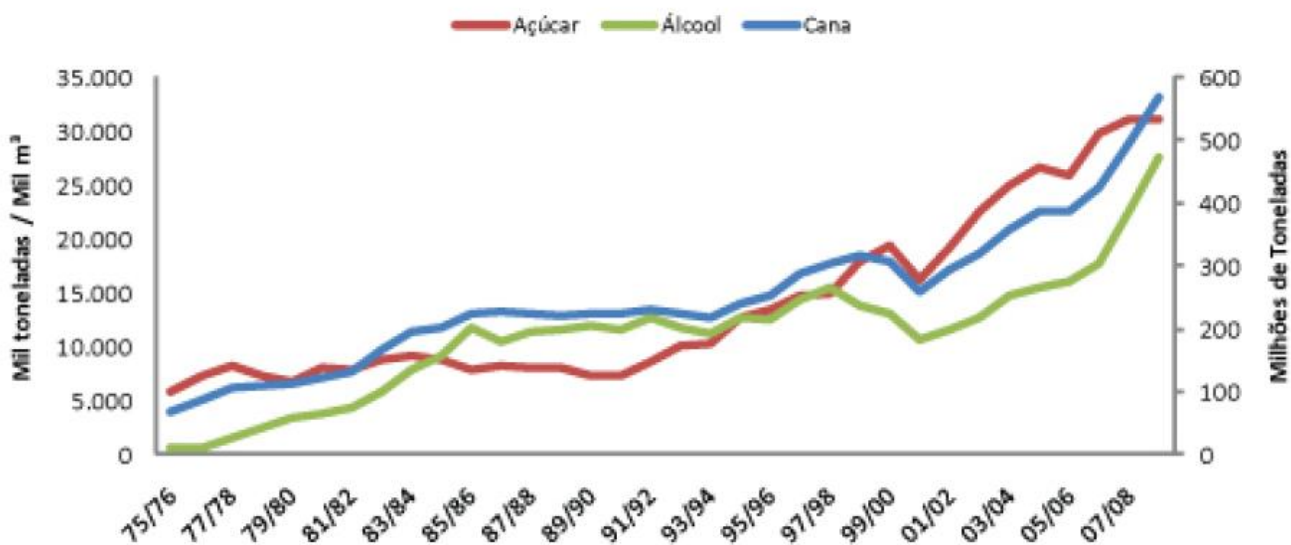
- ✿ Caracterizar a torta de dendê (*Elaines guineensis*) quanto a aspectos químicos relevantes: umidade, proteína total, lipídeos, cinzas totais, fibra bruta, fibra solúvel em detergente ácido (FSDA), fibra solúvel em detergente neutro (FSDN), celulose, lignina, hemicelulose, amido e açúcares solúveis totais;
- ✿ Avaliar os efeitos da concentração do ácido sulfúrico, da razão sólido/líquido e do tempo sobre o processo de pré-tratamento ácido da torta de dendê através do uso de planejamento fatorial;
- ✿ Implementar pré-tratamento alcalino para a remoção da lignina da torta de dendê;
- ✿ Avaliar os efeitos da concentração de celulase, da razão sólido/líquido e do tempo sobre o processo de sacarificação enzimática da fração celulósica da torta de dendê; e
- ✿ Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado celulósico para produção de bioetanol utilizando levedura *Saccharomyces cereviasae* comercial.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

O etanol vem sendo usado como combustível para veículos automotores no Brasil desde os anos 1920 e foi introduzido legalmente na matriz energética nacional a partir do decreto 19.717 de 1931, assinado por Getúlio Vargas, que previa a adição de 5% de bioetanol anidro à gasolina. No entanto, somente com o advento do programa Pró-Álcool, em novembro de 1975, que seu papel ficou claramente definido em longo prazo, permitindo que o setor privado investisse maciçamente no aumento de produção.

A motivação do governo para lançar o Pró-Álcool foi respaldada no peso devastador da conta do petróleo na balança de pagamentos do país, que importava na época mais de 80% do petróleo que consumia (LEITE e LEAL, 2007), nesse período o preço do barril de petróleo triplicou devido principalmente às diversas crises do petróleo, sendo as duas mais graves ocorridas na década de 1970. A queda de preço e a volta do fornecimento internacional de petróleo, fez com que a política de promoção do álcool no Brasil fosse sendo esquecida e somente após um período de estagnação de cerca de 15 anos é que a produção de etanol voltou a crescer novamente. Rosa e Garcia (2009) comentaram que esse crescimento está ligado a dois fatores principais: a legislação de diversos estados norte-americanos que determinou em 2003 que o éter metil-terbutílico – MTBE, aditivo à gasolina que apresentava problemas ambientais, fosse substituído pelo etanol; e a introdução do etanol, no Brasil, igualmente em 2003, de veículos com motor flexfuel. Enquanto isso o álcool sofreu influencia da cana-de-açúcar que também estava ligada a produção do açúcar, sendo esse mercado inversamente proporcional a produção e comercialização do álcool, logo com o gradativo aumento na produção de cana desde o início da década de 90 até meados de 2006, elevou-se a produção de açúcar no Brasil (PORTELA, 2011), como demonstrado na Figura 1.

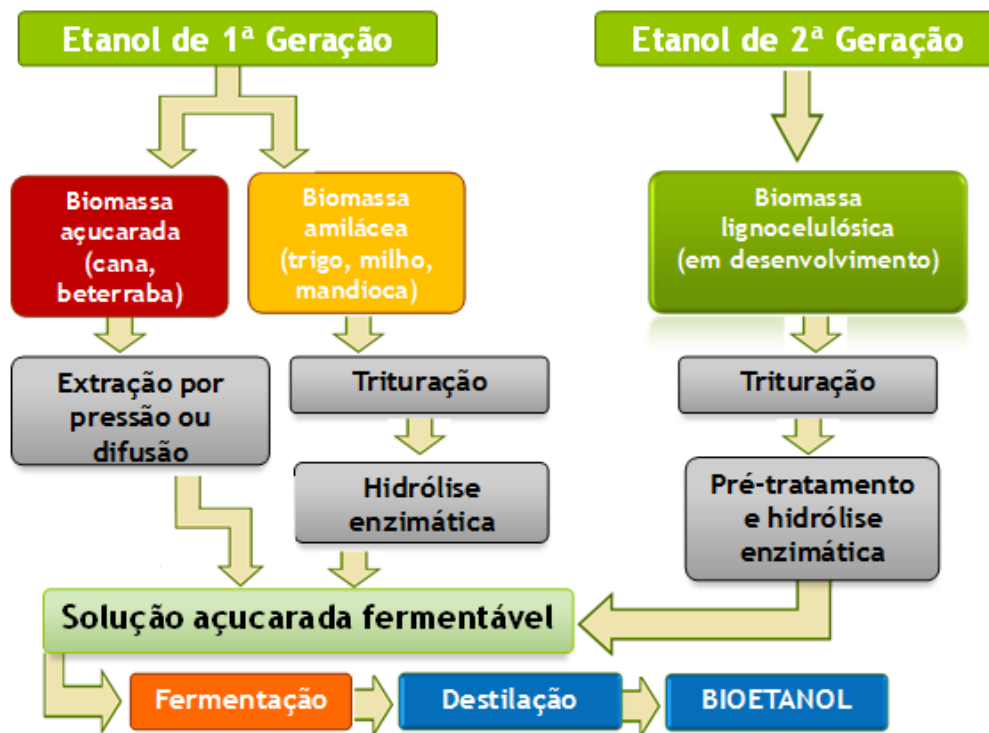


**Figura 1-** Histórico da produção de açúcar e álcool no Brasil.

Fonte: UNICA (2009)

O álcool a partir da cana-de-açúcar, cultura com tradição desde a época colonial, obteve melhores condições na implantação do Pró-Álcool, em detrimento ao álcool produzido de outras fontes vegetais como, por exemplo, a mandioca que não dispunha de meios produtivos desenvolvidos e confiáveis. Carvalho (2008) reportou que a indústria sucroalcooleira no país se modernizou e continuou alcançando novos patamares de produtividade, despontando como uma das maiores produtoras de álcool etílico do mundo.

Atualmente, a produção de biocombustíveis convencionais defronta-se com sérias dificuldades para atingir os níveis desejados, o que constitui forte estímulo à adoção de tecnologias mais avançadas capazes de melhorar o desempenho da produção no setor, onde se destaca o etanol de segunda geração. Este tipo de etanol se diferencia do convencional por utilizar rotas ainda em desenvolvimento, especialmente com base em resíduos lignocelulósicos, chamado, também, de etanol lignocelulósico. Dentre os resíduos utilizados, temos os resíduos agrícolas (palha-de-trigo, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de milho e arroz) e os resíduos florestais (pó e restos de serraria, pontas e galhos finos de espécies florestais nativas ou exóticas) se destacando como fonte de maior interesse graças ao baixo custo destas matérias-primas (HÄGERDAL et al., 2006; SILVA, 2010). Na Figura 2 estão apresentadas as possíveis rotas para produção de bioetanol a partir de diferentes biomassas.



**Figura 2-** Rotas tecnológicas para produção de bioetanol de primeira e segunda geração.  
 Fonte: Adaptado de BNDES e CGEE (2008)

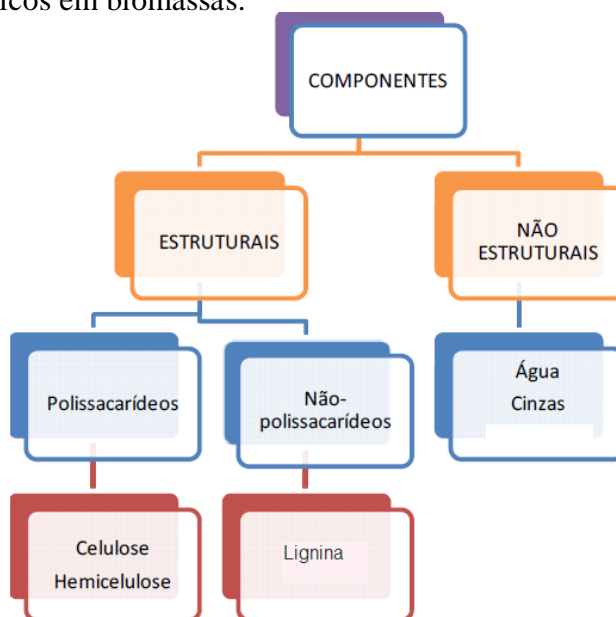
Diversos estudos e documentos sugerem que o etanol como biocombustível será redentor da viabilidade da bioenergia e poderá, então, ser considerada uma fonte energética moderna e sustentável. Pois, embora o bioetanol de segunda geração não esteja ainda disponível em escala comercial, na medida em que os processos se desenvolvam poderão se tornar competitivos e economicamente viáveis. A boa relação entre a energia produzida e a demanda reduzirá o impacto ambiental, contribuindo para mitigar a mudança climática (BNDES e CGEE, 2008).

O bioetanol de segunda geração, obtido por hidrólise química ou enzimática de materiais lignocelulósicos e fermentação, vem sendo produzido desde o fim do século XIX, no entanto somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta a fim de atender o mercado de combustíveis (SILVA, 2010). A demanda por este combustível, em nível nacional e internacional, tende a aumentar em função da sua versatilidade e disponibilidade de matérias-primas, tanto no setor de automotores com tecnologia *flexfuel* como na indústria do biodiesel a qual apresenta, também, na sua produção, a necessidade de consumo de álcool como insumo no processo de transesterificação. Neste cenário existe ainda a proposição de integração dessas duas indústrias, onde a biomassa gerada após a extração do óleo para produção de biodiesel poderia ser empregada na obtenção de etanol de segunda geração (CORTEZ, 2010).

### 3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O termo biomassa é conceituado como recursos naturais que dispõem de bioenergia e que podem ser processados para fornecer formas energéticas mais elaboradas e adequadas para o uso. Deste modo, podem ser relacionados como exemplos de fontes de bioenergia a lenha e os resíduos de serrarias, o carvão vegetal, o biogás resultante da decomposição anaeróbia de lixo orgânico e outros resíduos agropecuários, bem como os biocombustíveis líquidos, como o bioetanol e o biodiesel, e a bioeletricidade, gerada pela queima de combustíveis como o bagaço e a lenha (BNDES e CGEE, 2008). No amplo contexto da bioenergia, a produção de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa tem sido apreciada para atender particularmente às necessidades de transporte veicular. Para tais fins, ainda não existem outras alternativas renováveis bem estabelecidas, além dos biocombustíveis, que já apresentam maturidade tecnológica e viabilidade econômica (ZHANG e SMITH, 2010).

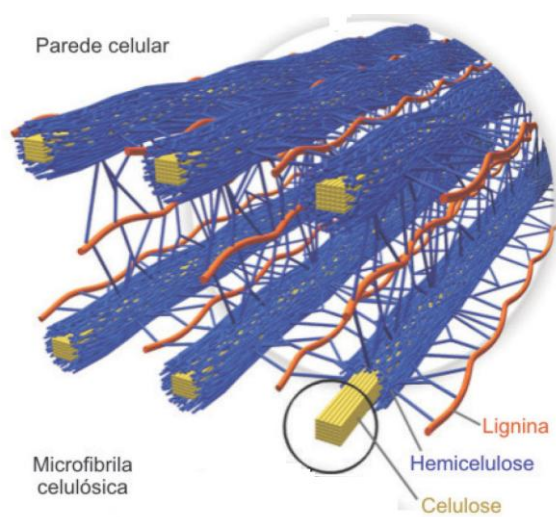
A biomassa lignocelulósica que compõe a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera e que representa a fração mais expressiva da biomassa vegetal é constituída por três frações principais, celulose, hemicelulose e lignina. Tais frações, juntas, perfazem mais de 90% da massa seca total (HARMSSEN et al., 2010) e dependendo da origem do vegetal, podem ainda, ser encontrados outros componentes secundários como resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, os de cálcio, potássio e magnésio (NEUREITER et al., 2002). Na Figura 3 encontra-se um esquema geral da composição dos componentes lignocelulósicos em biomassas.



**Figura 3-** Classificação química dos componentes da biomassa lignocelulósica.

Fonte: Adaptado de Jiménez (2009).

A biomassa lignocelulósica é composta por celulose que é uma matriz amorfa que age como uma barreira natural ao ataque de micro-organismos e/ou enzimas, sendo esta, basicamente, um esqueleto que é circundado pela hemicelulose e pela lignina que dá certa rigidez, estando todos intimamente associados entre si, conforme indicado na Figura 4. A participação desses constituintes na biomassa varia muito de uma espécie vegetal para outra, ou até mesmo, dentro da mesma espécie. Este fato é observado quando são analisadas partes diferentes do vegetal (MILEO, 2011).



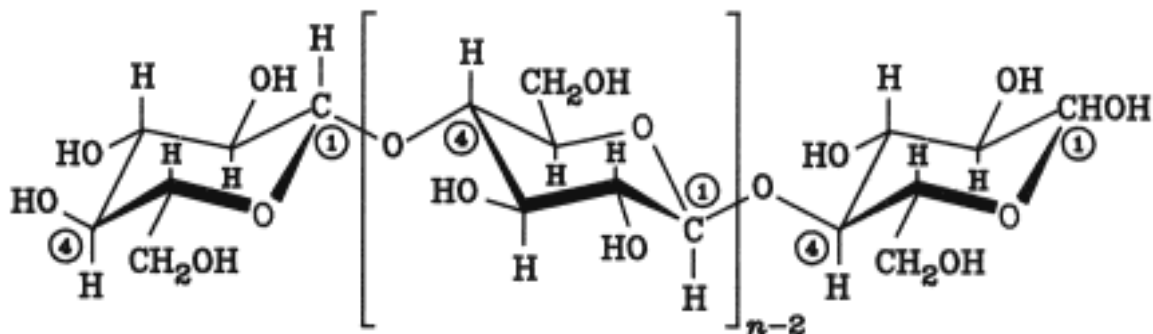
**Figura 4-** Estrutura lignocelulósica de uma biomassa vegetal evidenciando um esqueleto de celulose circundado por hemicelulose e lignina.

Fonte: Adaptado de Canilha et al. (2010)

### 3.2.1 CELULOSE

A celulose é o principal componente estrutural da parede vegetal, é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (CANILHA et al., 2010). O tamanho da cadeia da celulose varia de 100 a 14000 resíduos de açúcar, de acordo com sua origem vegetal, e grau de polimerização que esta tenha sofrido. Segundo Hedrinks e Zeeman (2009) a celulose é estabilizada por interações de hidrogênios intra e intermoleculares, sendo estas interações realizadas pela hidroxila ligada ao carbono três e o oxigênio do anel piranosídico do monossacarídeo adjacente (Figura 5). Essas ligações atribuem alta rigidez e ordenação à estrutura, criando as denominadas regiões cristalinas, responsáveis pela insolubilidade e pouca reatividade da molécula, que constituem uma das maiores barreiras para o aproveitamento biotecnológico da fração. Farinas (2011) reportou que há diferentes graus de

ordenação que ocorrem desde regiões cristalinas altamente ordenadas até regiões menos ordenadas ou amorfas. Mencionou ainda, que as regiões de elevada cristalinidade são pouco acessíveis por solventes e reagentes e que em contrapartida, as regiões relativamente mais desordenadas (amorfas) são mais acessíveis e mais susceptíveis a reagentes químicos.



**Figura 5-** Estrutura química da celulose.

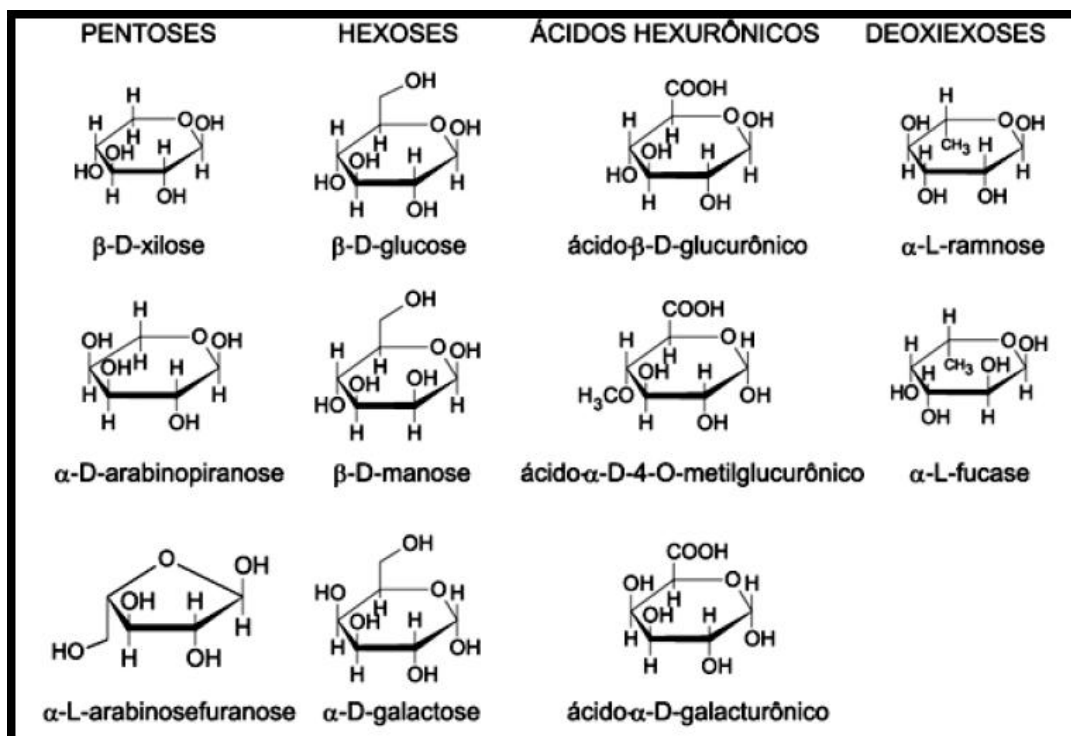
Fonte: Harmsen et al. (2010)

As fibras de celulose, quando colocadas em contato com água e certos solventes orgânicos, sofrem intumescimento, que pode ser intercrystalino ou intracrystalino. No primeiro caso o agente intumescedor penetra nas regiões amorfas da microfibrila da celulose e nos espaços entre elas causando inchamento das fibrilas. O caso mais comum de intumescimento intercrystalino é o intumescimento da celulose em água. No segundo caso o agente intumescedor penetra nas regiões cristalinas das microfibrilas sendo este efetuado pelo uso de soluções concentradas de ácidos e bases fortes e de soluções de alguns sais (FIDALE, 2010). A celulose quando hidrolisada origina polímeros menores, oligossacarídeos, que, após hidrólises mais extensas, origina celobiose e monômeros de glicose (BETANCUR, 2005) que podem ser fermentados para produzir etanol.

### 3.2.2 HEMICELULOSE

O termo hemicelulose é aplicado aos polissacarídeos compostos por diferentes unidades de açúcares formando cadeias lineares e altamente ramificadas (BRUICE, 2006). Podem ser constituídas por unidades de: xilose, manose, glicose, galactose, arabinose, alguns ácidos urônicos, e outros que são encontrados na parede celular de plantas. A hemicelulose tem diferente composição e estrutura dependendo da sua fonte e do método de extração (Figura 6). O tipo mais comum de polímeros que pertence à família da hemicelulose é a xilana, sua molécula possui

estrutura linear constituída de D-xilopirranose unidas por ligações  $\beta$  (1-4) com ramificações arabinosil e/ou acetil, dependendo da espécie vegetal em que se encontra.



**Figura 6-** Representação esquemática das diferentes estruturas que compõe a hemicelulose

Fonte: Morais (2005)

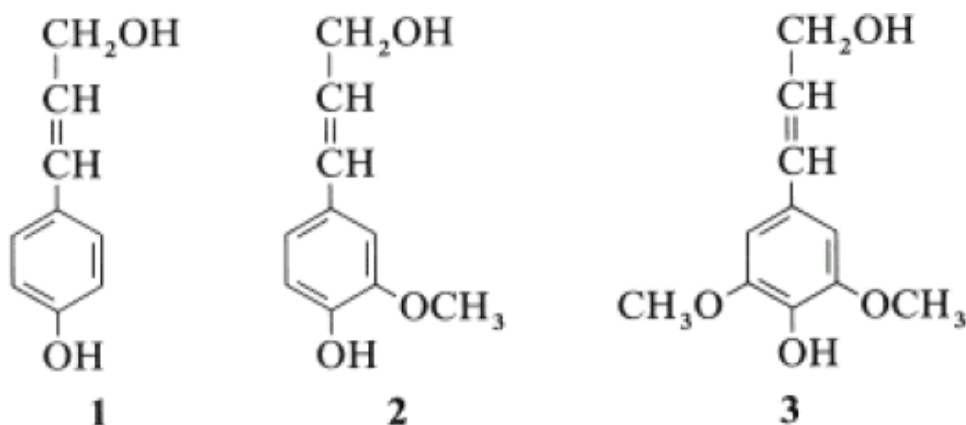
Um aspecto importante da estrutura e composição das hemiceluloses é a falta de regiões cristalinas, decorrentes, principalmente da presença de estrutura altamente ramificada, e de grupos acetil, ligados à cadeia do polímero. Embora não haja evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpretação física existente entre elas tornam a sua separação quantitativa difícil. A presença de hemicelulose junto à celulose resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade destas (FIDALE, 2010).

### 3.2.3 LIGNINA

A lignina, depois da celulose, é a substância orgânica polimérica mais abundante nas plantas. Esta macromolécula polifenólica, apresenta uma conformação tridimensional e amorfa, associada à parede vegetal, conferindo à planta resistência a ataques microbiológicos e mecânicos,



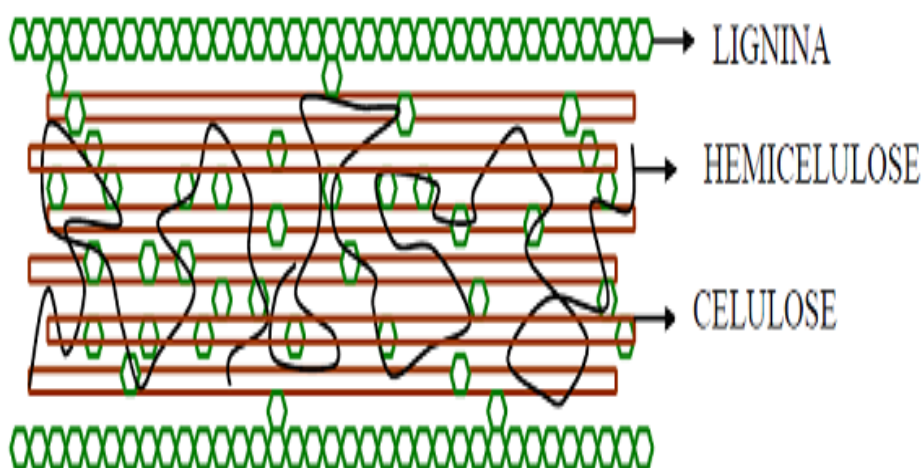
além de rigidez e impermeabilidade (PACHECO, 2011). A lignina possui uma elevada massa molecular, e é formada a partir da junção de vários ácidos e alcoóis fenilpropílicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) (Figura 7) (JIMÉNEZ, 2009).



**Figura 7-** Estrutura dos álcoois, álcool cumarílico (1), álcool coniferílico (2) e álcool sinapílico (3) precursores da lignina.

Fonte: Marabezi (2009)

O grau de solubilidade da lignina varia em função do tipo de material lignocelulósico e das condições hidrolíticas empregadas. A interação entre lignina, celulose e hemicelulose, determina a estrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos, conforme ilustrado na Figura 8. A íntima associação entre as três frações citadas é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros com elevado grau de pureza (SUN, 2002).



**Figura 8-** Representação esquemática da estrutura das fibras lignocelulósicas

Fonte: Mussato (2010).

### 3.3 TORTA DE DENDÊ

O uso da biomassa para a produção de energia e biocombustíveis é considerada por muitos países como sendo um dos caminhos tecnológicos mais promissores deste século devido à combinação harmoniosa entre desenvolvimento econômico e conservação ambiental. Tal fato ocorre, principalmente, em países em via de desenvolvimento, devido a estímulos do uso de biomassas de origem vegetal.

O Brasil tem capacidade para produzir combustíveis alternativos a partir de diversas espécies oleaginosas, dentre as espécies apresentadas na Tabela 1, o dendê destaca-se como uma das biomassas mais produtivas em óleo e conta com aproximadamente 75 milhões de hectares de terras aptas à sua cultura, sendo o norte e nordeste as principais regiões produtoras (FERREIRA, 2011).

**Tabela 1-** Características de algumas culturas vegetais com potencial teor oleaginoso.

Espécie	Origem do Óleo	Conteúdo de Óleo (%)	Rendimento em óleo t/ha	Autor/ano de publicação
Dendê ( <i>Elaeis guineenses</i> N.)	Polpa	26	4,0	MAPA (2007)
Girassol ( <i>Helianthus annuus</i> )	Grão	39,3	0,55	Negrette et al. (2011)
Canola ( <i>Brassica campestris</i> )	Grão	38	0,570	MAPA (2007)
Manona ( <i>Ricinus communis</i> )	Grão	44,7	1	Negrette et al. (2011)
Amendoim ( <i>Arachis ipgaea</i> )	Grão	49	0,9	Abdalla et al. (2008)
Soja ( <i>Glycine max</i> )	Grão	21,7	0,48	Negrette et al. (2011)
Pinhão manso( <i>Jatropha curcas</i> )	Grão	38	1,9	MAPA (2007)
Algodão	Grão	30- 40	-	ABIOVE (2011)

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; ABIOVE= Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira originada da Costa Ocidental da África (Golfo do Guiné) e foi introduzida no continente americano a partir do século XV. A palma, por ser uma cultura perene de grande porte, com colheita contínua durante o ano todo, possibilita o perfeito recobrimento da área quando adulta, e na fase jovem, é associada às leguminosas de cobertura de solo, podendo ser considerado um sistema de boa estabilidade ecológica e de baixo impacto ambiental (RENDEIRO, 2008).

O dendezeiro possui grande potencial de produção, em média de 20 a 22 toneladas de cachos de fruto fresco (CFF) por hectare, com taxa de extração média em torno de 20 a 22%, o que representa aproximadamente 4 a 6 toneladas de óleo de palma/ano (SILVA, 2009). Comparada com o rendimento anual de óleos vegetais brutos de outras oleaginosas, o dendê, possui a maior

produtividade (SANTOS, 2008), e seu rendimento em frutos (kg/ha), comparado ao da soja e da mamona, é aproximadamente oito vezes maior (MAPA, 2007; CONAB, 2010).

A partir do fruto do dendê (Figura 9) podem-se obter dois tipos de óleo: o óleo de dendê extraído do mesocarpo, conhecido no mercado internacional como “palm oil” e o óleo de palmiste, extraído da semente, conhecido internacionalmente como “palm kernel oil”. A partir desta cultura, vários resíduos, que podem ser utilizados como subprodutos, são gerados, dentre estes podemos destacar as fibras, pedúnculos de cachos, casca das amêndoas, efluentes líquidos e a torta, a qual geralmente é utilizada como adubo orgânico, ração animal ou como material para capear (NUNES e ALVES, 2010).



**Figura 9** – Aspecto morfológico do fruto do dendê *Elaeis guineenses*

Fonte: Vale - <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=biodiesel-dende-vai-abastecer-216-locomotivas-carajas> (2013).

Nas últimas décadas o dendezeiro tem sido avaliado e explorado para uso como matéria-prima para produção de biodiesel; no final de 2010 foi lançado no Brasil pelo governo federal o “Programa Nacional de Estimulo à Produção de óleo de Palma” (Decretos nº 5.297/04 e nº 5.457/05), cujo foco principal é a sustentabilidade de regiões de florestas com destinação do óleo para produção de biocombustíveis. Atualmente, o “Programa Nacional de Estimulo à Produção de óleo de Palma” vem sendo implantado com apoio da iniciativa privada e política pública, e engloba controle de áreas de plantio, crédito, pesquisa e formação técnica. Cabe mencionar que de 1990 a 2009 a produção de dendê cresceu de 522.883 para 1.122.216 toneladas (PA e BA), sendo o Norte e Nordeste as principais regiões produtoras (IBGE, 2010). Segundo Sarkan et al. (2012) em

vista a grande área de aptidão para o cultivo dessa espécie, as perspectivas de crescimento são ainda maiores, pois, estimam cerca de 100 bilhões de Litros de óleo em 2015. De acordo com o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento-PNDU (2011) o dendê foi apontado como uma das soluções tecnicamente satisfatórias para substituir o óleo diesel.

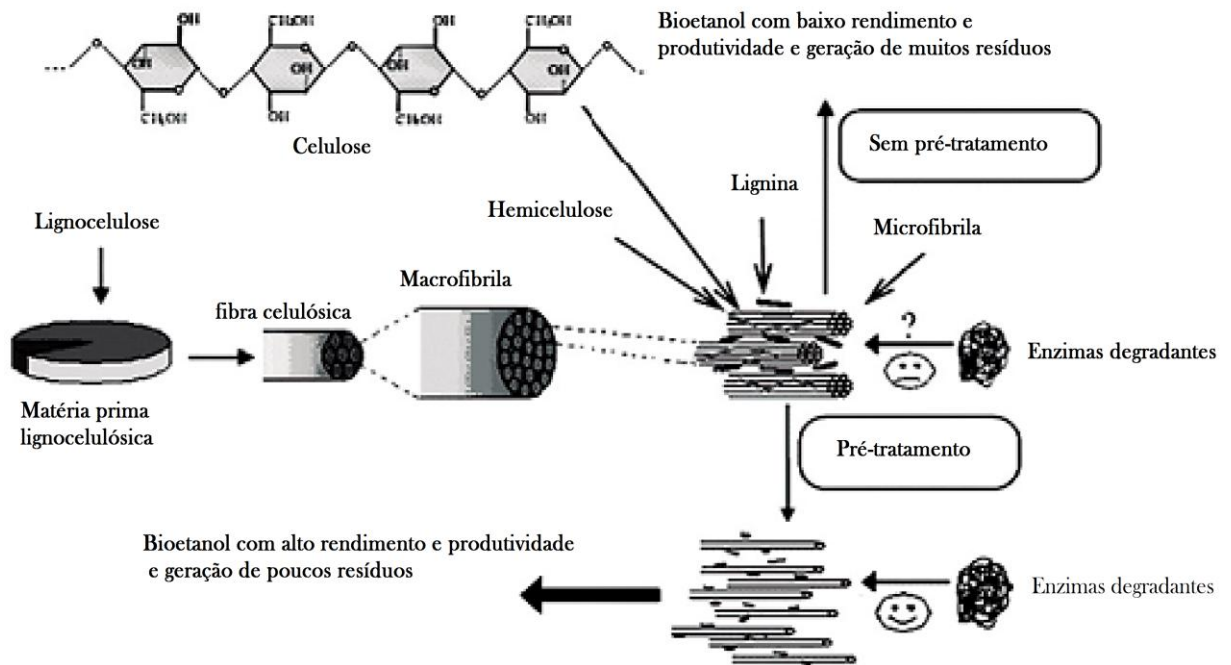
As características acima citadas têm estimulado estudos para o melhoramento desta palmácea, com vistas a torná-la apta para o cultivo comercial destinado a indústria do biodiesel. Este fato poderá ainda, contribuir com a redução dos dispêndios energéticos e financeiros destinados a produção dessas espécies, bem como evitar os entraves relacionados ao fornecimento de matéria-prima ocasionados pela sazonalidade, (SILVA, 2009). Os fatos comentados nos permitem conjecturar que essa cultura é uma promissora fonte de produção de biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol.

### **3.4 PRÉ-TRATAMENTO**

No processo de obtenção do etanol observam-se algumas dificuldades advindas da natureza química das paredes celulares vegetais. Devido à íntima associação, rígida e quimicamente complexa, existente entre os três componentes poliméricos das biomassas lignocelulósicas, a liberação dos polissacarídeos na forma de açúcares fermentescíveis para produção de etanol está entre as mais importantes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento do etanol celulósico (FITZPATRICK et al., 2010). Na parede celular dos vegetais, a celulose é envolvida por uma camada composta de uma combinação de lignina e hemicelulose, para a obtenção de substratos fermentescíveis tornou-se imprescindível estudos visando melhorar a eficiência do processo de hidrólise, para o qual são necessárias etapas de pré-tratamento adequadas, que apresentem características de alta eficiência, baixo custo, com reagentes facilmente recuperáveis, e que sejam aplicáveis a diversos substratos. O efeito do pré-tratamento na transformação da biomassa, encontra-se ilustrado na Figura 10, onde se pode observar a alteração da estrutura lignocelulósica e aumento da área superficial, que facilita a acessibilidade das enzimas celulolíticas.

O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais; além disso, evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de subprodutos que possam inibir os micro-organismos fermentadores (SILVA, 2010; PEJÓ, 2010). Dentre os diversos tipos de pré-tratamento os mais comumente utilizados são: hidrólise ácida, hidrólise alcalina, explosão de amônia (amônia fiber explosion), explosão de CO<sub>2</sub>, explosão a vapor, ozonólise, deslignificação oxidativa e processo organosolv

(OGEDA e PETRI, 2010). Na Tabela 2 encontram-se listados os principais tipos de pré-tratamentos empregados na produção de bioetanol de segunda geração.



**Figura 10** - Efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas degradantes.  
 Fonte: Adaptado de Taherzadeh e Karimi (2008).

**Tabela 2** – Diferentes tipos de pré-tratamentos aplicados a biomassas lignocelulósicas para produção de bioetanol e suas respectivas vantagens.

Processo de Pré-tratamento	Descrição/vantagem
Oxidação Úmida	Consiste em colocar a biomassa em contacto com a água a elevadas temperaturas, na presença de oxigênio. Apresenta como vantagem baixa produção de subprodutos.
Tratamento com ozônio	Consiste em um método que utiliza grande quantidade de ozônio no processo e apresenta como vantagem a eliminação efetiva da lignina, a não geração de produtos tóxicos que possam afetar as etapas posteriores do processo, e o fato da reação se processar à temperatura ambiente e à pressão atmosférica.
Hidrólise Alcalina	Consiste no inchamento da biomassa, fomentando um aumento da área superficial, pelo uso de bases, como hidróxidos de sódio, cálcio, ou amônio. Tem por vantagem uma diminuição da cristalinidade, uma melhor separação entre as unidades estruturais da lignina e dos polissacarídeos, com simultânea degradação da mesma.
Organosolv	O tratamento consiste em aplicar uma mistura de solventes orgânicos ou aquosos (metanol, etanol, acetona e etilenoglicol) juntamente com um catalisador ácido (ácido clorídrico ou sulfúrico). Tem por vantagem provocar a ruptura das ligações internas da lignina e da hemicelulose.
Explosão a vapor (EV)	Versa sobre um pré-tratamento hidrotérmico, onde a biomassa é submetida à ação de vapor saturado, durante um determinado período de tempo, que pode variar desde alguns segundos a vários minutos. Após este tratamento, o material é submetido a uma brusca descompressão. Tem por vantagem promover a hidrólise dos polissacarídeos.
<i>Liquid Hot Water</i> (LHW) (Pré-tratamento hidrotérmico)	Consiste no tratamento da biomassa lignocelulósica com água no estado líquido, a alta pressão e temperatura, hidratando a celulose e removendo a hemicelulose e parte da lignina. Esta hidratação da celulose provoca um aumento da área superficial acessível da biomassa, melhorando-a para a hidrólise enzimática. Tem como vantagens o curto período de tempo empregado no processo e por não necessitar de reagentes corrosivos, e consequentemente, não precisar utilizar equipamentos resistentes a corrosão.
AFEX – <i>Ammonia Fiber Explosion</i>	O método AFEX consiste no tratamento prévio do material com amoníaco líquido sob pressão, a temperaturas que rondam os 90°C, durante aproximadamente 30 minutos. As vantagens do processo estão relacionados a recuperação e reutilização de quase toda a amônia, estabilidade da biomassa tratada por longos períodos e, preservação da celulose e hemicelulose evitando a formação de subprodutos inibidores de atividade enzimática. Neste processo não há necessidade de neutralização da biomassa, antes do processo de hidrólise enzimática.

Fonte: Barbosa (2011); Pejó (2010), Taherzadeh e Karimi (2007), Silva (2009) e Dominguez (2003).

A obtenção de etanol a partir de biomassa envolve, basicamente, duas etapas. A primeira consistindo na hidrólise dos polissacarídeos, gerando principalmente mono e dissacarídeos e a

segunda, envolvendo a fermentação dos monos e dissacarídeos em etanol. A hidrólise de celulose gera glicose e celobiose (um dímero de glicose), por outro lado, a hidrólise da hemicelulose gera açúcares (principalmente pentoses) e da lignina, subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana (OGEDA e PETRI, 2010).

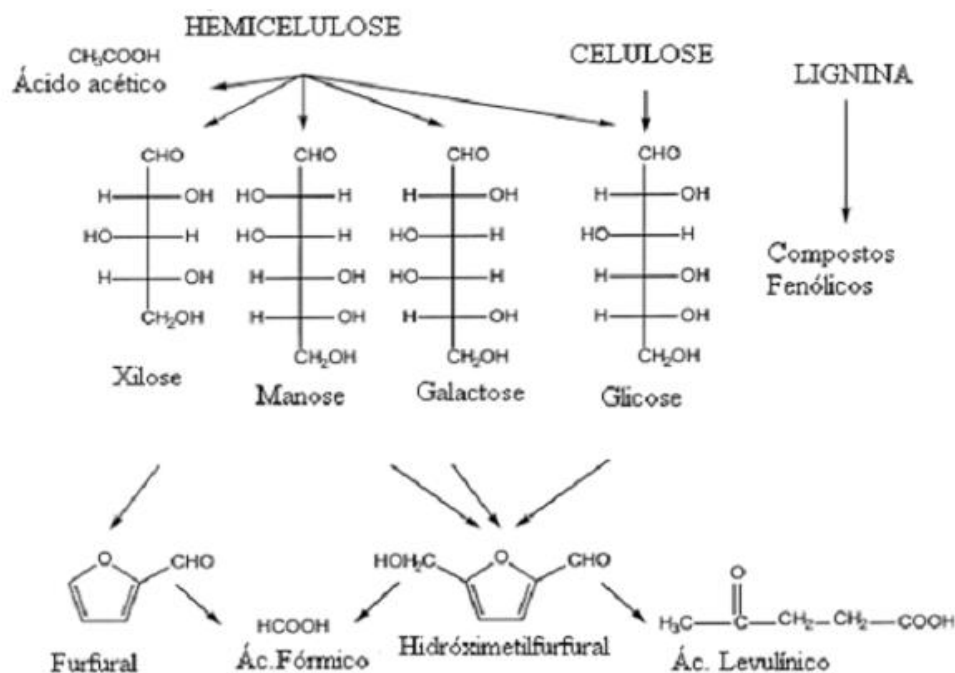
### 3.4.1 HIDRÓLISE ÁCIDA

O uso de ácidos para hidrolisar biomassas lignocelulósicas é relativamente antigo, considerando-se que sua utilização data do fim do século XIX.

A hidrólise ácida consiste num processo químico que, através da ação de catalisadores, transforma as cadeias dos polissacarídeos constituintes da biomassa (celulose e hemicelulose) em seus monômeros elementares, visando reduzir o teor de hemicelulose (ALVIRA et al., 2010). Para tal fim, segundo Barbosa (2011) pode ser utilizado ácido sulfúrico, clorídrico, sulfuroso, fosfórico, nítrico e fórmico, sendo que apenas o sulfúrico e o clorídrico são utilizados industrialmente.

A desvantagem do pré-tratamento ácido são os produtos gerados durante o processo, pois o ácido quando submetido a altas temperaturas promove a desidratação dos açúcares liberados em furfural, o qual é formado a partir da degradação das pentoses, ou hidroximetilfurfural (HMF), formado a partir da degradação das hexoses (NORONHA et al., 2010). O furfural pode ainda se degradar a ácido fórmico ou se polimerizar, e o HMF pode originar quantidades equimoleculares de ácidos fórmico e levulínico. Além do furfural, HMF e dos dois ácidos alifáticos (fórmico e levulínico) forma-se o ácido acético procedente da hidrólise dos radicais acetilas da hemicelulose (MACEDO, 2008), todos inibidores do processo fermentativo.

Na Figura 11 estão apresentadas as reações que ocorrem durante o processo de hidrólise ácida e alguns compostos que interferem no processo fermentativo, formados no final da reação.



**Figura 11-** Reações e compostos formados durante o processo de hidrólise ácida do material lignocelulósico. Fonte: Palmqvist e Haagerdal (2000)

### 3.4.2 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO

O termo pré-tratamento alcalino é utilizado para designar tecnologias que aplicam soluções alcalinas, tais como hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) ou hidróxido de amônia (NH<sub>4</sub>(OH)), para remover a lignina e parte da hemicelulose, aumentando eficientemente a acessibilidade da enzima à celulose (SILVA, 2010).

Os processos de pré-tratamento alcalinos geralmente utilizam condições de temperatura e pressão moderadas. Este processo em comparação aos sistemas de pré-tratamento ácidos são mais econômico e degradam menos a celulose (OLIVEIRA, 2007). O efeito deste pré-tratamento depende do conteúdo de lignina presente no material, pois seu principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, alterando a estrutura da celulose e promovendo maior reatividade da fibra, o que facilita a ação das enzimas celulolíticas (SILVA, 2010). Segundo Lynd et al. (2002) a incubação de materiais celulósicos de forma natural, ou seja, sem aplicação de pré-tratamento, na presença de enzimas celulases resulta em rendimentos inferiores a 20%, devido à forte ligação da celulose com a lignina, que constitui uma barreira física à penetração das enzimas.

A hidrólise alcalina provoca um intumescimento (“*swelling*”) da biomassa, promovendo aumento da área superficial, diminuição da cristalinidade, melhor separação entre as unidades



estruturais da lignina e os polissacarídeos, e simultaneamente a degradação da lignina. Neste processo evidencia-se uma cisão das ligações lignina-carboidrato, além da fragmentação da estrutura da lignina.

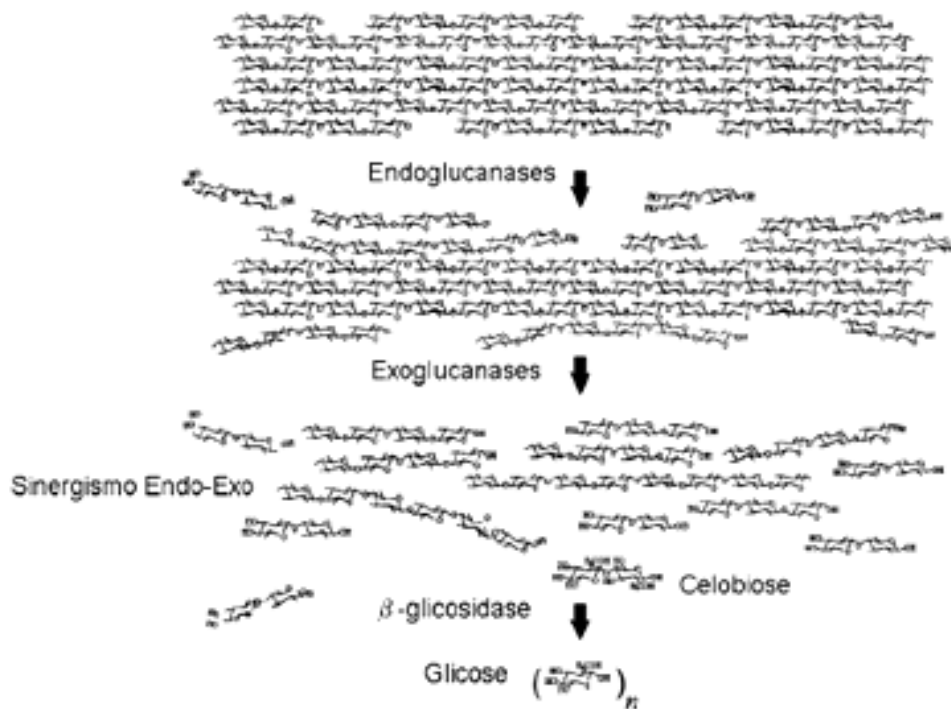
Segundo Ogeda e Petri (2010), os processos alcalinos devem ser preferencialmente utilizados no pré-tratamento de materiais com maior teor de lignina, a exemplo dos resíduos agroindustriais, a fim de minimizar a quantidade da mesma.

### **3.5 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

As enzimas são utilizadas há várias décadas como catalisadores biológicos para a produção de etanol por hidrólise do amido. A hidrólise da celulose, entretanto, é muito mais complexa, uma vez que envolve a quebra de polímeros mais resistentes e que estão protegidos por outros materiais, também resistentes ao ataque químico, como a lignina e a hemicelulose. Durante a sacarificação, ocorrem os seguintes passos: (1) a hemicelulose é hidrolisada de forma similar ao realizado em processo de hidrólise com ácido diluído; (2) ocorre a hidrólise propriamente dita, ou seja, a celulose é clivada por ação das enzimas. Devido a condições mais suaves aplicadas durante o processo, uma menor quantidade de subprodutos derivados da degradação de açúcares é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis (RABELO, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por um conjunto de enzimas, denominadas celulasas, as quais se constituem em um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente (Figura 12). Estas estão subdivididas em três classes: endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à liberação de celobiose, e 1,4- $\beta$ -D-glucosidades que catalisam a hidrólise dos oligossacarídeos a glicose (JUHÁ, 2004).

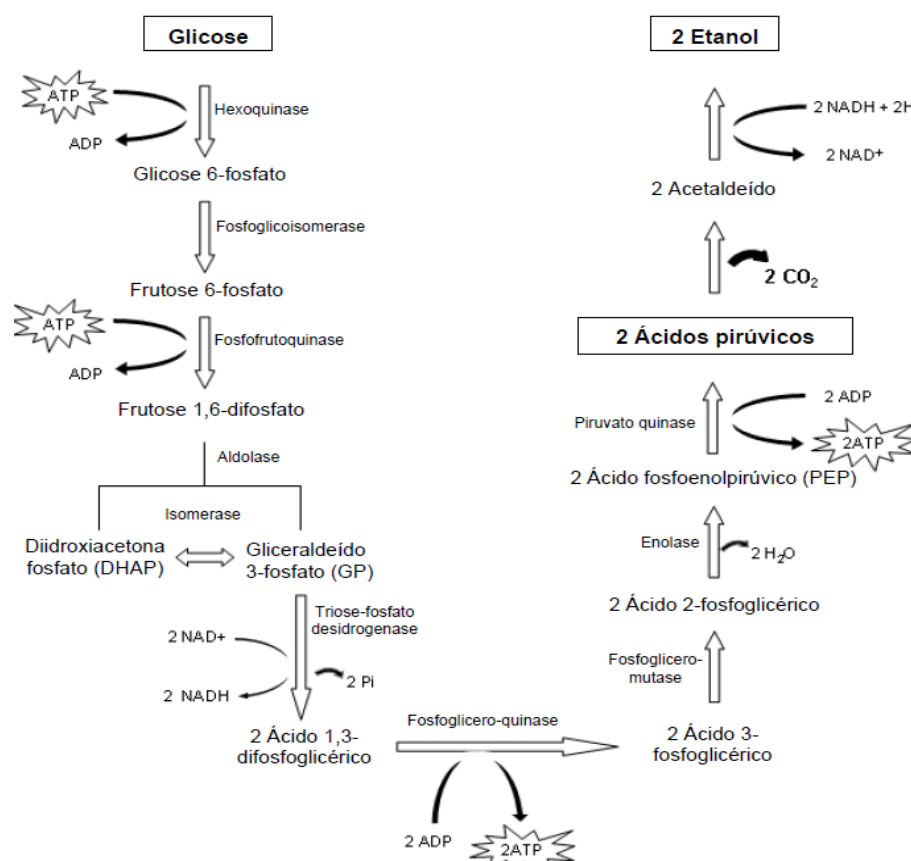
O rendimento da hidrólise enzimática depende de muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, o qual visa expor as cadeias de celulose; área superficial; cristalinidade; arranjo molecular; tamanho da partícula; porosidade do material; inibição da atividade enzimática pelos produtos finais, termoestabilidade das enzimas; concentração e adsorção do substrato; tempo de duração da hidrólise; pH do meio; temperatura; concentração de substrato e de enzima no meio, e taxa de agitação (SILVA, 2009).



**Figura 12.** Sistema enzimático do processo de degradação da celulose.  
 Fonte: Silva (2009).

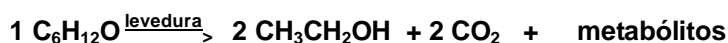
### 3.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação consiste na conversão anaeróbia de açúcares em dióxido de carbono e etanol por ação de micro-organismos, dos quais, resulta ainda, uma variedade de produtos tais como: ácidos orgânicos e outros álcoois (HASSAN, 2008), gerados com a finalidade de obter energia para o crescimento e manutenção das atividades metabólicas da própria célula. Tal processo consiste em uma série de reações químicas que se inicia com a glicólise, também chamada de *via Embden-Meyerhof*, na qual ocorre a oxidação da glicose em duas moléculas de ácido pirúvico, que são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de  $\text{CO}_2$ . As moléculas de acetaldeído obtidas são reduzidas por duas moléculas de  $\text{NADH}^+$  para formar duas moléculas de etanol, produto final da fermentação (Figura 13) (TORTORA et al., 2005). A via fermentativa é a via mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil, devido ao grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes que fornecem açúcares passíveis de fermentação microbiana. Na indústria, a fermentação é iniciada após as etapas de pré-tratamento e sacarificação dos polissacarídeos presentes nas biomassas vegetais, convertendo-os em moléculas de glicose ou outro açúcar fermentescível.



**Figura 13-** Representação esquemática da via glicolítica para obtenção de etanol.  
 Fonte: TORTORA, 2005

A reação de fermentação pode ser realizada por fungos ou bactérias, que se nutrem dos açúcares enquanto produzem dióxido de carbono e etanol. A reação líquida global envolve a produção de 2 mols de etanol, 2 mols de CO<sub>2</sub>, e 2 mols de ATP por mol de glicose fermentada, evidenciada na Equação 1. Com base no peso, cada grama de glicose pode, teoricamente, reverter a 0,51 gramas de etanol e 0,49 gramas de CO<sub>2</sub>. No entanto, parte dos açúcares presentes no meio é consumida em reações paralelas necessárias para a síntese de etanol, assim, além do etanol e gás carbônico, há também a formação de outros subprodutos em menores quantidades, como o glicerol e ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético e succínico. Além disso, a célula requer nutrientes para a síntese de nova biomassa e outras demandas relacionadas com a manutenção celular. Portanto, os rendimentos de etanol observados no processo são da ordem de 90% (DIAS, 2008).



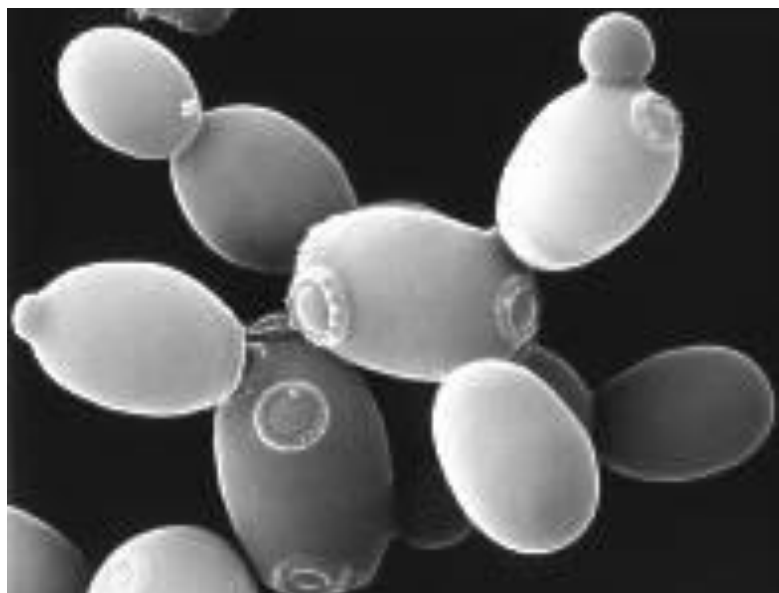
Equação 1

### 3.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

O gênero *Saccharomyces* (Figura 14) constitui um grupo de leveduras de vasto conhecimento humano, sendo o representante mais conhecido deste grupo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica e de panificação, bem como na produção de vinhos, etanol e outros. Atualmente, esta espécie é a mais utilizada no processo de produção de álcool combustível. Segundo Rabelo (2010) não existe micro-organismo mais apropriado para este fim, pois devido ao seu intensivo emprego na indústria de fermentações, já passaram por um processo de seleção natural, o que lhe permite melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica. Além deste fato, esta espécie é de fácil disponibilidade e manipulação, apresentando baixo custo.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo vivo com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria do meio de fermentação em resposta a alterações no meio, com grande impacto no rendimento do processo. Suas células são elípticas, medindo cerca de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento por 5  $\mu\text{m}$  de largura, e reproduzem-se assexuadamente por brotamento (ou gemulação) (CARVALHO, 2006; AMORIM, 2005).

De acordo com Pacheco (2010) geralmente leveduras são hábeis para crescer e eficientes na produção de etanol em valores de pH de 3,5 a 6,0 e em temperaturas entre 28 e 35°C. Temperaturas inferiores retardam a fermentação e temperaturas superiores ocasionam a evaporação do álcool e o aparecimento de contaminações. Além do pH e da temperatura, a fermentação pode também ser afetada pela linhagem e a concentração de levedura no meio (ATALA et al., 2000).



**Figura 14** Aspecto microscópico da células de *Saccharomyces cerevisiae*  
Fonte <http://beerstreetjournal.com/lager-yeast-mystery-solved/saccharomyces-cerevisiae/>

## 4.0 METODOLOGIA

As etapas experimentais realizadas no presente trabalho foram realizadas no Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação (LabBio) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), localizado no Campus I, Diamantina-MG.

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho experimental foi organizado em 5 etapas descritas a seguir:

**Etapa 1 Aquisição e tratamento da matéria-prima** - Etapa onde a torta de dendê foi adquirida e preparada para o experimento.

**Etapa 2 Caracterização química da torta de dendê** - Nesta etapa foi realizada a caracterização química da torta.

**Etapa 3 Processo de pré-tratamento** – Nesta etapa a torta de dendê foi submetida aos processos de pré-tratamento ácido e alcalino.

**Etapa 4 Processo de sacarificação enzimática** - Neste etapa foi realizado o processo hidrolítico de sacarificação enzimática utilizando o planejamento experimental com a finalidade de otimizar o processo.

**Etapa 5 Teste de fermentabilidade** – Essa etapa consistiu em avaliar a fermentabilidade do hidrolisado obtido em condição previamente otimizada, utilizando como agente fermentativo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### 4.2 AQUISIÇÃO E TRATAMENTO PARA OBTENÇÃO DA TORTA DE DENDÊ

A torta de dendê utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pela empresa Agropalma, localizada na cidade de Belém (PA). A torta foi proveniente do processamento do dendê para extração do óleo (por prensagem). Para fins analíticos as amostras foram cominuídas em moinho de facas para redução da granulometria, e desengorduradas com éter etílico.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS BIOMASSAS

A caracterização química das tortas foi realizada através da determinação dos teores de umidade, cinzas totais, proteínas totais, lipídeos totais segundo Adolph Lutz (IAL, 2008), fibra solúvel em detergente neutro-FDSN, fibra solúvel em detergente ácido-FDSA, celulose,

hemicelulose e lignina (VAN SOEST, 1966, 1967), fibra bruta (VON DE KAMER; VAN GINKEL, 1952), açúcares solúveis totais (DUBOIS et al., 1956), açúcares redutores (MILLER, 1952) e amido (McCREADY et al., 1950).

#### 4.3.1 UMIDADE

O teor de umidade foi determinado de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolph Lutz (IAL, 2008). A análise foi realizada a partir de 3,0g (triplicata) de amostra contidas em placas de vidro, previamente desumidificada e com peso conhecido. As placas contendo amostra foram submetidas à desidratação em estufa a 105°C, até peso constante. O resultado foi calculado segundo a fórmula abaixo e expresso em porcentagem de umidade.

$$U = \frac{(P_{mi} - P_{mf})}{P_{mi}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

U = teor de umidade, em porcentagem.

$P_{mi}$  = massa (g) da placa de vidro com amostra integra

$P_{mf}$  = massa (g) da placa de vidro com amostra seca (desidratada)

#### 4.3.2 CINZAS

O teor de cinzas foi determinado a partir de 0,5g de amostra (triplicata) contida em cadinho de porcelana, previamente calcinado em mufla a 550°C e com peso conhecido. As amostras foram previamente carbonizadas e em seguida incineradas em mufla a 550°C. Após completa incineração, os cadinhos contendo as amostras foram resfriados em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos em g/100g de matéria integral. A determinação foi feita segundo a fórmula abaixo (IAL, 2008).

$$C = \frac{(M - P)}{A} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

C = teor de cinzas em porcentagem

M = massa do cadinho com cinzas, em gramas

P = massa do cadinho vazio, em gramas

A = massa da amostra, em gramas

### 4.3.3 LIPÍDEOS OU EXTRATO ETÉREO

O teor de lipídeos foi quantificado segundo IAL (2008) a partir de 1,0g de amostra (triplicata) contidas em cartuchos de papel de filtro qualitativo, com porosidade de 12,5µm. Em seguida foram colocados em aparelho extrator Soxhlet, para extração dos lipídeos com éter etílico por aproximadamente 8 horas. Os lipídeos foram coletados em balões de fundo chato de 250 mL, previamente aquecidos a 105°C, resfriados até temperatura ambiente em dessecador e pesados. Após a extração, os balões foram mantidos em estufa a 105°C por aproximadamente uma hora para evaporação do solvente remanescente no óleo e em seguida, resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. Os resultados foram expressos em g/100g de amostra integral e determinado segundo a fórmula abaixo.

$$LIP = \frac{(M - P)}{A} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

LIP = teor de lipídeo, em porcentagem.

M = massa (g) do balão com lipídeo

P = massa (g) do balão vazio

A = massa (g) da amostra (torta) contida no cartucho de papel

### 4.3.4 PROTEÍNAS

O teor de proteína foi quantificado pelo método Kjeldal (IAL, 2008) a partir de 0,5g de amostra (em triplicata) contidos em tubo ensaio adicionados de 600mg de sulfato de potássio, 10mL de ácido sulfúrico concentrado e 300mg de sulfato de cobre, seguido de digestão em bloco digestor a 350°C. Em seguida, foram adicionados aos tubos 15 mL de hidróxido de sódio 50%, e a mistura foi destilada em destilador de nitrogênio (marca Tecnal). O destilado foi coletado em frasco cônico de 250mL, contendo 15mL de solução saturada de ácido bórico e 3 gotas de solução indicadora vermelho de metila 0,1%. Posteriormente, o destilado foi titulado com ácido clorídrico 0,02N. Os resultados foram expressos em g/100g de material integral. A determinação foi feita segundo a fórmula abaixo

$$Prot(\%) = \frac{V(HCl) \times N(HCl) \times 14 \times 6,25}{Peso amostra (mg)} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Prot (%) = teor de proteínas, em porcentagem.

V(HCl) = Volume gasto de ácido clorídrico (HCl) na titulação

N(HCl) = Normalidade da solução de HCl

6,25 = Fator de conversão para nitrogênio protéico

14 = n° de massa atômica do nitrogênio

#### 4.3.5 FIBRA BRUTA

O teor de fibra bruta foi determinado segundo Kamer e Ginkel (1952). Para o cálculo do teor de fibra bruta foram adicionados 0,5g de amostra (em triplicata), 17,5 mL de ácido acético a 70% e 0,5 g de ácido tricloroacético em um tubo de ensaio. Em seguida, as amostras contidas nos tubos foram digeridas em bloco digestor a 110°C por 30 min. Posteriormente, o material foi filtrado usando filtros sinterizados previamente desumificados e pesados, contendo lã de vidro. As amostras foram lavadas com água destilada quente (65±2°C) até retirada total da acidez. Os filtros sinterizados contendo amostra foram secos em estufa a 105°C até peso constante. Os resultados foram expressos em g/100g de fibra integral e cálculo de acordo com a fórmula abaixo:

$$FB(\%) = \frac{(C - F)}{\text{peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

FB = teor de fibra bruta, em porcentagem

C = massa do filtro sinterizado com resíduo de fibra após lavado e seco (g)

F = massa do filtro sinterizado vazio(g)

As determinações de fibras solúveis em detergentes ácidos, fibras solúveis em detergentes neutros, celulose, hemicelulose e lignina, foram determinadas segundo a metodologia de VANSOEST (1970) como descrito a seguir.

#### 4.3.6 FIBRA SOLÚVEL EM DETERGENTE ÁCIDO (FSDA)

Cerca de 0,25 g de amostra foram transferidos para tubo de ensaio, juntamente com 25 mL de solução de detergente ácida. As amostras contidas nos tubos foram digeridas em bloco digestor por 30 minutos a 110°C. Em seguida o material foi filtrado em filtros sinterizados, previamente desumificados em estufas a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água



destilada quente ( $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e posteriormente com acetona para retirada total do detergente. Em seguida os filtros sinterizados contendo as amostras foram secos em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente ácido foi expresso em % de FSDA/g de torta íntegra, calculada usando a fórmula a seguir:

$$FSDA(\%) = \frac{(Flv - Fvazio)}{\text{peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

FSDA = teor de fibra bruta solúvel em detergente ácido, em porcentagem.

Flv = massa do filtro com resíduo depois de lavado e seco (g)

Fvazio = massa do filtro vazio(g)

#### 4.3.7 FIBRA SOLÚVEL EM DETERGENTE NEUTRO (FSDN)

A quantificação da FSDN foi realizada partir de 0,25g de amostra contidas em tubo de ensaio, juntamente com 25mL de solução de detergente neutro, submetidas a digestão em bloco digestor por 30 minutos a  $110^{\circ}\text{C}$ . Em seguida o material foi filtrado em filtros sintetizados, previamente desumidificados em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente ( $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e posteriormente com acetona para retirada total do detergente. Em seguida, os filtros sinterizados contendo a amostra foram secos em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente neutro foi expresso em % de FSDN/g de torta íntegra, usando a formula a seguir:

$$FSDN(\%) = \frac{(Fs - Fvazio)}{\text{peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

FSDA = teor de fibra bruta solúvel em detergente ácido, em porcentagem.

Fs = massa do filtro sinterizado com resíduo depois de lavado e seco (g)

Fvazio= massa do filtro sinterizado vazio(g)

#### 4.3.8 CELULOSE

Os filtros sinterizados proveniente da análise de FSDA, com peso conhecido, foram adicionados de 30mL de ácido sulfúrico 72% (p/p) e submetidos a agitação vigorosa. Em seguida, após o escoamento completo do ácido, os filtros foram lavados com água destilada quente (90 a 100°C), por três vezes. Em seguida foram secos em estufa a 105°C, até peso constante, sendo resfriados em dessecador e pesados. A massa de celulose foi dada pela diferença da massa do filtro sinterizado antes e depois da adição da solução de ácido sulfúrico a 72%. O resultado foi calculado de acordo com a fórmula descrita a seguir e expresso em porcentagem de massa integral.

$$CEL(\%) = \frac{(F(antes) - F(depois))}{\text{peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

CEL(%) = teor de celulose

F(antes) = massa do filtro sinterizado com resíduo depois de lavado e seco, antes da adição do ácido sulfúrico (g)

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

#### 4.3.9 LIGNINA

Para o cálculo do teor de lignina, as amostras remanescentes da análise de celulose foram incineradas em mufla a 550°C. Após a completa incineração, os filtros foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente (25±2°C). O teor de lignina foi calculado pela diferença entre a massa do filtro sinterizado antes da incineração e a massa do filtro sinterizado após incineração e resfriamento em dessecador. Os resultados foram calculados de acordo com a fórmula abaixo e expressos em porcentagem de massa integral:

$$LIG(\%) = \frac{(F(antes) - F(mufla))}{\text{peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

LIG(%) = teor de lignina

F(antes) = massa do filtro sinterizado contendo resíduo lavado e seco depois da adição do ácido sulfúrico (g)

Fmufla = massa do filtro sinterizado contendo resíduo depois de incinerados em mufla (g)

#### 4.3.10 HEMICELULOSE

O cálculo do teor de hemicelulose foi feito com base na diferença entre a massa da amostra remanescente da análise de FSDN pela massa da amostra remanescente da análise de FSDA. Os resultados foram calculados de acordo com a fórmula abaixo e expresso em porcentagem de massa integral.

$$HEM = \frac{m(FSDA) - m(FSDN)}{\text{peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

HEM = teor de hemicelulose, em porcentagem

m(FSDA) = massa da amostra remanescente da análise de FSDA (g)

m(FSDN) = massa da amostra remanescente da análise de FSDN (g)

#### 4.3.11 AMIDO E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS (AST)

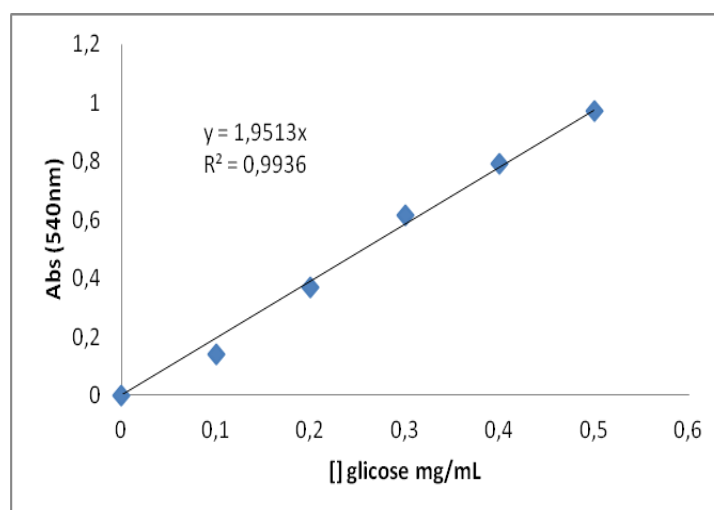
Os teores de amido e açúcares solúveis totais foram determinados segundo a metodologia descrita por McCready (1950), conforme descrito a seguir.

##### a) Preparo da amostra

Em microtubos tipo Eppendorfs de 2 mL (triplicata), foram adicionados 0,2g de amostra e 1,5mL álcool 80% fervente. Em seguida o conteúdo dos tubos foi submetido a centrifugação a 11.500 g, sendo o processo repetido por três vezes. Uma fração do sobrenadante foi coletada e avolumada para 10 mL em balão volumétrico, para posterior quantificação de açúcares solúveis totais (AST). A partir do precipitado foi realizada a extração do amido, para tanto foram adicionados 1,5mL de ácido perclórico 30%, seguido de agitação em agitador tipo vortex por dois minutos. Em seguida, a reação foi deixada em repouso por 30 minutos, com agitação ocasional e então, centrifugada a 11.500 g por 10 minutos (o procedimento foi repetido por três vezes). O sobrenadante foi coletado e avolumado em balão volumétrico de 10 mL para posterior quantificação do amido.

##### b). Quantificação do teor de amido e açúcares solúveis totais (AST)

As quantificações dos teores de amido e AST foram realizadas com solução de antrona 0,1% em ácido sulfúrico, utilizando curva analítica utilizando D-glicose como referência nas concentrações de 0 a 0,5 mg/mL (Figura 15). A partir de cada amostra foi coletado 1mL, seguido da adição de 5mL da solução de antrona, em tubos de ensaio. Os tubos contendo o ensaio foram incubados em banho de água fervente ( $95\pm 1^\circ\text{C}$ ) por doze minutos, seguidos de resfriamento em banho de água com gelo. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics 1105) a 620nm.



**Figura 15-** Curva analítica de glicose, nas concentrações de 0 a 0,5 mg/mL de glicose, determinada segundo método descrito por McCready (1950).

#### 4.3.11 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR)

Os teores de açúcares (AR) foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). A quantificação foi realizada em microtubo tipo Eppendorf de 2 mL, pela adição de 100  $\mu\text{L}$  da amostra (centrifugada) e 100  $\mu\text{L}$  do reagente DNS, seguidos de incubação a  $100^\circ\text{C}$  por 5 min e adição de 1,0 mL de água. Após homogeneização procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva analítica foi preparada utilizando D-glicose como referência nas concentrações de 0 a 0,5 mg/mL, sendo esta prepara de acordo com o procedimento empregado para amostra.

#### 4.4 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO

O processo de pré-tratamento ácido foi realizado empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), incluindo seis pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 18 ensaios. As variáveis independentes avaliadas sobre a eficiência da hidrólise ácida na fração hemicelulósica das tortas e otimização das condições hidrolíticas foram: tempo, razão sólido líquido (S/L) e concentração de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). A partir das condições definidas no planejamento foi pesada 1g de amostra (torta) desengordurada, em tubos de ensaio, tipo pirex (30 cm x 2,5 cm), seguido da adição de ácido sulfúrico e autoclavado a 1 atm (120°C) por tempo variado, conforme condição descrita no planejamento apresentados na Tabela 3.

O planejamento e análise dos resultados foi realizado utilizando-se o programa *STATISTICA Versão 8.0* (Statsoft Inc., Tulsa). A qualidade do ajuste da equação do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e sua significância estatística condicionada pelo teste-*F*. Os efeitos dos fatores avaliados foram mensurados pela análise do diagrama de Pareto e pelas curvas de superfície de resposta, com suas correlações e curvaturas.

**Tabela 3-** Delineamento Composto Central Rotacional com dois níveis, 3 fatores (concentração de  $H_2SO_4$ , razão sólido líquido e tempo em minutos), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), autoclavados a 1 atm a 120 °C.

Amostra	Pré-tratamento ácido		
	Ácido Sulfúrico (%)	Razão S/L (%)	Tempo (minutos)
1	2,000	20,000	30,000
2	2,000	20,000	80,000
3	2,000	50,000	30,000
4	2,000	50,000	80,000
5	7,000	20,000	30,000
6	7,000	20,000	80,000
7	7,000	50,000	30,000
8	7,000	50,000	80,000
9	0,964	35,000	55,000
10	8,036	35,000	55,000
11	4,500	13,787	55,000
12	4,500	56,213	55,000
13	4,500	35,000	19,645
14	4,500	35,000	90,355
<b>15C</b>	<b>4,500</b>	<b>35,000</b>	<b>55,000</b>
<b>16C</b>	<b>4,500</b>	<b>35,000</b>	<b>55,000</b>
<b>17C</b>	<b>4,500</b>	<b>35,000</b>	<b>55,000</b>
<b>18C</b>	<b>4,500</b>	<b>35,000</b>	<b>55,000</b>

S/L = Razão sólido/liquído

#### **4.4.1 SELEÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO**

A seleção da melhor condição de pré-tratamento ácido foi feita a partir dos dados obtidos no planejamento DCCR. Após o pré-tratamento o hidrolisado foi filtrado a vácuo, e retiradas alíquotas para determinação das análises de AR, compostos fenólicos e glicose. O resíduo sólido oriundo do processo de filtração do pré-tratamento foi lavado com água destilada sob vácuo até atingir pH neutro, e em seguida submetido a secagem em estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 24 horas. Amostras do resíduo já desidratado foram reservadas para as análises de amido, celulose, hemicelulose e lignina

#### **4.4.2 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE**

A metodologia utilizada para a dosagem de glicose foi o método enzimático descrita por Lloyd e Whelan (1969). Por ação das enzimas glicose oxidase (GOD) e peroxidase (POD), na presença dos reativos, fenol e 4-aminofenazona, a glicose é oxidada, produzindo um composto de coloração rosa. O teor de glicose foi determinado pelo Kit enzimático de GLICOSE PAP (Liquiforme da empresa LABTEST) a partir de 0,01 mL da solução analítica proveniente do Kit. A leitura da absorbância da amostra foi realizada por espectrofotometria a 505nm. Para quantificação da amostra (hidrolisado) utilizou-se o mesmo volume do padrão, 0,01 mL, acrescido de 1 mL do reagente analítico originário do Kit. Após esta etapa a mistura foi submetida a vigorosa homogeneização em aparelho vortex (QL 901 biomiXer) e incubação a 37 °C durante 15 minutos. As análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS**

A dosagem de compostos fenólicos (CF) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Este método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve comprimento de onda entre 620 e 740 nm, sendo a absorbância de 725 nm dada como comprimento de máxima absorção. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada.

A determinação foi realizada a partir de 100 uL do hidrólisado diluído em metanol 80%, seguido da adição de 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu, 800 µL de carbonato de sódio e 1000 µL de água. Após homogeneização, a solução foi incubada a temperatura ambiente, na ausência de luz, por uma hora e trinta minutos (1h30), seguidos de leitura em espectrofotômetro a 740 nm. Paralelamente a extração foi preparada uma curva analítica com solução de ácido gálico na

concentração de 0,1 g/L. A solução de Folin-Ciocalteu foi preparada pela adição de 10 g de tungstato de sódio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) e 1,8 g de óxido de molibdênio ( $\text{MoO}_3$ ) em solução composta por 75 mL de água e 5 mL de ácido fosfórico a 85%. Após homogeneização a mistura foi submetida a fervura por duas horas, seguida de resfriamento em banho de água com gelo.

#### 4.5 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO

Para realização do processo de pré-tratamento alcalino, foi utilizada a torta proveniente do pré-tratamento ácido, empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), a fim de avaliar a influência da eficiência da hidrólise alcalina na remoção da lignina das tortas e otimizar as condições hidrolíticas, foram avaliados dois fatores, sendo estes: temperatura e concentração de hidróxido de sódio (NaOH).

O planejamento e análise dos resultados também foi realizado por meio do programa *STATISTICA Versão 8.0* (Statsoft Inc., Tulsa). A qualidade do ajuste da equação do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e sua significância estatística condicionada pelo teste-*F*. Os efeitos dos fatores avaliados foram mensurados pela análise do diagrama de Pareto e pelas curvas de superfície de resposta, com suas correlações e curvaturas.

O planejamento experimental constituiu-se de 12 ensaios. Para cada condição foi pesado 0,5 g de amostra (torta) desengordurada em tubos de ensaio (30 x 2,5 cm), seguido da adição de 4,5 mL de hidróxido de sódio e incubação em banho-maria a uma razão sólido-líquido de 10%, por 12 horas, conforme condição descrita no planejamento apresentados na Tabela 4. Para cada ensaio foram determinados açúcares redutores, glicose e fenólicos.

**Tabela 4-** Delineamento Composto Central Rotacional com dois níveis, 2 fatores (concentração de NaOH e temperatura), 4 pontos axiais e 4 pontos centrais (9C, 10C, 11C, 12C), realizado a uma razão sólido-líquido de 10% por um período de 12 horas.

Pré-tratamento alcalino		
Amostra	NaOH (%)	Temperatura (°C)
1	2,0	30,0
2	2,0	80,0
3	12,0	30,0
4	12,0	80,0
5	0,9	55,0
6	13,1	55,0
7	7,0	24,7
8	7,0	85,2
<b>9</b>	<b>7,0</b>	<b>55,0</b>
<b>10</b>	<b>7,0</b>	<b>55,0</b>
<b>11</b>	<b>7,0</b>	<b>55,0</b>
<b>12</b>	<b>7,0</b>	<b>55,0</b>

A condição de temperatura e concentração de NaOH em que houve maior liberação de fenólicos foi escolhida e novamente avaliada. Para cada condição avaliada foi pesado 5 g de amostra em tubos de ensaio tipo pirex (30 x 2,5 cm), seguido da adição de NaOH e incubação em banho-maria nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas. Após o referido procedimento, o pré-tratado foi filtrado á vácuo, lavado com água até pH neutro e seco em estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 24 horas e conseguinte análise de lignina.

#### **4.6 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

As melhores condições de hidrólise enzimática foram realizadas avaliando os parâmetros: razão sólido-líquido (S/L), tempo e concentração de enzimas. Neste experimento foi utilizada a biomassa pré-tratada com ácido e posteriormente álcali. Para tanto foi construído um planejamento fatorial, incluindo seis pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 18 ensaios. No processo de sacarificação, foi utilizado o preparado enzimático Celluclaste (®Novozymes) e a atividade enzimática foi calculada pelo método de hidrólise em papel de filtro Whatman n° 1, segundo Ghose (1987). Para fins comparativos foi preparada uma curva analítica de glicose como referência nas concentrações de 0 a 0,5 mg/mL, sendo 1 U (unidade de atividade) a quantidade de enzima que catalisa um micromol de produto por minuto. Para o processo de sacarificação enzimática foi utilizado 1 g de biomassa pré-tratada, seguida da adição de tampão de bicarbonato de sódio 50 Mm (pH 5), homogeneização e adição da enzima em quantidades específicas determinada no planejamento experimental (DCCR). A seguir a mistura foi incubada a 50°C com agitação constante (100 rpm) por diferentes tempos como apresentado na Tabela 5. Alíquotas do filtrado (hidrolisado) foram coletadas, e analisadas quanto aos teores de AR e glicose a fim de verificar os açúcares liberados.



**Tabela 5-** Delineamento Composto Central Rotacional com dois níveis, 3 fatores (razão S/L, celulase e tempo), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), mantido a 50 °C a 100 rpm.

Amostra	Pré-tratamento enzimático		
	Celulase ( $\mu\text{L/g}$ )	razão S/L (%)	Tempo (minutos)
1	20,0	10,0	12,0
2	20,0	10,0	36,0
3	100,0	10,0	12,0
4	100,0	10,0	36,0
5	20,0	20,0	12,0
6	20,0	20,0	36,0
7	100,0	20,0	12,0
8	100,0	20,0	36,0
9	60,0	7,9	24,0
10	60,0	22,1	24,0
11	3,4	15,0	24,0
12	116,6	15,0	24,0
13	60,0	15,0	7,0
14	60,0	15,0	40,9
<b>15C</b>	<b>60,0</b>	<b>15,0</b>	<b>24,0</b>
<b>16C</b>	<b>60,0</b>	<b>15,0</b>	<b>24,0</b>
<b>17C</b>	<b>60,0</b>	<b>15,0</b>	<b>24,0</b>
<b>18C</b>	<b>60,0</b>	<b>15,0</b>	<b>24,0</b>

S/L = sólido/líquido

#### 4.7 MEIO DE FERMENTAÇÃO E MONITORAMENTO DO BIOPROCESSO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (marca FLEISCHMANN®), na forma desidratada foi adquirida no comércio local da cidade de Diamantina-MG. Para o início do processo fermentativo procedeu-se o inoculação da levedura na proporção de 1 % do meio, seguido de incubação a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

O processo fermentativo foi monitorado por 25 horas em fermentômetro (Figura 16), que consiste em um sistema composto por um frasco cônico acoplado a um dispositivo que permite o desprendimento de  $\text{CO}_2$  e que impede a entrada de  $\text{O}_2$ . Este sistema possibilita acompanhar o processo fermentativo, por meio de sucessivas pesagens, em intervalos de tempos regulares. A massa de  $\text{CO}_2$  desprendida é utilizada para estimar o etanol produzido e conseqüentemente a concentração de açúcares fermentescíveis existente na biomassa (PANTOJA, 2006). A pesagem do sistema foi realizada a cada uma hora e os valores obtidos pela perda de massa ( $\text{CO}_2$ ) do sistema foram utilizados para determinar o fim da fermentação. No início e final do processo fermentativo alíquotas de 2 mL foram retiradas para posterior análise de açúcares redutores (AR) e glicose de acordo com os itens 4.3.12 e 4.4.2, respectivamente, e 2 mL ao final do processo para avaliar o teor de etanol, conforme descrito a seguir:



**Figura 16** – Sistema de fermentômetro utilizado no processo de fermentação. a) Dispositivo fermentômetro e b) aspecto do sistema de fermentômetro acoplado a um Erlenmeyer.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

#### 4.7.1 TEOR DE ETANOL

A determinação do teor de etanol (EtOH) no meio de fermentação foi realizada no final do processo. Para isso foram coletados 2 mL do meio fermentado, o qual foi submetido à destilação em microdestilador de álcool (TEC132/TECNAL), recolhendo um volume final de 20 mL de destilado (em triplicata), o qual foi submetido a quantificação de etanol pelo método do dicromato de potássio a 0,1M preparado em solução de ácido sulfúrico a 5M, segundo metodologia descrita por Isarankura-Na\_Ayudhya et al. (2007). A partir do destilado foram coletados 300  $\mu$ L, os quais foram transferidos para tubo de ensaio de 10 mL, seguidos da adição de 3 mL do reagente dicromato de potássio em ácido sulfúrico e homogeneização em aparelho Vórtex (QL 901 BiomiXer). A reação foi deixada em repouso por 15 minutos e a intensidade da cor formada foi determinada por espectrofotometria a 590 nm.

#### 4.7.2 VARIÁVEIS DO PROCESSO FERMENTATIVO

As variáveis de resposta do bioprocesso, fatores de rendimento em produção de etanol ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) e eficiência fermentativa ( $E_f$ ) foram calculadas tomando por base o consumo de substrato, o tempo e a formação do produto.

##### 4.7.2.1 FATOR DE RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DE ETANOL ( $Y_{P/S}$ )

O fator de rendimento em etanol foi calculado pela relação entre gramas de etanol produzida e gramas de açúcares totais consumidos. Os resultados foram expressos em  $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$ . O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{(S - S_0)} = \frac{P}{(S - S_0)} \quad \text{Equação 12}$$

Onde:

P = Concentração do produto final (g/L)

P<sub>0</sub> = Concentração de produto inicial (g/L)

S = Concentração de substrato inicial (g/L)

S<sub>0</sub> = Concentração de substrato inicial (g/L)

#### 4.7.2.3 PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA (Q<sub>P</sub>)

A produtividade volumétrica foi calculada com base na equação abaixo e quantificada em gramas de etanol produzido por Litro de meio fermentado por hora ( $P.L^{-1}.h^{-1}$ ). O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$Q_P = \frac{P}{t} \quad \text{Equação 13}$$

Onde:

P = concentração do produto (etanol) em (g/L)

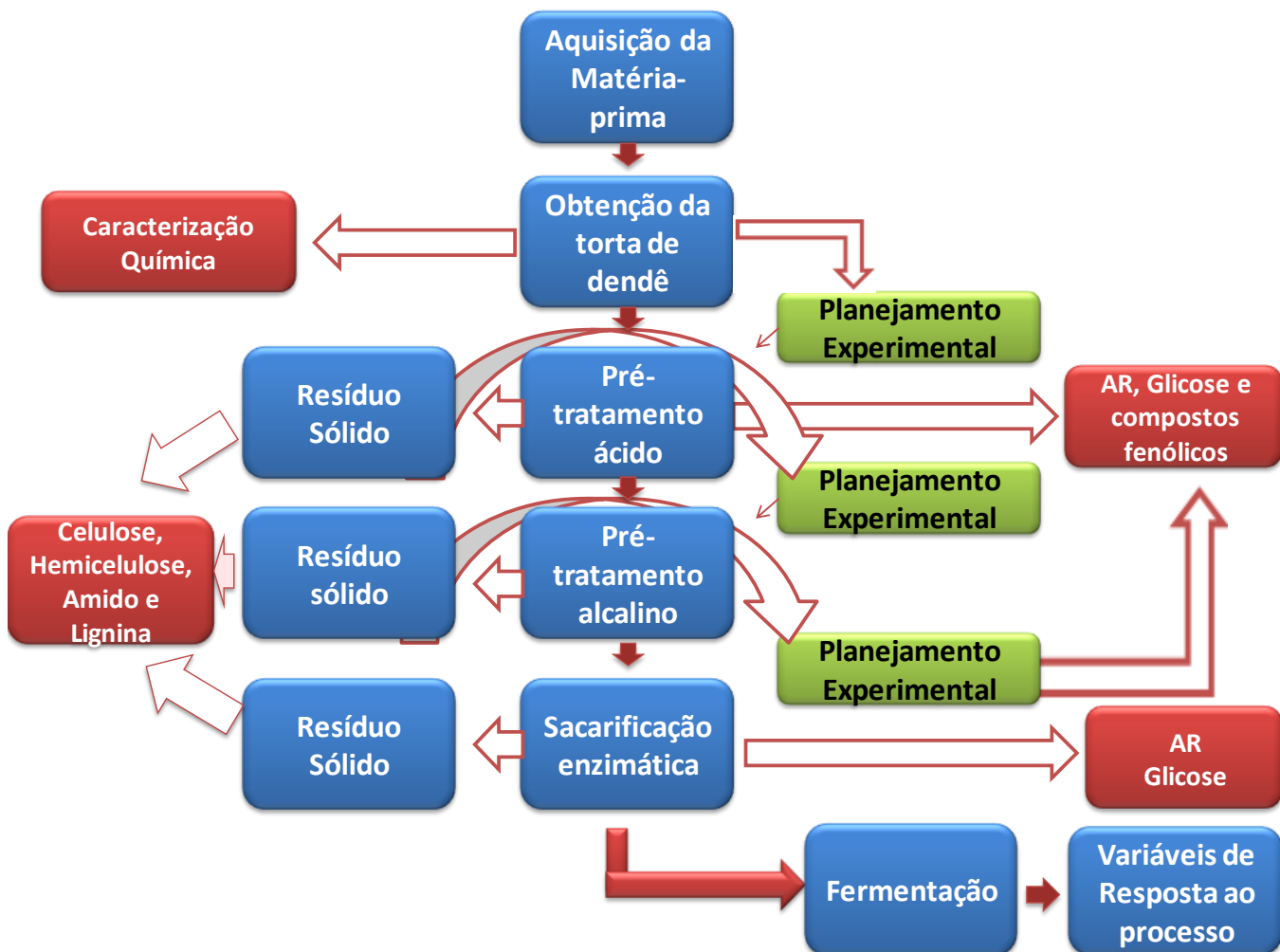
t = tempo em h

#### 4.7.2.4 EFICIÊNCIA FERMENTATIVA (E<sub>f</sub>)

A eficiência fermentativa foi calculada pela relação entre rendimento do processo em função do substrato ( $Y_{p/s}$ ) e o rendimento teórico ( $0,511g_{\text{etanol}}/g_{\text{açúcar}}$ ) multiplicado por 100.

$$E_f = Y_{p/s} \div 0,511 \times 100$$

As etapas do processo experimental realizadas neste trabalho para produção de bioetanol a partir de torta de dendê (*Elaeis guineensis*) podem ser melhor visualizadas no fluxograma abaixo, Figura 17.



**Figura 17** - Fluxograma das atividades realizadas para produção de bioetanol a partir de torta de dendê (*Elaeis guineensis*).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA TORTA DE DENDÊ

Na Tabela 6 encontram-se os resultados das análises da composição química obtidos para a torta de dendê, os quais fornecem informações importantes a respeito da qualidade da biomassa para produção de bioetanol. A torta de dendê apresentou baixo teor de umidade, bem como de lipídeos, após o tratamento de desengorduramento com éter etílico. Dentre os componentes analisados, merecem destaque os açúcares solúveis totais (AST), amido, celulose, hemicelulose e lignina, os quais serão discutidos criteriosamente, devido sua relação e influência direta com o processo em estudo.

**Tabela 6** - Composição química da torta de dendê desengordurada com éter etílico.

<b>Parâmetros</b>	<b>Torta de dendê (%)</b>
Umidade	5,14 ± 0,07
Lipídeos	2,72 ± 0,08
Cinzas	4,68 ± 0,57
Fibra Bruta	24,29 ± 0,24
Proteína Bruta	5,44 ± 0,29
<b>AST</b>	4,56 ± 0,11
<b>Amido</b>	5,02 ± 0,35
FDA	72,01 ± 1,38
FDN	80,92 ± 0,66
<b>Celulose</b>	32,47 ± 0,11
<b>Hemicelulose</b>	11,13 ± 0,60
Lignina	41,65 ± 2,29

FDA: Fibras solúveis em detergente ácido; FDN: fibras solúveis em detergente neutro; AST: açúcares solúveis totais.

A torta de dendê, como a maioria de outras biomassas lignocelulósicas, apresenta variação em sua composição química, as quais estão relacionadas com vários fatores, tais como, fase de colheita, tempo de maturação dos frutos, fatores edafoclimáticos, composição do solo, bem como, forma de extração do óleo (DE PAULA e FATURI, 2008; COSTA, 2009). Conforme dados da Tabela 6, pode-se observar que a torta de dendê apresentou considerável teor de celulose (32,47%) que, junto com a fração de hemicelulose (11,13%), amido (5,02%) e açúcares solúveis totais (4,56%) perfaz um total de 53,18% de carboidratos. Esses dados refletem em uma projeção

estequiométrica de 344L de etanol por tonelada, o que torna este resíduo uma matéria-prima com interessante potencial para produção de etanol. Avaliando a produção de etanol advindo do bagaço e da palha da cana de açúcar, resíduos lignocelulósicos da principal matéria-prima utilizada na produção de bioetanol no Brasil, chega-se a uma produção, também estequiométrica, de 456 litros para o bagaço e 443 litros para a palha, ambas por tonelada de torta, de acordo com as caracterizações químicas descritas por Silva (2011) e Santos (2012), para o bagaço e para a palha, respectivamente.

Nas Figuras 18 e 19 estão apresentados os aspectos das tortas de dendê antes e após o processo de trituração.



**Figura 18-** Resíduo da extração do óleo do dendê na sua forma íntegra.  
**Fonte:** Arquivo pessoal do autor



**Figura 19 -** Torta de dendê (*Elaeis guineensis*) após o processo de trituração.  
**Fonte:** Arquivo pessoal do autor

Na Tabela 7 está apresentada a composição química de algumas matérias-primas lignocelulósicas, que nos últimos anos vêm sendo reportadas na literatura como potenciais biomassas para produção de etanol de segunda geração.

**Tabela 7** – Composição química de diferentes resíduos lignocelulósicos agroindustriais.

Resíduo	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referência
	%			
Dendê	42 – 65	17,1 - 33,5	13,2 - 25,31	Shinoj (2011)
Farelo de trigo	10,86	28,88	4,89	Zúñiga (2010)
Casca de soja	38,00	10,00	3,00	Mielenz et al. (2009)
Torta de girassol	23,22	20,55	9,77	Silva (2011)
Torta de macaúba	11,49	09,60	4,33	Santos (2010)
Farelo de soja	34,59	18,13	9,78	Zúñiga (2010)

Comparando os percentuais de celulose, hemicelulose e lignina obtidos neste trabalho para a torta de dendê com os citados na literatura, descritos por Shinoj (2011), observou-se que os valores obtidos para hemicelulose apresentou-se abaixo da faixa citada, bem como, que os teores de lignina e celulose foram superiores e inferiores, respectivamente, a estes. Observou-se ainda, que a torta de dendê estudada apresentou maior teor de lignina quando comparado aos resíduos de farelo de trigo, casca de soja, torta de girassol, macaúba e farelo de soja. Verificou-se ainda que o dendê apresentou os maior teor de celulose, quando comparada, as tortas de macaúba, torta de girassol e farelo de trigo. Os fatos apresentados justificam a importância do estudo deste insumo no contexto do bioetanol de segunda geração.

## **5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR PARA O PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO DILUÍDO**

As condições estabelecidas pelo delineamento experimental, bem como as respostas observadas, encontram-se na Tabela 8.

Os dados obtidos demonstraram que a máxima liberação de açúcares redutores (15,5%) ocorreu nos ensaios referentes à condição usada para o ponto central (15C, 16C, 17C e 18C). Nesta condição houve uma conversão equivalente à hidrólise de 93% de toda a fração de hemicelulose (11,13%) e amido (5,02%) juntas.

Ressalta-se que o teor de glicose liberada na condição do ponto central (2,6%) indica que o pré-tratamento ácido não implicou na hidrólise da fração celulósica, fato relevante quando se tem como objetivo principal preservar esta fração e remover a hemicelulose.

**Tabela 8:** Delineamento Composto Central Rotacional, do tipo 2<sup>3</sup> com dois níveis de variações, 3 fatores (concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, razão S/L e tempo de hidrólise), 6 pontos axiais e 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C), autoclavados à 1 atm a 120°C, com os respectivos fatores de resposta para o pré-tratamento ácido da torta de dendê.

Ensaios	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %	Razão S/L %	Tempo Min.	Glicose %	Fenólicos %	AR %
1	2,0	20,0	30,0	1,37	1,71	6,29
2	2,0	20,0	80,0	1,58	1,39	7,40
3	2,0	50,0	30,0	1,02	0,128	1,27
4	2,0	50,0	80,0	1,28	0,22	2,09
5	7,0	20,0	30,0	2,94	0,198	5,90
6	7,0	20,0	80,0	2,80	0,84	12,54
7	7,0	50,0	30,0	2,72	0,168	3,98
8	7,0	50,0	80,0	2,78	1,01	10,66
9	0,9	35,0	55,0	2,37	0,73	0,25
10	8,0	35,0	55,0	2,63	0,53	10,81
11	4,5	13,8	55,0	2,60	1,2	12,66
12	4,5	56,2	55,0	2,73	0,47	4,97
13	4,5	35,0	19,6	3,23	1,19	8,24
14	4,5	35,0	90,3	2,54	1,48	6,56
15C	4,5	35,0	55,0	2,65	0,55	15,51
16C	4,5	35,0	55,0	2,48	0,55	15,63
17C	4,5	35,0	55,0	2,7	0,59	15,48
18C	4,5	35,0	55,0	2,65	0,57	15,41

AR= açúcares redutores; S/L = sólido-líquido. 15C, 16C, 17C, 18C = pontos centrais

**Fonte:** Dados experimentais do autor obtidos no LabBBIO através do software STATISTICA Versão 8.0

Quanto ao teor de compostos fenólicos, sua concentração foi mínima em todas as condições estudadas, indicando que o uso de um pré-tratamento ácido diluído não remove, de maneira considerável, a lignina do complexo lignocelulósico. Canilha et al (2010) reportaram que o pré-tratamento com ácido diluído remove grande parte da hemicelulose, no entanto, que a remoção da lignina ocorre de maneira bastante limitada.

O modelo ajustado para o planejamento experimental DCCR (Equação 1) apresentou um coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) de 90% para resposta AR (%).

Equação 1:

$$y = 14,81 + 5,16x_1 - 7,88x_1^2 - 4,17x_2 - 4,59x_2^2 - 6,01x_3^2$$

onde:

X<sub>1</sub>: concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;



X<sub>2</sub>: razão sólido-líquido (S/L) e

X<sub>3</sub>: tempo em minutos.

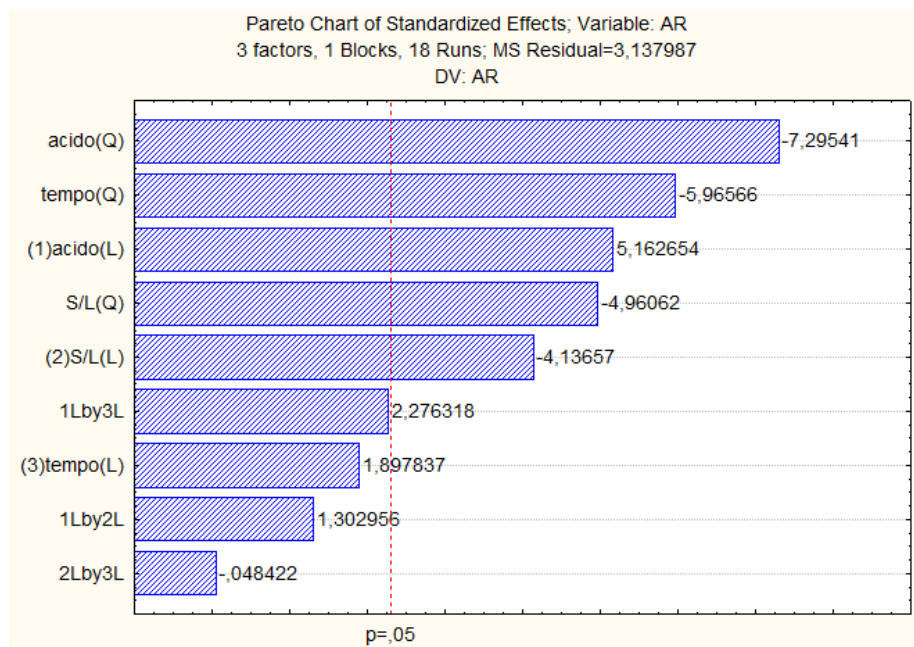
Os efeitos estimados das variáveis estudadas e suas interações encontram-se abaixo, na Tabela 9, e destacados na cor vermelha estão os efeitos significativos a  $p < 0,05$ .

**Tabela 9-** Análise dos efeitos principais e de interações das variáveis do planejamento composto central para os percentuais de AR encontrados na torta de dendê.

Effect Estimates; Var.:AR; R-sqr=.90088; Adj.:.78936 (dendê- pré-tratamento) 3 factors, 1 Blocks, 18 Runs; MS Residual=5,58803 DV: AR										
Factor	Effect	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	14,81042	1,114375	13,29034	0,000001	12,2407	17,38017	14,81042	1,114375	12,24067	17,38017
(1)H2SO4 (L)	5,16180	1,364739	3,78226	0,005371	2,0147	8,30890	2,58090	0,682370	1,00736	4,15445
H2SO4 (Q)	-7,88248	1,671237	-4,71656	0,001509	-11,7364	-4,02860	-3,94124	0,835618	-5,86818	-2,01430
(2)S/L(L)	-4,17024	1,364803	-3,05556	0,015688	-7,3175	-1,02300	-2,08512	0,682402	-3,65874	-0,51150
S/L(Q)	-4,59509	1,671552	-2,74899	0,025098	-8,4497	-0,74048	-2,29754	0,835776	-4,22485	-0,37024
(3)tempo (L)	2,14560	1,364803	1,57209	0,154573	-1,0016	5,29284	1,07280	0,682402	-0,50082	2,64642
tempo (Q)	-6,01097	1,671552	-3,59604	0,007023	-9,8656	-2,15637	-3,00549	0,835776	-4,93279	-1,07818
1L by 2L	1,63208	1,671531	0,97640	0,357465	-2,2225	5,48663	0,81604	0,835765	-1,11124	2,74332
1L by 3L	2,85130	1,671531	1,70580	0,126437	-1,0033	6,70586	1,42565	0,835765	-0,50163	3,35293
2L by 3L	-0,06065	1,671531	-0,03629	0,971944	-3,9152	3,79390	-0,03033	0,835765	-1,95760	1,89695

A análise do gráfico de Pareto representado na Figura 20 também possibilita observar os valores estimados dos efeitos de cada variável, bem como verificar se os mesmos foram ou não estatisticamente significativos a  $p < 0,05$ .

Os dados mostram que o fator de maior relevância, a um nível de significância de 95 % ( $p < 0,05$ ), foi a concentração de ácido, sendo que esta apresentou um efeito linear significativo e positivo e um efeito quadrático significativo e negativo para a remoção de hemicelulose, representada pela liberação de açúcares redutores. O efeito linear positivo indica que o aumento da concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> levou a uma maior liberação de AR para o meio. Já o efeito quadrático negativo observado é decorrente, provavelmente, do fenômeno de desidratação de açúcares provocado pelo ácido sulfúrico a altas temperaturas, o que geram compostos como furfurais e hidroximetilfurfurais (HMF).

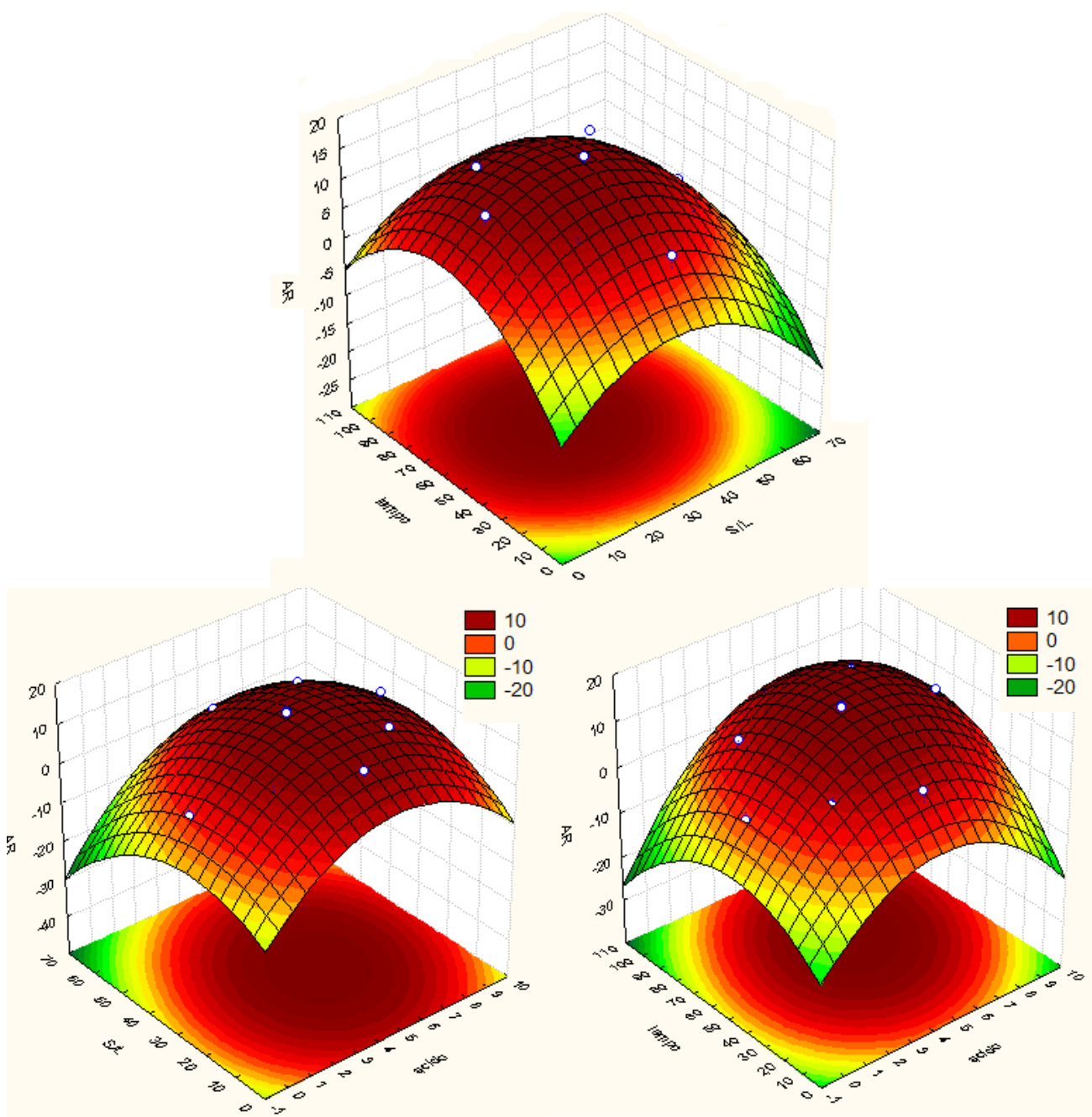


**Figura 20-** Gráfico de Pareto apresentando os efeitos dos fatores de respostas, em percentual de açúcares redutores sobre o processo de hidrólise ácida da torta de dendê.

Em relação à razão sólido-líquido, observou-se um efeito linear negativo e significativo para o AR, o qual se deve, provavelmente, à limitação de transferência de massa e calor decorrente do aumento da fração sólida em detrimento da fase líquida, água, ao mesmo tempo solvente e reagente do processo, onde se encontra o agente catalisador ( $H_2SO_4$ ).

O tempo apresentou um efeito quadrático negativo e significativo no processo de hidrólise ácida, consequência previsível da cinética de degradação de açúcares por desidratação ácida.

Visando uma melhor análise dos efeitos combinados exercidos por cada fator sobre a liberação de AR, foram gerados gráficos de superfície de resposta (Figura 21). Nos gráficos apresentados observou-se que a máxima liberação de AR ocorreu numa faixa de valores de concentração  $H_2SO_4$  de 5 a 7%, 60 a 80 minutos de pré-tratamento e razão sólido-líquido de 30 a 40%. Valores superiores aos destacados ocasionam uma queda no teor de AR liberados para o meio.



**Figura 21** - Gráficos de superfície de resposta para o percentual de açúcares redutores (AR%) removidos da torta de dendê em função dos efeitos combinados do tempo, concentração de  $H_2SO_4$  e Razão S/L (razão sólido-líquido).

Quanto às análises dos compostos fenólicos e glicose observou-se por meio do planejamento DCCR que não houve ajuste para tais respostas ao nível de confiança de 95%.

A remoção da lignina, determinada indiretamente através da dosagem de compostos fenólicos totais, não foi significativa. A análise estatística do fator de resposta glicose (Tabela 8) não resultou em ajuste significativo para modelagem do planejamento, entretanto indicou que não

houve hidrólise significativa da fração celulósica da torta de dendê, o que é vantajoso para o processo de pré-tratamento.

As condições críticas geradas pela modelagem do planejamento experimental para a resposta AR (Tabela 10) foram usadas para o pré-tratamento semi-preparativo da torta de dendê, com vistas à obtenção de material para as etapas de pré-tratamento alcalino e subsequente sacarificação. Os resultados da análise do resíduo sólido após o pré-tratamento reproduzido em condição otimizada podem ser vistos na Tabela 11. A concentração de amido foi reduzida a 0,54% no sólido pré-tratado e a concentração de hemicelulose foi reduzida a 2,0 %.

**Tabela 10-** Condições experimentais utilizadas na ampliação da escala experimental para obtenção dos hidrolisados hemicelulósicos.

Fator	Mínimo Observado	Valores críticos	Máximo observado
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,96400	5,33334	8,03600
razão S/L	13,78700	29,05569	56,21300
Tempo	19,64500	61,48830	90,35500

**Tabela 11:** Comparação das frações de carboidratos e lignina das tortas de dendê antes e após o pré-tratamento ácido.

Frações	Antes do pré-tratamento ácido %	Após pré-tratamento ácido %
Amido	5,02 ± 0,35	0,54 ± 0,04
Hemicelulose	11,13 ± 0,60	2,00 ± 0,12
Lignina	41,65 ± 2,29	47,87 ± 0,84
Celulose	32,47 ± 0,11	38,94 ± 1,6

A lignina foi concentrada a 47,87% e a celulose a 38,94% no resíduo sólido recuperado após o pré-tratamento ácido, o que induziu a adoção de uma etapa adicional de deslignificação da amostra com a finalidade de se melhorar a eficiência do processo de sacarificação enzimática. Estudos comprovam que a lignina e seus derivados são tóxicos ao micro-organismo, bem como a ação das enzimas, pois, segundo Chang e Holtzaple (2000) substratos com baixa concentração de lignina apresentam maior atividade enzimática.

A fração solúvel do processo de pré-tratamento ácido, obtida na condição otimizada, apresentou valores significativos de açúcares redutores e glicose, com 81g/L e 10,24 g/L, respectivamente. A conversão completa dos açúcares provenientes do hidrolisado de torta de dendê, com

base em cálculos estequiométricos, poderia hipoteticamente render até 52L de etanol por tonelada de torta hidrolisada.

### 5.3 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO

O pré-tratamento alcalino realizado para a torta de dendê, de acordo com as condições estabelecidas no planejamento experimental desenhado segundo o item 4.5, gerou os resultados apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12** - Delineamento Composto Central Rotacional para o pré-tratamento alcalino da torta de dendê apresentando dois níveis, 2 fatores (concentração de NaOH e temperatura), 4 pontos axiais e 4 pontos centrais (9C, 10C, 11C, 12C), razão-sólido líquido de 10%, tempo de incubação de 12 horas, e os respectivos fatores de resposta.

Ensaio	NaOH %	Temperatura °C	Glicose %	Fenólicos %	AR %
1	2,0	30,0	0,91	0,75	0,28
2	2,0	80,0	0,09	3,64	2,03
3	12,0	30,0	0,11	1,57	0,73
4	12,0	80,0	0,07	6,43	3,70
5	0,9	55,0	0,09	0,89	0,43
6	13,0	55,0	0,07	2,48	0,73
7	7,0	24,7	0,08	1,40	0,72
8	7,0	85,2	0,08	7,44	4,55
9C	7,0	55,0	0,06	2,87	1,30
10C	7,0	55,0	0,06	2,95	1,45
11C	7,0	55,0	0,06	2,93	1,44
12C	7,0	55,0	0,06	2,95	1,64

AR= açúcares redutores; 9C, 10C, 11C, 12C= pontos centrais

Os valores obtidos para as variáveis observadas, por meio do software STATISTICA, não resultaram em ajuste significativo de modelo baseado no DCCR. Entretanto, a condição 8 (7% de NaOH a 85°C) apresentou a maior liberação de compostos fenólicos, 7,44%. Ainda assim pode-se observar que os valores de compostos fenólicos liberados ainda eram insatisfatórios, sugerindo que o tempo de 12 horas foi insuficiente para a solubilização completa da lignina. Portanto esta condição foi reproduzida com tempos de incubação crescentes, conforme apresentado na Tabela 13, para o acompanhamento da cinética de remoção de lignina.

**Tabela 13** – Teores de lignina no resíduo sólido da torta de dendê após o tratamento alcalino com 7% de, NaOH, temperatura de 85°C, razão de sólido líquido de 10% e diferente tempos de reação.

Ensaio	Tempo (horas)	Lignina Residual %	Lignina Removida %
0	0	47,87 ± 0,084	0
1	12	37,15 ± 0,28	22,4
2	24	24,84 ± 1,19	48,1
3	36	13,52 ± 0,67	71,8
4	48	11,23 ± 0,08	76,6

Na Tabela 13 é possível perceber que o tempo de 36 horas marca o limite em que a cinética de remoção da lignina começa ser desacelerada, alcançando o valor de 72% de remoção. Esta observação levou a eleger o tempo de deslignificação de 36 horas como etapa anterior ao processo de sacarificação enzimática. Rabelo (2010) afirmou que ocorrer uma deslignificação completa da biomassa é bastante difícil devido ao fato da lignina se localizar profundamente na parede celular, ser hidrofóbica, bem consistente e apresentar fortes anéis de ligação C-O-C-, C-C, além de apresentar uma tendência à recondensação (complexo lignina-carboidrato) durante a deslignificação.

O resíduo sólido obtido com o pré-tratamento ácido foi submetido à condição destacada como a mais eficiente para a remoção de lignina do resíduo, usando o tempo de 36 horas, e foi obtida uma remoção de lignina de 71,7% (Tabela 14), reproduzindo o resultado obtido na avaliação cinética mostrada na Tabela 13. A fração insolúvel recuperada após o pré-tratamento alcalino apresentou 63,6% de celulose, representando uma concentração deste polissacarídeo de 1,63 vezes.

**Tabela 14-** Comparação das frações de hemicelulose, celulose e lignina das tortas de dendê antes e após o pré-tratamento alcalino, com concentração de NaOH de 7% a 85°C, por 36 horas e razão de sólido líquido de 10%.

Frações	Antes pré-tratamento alcalino %	Após pré-tratamento alcalino %
Hemicelulose	2,00 ± 0,12	ND
Lignina	47,87 ± 0,84	13,52 ± 0,09
Celulose	38,94 ± 1,60	63,58 ± 1,12

ND não detectado

## 5.4 Processo de sacarificação enzimática

Os resultados dos ensaios de sacarificação nas condições desenhadas pelo planejamento fatorial descrito no item 4.6 estão apresentados na Tabela 14.

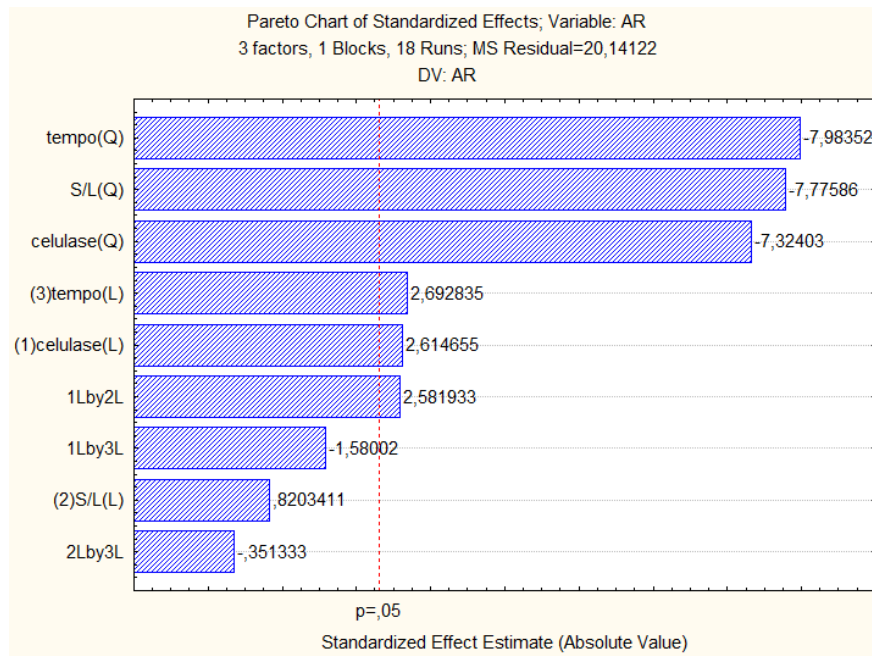
**Tabela 15** -. Planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup> com 3 fatores, 4 pontos centrais (15C, 16C, 17C, 18C) e 6 axiais, com 3 níveis de variações (concentração de celulase, razão S/L e tempo) a 50°C a 100 rpm, com os respectivos fatores de resposta para o pré-tratamento enzimático da torta de dendê.

Ensaio	Celulase (µL)	Razão S/L %	Tempo (Hora)	Glicose %	AR %
1	20,0	10,0	12,0	12,97	11,1
2	20,0	10,0	36,0	22,34	24,13
3	100,0	10,0	12,0	16,00	15,03
4	100,0	10,0	36,0	15,01	19,54
5	20,0	20,0	12,0	7,11	8,01
6	20,0	20,0	36,0	20,02	20,30
7	100,0	20,0	12,0	27,01	29,95
8	100,0	20,0	36,0	24,00	30,69
9	60,0	7,9	24,0	26,01	29,05
10	60,0	22,1	24,0	20,00	24,32
11	3,4	15,0	24,0	23,79	25,02
12	116,6	15,0	24,0	33,01	31,19
13	60,0	15,0	7,0	20,02	22,01
14	60,0	15,0	40,9	28,35	30,15
15C	60,0	15,0	24,0	53,92	56,40
16C	60,0	15,0	24,0	54,02	56,35
17C	60,0	15,0	24,0	54,1	56,53
18C	60,0	15,0	24,0	54,04	56,48

De acordo com o planejamento experimental utilizado, a condição que apresentou os maiores percentuais de liberação de AR e glicose da torta de dendê pré-tratada foi a referente aos pontos centrais, os quais foram obtidos com concentrações de 60µL da enzima celulase (Celluclast ®Novozymes) por grama de torta, 15% de razão S/L, e tempo de 24 horas. Essas condições permitiram obter um percentual médio de 56% de açúcares redutores e 54% de glicose.

Os efeitos significativos que influenciaram na liberação dos açúcares redutores, estão demonstrados no gráfico de Pareto, representado na Figura 21. Pode-se observar que a concentração de celulase teve efeito linear positivo significativo em relação aos açúcares redutores (AR), o que pode ser explicado pela ação hidrolítica de tais enzimas que geram AR e glicose a partir dos oligossacarídeos disponíveis. O tempo também apresentou efeito linear positivo significativo, consequência natural da cinética da catálise. Quanto ao efeito quadrático da razão sólido-líquido, do

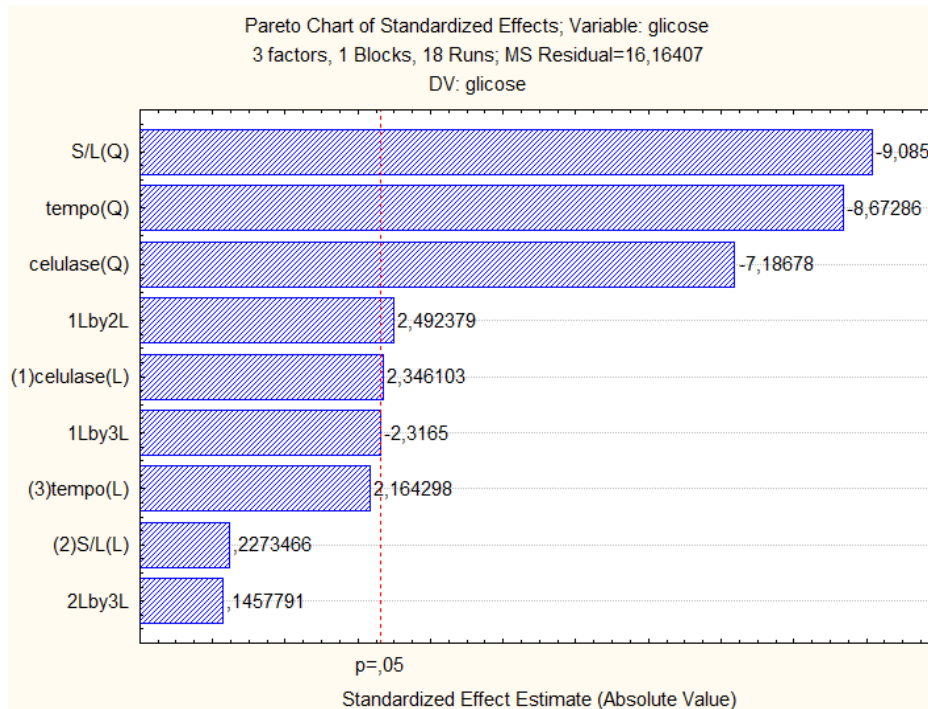
tempo e da concentração de enzimas observaram-se efeitos negativos, indicando que as condições empregadas apresentam regiões de máximo (ponto crítico) no gráfico de superfície resposta (Figura 22), característica de condição otimizada quando se observa conversões próximas de 100%.



**Figura 22** - Gráfico de Pareto para o fator de resposta percentual de açúcares redutores (AR) removidos durante o DCCR para sacarificação da torta de dendê.

Os efeitos das variáveis analisadas sobre a liberação de glicose durante o processo de sacarificação, observado por meio do Diagrama de Pareto (Figura 23), foram similares aos observados para o fator de resposta AR%.

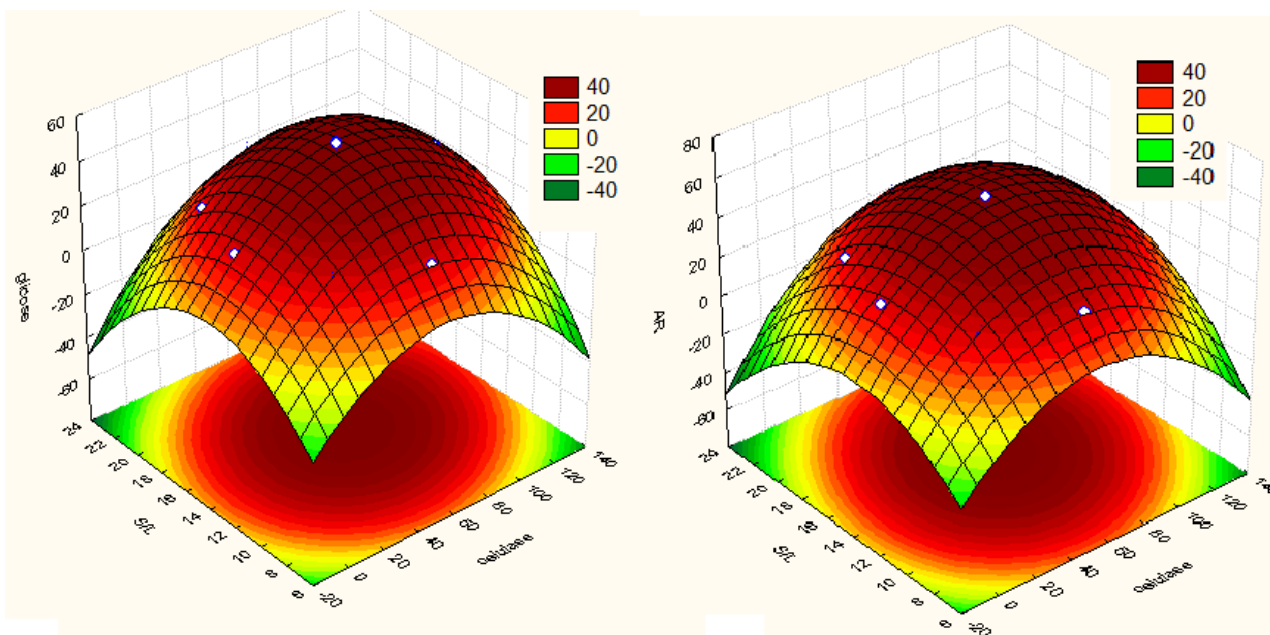




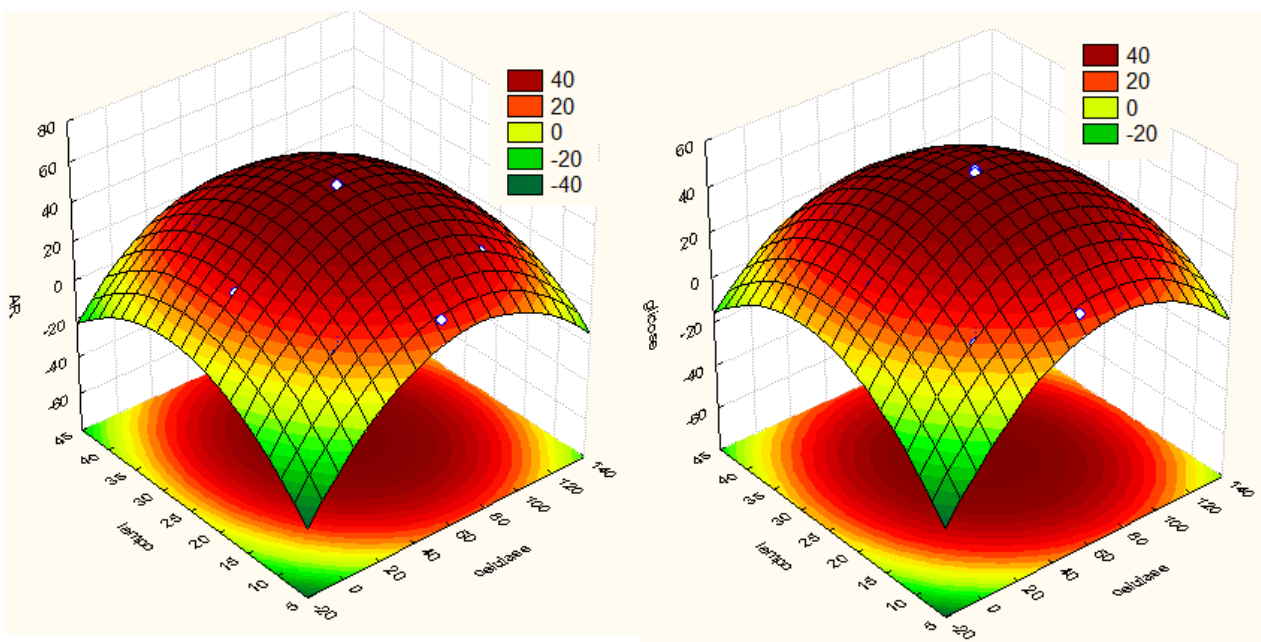
**Figura 23** - Gráfico de Pareto para o fator de resposta percentual de glicose removida durante o DCCR para sacarificação da torta de dendê

Ao analisar os gráficos de superfícies de resposta, apresentadas nas Figuras 24, 25 e 26 pode-se perceber uma ampla faixa de condições reacionais que maximizam o rendimento de glicose e açúcares redutores, bem como, que os maiores rendimentos são obtidos quando se trabalha com concentrações de enzimas entre 60 a 80  $\mu\text{L/g}$ , razão sólido líquido entre 16 a 18%, e tempo de 30 a 40 minutos. Neste processo de sacarificação, observou-se ainda que, à medida que se aumenta a concentração de enzimas, há um aumento da produção de glicose e AR. No entanto, o efeito quadrático negativo sobre estas respostas, impõe limite ao incremento de enzimas, por que à medida que a glicose se acumula no meio, ocorre o efeito repressivo, também chamado “efeito glicose” (REGULY, 1996) ou na enzimologia, de repressão catalítica. Este comportamento também foi observado para a variável razão S/L, uma vez que aumentos excessivos da quantidade de sólido em relação a líquido ocasionou uma menor liberação de AR e glicose. Por certo, nesta condição, a transferência de massa é dificultada, sugerindo que o acesso da enzima ao substrato é dificultado. Em um estudo realizado por Scipioni (2011) as maiores concentrações de substrato e enzimas foram as que apresentaram os melhores rendimentos de hidrólise para todos os ensaios. Este autor relatou ainda, que quando quantidades de enzimas são fixas, a baixa concentração de substrato influencia positivamente na hidrólise permitindo melhor interação da enzima com substrato alvo.

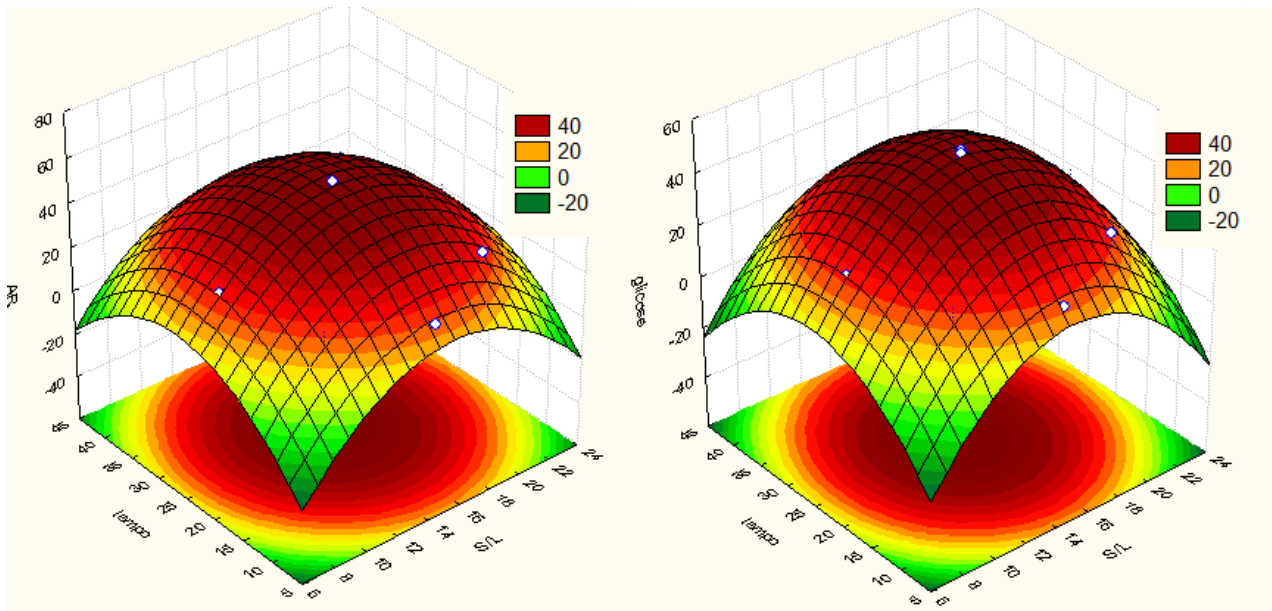
Em relação ao fator tempo, foi observado que ocorreu um aumento da concentração de AR e glicose em função deste, o que se deve ao maior tempo de contato entre enzimas e seus substratos.



**Figura 24** - Gráfico de superfície resposta para o efeito da enzima celulase ( $\mu\text{L/g}$ ) e Razão S/L sobre os açúcares (AR e glicose) liberados durante o processo de sacarificação enzimática.



**Figura 25** - Gráfico de superfície resposta para o efeito da enzima celulase ( $\mu\text{L/g}$ ) e tempo (h) sobre os açúcares (AR e glicose) liberados durante o processo de sacarificação enzimática.



**Figura 26** - Gráfico de superfície resposta para o efeito da razão sólido-líquido – S/L (%) e tempo (h) sobre os açúcares (AR e glicose) liberados durante o processo de sacarificação enzimática.

O modelo obtido pelo planejamento experimental DCCR apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 96,18% para AR (%) (Tabela 15), e 96,65% para a glicose (Tabela 16). Os efeitos estimados para AR (Equação 15) e glicose (Equação 16) foram calculados de acordo com as equações abaixo.

$$y = 54,73 + 6,77x_1 - 23,24x_1^2 + 2,12x_2 - 24,67x_2^2 + 6,96x_3 - 25,33x_3^2 \quad \text{Equação 15}$$

$$y = 51,94 + 5,44x_1 - 20,43x_1^2 + 0,52x_2 - 24,67x_2^2 + 5,02x_3 - 24,65x_3^2 \quad \text{Equação 16}$$

onde:

- $X_1$ : concentração de celulase;
- $X_2$ : razão sólido-líquido (S/L) e
- $X_3$ : tempo em minutos

**Tabela 16** - Análise dos efeitos principais e de interações das variáveis do planejamento composto central para os percentuais de AR (%), encontrados na torta de dendê.

Effect Estimates; Var.:AR; R-sqr=.96188; Adj.:.919 (planejamento enzimatico com respostas) 3 factors, 1 Blocks, 18 Runs; MS Residual=20,14122 DV: AR										
Factor	Effect	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
<b>Mean/Interc.</b>	<b>54,7385</b>	<b>2,115624</b>	<b>25,87347</b>	<b>0,000000</b>	<b>49,8599</b>	<b>59,6172</b>	<b>54,7385</b>	<b>2,115624</b>	<b>49,8599</b>	<b>59,61719</b>
(1)celulase(L)	6,7748	2,591078	2,61465	0,030906	0,7997	12,7498	3,3874	1,295539	0,3999	6,37490
celulase(Q)	-23,2419	3,173369	-7,32403	0,000082	-30,5597	-15,9241	-11,6209	1,586685	-15,2798	-7,96203
(2)S/L(L)	2,1256	2,591060	0,82034	0,435781	-3,8494	8,1005	1,0628	1,295530	-1,9247	4,05027
S/L(Q)	-24,6750	3,173283	-7,77586	0,000054	-31,9926	-17,3574	-12,3375	1,586642	-15,9963	-8,67871
(3)tempo (L)	6,9774	2,591104	2,69283	0,027376	1,0023	12,9525	3,4887	1,295552	0,5012	6,47626
tempo (Q)	-25,3357	3,173500	-7,98352	0,000044	-32,6538	-18,0176	-12,6679	1,586750	-16,3269	-9,00880
1L by 2L	8,1936	3,173422	2,58193	0,032518	0,8756	15,5115	4,0968	1,586711	0,4378	7,75575
1L by 3L	-5,0141	3,173422	-1,58002	0,152758	-12,3320	2,3039	-2,5070	1,586711	-6,1660	1,15193
2L by 3L	-1,1149	3,173422	-0,35133	0,734412	-8,4329	6,2030	-0,5575	1,586711	-4,2164	3,10150

**Tabela 17** - Análise dos efeitos principais e de interações das variáveis do planejamento composto central para os percentuais de glicose (%), encontrados na torta de dendê.

Effect Estimates; Var.:glicose; R-sqr=.96656; Adj.:.92894 3 factors, 1 Blocks, 18 Runs; MS Residual=16,16407 DV: glicose										
Factor	Effect	Std.Err.	t(8)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
<b>Mean/Interc.</b>	<b>51,9429</b>	<b>1,895270</b>	<b>27,40657</b>	<b>0,000000</b>	<b>47,5724</b>	<b>56,3134</b>	<b>51,9429</b>	<b>1,895270</b>	<b>47,5724</b>	<b>56,31335</b>
(1)celulase(L)	5,4458	2,321202	2,34610	0,046966	0,0931	10,7985	2,7229	1,160601	0,0465	5,39924
celulase(Q)	-20,4309	2,842845	-7,18678	0,000094	-26,9865	-13,8753	-10,2154	1,421422	-13,4933	-6,93764
(2)S/L(L)	0,5277	2,321186	0,22735	0,825857	-4,8250	5,8804	0,2639	1,160593	-2,4125	2,94019
S/L(Q)	-25,8269	2,842768	-9,08511	0,000017	-32,3823	-19,2714	-12,9134	1,421384	-16,1911	-9,63571
(3)tempo (L)	5,0238	2,321226	2,16430	0,062370	-0,3289	10,3766	2,5119	1,160613	-0,1645	5,18829
tempo (Q)	-24,6566	2,842962	-8,67286	0,000024	-31,2125	-18,1007	-12,3283	1,421481	-15,6062	-9,05036
1L by 2L	7,0856	2,842892	2,49238	0,037383	0,5298	13,6413	3,5428	1,421446	0,2649	6,82064
1L by 3L	-6,5856	2,842892	-2,31650	0,049187	-13,1413	-0,0298	-3,2928	1,421446	-6,5706	-0,01492
2L by 3L	0,4144	2,842892	0,14578	0,887702	-6,1413	6,9702	0,2072	1,421446	-3,0706	3,48508

As condições críticas (15% para S/L; 65,75 µL/g de celulase e tempo de 25 horas) geradas por este planejamento para a resposta AR e glicose foi selecionada para posterior etapa de fermentação. Sob tais condições foi possível obter uma eficiência de hidrólise de aproximadamente 80%. A caracterização química da torta antes e a após o processo de sacarificação enzimática está apresentado na Tabela 17, os resultados obtidos evidenciaram a eficiência do processo empregado.

**Tabela 18** - Teores de celulose, hemicelulose e lignina analisados na torta de dendê antes e após a sacarificação enzimática, utilizando razão S/L de 15%, concentração de celulase de 65,75 µL/g de torta, 25 horas, 100 rpm à 50°C.

Frações	Antes da sacarificação enzimática	Após sacarificação enzimática
	%	%
Hemicelulose	ND	ND
Lignina	13,52 ± 0,09	15 ± 0,89
Celulose	63,58 ± 1,12	11 ± 0,56

ND = não detectado

## 5.5 FERMENTAÇÃO COM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A fermentação alcoólica utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* (marca Fleischmann®) como agente do processo foi acompanhada durante aproximadamente 21h. A análise inicial do meio fermentativo preparado com 75 mL de hidrolizado apresentou concentrações de açúcares redutores e glicose de 89,80 g/L e 81,62 g/L, respectivamente. Segundo Phippips e Humphrey (1983) na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos para que haja uma recuperação eficiente deste produto, exige-se uma produção superior a 40g/L, que por sua vez, necessita que a fermentação inicie com concentração de açúcares fermentescíveis de no mínimo 80g/L.

Ao final do processo fermentativo foi possível observar as concentrações de glicose, açúcares redutores e etanol, estes valores estão apresentados na Tabela 18. Com base nos dados apresentados, pode-se observar que toda a glicose foi convertida em etanol. Entretanto, ao final do processo, foi observado uma concentração residual de açúcares redutores de 4,11 g/L, o que indica a presença de açúcares não fermentáveis.

Os dados das variáveis do processo encontrados neste estudo foram superiores aos descritos por Ribeiro (2010) que encontrou eficiência fermentativa (Ef) próximos a 90%, trabalhando com bagaço de cana de açúcar pré-tratada com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio. Os valores obtidos para Ef, igualmente, foram superiores aos achados por Kim e kim (2012) e Chin et al (2010), utilizando o dendê como insumo para produção de bioetanol que encontram valores de Ef de 88 % e 80,12%, respectivamente.

**Tabela 19** - Variáveis do processo fermentativo utilizando como agente fermentativo a levedura *S. cerevisiae* após os pré-tratamentos ácido e alcalino e posterior sacarificação enzimática.

$G_i$ g/L	$G_f$ g/L	$AR_i$ g/L	$AR_f$ g/L	Tempo (h)	$EtOH_f$ g/L	$Y_{P/S}$ (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )	$Q_p$ (g/L/h)	$E_f$ (%)
81,62	0,23	89,80	4,11	25	42,43	0,49	1,69	96

$Y_{p/s}$  = rendimento de produção em etanol;  $Q_p$ = produtividade volumétrica e  $E_f$ = eficiência fermentativa

$G_i$ =glicose inicial  $G_f$ = glicose final  $AR_i$ =Açúcares redutores inicial  $AR_f$ = açúcares redutores final

## 6.0 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A caracterização química da torta de dendê resultou na determinação do valor de 53,2% de carboidratos totais, que se convertidos a etanol resultaria em 344L por tonelada de resíduo. O uso exclusivo da fração celulósica, 32,4%, permite projetar produção de 210L de etanol por tonelada de torta.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído foi otimizado levando à remoção de mais de 82% da hemicelulose.

O pré-tratamento alcalino mostrou-se eficiente na remoção da lignina presente no resíduo sólido derivado do processo de pré-tratamento ácido, com 72% de remoção.

O processo de sacarificação enzimática da torta de dendê após os pré-tratamentos ácido e alcalino foi otimizado e converteu mais de 80% da celulose a glicose.

O uso da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann) mostrou-se adequada para a conversão dos açúcares derivados do pré-tratamento da torta de dendê, obtendo-se mosto fermentado com 5,4% (v/v) de etanol e  $Y_{P/S}$  de 0,49.

O uso do planejamento DCCR permitiu verificar a combinação dos efeitos de todos os fatores avaliados, trabalhando simultaneamente com múltiplas variáveis, encurtando o número de etapas experimentais.

No pré-tratamento ácido observou-se a possibilidade de maiores estudos sobre o uso da fração hemicelulósica, a qual é constituída principalmente por pentoses, que representa 18,55% da torta em questão. Este estudo poderá incrementar a produção de etanol por tonelada de torta.



## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. L., FILHO, J. C. S., GODOI, A. R., CARMO, C. A., EDUARDO, J. L. P. **Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes** Revista Brasileira Zootecnia, v.37, suplemento especial, p.260-258, 2008.
- ABIOVE. **Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais**. Disponível em:<[http://www.abiove.com.br/menu\\_br.html](http://www.abiove.com.br/menu_br.html)>. Acesso em: 22 dez. 2012.
- ALVIRA P, TOMÁS-PEJÓ E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technol**, v. 101, p.4851-61, jul. 2010.
- AMORIM, H.V. de. Fermentação alcoólica: **Ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 103p, 2005.
- ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R. e MAUGERI FILHO, F.; **Fermentação alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros**; Livro de Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000.
- BARBOSA, M.M, **Produção de etanol a partir da palha de cevada**. 2011. 112 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Escola Superior de Tecnologia e de Gestão Engenharia Química, Bragança-PA, 2011.
- BETANCUR, G. J. V. **Avanços em Biotecnologia de Hemicelulose para Produção de Etanol por *Pichia stipitis***. 2005. 123p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- BNDES e CGEE. Banco Nacional de Desenvolvimento e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro. 314p. 2008.
- BRUCE, P Y. **Química Orgânica** Volume 2, 4º ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.
- CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S.S.; SILVA, J. B. A; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M. FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: Uma estratégia de desconstrução da fibra vegetal. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia. **Revista Analytica**, Lorena, n.44, p. 48-54, jan. 2010.
- CARVALHO G. B. M.; BENTO, C. V.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Elementos Biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte- as leveduras. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, **Revista Analytica**, Lorena, n. 25, p 36-42, nov. 2006.
- CARVALHO, L. C. V Revista Opiniões. Açúcar e Álcool. **Sobre energias renováveis**. Editora WDS: Ribeirão Preto-SP, mar 2008.
- CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. **Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw**. Applied Biochemistry na Biotechnology, 74:135-159, 1998.

CHIN, K.L.; H'NG, P.S. L.J.; WONG B.T. TEY, M.T. **Optimization study of ethanolic fermentation from oil palm trunk, rubberwood and mixed hardwood hydrolysates using *Saccharomyces cerevisiae***. *Bioresource Technology*, p.3287–3291, 2010.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: quarto levantamento, janeiro 2011**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_01\\_06\\_08\\_41\\_56\\_boletim\\_graos\\_4o\\_le\\_v\\_safr\\_2010\\_2011.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_le_v_safr_2010_2011.pdf)> Acesso em: 19 dez. 2012.

CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. e FAPESP. 992 p. 2010.

DE PAULA, C. C. F.; FATURI C. **Avaliação da torta de dendê para alimentação de ruminantes na região amazônica**. VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da Amazônia Oriental/2008

DIAS, M. O. S. **Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço**. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

DOMÍNGUEZ, J.M. **Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus***. Tese (Doutorado). Universidad Complutense de Madrid, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, K.K.; HEBERS, P.A.; SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugar and related substances**. *Analytical Chemistry*, Flórida, v. 28, n. 3, p. 350- 356, 1956.

FARINAS, C.S. Embrapa Instrumentação. Documentos, ISSN: 1518-7179; 54. São Carlos, 13 p, 2011.

FERREIRA A. C. **Níveis de torta dendê oriunda da produção de biodiesel na alimentação de bovinos holandês x zebu**. 2011. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos)-Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

FIDALE, L. C. **Biopolímeros Modificados: Aspectos da derivatização da celulose sob condições homogêneas de reação**. 2010. 248p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Química Universidade São Paulo, São Paulo, 2010.

FITZPATRICK, M.;CHAMPAGNE, P.; WHITNEY, R. A. **A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the uction of value-added products**. *Bioresour Technol*;v 101, n. 23, p. 8915-8922, 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

HÄGERDAL B. H.; GALBE, M.;GORWA-GRAUSLUND M.F.; LIDÉN G.; ZACCHI G. **Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today**. **Review Article Trends in**



**Biotechnology**, v. 24,n.12, p. 549-556, dez 2006.

HARMSSEN, P. F.H.; HUIJGEN, W.J.J.; BERMÚDEZ, L. M.; BAKKER, R.R.C. **Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic**. Biosynergy, Energy Research Centre of the Netherlands, 2010.

HASSAN, M.S.B.M. **Batch Ethanol fermentation using glucose derived from tapioca flour starch by *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of inoculum age and agitation speed**. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química e recursos naturais) Universidade Pahang, Malásia, Mai. 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4. ed. São Paulo: IMESP, . 2008

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA IBGE. **Produção agrícola municipal (PAM)**. [2010]. Disponível em: <[http://www. sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acesso em: 10 dez. 2012.

ISARANKURA-Na-AYUDHYA, C. ; TANTIMONGCOLWAT, T.;KONGPANPEE, T.; PRABKATE, P.; PRACHAYASITTIKUL, V. Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. **EXCLI Journal**, v 6, p.167-176. 2007.

JIMÉNEZ, S.C. Fraccionamiento integral de vegetales no alimentarios para la obtención de pasta celulósica y subproductos. Tese (Doutorado). Universidad de Huelva, Huelva, 2009.

KAMER,S.B.V.,GINKEL,V.L.**Cer.Chem.,Sanit Paul**, v.19, n°4, p. 239-251, 1952

KIM S.; KIM C. H. Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber a Renewable Energy xxx (2012) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 181 Ipsin-gil, Jeongseup 580-185, Republic of Korea, 2012.

LEITE, R. C. C.; LEAL M. R. L. V. **O biocombustível no Brasil**. Novos estudos – CEBRAP N. 78, São Paulo, Julho de 2007.

LLOYD, J.B.; WHELAN, W.J. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. *Analytical Biochemistry*, v.30, p. 467-470, 1969.

LYND, L. R.; CUSHMAN, J. H.; NICHOLS, R. J.; WYMAN, C. E.. **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology**. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MACEDO, I. C. ; NOGUEIRA, H. A.; **Avaliação de biodiesel no Brasil**. Brasília, DF, Núcleo de assuntos Estratégicos da Presidência da República, 223p. 2005.

MACEDO, I.C.; SEABRA. J.E.A.; SILVA, J.E.A.R, S. **Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020**". *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 582-595, 2008.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações na determinação dos teores de lignina e**

**holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar.** 2009. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MCCREADY, R. M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V, e. OWENS, H. S. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. **Analytical chemistry.** v.22,n. 9, p. 1156-1158.1950.

MIELLENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour. Technol.* v. 100, p. 3532-3539, 2009.

MILEO P. C. **Aplicações da celulose de palha de cana-de-açúcar: obtenção de derivados partindo de celulose branqueada e de biocompósitos com poliuretana obtida a partir de óleo de mamona (*Ricinus communis* L.).** 2011. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, São Paulo, mai. 2011.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry.* v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- **Balanco Nacional da Cana-de-açúcar e Agroenergia; 2007.** Edição Especial de Lançamento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. Brasília; DF, 103 p, 2007.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. **Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives.** *Revista Árvore,* v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MUSSATTO, S.I, TEIXEIRA, J.A. **Lignocellulose as raw material in fermentation processes.** In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Current Research. Technology and Education Topics in Applied Microbial Biotechnology,* 2010.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. **Dillute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions.** *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v. 98, p. 49-58, 2002.

NORONHA, L. L.; FONSECA, C. R.; SILVA, C. C.; SILVA, M. B.; FARIA, L. F. F. **Utilização de diferentes tipos de policloreto de alumínio para purificação de hidrolisado de bagaço de cana através da técnica de coagulação e floculação.** *Química Nova,* v.33, n. 8, p. 1698-1702, Lorena-SP, 2010.

NUNES, J. L.; ALVES, T. W. Produção de biodiesel de dendê nos sistemas isolados do amazonas: um meio para geração de desenvolvimento sócio-econômico para o estado. **IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa, Inclusão Social e Energia: Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, p. 173-177, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Quím. Nova,** São Paulo, v. 33, n. 7, 2010 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_artt ext&pid=S010040422010000700023&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_artt ext&pid=S010040422010000700023&lng=en&nrm=iso)>. access on 29 Jan. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>.

OLIVEIRA, M.D.S. **Torta da prensagem a frio na alimentação de bovinos.** In: SIMPÓSIO NACIONAL XV REUNIÃO NACIONAL DA CULTURA DE GIRASSOL, 3p., Anais... Ribeirão Preto, 2007.

PACHECO, T. F.; **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** 2010. 106p. Dissertação (mestrado), Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 106 p. 2010.

PACHECO T. F, **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração.** Circular Técnica 04. EMBRAPA, Brasília, DF . Abril, 2011.

PALMQVIST,E.; HAAGERDAL,H. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition,** *Bioresource Technology*, v.74, p. 25-33, 2000.

PANTOJA, L. **Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos da Amazônia para elaboração de bebidas alcoólicas fermentadas utilizando leveduras imobilizadas.** ManausUFAM, 2006. 176p. Tese (Doutorado) - Programa Multi-Institucional de Pós-graduação Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas. 2006.

PEJÓ, M.E.T. **Bioetanol de Paja de Trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso.** Tese (Doutorado). Universidade Complutense de Madrid, MADRID, 2010.

PHILIPS, J. A., HUMPHREY, A. E. **Na overview of process technology for the production of liquid fuels and chemicals feedstocks via fermentation.** In D. L. Wise, *Organic Chemicals from Biomass*, p.247-304, Menlo Park: Benjamin/ Cummings,1983.

PNDU- Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento **Produção de biodiesel requer mais pesquisa.** Disponível em: <http://www.pnud.org.br>. Acessado em: 17. dez. 2012.

PORTELA, F. M. **Efeito da catálise ácida e alcalina na produção e propriedades físico-químicas do biodiesel metílico de pinhão-manso,** 2011. 75p. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em Química. Universidade Federal de Uberlândia, 75p. 2011.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.** 2010. 414p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos: Produção de enzimas e engenharia das fermentações.** Pelotas: Universitária/UFPEL. 3 v, 205p, 1996.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDS**, n. 32. p. 117 – 156, 2009.

RUNQUIST, D., HAGERDAL, B.H., RADSTRO, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, n.3, v.5, 2010.

SANTOS, H. T. L. **Avaliação da torta de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacquin) Loddiges ex Martius) como insumo para produção de bioetanol.** 2011. 81p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina-MG. 2011.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da Palha de Cana de Açúcar para Produção de Etanol. Química Nova, São Paulo, Vol. 35, No. 5, p. 1004-1010, Janeiro, 2012.

SARKAN, N.; GHOSH, S. K. BANNERJEE; AIKAT, S. K. Bioethanol production from agricultura wastes: na overview **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 336-347, 2012.

SCIPIONI, G. C. **Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas.** 2011. 95p. Dissertação (Mestrado em de Processos ) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2011.

SHINOJ, S. VISVANATHAN, R., PANIGRAHI,S., KOCHUBABU M. **Oil palm fiber (OPF) and its composites: A review.** Industrial Crops and Products. ScienceDirect. n.33, p.7–22 Canadá, 2010.

SILVA E. F. **Anatomia de órgãos vegetativos de elais guineensis jacq. (dende) afetados pela doença amarelecimento fatal.** Brasília, DF, 2009. In: III CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, v. 3, Brasilia. Anais XCVIII Brasilia, DF, p. 25-26, 2009.

SILVA ,N. L. C, **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de bioassa residual da indústri de celulose.** 2010. 104p. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, R. G. C. **Otimização de pré-tratamento ácido da torta de girassol (*Helianthus annus* L.) para produção de etanol de segunda geração** (Monografia do curso de Bacharelado em Ciência e Tecnologia). 2011. 40p. Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG. 2011.

SINGLETON, V. L., JOSEPH, A., ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture, Davis**, v. 16, p. 144-149, 1965.

SUN Y., CHENG J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** Bioresource Technology. v. 83, p.1-11, 2002.

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2005). Department of Energy Genome Programs **Microbiologia**. 8° ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, 894 p.2005.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Bioenergia e Indústria Automobilística no Brasil e no Mundo.** In: Conferência Nacional de Bioenergia (Bioconfe), São Paulo, Brasil, 2009.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method of the determination of fiber and lignin. **J. Assoc. Official Agr. Chem.**, v26, n.5, p.829-835. 1963.

VON DE KAMER S. B.; VAN GINKEL, L. **Rapid determination of crude fiber in cereals.** *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, 1952.

ZHANG, J.; SMITH, K.R. Household air pollution from coal and biomass fuels in China: Measurements, health impacts, and interventions. *Environ Health Perspect*, v. 115, n. 6, p. 848–855. 2007.

ZUCHI, J.; ZANUNCIO, J. C.; BEVILAQUA, G.A.P. Componentes do rendimento de mamona segundo a ordem floral e época de semeadura no Rio Grande do Sul. *Revista de Ciência Agronômica*, Fortaleza, v.41, n.3, p.380-386, 2010.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração.** 2010. 187p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental)- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.